

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2004-20
(22) Přihlášeno: 05.06.2002
(30) Právo přednosti: 08.06.2001 US 60/296,961
(40) Zveřejněno: 12.01.2005
(Věstník č. 1/2005)
(47) Uděleno: 16.02.2022
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: 30.03.2022
(Věstník č. 13/2022)
(86) PCT číslo: PCT/US2002/017790
(87) PCT číslo zveřejnění: WO 2002/100330

A61K 39/395 (2006 01)
C07K 16/00 (2006 01)
C07K 16/24 (2006 01)
A61P 19/08 (2006 01)
A61P 25/00 (2006 01)
A61P 19/06 (2006 01)
A61P 19/02 (2006 01)
A61P 17/02 (2006 01)
A61P 13/12 (2006 01)
A61P 11/00 (2006 01)
A61P 9/10 (2006 01)
A61P 9/00 (2006 01)
A61P 7/04 (2006 01)
A61P 3/10 (2006 01)
A61P 1/16 (2006 01)
A61K 38/00 (2006 01)
A61P 1/00 (2006 01)
A61K 31/519 (2006 01)
A61M 5/28 (2006 01)
A61P 37/06 (2006 01)
A61P 37/08 (2006 01)
A61P 27/02 (2006 01)
A61P 29/00 (2006 01)
A61P 31/00 (2006 01)
A61P 37/02 (2006 01)
A61P 35/00 (2006 01)

(56) Relevantní dokumenty:

(73) Majitel patentu:
AbbVie Biotechnology Ltd, Hamilton HM 11, BM

(72) Původce:
Joachim Kempeni, 67433 Neustadt, DE
Roberta Weiss, 19096 Wynnewood, PA, US
Steven A. Fischkoff, 07078 Short Hills, NJ, US

(74) Zástupce:
Rott, Růžička & Guttman a spol., Vyskočilova
1566, 140 00 Praha 4, Michle

(54) Název vynálezu:
Způsoby podávání anti-TNF alfa protilátek

(57) Anotace:
Jsou popisovány způsoby ošetřování chorob, při kterých škodí aktivita TNF_{α} , cestou čtrnáctidenního subkutánního podávání lidských protilátek, přednostně rekombinantních lidských protilátek, které se specificky vážou na α -faktor nekrotizující tumor (TNF_{α}). Protilátka může být aplikována spolu nebo bez methotrexatu. Tyto protilátky mají vysokou afinitu pro $hTNF_{\alpha}$ (např. $K_d=10^{-8}$ M nebo méně), pomalou rychlost zániku $hTNF_{\alpha}$ disociace (např. $K_{off}=10^{-3}$ s⁻¹ nebo méně) a neutralizují $hTNF_{\alpha}$ aktivitu in vitro a in vivo. Protilátkou podle vynálezu může být protilátka s úplnou délkou nebo její část vážající antigen. Sady obsahující farmaceutickou kompozici a instrukce pro dávkování a předplněné injekční stříkačky obsahující farmaceutické kompozice jsou do vynálezu zahrnuty rovněž.

Způsoby podávání anti-TNF α protilátek

Dosavadní stav techniky

5

α -Faktor nekrotizující tumor (TNF α) je cytokinem produkovaným četnými buněčnými typy včetně monocytů a makrofágů, jak bylo původně zjištěno na základě jeho schopnosti indukovat nekrózu určitých myších tumorů [viz např. Old L., *Science* 230, 630-632 (1985)]. Poté bylo prokázáno, že faktor označovaný kachektin, spojený s kachexií, je stejnou molekulou jako TNF α . TNF α byl zahrnut mezi mediátory šoku [viz např. Beutler B. a Cerami A., *Annu. Rev. Biochem.* 57, 505-518 (1988); Beutler B. a Cerami A., *Annu. Rev. Immunol.* 7, 625-655 (1989)]. Navíc dále byl TNF α implikován do patofyziologie řady jiných lidských onemocnění a poruch, včetně sepsy, infekcí, autoimunitních chorob, odmítání transplantátu, chorob štěp-verzus-hostitel [viz např. Vasilli P., *Annu. Rev. Immunol.* 10, 411-452 (1992); Tracey K. J. a Cerami A., *Annu. Rev. Med.* 45, 491-503 (1994)].

10

15

20

25

30

Vzhledem ke škodlivé úloze lidského TNF α (hTNF α) při různých lidských chorobách byly navrhovány terapeutické strategie pro inhibici nebo paralyzování aktivity hTNF α . Za prostředek pro inhibici aktivity hTNF α byly považovány zvláště protilátky, které se váží a neutralizují hTNF α . Některé z nejdřívějších takových protilátek byly monoklonální myši protilátky (mAbs), vylučované hybridomy připravenými z lymfocytů myši imunizovaných hTNF α [viz např. Hahn T. a spol., *Proc. Natl. Akad. Sci. U.S.A.* 82, 3814-3818 (1985); Liang C-M. a spol., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137, 847-854 (1986); Hirai M. a spol., *J. Immunol. Methods* 96, 57-62 (1987); Fendly B. M. a spol., *Hybridoma* 6, 359-370 (1987); Moeller A. a spol., *Cytokine* 2, 162-169 (1990); US patent 5231024 pro Moellera a spol.; Wallach D., Evropský patent 186833 B1; Old a spol., Evropská patentová přihláška 218868 A1; Moeller A. a spol., Evropský patent 260610]. I když tyto myši anti-hTNF α protilátky často projevují vysokou afinitu vůči hTNF α (např. $K_d \leq 10^{-9}$ M) a byly schopny neutralizovat aktivitu hTNF α , může být jejich užití *in vivo* limitováno problémy spojenými s podáváním myších protilátek lidem, jako je krátký poločas séra, neschopnost spouštět určité funkce lidského efektoru a vyvolávání nežádoucí imunitní odezvy proti myši protilátce v lidech [reakce "human anti-mouse antibody" (HAMA)].

35

40

45

Ve snaze překonat problémy spojené s užíváním čistě myších protilátek u lidí byly pomocí genetického inženýrství upravovány myši anti-hTNF α protilátky tak, aby se staly "lidem podobnější". Byly připraveny například chimerové protilátky, ve kterých variabilní oblasti řetězce protilátky pocházejí z myši a konstantní oblasti řetězce protilátky pocházejí z lidí [Knight D. M. a spol., *Mol. Immunol.* 30, 1443-1453 (1993); Daddona P. E. a spol., PCT publikace WO 92/16553]. Vedle toho byly rovněž připraveny humanizované protilátky, ve kterých hypervariabilní domény protilátky pocházejí z myši, ale zbytek variabilních oblastí a konstantní oblasti protilátky pocházejí z lidí (Adair J. R. a spol., PCT publikace WO 92/11383). Avšak protože v těchto chimerových a humanizovaných protilátkách zůstávají ještě určité myši sekvence, mohou stále, zejména pokud jsou dlouhodobě podávány, vyvolávat nežádoucí imunitní reakci, reakci lidské antichimerové protilátky (HACA), např. u chronických indikací jako je reumatoidní artritida [např. Elliott M. J. a spol., *Lancet* 344, 1125-1127 (1994); Elliott M. J. a spol., *Lancet* 344, 1105-1110 (1994)].

50

Preferovaným hTNF α inhibičním činidlem vůči myši mAbs nebo jejím derivátům (např. chimerovým nebo humanizovaným protilátkám) by byla zcela lidská anti-hTNF α protilátka, protože takové činidlo by nevyvolávalo HAMA reakci, i když bude dlouhodobě používáno. Lidské monoklonální auto-protilátky proti hTNF α byly připraveny při použití techniky hybridomu [Boyle P. a spol., *Cell. Immunol.* 152, 556-568 (1993); Boyle P. a spol., *Cell. Immunol.* 152, 569-581 (1993); Boyle P. a spol., Evropská patentová přihláška 614984 A2]. Avšak tyto z hybridomu pocházející monoklonální protilátky, u nichž bylo popsáno, že mají afinitu pro hTNF α , která byla příliš nízká pro vypočtení konvenčními metodami, nebyly schopné

vázat rozpustnou hTNF α a nebyly schopné neutralizovat cytotoxicitu indukovanou hTNF α (viz Boyle a spol. shora). Navíc úspěch techniky lidského hybridomu závisí na přirozené přítomnosti lymfocytů, produkujících v lidském krevním oběhu auto-protilátky specifické pro hTNF α . Určité studie zjistily u lidských subjektů, v séru auto-protilátky proti hTNF α [Fomsgaard A. a spol., *Scand. J. Immunol.* 30, 219-223 (1989); Bendtzen K. a spol., *Prog. Leukocyte Biol.* 10B, 447-452(1990)], zatímco jiné nikoliv [(Leusch H-G. a spol., *J. Immunol. Methods* 139, 145-147 (1991)].

Alternativou k přirozeně se vyskytujícím lidským anti-hTNF α protilátkám by byla rekombinantní hTNF α protilátka. Byly popsány rekombinantní lidské protilátky, které vážou hTNF α s relativně nízkou afinitou (tj. $K_D \sim 10^{-7}$ M) a rychlým stupněm zániku (tj. $K_{off} \sim 10^{-2}$ s $^{-1}$) [Griffiths A. D. a spol., *EMBO J.* 12, 725-734 (1993)]. Avšak tyto protilátky nemohou být vhodné pro terapeutické použití vzhledem k jejich relativně rychlé kinetice disociace. Vedle toho byla popsána lidská rekombinantní anti-hTNF α , která neneutralizuje hTNF α aktivitu, nýbrž spíše zvyšuje vázání hTNF α na povrch buněk a zvyšuje internalizaci hTNF α [Lidbury A., a spol., *Biotechnol. Ther.* 5, 27-45 (1994); Aston R. a spol., PCT publikace WO 92/03145].

Rekombinantní lidské protilátky, které vážou rozpustnou hTNF α s vysokou afinitou a pomalou kinetikou disociace, a které mají schopnost neutralizovat hTNF α aktivitu včetně hTNF α indukované cytotoxicity (*in vitro* a *in vivo*) a hTNF α indukované aktivace buněk, byly popsány rovněž (viz US patent 6090382). Typické postupy pro podávání protilátek byly uskutečněny intravenózně v týdenním cyklu. Týdenní dávkování antilátek a/nebo léčiva může být nákladné, nepohodlné a díky frekvenci podávání má za následek vzrůst počtu vedlejších účinků. Intravenózní administrace má rovněž své meze v tom, že administrace je obvykle prováděna někým, kdo je zdravotnický vyškolen.

Podstata vynálezu

Předložený vynález poskytuje způsoby pro čtrnáctidenní režimy dávkování při léčení s TNF α spojených chorob, přednostně subkutánní cestou. Čtrnáctidenní dávkování má před týdenním dávkováním mnoho výhod včetně, ale ne jenom, menšího počtu celkových injekcí, sníženého počtu reakcí v místě (lokání bolest a otok), zvýšení pacientovy pohody (tj. díky menší frekvenci injekcí) a menších nákladů na pacienta právě tak jako na poskytovatele zdravotní péče. Subkutánní dávkování je výhodné, protože pacient si může terapeutickou substanci, např. lidskou TNF α protilátku, podávat sám, což vyhovuje oběma, jak pacientovi tak poskytovateli zdravotní péče.

Vynález poskytuje způsoby pro ošetřování chorob, při kterých aktivita TNF α škodí. Způsoby zahrnují čtrnáctidenní subkutánní injekce protilátek subjektu. Protilátkami jsou přednostně rekombinantní lidské protilátky, které se vážou na lidský TNF α . Tento vynález dále poskytuje způsoby pro léčení chorob, při kterých je aktivita TNF α škodlivá. Tyto způsoby zahrnují využití kombinované terapie, při níž se lidské protilátky podávají subjektu spolu s jiným terapeutickým prostředkem, jako je například jedna nebo více dalších protilátek, které se vážou na jiné cíle (např. protilátky, které se vážou s jinými cytokiny, nebo které se vážou na molekuly buněčného povrchu), jeden nebo více cytokinů, rozpustný TNF α receptor (viz např. PCT publikaci WO 94/06476) a/nebo jedno či více chemických činidel, která inhibují produkci nebo aktivitu hTNF α (jako cyklohexanylidén deriváty, jak je popsáno v PCT publikaci WO 93/19751), nejlépe methotrexat. Protilátkami jsou především rekombinantní lidské protilátky, které se specificky vážou na lidský TNF α . Protilátky podle vynálezu jsou charakterizovány vazbou na hTNF α s vysokou afinitou a pomalou kinetikou disociace a neutralizováním hTNF α aktivity, včetně cytotoxicity indukované hTNF α (*in vitro* a *in vivo*) a hTNF α indukované buněčné aktivace. Protilátky mohou mít celou délku (např. protilátka IgG1 nebo IgG4) nebo mohou obsahovat pouze část vázající se na antigen [např. fragment Fab, F(ab') $_2$, scFv nebo jednotlivá doména].

Nejvíce preferovaná rekombinantní protilátka podle vynálezu, označovaná D2E7, má CDR3 doménu lehkého řetězce, obsahující sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 3 a CDR3 doménu těžkého řetězce, obsahující sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 4 (uvedeny dále v příloze B). Přednostně má D2E7 variabilní oblast lehkého řetězce (LCVR) obsahující sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 1 a variabilní oblast těžkého řetězce (HCVR) obsahující sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 2. Tyto protilátky jsou popsány v US patentu 6090382, na který se kompletně odkazuje.

Při jednom provedení poskytuje vynález způsoby pro ošetřování chorob, u kterých aktivita TNF α škodí. Tyto způsoby zahrnují inhibici TNF α aktivity subkutánním, čtrnáctidenním podáváním anti-TNF α protilátky, takže dochází k léčení choroby. Chorobou může být na příklad sepse, autoimunitní nemoc (např. reumatoidní artritida, alergie, roztroušená skleróza, autoimunitní diabetes, autoimunitní uveitis a nefrotický syndrom), infekční choroba, zhoubný nádor, odmítání transplantátu nebo nemoc štěp-verzus-hostitel, plicní choroba, onemocnění kostí, střevní choroba nebo srdeční choroba.

Při jiném provedení poskytuje vynález způsoby pro ošetřování chorob, u kterých aktivita TNF α škodí. Tyto způsoby zahrnují inhibici aktivity TNF α subkutánním, čtrnáctidenním podáváním anti-TNF α protilátky a methotrexatu, takže dochází k léčení choroby. Podle jednoho hlediska je methotrexat podáván spolu s anti-TNF α protilátkou. Podle jiného hlediska je methotrexat podáván před podáním anti-TNF α protilátky. Podle ještě dalšího hlediska je methotrexat podáván po podání anti-TNF α protilátky.

Při preferovaném provedení je anti-TNF α protilátka, užitá pro ošetřování chorob, u kterých aktivita TNF α škodí, lidskou anti-TNF α protilátkou. Vhodněji probíhá léčení právě pomocí čtrnáctidenní subkutánní administrace izolované lidské protilátky nebo její části, která se váže na antigen. Protilátka nebo její část, která se váže na antigen, přednostně disociuje z lidského TNF α s K_d 1×10^{-8} M nebo méně a K_{off} rychlostní konstantou $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ nebo méně, obojí stanoveno rezonancí povrchových plazmonů, a neutralizuje cytotoxicitu lidské TNF α při standardním L929 testu *in vitro* s IC_{50} 1×10^{-7} M nebo méně. Vhodněji izolovaná lidská protilátka nebo její část, která se váže na antigen, disociuje z lidského TNF α s K_{off} $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ nebo méně, nebo ještě vhodněji s K_{off} $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ nebo méně. Izolovaná lidská protilátka nebo její část, která se váže na antigen, přednostně neutralizuje cytotoxicitu lidské TNF α při standardním L929 testu *in vitro* s IC_{50} 1×10^{-8} M nebo méně, ještě vhodněji s IC_{50} 1×10^{-9} M nebo méně a ještě nejvhodněji s IC_{50} 1×10^{-10} M nebo méně.

Při dalším provedení poskytuje vynález způsoby pro ošetřování chorob, u kterých aktivita TNF α škodí, tak, že se subjektu čtrnáctidenně subkutánně podává lidská protilátka nebo její část, která se váže na antigen. Lidská protilátka nebo její část, která se váže na antigen, má nejvhodněji následující charakteristiku:

a) disociuje z lidského TNF α s K_{off} rychlostní konstantou $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ nebo méně, jak bylo stanoveno rezonancí povrchových plazmonů;

b) má CDR3 doménu lehkého řetězce obsahující sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 3, nebo modifikovanou z SEQ ID NO: 3 jednotlivou substitucí alaninem v poloze 1, 4, 5, 7 nebo 8 nebo jednou až pěti konzervativními substitucemi aminokyselin v polohách 1, 3, 4, 6, 7, 8 a/nebo 9;

c) má CDR3 doménu těžkého řetězce obsahující sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 4, nebo modifikovanou z SEQ ID NO: 4 jednotlivou substitucí alaninem v poloze 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 nebo 11 nebo jednou až pěti konzervativními substitucemi aminokyselin v polohách 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 a/nebo 12.

Vhodněji protilátka nebo její část, která se váže na antigen, disociuje z lidského TNF α s K_{off} $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ nebo méně. Ještě vhodněji protilátka nebo její část, která se váže na antigen, disociuje z lidského TNF α s K_{off} $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ nebo méně.

- 5 Vynález poskytuje způsoby pro ošetřování chorob, u kterých aktivita TNF α škodí, ještě při jiném provedení. Tyto metody u subjektu zahrnují čtrnáctidenní subkutánní podávání lidské protilátky nebo její části, která se váže na antigen. Protilátka nebo její část, která se váže na antigen obsahuje přednostně LCVR mající CDR3 doménu obsahující sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 3, nebo modifikovanou z SEQ ID NO: 3 jednotlivou substitucí alaninem v poloze 1, 4, 5, 7
10 nebo 8 a s HCVR mající CDR3 doménu obsahující sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 4, nebo modifikovanou z SEQ ID NO: 4 jednotlivou substitucí alaninem v poloze 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 nebo 11. Přednostně má LCVR dále doménu CDR2 obsahující sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 5 a HCVR dále má doménu CDR2 obsahující sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 6. Ještě preferovaněji má LCVR dále doménu CDR1 obsahující sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 7 a
15 HCVR má doménu CDR1 obsahující sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 8.

Při dalším provedení poskytuje vynález ještě způsoby pro ošetřování chorob, u kterých aktivita TNF α škodí, tak, že se subjektu čtrnáctidenně subkutánně podává izolovaná lidská protilátka nebo její část, která se váže na antigen. Protilátka nebo její část, která se váže na antigen,
20 obsahuje LCVR zahrnující sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 1 a HCVR zahrnuje sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 2. Při určitých provedeních má protilátka konstantní oblast těžkého řetězce IgG1 nebo konstantní oblast těžkého řetězce IgG4. U jiných provedení je protilátkou Fab fragment, F(ab')₂ fragment nebo fragment jednotlivého Fv řetězce.

25 Při jiných provedeních poskytuje vynález ještě způsoby pro ošetřování chorob, při kterých administrace anti-TNF α protilátky je prospěšná subjektu při čtrnáctidenním subkutánním podávání jedné nebo více anti-TNF α protilátek nebo jejich částí, které se vážou na antigen. Protilátky nebo jejich části, které se vážou na antigen preferenčně obsahují LCVR mající CDR3 doménu obsahující sekvenci aminokyselin zvolenou ze skupiny, která sestává z SEQ ID NO: 3,
30 SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 nebo s HCVR mající CDR3 doménu obsahující sekvenci aminokyselin zvolenou ze skupiny, která sestává z SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30,
35 SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 a SEQ ID NO: 35.

Další aspekt vynálezu se ještě týká sad obsahujících formulaci zahrnující farmaceutickou kompozici. Sady obsahují anti-TNF α protilátku a farmaceuticky přijatelný nosič. Sady obsahují instrukce pro čtrnáctidenní subkutánní dávkování farmaceutické kompozice pro léčení choroby, u
40 které je podávání anti-TNF α protilátky prospěšné. Z jiného hlediska se vynález týká sad obsahujících formulaci zahrnující farmaceutickou kompozici, obsahující dále anti-TNF α protilátku, methotrexat a farmaceuticky přijatelný nosič. Sady obsahují instrukce pro čtrnáctidenní subkutánní dávkování farmaceutické kompozice pro léčení choroby, u které je podávání anti-TNF α protilátky prospěšné.

45 Ještě jiný aspekt vynálezu poskytuje předem naplněnou injekční stříkačku obsahující farmaceutickou kompozici, ve které je anti-TNF α protilátka a farmaceuticky přijatelný nosič. Z dalšího aspektu ještě poskytuje vynález předem naplněnou injekční stříkačku s farmaceutickou kompozicí obsahující anti-TNF α protilátku, methotrexat a farmaceuticky přijatelný nosič.

50

Podrobný popis vynálezu

5 Tento vynález se týká způsobů léčeni chorob, při nichž je prospěšné podávat anti-TNF α protilátku, zahrnujících administraci izolovaných lidských protilátek, nebo jejich antigen vázajících částí, které se vážou na lidský TNF α s vysokou afinitou, nízkou rychlostí zániku a vysokou schopností neutralizace, takže dochází k léčení choroby. Různá hlediska vynálezu se vztahují na léčení protilátkami nebo fragmenty protilátek a jejich farmaceutických kompozic.

10 Aby mohlo být vynálezu snadněji porozuměno jsou nejprve definovány určité termíny.

Termín "dávkování", jak je zde používán, se týká administrace substance (např. anti-TNF α protilátky) pro dosažení terapeutického cíle (např. léčení choroby spojené s TNF α).

15 Zde používané termíny "čtrnáctidenní režim dávkování", "čtrnáctidenní dávkování" a "čtrnáctidenní administrace" se vztahují na časový průběh podávání substance (např. anti-TNF α protilátky) subjektu pro dosažení terapeutického cíle (např. léčení choroby spojené s TNF α). Čtrnáctidenním dávkovacím režimem se nemyslí, že by zahrnoval týdenní dávkovací režim. Substance je administrována pokud možno každých 9 až 19 dnů, vhodněji každých 11 až 17 dnů,
20 ještě vhodněji každých 13 až 15 dnů a nejvýhodněji každých 14 dnů.

Jak se zde používá termín "kombinovaná terapie", týká se podávání dvou nebo více terapeutických substancí, např. anti-TNF α protilátky a léčiva methotrexatu. Methotrexat může být administrován doprovodně společně, napřed nebo následně s podáváním anti-TNF α
25 protilátky.

U zde používaného termínu "lidská TNF α " (zde zkracovaná jako hTNF α nebo jednoduše hTNF) se rozumí, že se vztahuje na lidský cytokin, který existuje jako vylučovaná forma o 17 kD a membráně asociovaná forma o 26 kD, jehož biologicky aktivní forma je složena z trimernu
30 nekovalentně vázaných 17 kD molekul. Struktura TNF α je dále popisována např. v Pennica D., a spol., *Nature* 312, 724-729 (1984); Davis J. M. a spol., *Biochemistry* 26, 1322-1326 (1987) a Jones E. Y. a spol., *Nature* 338, 225-228 (1989). Pod termínem lidský TNF α se rozumí, že zahrnuje rekombinantní lidský TNF α (rhTNF α), který může být připraven metodami rekombinantní exprese nebo komerčně nakoupen (R & D Systems, Catalog No. 210 TA,
35 Minneapolis, MN).

U zde používaného termínu "protilátka" se rozumí, že se vztahuje na molekuly imunoglobulinu sestávající ze čtyřech polypeptidových řetězců, dvou těžkých (H) řetězců a dvou lehkých (L) řetězců navzájem spojených disulfidovými vazbami. Každý těžký řetězec sestává z variabilní
40 oblasti těžkého řetězce (zde zkracované jako HCVR nebo VH) a konstantní oblasti těžkého řetězce. Konstantní oblast těžkého řetězce je složena ze tří domén, CH1, CH2 a CH3. Každý lehký řetězec sestává z variabilní oblasti lehkého řetězce (zde zkracované jako LCVR nebo VL) a konstantní oblasti lehkého řetězce. Konstantní oblast lehkého řetězce je složena z jedné domény, CL. VH a VL oblasti mohou být dále rozděleny na oblasti hypervariability, označované jako
45 komplementaritu určující oblasti (CDR), promísené s oblastmi, které jsou více zachovávané, označované jako nosné strukturní oblasti (FR). Každá VH a VL je složena ze tří CDR a čtyř FR, uspořádaných od koncové aminoskupiny do koncové karboxyskupiny v následujícím pořadí:

FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

50 Termín "část protilátky, která se váže na antigen" (nebo jednoduše "část protilátky"), který se zde používá, se týká jednoho nebo více fragmentů protilátky, které zachovávají schopnost vázat se specificky na antigen (např. hTNF α). Bylo prokázáno, že funkce vázání se protilátky na antigen

může být prováděna fragmenty z celkové délky protilátky. Příklady vázajících se fragmentů zahrnovaných pod termín "část protilátky, která se váže na antigen" tvoří

- (I) Fab fragment, monovalentní fragment sestávající z domén VL, VH, CL a CH1;
- (II) F(ab')₂ fragment, bivalentní fragment obsahující dva Fab fragmenty spojené disulfidovým můstkem v pantové oblasti;
- (III) Fd fragment sestávající z domén VH a CH1;
- (IV) Fv fragment sestávající z VL a VH domén jednotlivého ramena protilátky;
- (V) dAb fragment [Ward a spol., *Nature* 341, 544-546 (1989)], který sestává z VH domény; a
- (VI) izolovaná, komplementaritu určující oblast (CDR).

Dále navíc, i když dvě domény Fv fragmentu, VL a VH, jsou kódovány oddělenými geny, mohou být pomocí rekombinantních metod spojeny syntetickým spojovníkem, který jim umožní utvořit jednotný proteinový řetězec, ve kterém VL a VH oblasti jsou spárovány, aby tvořily monovalentní molekuly [známý jako jednotný řetězec Fv (scFv); viz např. Bird a spol., *Science* 242, 423-426 (1988) a Huston a spol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5879-5883 (1988)]. Takové jednořetězové protilátky jsou rovněž považovány za patřící pod termín "část protilátky, která se váže na antigen". Zahmuty jsou rovněž jiné formy jednořetězových protilátek jako diaprotilátky. Diaprotilátky jsou bivalentní, bispecifické protilátky, ve kterých domény VH a VL jsou exprimovány na jediném polypeptidovém řetězci, avšak pomocí spojovníku, který je příliš krátký, aby dovolil párování mezi dvěma doménami na též řetězci a takto vynucují, aby se domény párovaly s komplementárními doménami jiného řetězce a vytvořila se dvě vazebná místa antigenu [viz např. Holliger P. a spol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6444-6448 (1993); Poljak R. J. a spol., *Structure* 2, 1121-1123 (1994)].

A dále ještě protilátka nebo její část, která se váže na antigen, může být částí větších imunoadhezivních molekul, utvořených kovalentním nebo nekonvalentním přidružením protilátky nebo její, na antigen se vázající části, k jednomu nebo více proteinům nebo peptidům. Mezi příklady takových imunoadhezivních molekul patří použití jádrové oblasti streptavidinu, aby se vytvořila tetamerní scFv molekula [Kipriyanov S. M. a spol., *Human Antibodies and Hybridomas* 6, 93-101 (1995)] a použití cysteinového zbytku, signálního peptidu a C-zakončení volného konce polyhistidinu, aby se vytvořily bivalentní a biotinylované scFv molekuly [Kipriyanov S. M. a spol., *Mol. Immunol.* 31, 1047-1058 (1994)]. Části protilátky, jako fragmenty Fab a F(ab')₂, mohou být připraveny z kompletních protilátek pomocí konvenčních technik jako je digesce kompletních protilátek s papainem respektive s pepsinem. Nad to navíc protilátky, části protilátek a imunoadhezivní molekuly mohou být získány pomocí standardních rekombinantních technik DNA, jak se zde popisuje.

U zde používaného termínu "lidská protilátka" se rozumí, že zahrnuje protilátky mající variabilní a konstantní oblasti pocházející z lidské zárodečné linie imunoglobulinových sekvencí. Lidské protilátky podle vynálezu mohou zahrnovat aminokyselinové zbytky nekódované lidskou zárodečnou linií imunoglobulinových sekvencí (např. mutace zavedené náhodnou nebo místně specifickou mutagenezí *in vitro* nebo somatickou mutací *in vivo*) například v CDR a zejména v CDR3. U zde používaného termínu "lidská protilátka" se však neuvažuje, že by zahrnoval protilátky, u nichž byly do struktur lidských sekvencí naroubovány CDR sekvence, pocházející z zárodečných linií jiných savčích druhů, jako například myši.

U zde používaného termínu "rekombinantní lidská protilátka" se rozumí, že zahrnuje všechny lidské protilátky, které jsou připraveny, exprimovány, vytvořeny nebo izolovány rekombinantními prostředky, jako jsou protilátky exprimované pomocí rekombinantního

expresního vektoru transfektovaného do hostitelské buňky (popsáno dále v Sekci II, níže), protilátky izolované z rekombinantní, kombinatorické knihovny lidských protilátek (popsáno dále v Sekci III, níže), protilátky izolované ze zvířete (např. myši), které je transgenní pro geny lidského imunoglobulinu [viz např. Taylor L. D. a spol., *Nucl. Acids Res.* 20, 6287-6295 (1992)]
 5 nebo protilátky připravené, exprimované, vytvořené nebo izolované jinými prostředky, které zahrnují spojování sekvencí lidského genu imunoglobulinu s jinými DNA sekvencemi. Takové rekombinantní lidské protilátky mají variabilní a konstantní oblasti pocházející z lidské zárodečné linie imunoglobulinových sekvencí. Při určitých provedeních jsou však takové rekombinantní lidské protilátky podrobeny mutagenезi *in vitro* (nebo somatické mutagenезi *in vivo*, pokud je použito zvíře transgenní pro lidské Ig sekvence) a tudíž sekvence aminokyselin
 10 VH a VL oblastí rekombinantních protilátek jsou sekvence, které nemohou přirozeně existovat v repertoáru zárodečné linie lidské protilátky *in vivo*, i když pocházejí a vztahují se na lidskou zárodečnou linii VH a VL sekvencí.

15 Pod zde používanou "izolovanou protilátkou" se rozumí, že se vztahuje na protilátku, která je v podstatě prosta jiných antilátek majících odlišné antigenní specifickéosti (např. izolovaná protilátka, jež specificky váže hTNF α je v podstatě prosta protilátek, které specificky vážou antigeny jiné než hTNF α). Izolovaná protilátka, jež specificky váže hTNF α však může mít křížovou reaktivitu vůči jiným antigenům, jako například hTNF α molekulám z jiných druhů
 20 (podrobněji diskutováno níže). K tomu navíc izolovaná protilátka může být v podstatě prosta od jiného buněčného materiálu a/nebo chemikálií.

Pod zde používanou "neutralizující protilátkou" (nebo "protilátkou, která neutralizuje hTNF α aktivitu") se rozumí, že se vztahuje na protilátku, jejíž vazba na hTNF α má za následek inhibici
 25 biologické aktivity hTNF α . Tato inhibice biologické aktivity hTNF α může být stanovena změřením jednoho nebo více indikátorů biologické aktivity hTNF α , jako je cytotoxicita indukovaná hTNF α (buď *in vitro* nebo *in vivo*), hTNF α indukovaná buněčná aktivace a hTNF α vazba na hTNF α receptory. Tyto indikátory biologické aktivity hTNF α mohou být stanoveny pomocí jednoho nebo více v praxi známých standardních testů *in vitro* nebo *in vivo* (viz příklad
 30 4). Přednostně je schopnost protilátky neutralizovat aktivitu hTNF α hodnocena inhibicí cytotoxicity L929 buněk, indukované hTNF α . Dalším nebo alternativním parametrem aktivity hTNF α může být stanovení schopnosti protilátky inhibovat pomocí hTNF α indukovanou expresi ELAM-1 na HUVEC jako míry hTNF α indukované buněčné aktivace.

35 Termín "rezonance povrchových plazmonů", který se zde používá, se týká optického fenoménu, který poskytuje analýzu biospecifických interakcí v reálném čase detekcí změn proteinových koncentrací v biosenzorové matici, například pomocí systému BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala Sweden a Piscataway, NJ). Pro další popis viz příklad 1 a Jönsson U. a spol., *Ann. Biol. Clin.* 51, 19-26 (1991); Jönsson U. a spol., *Biotechniques* 11, 620-627 (1991); Johnsson B. a spol., *J. Mol. Recognit.* 8, 125-131 (1995) a Johnsson B. a spol., *Anal. Biochem.* 198, 268-277
 40 (1991).

Zde používaným termínem " K_{off} " se rozumí, že se týká rychlostní konstanty pro disociaci protilátky z komplexu protilátka/antigen.
 45

Zde používaným termínem " K_d " se rozumí, že se týká konstanty disociace pro určitou interakci protilátka-antigen.

Termínem "molekula nukleové kyseliny" jak se zde používá, se rozumí, že zahrnuje DNA molekuly a RNA molekuly. Molekula nukleové kyseliny může být jed no řetězcová nebo dvou řetězcová, ale přednostně je dvou řetězcovou DNA.
 50

Termínem "izolovaná molekula nukleové kyseliny" jak se zde používá v odkazu na nukleové kyseliny kódující protilátky nebo části protilátek (např. VH, VI, CDR3), které vážou hTNF α , se

rozumí, že se týká molekuly nukleové kyseliny, ve které nukleotidové sekvence, kódující protilátku nebo část protilátky, jsou prosty jiných nukleotidových sekvencí kódujících protilátku nebo části protilátek, které vážou antigeny jiné než hTNF α , a kteréžto jiné sekvence mohou přirozeně doprovázet nukleovou kyselinu v lidské genomické DNA. Tak například izolovaná

5 nukleová kyselina podle vynálezu, kódující VH oblast anti-hTNF α protilátky, neobsahuje jiné sekvence kódující jiné VH oblasti, které vážou antigeny jiné než hTNF α .

Zde používaným termínem "vektor" se rozumí, že se vztahuje na molekulu nukleové kyseliny schopnou transportovat jinou nukleovou kyselinu, se kterou byl spojen. Jedním typem vektoru je

10 "plazmid", který se týká cirkulární smyčky dvouřetězcové DNA, do níž mohou být navázány další segmenty DNA. Jiným typem vektoru je virální vektor, do něhož může být navázán další segment DNA do genomu viru. Určité vektory jsou schopny autonomní replikace v hostitelské buňce, do níž jsou zavedeny (např. bakteriální vektory mající bakteriální původ replikace a epizomální savčí vektory). Jiné vektory (např. neepizomální savčí vektory) mohou být

15 integrovány do genomu hostitelské buňky po zavedení do hostitelské buňky, a tudíž jsou replikovány spolu s genomem hostitele. Navíc mimo to mají určité vektory schopnost řízení exprese genů, ke kterým jsou operativně připojeny. Takové vektory jsou zde označovány jako "rekombinantní expresní vektory" (nebo jednoduše "expresní vektory"). Expresní vektory užitečné pro rekombinantní DNA techniky jsou obvykle často ve formě plazmidů. V existující

20 specifikaci mohou být "plazmid" a "vektor" užívány zaměnitelně, protože plazmid je nejobvykleji užívaná forma vektoru. Nicméně u vynálezu se má na mysli, že zahrnuje takové jiné formy expresních vektorů jako např. virální vektory, které poskytují ekvivalentní funkce (např. replikační detektivní retroviry, adenoviry a adeno-asociované viry).

Pod zde používaným termínem "rekombinantní hostitelská buňka" (nebo jednoduše "hostitelská buňka") se rozumí, že se týká buňky, do které byl zaveden rekombinantní expresní vektor. Je třeba chápat, že pod takovými termíny se má na mysli, že se týkají nejen konkrétního buněčného subjektu, nýbrž i potomstva takových buněk. Protože v následujících generacích může dojít k

25 určitým modifikacím buď mutací nebo vlivy prostředí, nemusí být takové potomstvo ve skutečnosti identické s matečnou buňkou, ale stále jsou zahrnována do rámce zde používaného termínu "hostitelská buňka".

Různá hlediska vynálezu jsou popsána v následujících pododdílech dalšími detaily.

35 I. Lidské protilátky, které vážou lidský TNF α

Tento vynález poskytuje způsoby léčení chorob, u nichž je prospěšná administrace anti-TNF α protilátky. Tyto způsoby zahrnují čtrnáctidenní subkutánní administraci izolovaných lidských protilátek nebo jejich, na antigen se vážajících částí, které se vážou na lidský TNF α s velkou

40 afinitou, nízkou rychlostí zániku a vysokou schopností neutralizace. Lidské protilátky podle vynálezu jsou přednostně rekombinantními, neutralizujícími lidskými anti-TNF α protilátkami. Nejvíce preferovaná rekombinantní, neutralizující protilátka podle vynálezu je zde uváděna jako D2E7 (sekvence aminokyselin D2E7 VL oblasti je uvedena v SEQ ID NO:1; sekvence aminokyselin D2E7 VH oblasti je uvedena v SEQ ID NO:2). Vlastnosti D2E7 byly popsány v

45 Salfeld a spol., US patent 6090382, na který se zde odkazuje.

Jedno hledisko vynálezu se týká léčení chorob, u nichž je prospěšná administrace anti-TNF α protilátky. Tyto způsoby zahrnují čtrnáctidenní subkutánní administraci D2E7 protilátek a částí protilátek, D2E7-příbuzných protilátek a částí protilátek a jiných lidských protilátek a částí

50 protilátek s ekvivalentními vlastnostmi jako D2E7, jako je vysoká afinita vazby k lidskému hTNF α s nízkou disociační kinetikou a vysokou neutralizační kapacitou. Při jednom provedení poskytuje vynález léčení s izolovanou lidskou protilátkou, nebo její, na antigen se vážající částí, která disociuje z lidského TNF α s K_d 1×10^{-8} M nebo méně a K_{off} rychlostní konstantou 1×10^{-3} s $^{-1}$ nebo méně, obojí stanoveno rezonancí povrchových plazmonů, a neutralizuje cytotoxicitu

lidského TNF α při standardním L929 testu *in vitro* s IC₅₀ 1 x 10⁻⁷ M nebo méně. Přednostně izolovaná lidská protilátka nebo její část, která se váže na antigen, disociuje z lidského TNF α s K_{off} 5 x 10⁻⁴ s⁻¹ nebo méně, nebo ještě preferovaněji s K_{off} 1 x 10⁻⁴ s⁻¹ nebo méně. Přednostně izolovaná lidská protilátka nebo její část, která se váže na antigen, neutralizuje cytotoxicitu lidské TNF α při standardním L929 testu *in vitro* s IC₅₀ 1 x 10⁻⁸ M nebo méně, ještě lépe s IC₅₀ 1 x 10⁻⁹ M nebo méně a ještě nejlépe s IC₅₀ 1 x 10⁻¹⁰ M nebo méně. Při preferovaném provedení je protilátkou izolovaná lidská rekombinantní protilátka nebo její antigen vázající část.

Obecně je známo z praxe, že těžký a lehký řetězec CDR3 domén protilátky hrají významnou úlohu ve specifičnosti vazby/afinity protilátky na antigen. Podle toho, se vynález z jiného hlediska týká léčení chorob, u nichž je prospěšná administrace anti-TNF α protilátky subkutánním podáváním lidských protilátek, které mají pomalou disociační kinetiku pro asociaci s hTNF α , a které mají těžký a lehký řetězec CDR3 domén, jež jsou identické nebo příbuzné těm v D2E7. Poloha 9 D2E7 VL CDR3 může být obsazena s Ala nebo Thr, aniž by to K_{off} podstatně ovlivnilo. Podle toho konsenzuální motiv pro D2E7 VL CDR3 obsahuje aminokyselinovou sekvenci:

Q-R-Y-N-R-A-P-Y-(T/A) (SEQ ID NO. 3). Dodatečně poloha 12 D2E7 VL CDR3 může být obsazena s Tyr nebo Asn, aniž by to K_{off} podstatně ovlivnilo. Podle toho konsenzuální motiv pro D2E7 VH CDR3 obsahuje aminokyselinovou sekvenci:

V-S-Y-L-S-T-A-S-S-L-D-(Y/N) (SEQ ID NO: 4). Mimo to navíc, jak je ukázáno v příkladu 2, CDR3 doména těžkých a lehkých řetězců v D2E7 je přístupná substituci jednotlivým alaninovým zbytkem (v poloze 1, 4, 5, 7 nebo 8 ve VL CDR3 nebo v poloze 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 nebo 11 ve VH CDR3), aniž by to K_{off} podstatně ovlivnilo. Zkušený pracovník dále ještě ocení, že existující přístupnost D2E7 VL a VH CDR3 domén pro substituce alaninem, může umožnit substituci jiných aminokyselin v CDR3 doménách, především substituci konzervativními aminokyselinami, když je stále zachována nízká konstanta rychlosti zániku protilátky. Zde používaná "konzervativní substituce aminokyselin" je taková, ve které je jeden zbytek aminokyseliny nahrazen jiným zbytkem aminokyseliny majícím podobný vedlejší řetězec. Skupiny aminokyselinových zbytků majících podobný vedlejší řetězec jsou v oboru definovány, včetně zásaditých vedlejších řetězců (např. lysin, arginin, histidin), kyselých vedlejších řetězců (např. kyselina asparagová, kyselina glutamová), polárních vedlejších řetězců bez náboje (např. asparagin, glutamin, serin, threonin, tyrosin, cystein), nepolárních vedlejších řetězců (např. alanin, valin, leucin, isoleucin, prolin, fenylalanin, methionin, tryptofan), β -rozvětvených vedlejších řetězců (např. threonin, valin, isoleucin) a aromatických vedlejších řetězců (např. tyrosin, fenylalanin, tryptofan, histidin). V doménách D2E7 VL a/nebo VH CDR3 se pak přednostně nedělá více než jedna až pět konzervativních substitucí aminokyselin. V doménách D2E7 VL a/nebo VH CDR3 se pak přednostně neprovede více než jedna až tři konzervativní substituce aminokyselin. Navíc konzervativní substituce aminokyselin nesmí být provedeny v polohách aminokyselin kritických pro vazbu k hTNF α . Polohy 2 a 5 u D2E7 VL CDR3 a polohy 1 a 7 u D2E7 VH CDR3 se jeví jako kritické pro interakci s hTNF α , a tudíž v těchto polohách se přednostně konzervativní substituce aminokyselin neprovádějí (i když je přijatelná substituce alaninem v poloze 5 u D2E7 VL CDR3, jak se popisuje shora) (viz US patent 6090382).

Shodně při jiném provedení poskytuje vynález způsoby léčení chorob, u nichž je prospěšná administrace anti-TNF α protilátky při čtrnáctidenní subkutánní administraci izolované lidské protilátky nebo její antigen vázající části. Protilátka nebo její antigen vázající část, má nejvhodněji následující charakteristiku:

a) disociuje z lidské TNF α s K_{off} rychlostní konstantou 1 x 10⁻³ s⁻¹ nebo méně, jak bylo stanoveno rezonancí povrchových plazmonů;

- b) má CDR3 doménu lehkého řetězce obsahující sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 3, nebo modifikovanou z SEQ ID NO: 3 jednotlivou substitucí alaninem v poloze 1, 4, 5, 7 nebo 8 nebo jednou až pěti konzervativními substitucemi aminokyselin v polohách 1, 3, 4, 6, 7, 8 a/nebo 9;
- 5 c) má CDR3 doménu těžkého řetězce obsahující sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 4, nebo modifikovanou z SEQ ID NO: 4 jednotlivou substitucí alaninem v poloze 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 nebo 11 nebo jednou až pěti konzervativními substitucemi aminokyselin v polohách 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 a/nebo 12.
- 10 Přednostně protilátka nebo její část, která se váže na antigen, disociuje z lidské TNF α s K_{off} $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ nebo méně. Ještě preferovanější je, když protilátka nebo její část, která se váže na antigen, disociuje z lidské TNF α s K_{off} $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ nebo méně.
- Vynález poskytuje způsoby pro ošetřování chorob, u nichž je prospěšná administrace anti-TNF α protilátky při čtrnáctidenní subkutánní administraci izolované lidské protilátky nebo její antigen vázající části ještě ph jiném provedení. Protilátka nebo její část, která se váže na antigen, obsahuje přednostně variabilní oblast lehkého řetězce (LCVR) mající CDR3 doménu obsahující sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 3, nebo modifikovanou z SEQ ID NO: 3 jednotlivou substitucí alaninem v poloze 1, 4, 5, 7 nebo 8 a variabilní oblast (HCVR) mající CDR3 doménu obsahující sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 4, nebo modifikovanou z SEQ ID NO: 4 jednotlivou substitucí alaninem v poloze 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 nebo 11. Přednostně má LCVR dále doménu CDR2 obsahující sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 5 (tj. D2E7 VL CDR2) a HCVR dále má doménu CDR2 obsahující sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 6 (tj. D2E7 VH CDR2). Ještě přednostněji má LCVR dále doménu CDR1 obsahující sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 7 (tj. D2E7 VL CDR1) a HCVR má doménu CDR1 obsahující sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 8 (tj. D2E7 VH CDR1). Struktury oblastí pro VL jsou přednostně z V_{K} I druhu lidské zárodečné linie, přednostněji z A20 lidské zárodečné linie V_{K} genu a nejpřednostněji z D2E7 VL rámce sekvencí uvedených na obrázcích 1A a 1B US patentu 6090382. Struktury oblastí pro VH jsou přednostně z V_{H} I druhu lidské zárodečné linie, přednostněji z DP31 lidské zárodečné linie VH genu a nejpřednostněji z D2E7 VH rámce sekvencí uvedených na obrázcích 2A a 2B US patentu 6090382.
- Při ještě dalším provedení poskytuje vynález způsoby pro ošetřování chorob, u nichž je prospěšná administrace anti-TNF α protilátky při čtrnáctidenní subkutánní administraci izolované lidské protilátky nebo její antigen vázající části. Protilátka nebo její část, která se váže na antigen, obsahuje přednostně variabilní oblast lehkého řetězce (LCVR) obsahující sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 1 (tj. D2E7 VL) a variabilní oblast těžkého řetězce (HCVR) obsahující sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 2 (tj. D2E7 VH). U jistých provedení obsahuje protilátka konstantní oblast těžkého řetězce jako je IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM nebo IgD konstantní oblast. Přednostně je konstantní oblastí těžkého řetězce IgG1 konstantní oblast těžkého řetězce nebo IgG4 konstantní oblast těžkého řetězce. Navíc může protilátka obsahovat dále konstantní oblast lehkého řetězce, buď kappa konstantní oblast lehkého řetězce nebo lambda konstantní oblast lehkého řetězce. Přednostně obsahuje protilátka kappa konstantní oblast lehkého řetězce. Části protilátky může být alternativně na příklad Fab fragment nebo jednořetězový Fv fragment.
- Při jiném provedení poskytuje vynález ještě způsoby pro ošetřování chorob, u nichž je prospěšná administrace anti-TNF α protilátky při čtrnáctidenní subkutánní administraci izolované lidské protilátky nebo její antigen vázající části. Protilátka nebo její část, která se váže na antigen, obsahuje přednostně na D2E7 se vztahující VL a VH CDR3 domény, například protilátky nebo jejich antigen vázající části s variabilní oblastí lehkého řetězce (LCVR) mající CDR3 doménu obsahující sekvenci aminokyselin volenou ze skupiny, kterou tvoří: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 a SEQ ID NO: 26, nebo s variabilní oblastí těžkého řetězce (HCVR) mající CDR3 doménu obsahující sekvenci aminokyselin volenou ze skupiny, kterou

tvoří: SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 a SEQ ID NO: 35.

5 Protilátka nebo část protilátky podle vynálezu může být derivatizována nebo napojena na jinou funkční molekulu (např. jiný peptid nebo protein). Protilátka nebo část protilátky podle vynálezu jsou tedy myšleny, že zahrnují derivatizované a jinak modifikované formy zde popisovaných lidských anti-TNF α protilátek, včetně imunoadezivních molekul. Například protilátka nebo část protilátky podle vynálezu může být funkčně spojena (chemickou vazbou, genetickou fúzí, nekovalentní asociací nebo jinak) s jednou nebo více jinými molekulárními entitami jako jinou protilátkou (např. bispecifická protilátka nebo diaprotilátka), detekovatelným agens, 10 cytotoxickým činidlem, farmaceutickým agens a/nebo proteinem či peptidem, které mohou zprostředkovat asociát protilátky nebo části protilátky s jinou molekulou (jako jádrovou oblastí streptavidinu nebo volným koncem polyhistidinu).

15 Jeden typ derivatizované protilátky se produkuje příčným spojováním dvou nebo více protilátek (stejného typu nebo různých typů, aby se např. vytvořily bispecifické protilátky). Vhodné příčné spojovníky zahrnují ty, které jsou heterobifunkční, mající dvě rozdílně reaktivní skupiny oddělené vhodným mezerníkem (např. m-maleinimidobenzoyl-*N*-hydroxysukcinimid-ester) nebo homobifunkční (např. disukcinimidyl suberát). Takové spojovníky lze získat od Pierce Chemical 20 Company, Rockford, IL.

Vhodná detekovatelná činidla, se kterými může být protilátka nebo část protilátky derivatizována, představují fluorescenční sloučeniny. Příkladná fluorescenčně detekovatelná činidla zahrnují fluorescein, fluorescein-isokyanát, rhodamin, 5-dimethylamin-1- 25 naftalensulfonylchlorid, fykoerythrin a podobně.

Protilátka může být derivatizována také detekovatelnými enzymy, jako alkalickou fosfatázou, křenovou peroxidázou, glukosaoxidázou a podobně. Jestliže je protilátka derivatizována detekovatelným enzymem, provádí se detekce přidáním dodatečných reagentů, které enzym 30 využívá, aby produkoval detekovatelný reakční produkt. Je-li například jako detekovatelné činidlo přítomna křenová peroxidáza, vede přidání hydrogen peroxidu a diaminobenzidinu k barevnému reakčnímu produktu, který je detekovatelný. Protilátka může být derivatizována také biotinem a detekována nepřímým měřením vazby avidinu nebo streptavidinu.

35 II. Expresí protilátek

Protilátka nebo část protilátky podle vynálezu může být připravena rekombinantní expresí genů imunoglobulinového lehkého a těžkého řetězce v hostitelské buňce. Aby se protilátka 40 exprimovala rekombinantně, je hostitelská buňka transfektována jedním nebo více rekombinantními expresními vektory nesoucími DNA fragmenty, které kódují imunoglobulinové lehké a těžké řetězce protilátky tak, že lehké a těžké řetězce jsou exprimovány v hostitelské buňce a vylučovány přednostně do media, ve kterém jsou hostitelské buňky kultivovány, a z kteréhožto media mohou být protilátky zpět získány. Pro získání genů těžkého a lehkého řetězce protilátky jsou používány standardní rekombinantní DNA metodologie, tyto geny inkorporují do 45 rekombinantních expresních vektorů a zavádějí vektory do hostitelských buněk tak, jak jsou popisovány v Sambrook, Fritsch a Maniatis (editoři), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989); Ausubell F. M. a spol. (editoři), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1989) a v Boss a spol., US patent 4816397.

50 Pro expresi D2E7 nebo s D2E7 příbuzné protilátky se nejprve získají DNA fragmenty kódující variabilní oblasti lehkého a těžkého řetězce. Tyto DNA mohou být získány amplifikací a modifikací variabilních sekvencí lehkého a těžkého řetězce zárodečné linie pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Sekvence zárodečné linie DNA pro geny variabilní oblasti lidského 55 těžkého a lehkého řetězce jsou v oboru známe [viz např. "Vbase" databáze sekvencí lidské

zárodečné linie; viz také Kabát E. A. a spol., *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991); Tomlinson I. M. a spol., "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol.* 227, 776-798 (1992) a Cox J. P. L. a spol., "A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur. J. Immunol.* 24, 827-836 (1994); na obsah každé z nich se zde výslovně odkazuje]. Aby se získal DNA fragment kódující variabilní oblast těžkého řetězce D2E7 nebo D2E7 příbuzné protilátky, amplifikuje se pomocí standardní PCR člen V_H³ skupiny zárodečné linie V_H genů. Nejprřednostněji se amplifikuje sekvence DP-31 V_H zárodečné linie. Aby se získal DNA fragment kódující variabilní oblast lehkého řetězce D2E7 nebo D2E7 příbuzné protilátky, amplifikuje se pomocí standardní PCR člen V_L skupiny zárodečné linie V_L genů. Nejprřednostněji se amplifikuje sekvence A20 V_L zárodečné linie. PCR primery vhodné pro amplifikaci sekvencí DP-31 zárodečné linie V_H a A20 zárodečné linie V_L mohou být určeny pomocí standardních metod na základě nukleotidových sekvencí uvedených v odkazech citovaných shora.

Jakmile se získají fragmenty zárodečné linie V_H a V_L, mohou být tyto sekvence mutovány, aby kódovaly zde uváděné D2E7 nebo s D2E7 příbuzné sekvence aminokyselin. Sekvence aminokyselin, kódované zárodečnou linií V_H a V_L DNA sekvencí, se nejprve srovnávají s D2E7 nebo s D2E7 příbuznými V_H a V_L sekvencemi aminokyselin pro identifikování aminokyselinových zbytků v D2E7 nebo s D2E7 příbuzných sekvencích, které se od zárodečné linie liší. Potom jsou vhodné nukleotidy zárodečné linie DNA sekvencí mutovány tak, že mutovaná sekvence zárodečné řady kóduje D2E7 nebo s D2E7 příbuzné sekvence aminokyselin za pomoci genetického kódu, aby se určilo jaké změny nukleotidů mají být učiněny. Mutageneze zárodečné řady sekvencí se provádí standardními metodami, např. mutagenezi zprostředkovanou PCR (při níž jsou mutované nukleotidy inkorporovány do PCR primerů tak, že produkt PCR obsahuje mutace) nebo místně cílenou mutagenezi.

Jakmile se (amplifikací a mutagenezi zárodečné linie V_H a V_L genů, jak je shora popsáno) získají DNA fragmenty kódující D2E7 nebo s D2E7 příbuzné V_H a V_L segmenty, mohou být tyto DNA fragmenty dále zpracovávány standardními rekombinantními DNA technikami, například, aby se variabilní oblasti genů konvertovaly na geny s úplnou délkou řetězce protilátky, na geny Fab fragmentů nebo na scFv gen. Při těchto manipulacích je V_L- nebo V_H-kódující DNA fragment operativně spojen s jiným DNA fragmentem kódujícím jiný protein jako například konstantní oblastí protilátky nebo flexibilním spojovníkem. Termínem "operativně spojen", užívaným v tomto kontextu se rozumí, že dva DNA fragmenty jsou spojeny tak, že sekvence aminokyselin kódované dvěma DNA fragmenty zůstávají součástí struktury.

Izolovaná DNA kódující V_H oblast může být konvertována na gen těžkého řetězce o plné délce operativním spojením V_H-kódující DNA s jinou DNA molekulou kódující konstantní oblastí těžkého řetězce (CH1, CH2 a CH3). Sekvence lidských genů konstantní oblasti těžkého řetězce jsou v praxi známy [viz např. Kabat E. A. a spol., *Sequences of Protein of Immunological Interest, Fifth Edition*, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)] a DNA fragmenty obsahující tyto oblasti mohou být získány standardní PCR amplifikací. Konstantní oblastí těžkého řetězce může být IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM nebo IgD konstantní oblast, ale nejpreferovanější je IgG1 nebo IgG4 konstantní oblast. Pro gen Fab fragmentu těžkého řetězce může být V_H-kódující DNA operativně spojena s jinou molekulou DNA kódující pouze CH1 konstantní oblast těžkého řetězce.

Izolovaná DNA kódující V_L oblast může být konvertována na gen lehkého řetězce o plné délce operativním spojením V_L-kódující DNA s jinou DNA molekulou kódující konstantní oblast lehkého řetězce, CL. Sekvence lidských genů konstantní oblasti lehkého řetězce jsou v praxi známy [viz např. Kabát E. A. a spol., *Sequences of Protein of Immunological Interest, Fifth Edition*, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)] a DNA fragmenty obsahující tyto oblasti mohou být získány standardní PCR amplifikací.

Konstantní oblastí lehkého řetězce může být kappa nebo lambda konstantní oblast, ale nejpreferovanější je kappa konstantní oblast.

Pro vytvoření scFv genu jsou VH- a VL-kódující DNA fragmenty operativně spojeny s jiným fragmentem kódujícím flexibilní spojovník, např. kódující sekvenci aminokyselin (Gly4-Ser)₃ tak, že VH a VL sekvence mohou být exprimovány jako souvislý jednořetězový protein s VL a VH oblastmi spojenými flexibilním spojovníkem [viz . Bird a spol., *Science* 242, 423-426 (1988) a Huston a spol., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 5879-5883 (1988), McCafferty a spol., *Nature* 348, 552-554 (1990)].

K exprimování protilátek nebo částí protilátek podle vynálezu, DNA kódující lehké a těžké řetězce zčásti nebo o úplné délce, získané, jak je popisováno shora, jsou vloženy do expresního vektoru tak, že geny jsou operativně spojeny s transkripčními a translačními kontrolními sekvencemi. Termínem "operativně spojen", užívaným v tomto kontextu se rozumí, že gen protilátky je vázán do vektoru tak, že transkripční a translační kontrolní sekvence ve vektoru slouží jejich zamýšlené funkci regulování transkripce a translace genu protilátky. Expresní vektor a expresní kontrolní sekvence jsou voleny tak, aby byly kompatibilní s expresí použitých hostitelských buněk. Gen lehkého řetězce protilátky a gen těžkého řetězce protilátky může být vložen do separátního vektoru nebo typičtěji jsou oba geny vloženy do téhož expresního vektoru. Geny protilátky se do expresního vektoru vkládají standardními metodami (např. spojením komplementárních restrikčních míst na genu fragmentu protilátky a vektoru nebo spojením na otevřeném konci, pokud nejsou restrikční místa přítomna). Před inzercí D2E7 nebo D2E7 příbuzných sekvencí lehkého nebo těžkého řetězce může expresní vektor již nést sekvence konstantní oblasti protilátky. Například jeden přístup ke konvertování D2E7 nebo D2E7 příbuzných VH a VL sekvencí na geny protilátky o úplné délce je vložit je do expresních vektorů, které již kódují konstantní oblasti těžkého řetězce, respektive konstantní oblasti lehkého řetězce tak, že VH segment je operativně připojen k CH segmentu/segmentům ve vektoru a VL segment je operativně připojen k CL segmentu ve vektoru. Dodatečně nebo alternativně může rekombinantní expresní vektor kódovat signální peptid, který usnadňuje sekreci řetězce protilátky z hostitelské buňky. Gen řetězce protilátky může být klonován na vektor tak, že signální peptid se zapojí do struktury na aminovém zakončení řetězce genu protilátky. Signálním peptidem může být imunoglobulinový signální peptid nebo heterologní signální peptid (tj. signální peptid nikoliv z imunoglobulinového proteinu).

Navíc ke genům řetězce protilátky nesou rekombinantní expresní vektory podle vynálezu regulativní sekvence, které kontrolují expresi genů řetězce protilátky v hostitelské buňce. Termínem "regulativní sekvence" se rozumí, že zahrnuje promotory, zesilovače transkripce a jiné prvky kontroly exprimování (např. polyadenylační signály), které ovládají transkripci a translaci genů řetězce protilátky. Takové regulativní sekvence jsou popsány například v Goedel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Zkušební odborníci si jsou vědomi, že určení expresního vektoru, včetně selekce regulativních sekvencí může záviset na takových faktorech jako volbě hostitelské buňky, která má být transformována, úrovni exprese požadovaného proteinu atd. Preferované regulativní sekvence pro expresi savčích hostitelských buněk zahrnují virové elementy, které řídí vysoké úrovně exprese v savčích buňkách, jako například promotory a/nebo zesilovače transkripce pocházející z cytomegaloviru (CMV) (jako CMV promotor/zesilovač transkripce), Simian Virus 40 (SV 40) (jako SV⁴⁰ promotor/zesilovač transkripce), adenovirus [např. promotor pozdního adenoviru major (AdMLP)] a polyomy. Pro další popis virálních regulativních elementů a jejich sekvencí viz Stinski, US patent 5168062; Bell a spol., US patent 4510245 a Schaffner a spol., US patent 4968615.

Navíc ke genům řetězce protilátky a regulativním sekvencím, mohou rekombinantní expresní vektory nést další sekvence, například sekvence, které regulují replikaci vektoru v hostitelské buňce (např. původce replikace) a volitelné signální geny. Volitelné signální geny usnadňují volbu hostitelských buněk, do nichž má být vektor zaveden (viz např. Axel a spol., US patenty

4399216, 4634665 a 5179017). Například volitelné signální geny, hostitelské buňce, do které byly zavedeny, přinášejí typicky odolnost vůči léčivům jako například G418, hygromycin nebo methotrexat. Preferované volitelné signální geny zahrnují geny dihydrofolátreduktázy (DHFR) (pro použití v dhfr⁻ hostitelských buňkách se selekcí/amplifikací methotrexatu) a *neo* geny (pro selekci G418).

Pro expresi lehkých a těžkých řetězců je standardními technikami do hostitelské buňky transfekován expresní vektor/vektory kódující lehké a těžké řetězce. Pod rozličnými formami termínu "transfekce" se rozumí, že zahrnuje širokou škálu technik běžně užívaných pro zavádění exogenní DNA do prokaryotických nebo eukaryotických hostitelských buněk, např. elektroporaci, srážení fosforečnanem vápenatým, transfekci DEAE-dextranu a podobně. I když je teoreticky možné exprimovat protilátky podle vynálezu buď v prokaryotických nebo v eukaryotických hostitelských buňkách, je exprese protilátek v eukaryotických buňkách a nejlépe v savčích hostitelských buňkách, preferována nejvíce, protože eukaryotické buňky a zejména savčí buňky, lze vhodněji než prokaryotické buňky shromažďovat a vylučují protilátku správně složenou a imunologicky aktivní. Prokaryotická exprese genů protilátek byla pro produkci vysokých výtěžků aktivní protilátky publikována jako neefektivní [Boss M. A. a Wood C. R., *Immunology Today* 6, 12-13 (1985)].

Preferované savčí hostitelské buňky pro exprimování rekombinantních protilátek podle vynálezu představují ovaria čínskému křečka (CHO buňky) [počítaje v to dhfr-CHO buňky popsané v Urlaub a Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 42164220 (1980), užívané s DHFR volitelným signálním znakem např. jak je popsáno v Kaufman R. J. a Sharp P. A., *Mol. Biol.* 159, 601-621 (1982)], NSO myeloma buňky, COS buňky a SP2 buňky. Když se do savčích hostitelských buněk zavedou rekombinantní expresní vektory kódující geny protilátek, jsou kultivací hostitelských buněk produkovány protilátky po dobu, která umožní expresi protilátky v hostitelské buňce nebo přednostně sekreci protilátky do kultivačního media, ve kterém jsou hostitelské buňky pěstovány. Z kultivačního media mohou být protilátky získány pomocí standardních metod pro purifikaci proteinů.

Hostitelské buňky mohou být také využity k produkci částí celkových protilátek, například Fab fragmentů nebo scFv molekul. Rozumí se, že variace shora uvedené procedury patří do rozsahu předkládaného vynálezu. Například může být žádoucí v transfekovat hostitelskou buňku s DNA kódující buď lehký řetězec nebo těžký řetězec (nikoliv však oba) protilátky podle tohoto vynálezu. Rekombinantní DNA technologie může být využita také k odstranění některých nebo všech DNA kódujících buď jeden nebo oba z lehkých a těžkých řetězců, které nejsou pro vazbu s hTNF α nutné. Molekuly exprimované z takto zkrácených DNA molekul jsou rovněž zahrnovány do protilátek podle vynálezu. Kromě toho mohou být produkovány bifunkční protilátky, ve kterých jeden těžký a jeden lehký řetězec jsou protilátkou podle vynálezu a jiný těžký a lehký řetězec jsou specifické pro jiný antigen než hTNF α vazbou protilátky podle vynálezu křížem s další protilátkou pomocí standardních chemických metod křížové vazby.

Při preferovaném systému pro rekombinantní expresi protilátky nebo její antigen vázající části podle vynálezu, je rekombinantní expresní vektor kódující obojí, těžký řetězec protilátky i lehký řetězec protilátky, zaveden do dhfr-CHO buněk transfekcí zprostředkovanou fosforečnanem vápenatým. V rekombinantním expresním vektoru jsou geny těžkého a lehkého řetězce každý operativně navázán na regulační elementy CMV zesilovače transkripce/AdMLP promotoru, aby se dosahovaly vysoké úrovně transkripce genů. Rekombinantní expresní vektor nese také DHFR gen, který umožňuje selekci CHO buněk, které byly transfekovány vektorem pomocí selekce/amplifikace methotrexatem. Vybrané transformované hostitelské buňky se kultivují, aby se umožnila exprese těžkých a lehkých řetězců protilátky a z kultivačního media se izoluje úplná protilátka. Pro přípravu rekombinantního expresního vektoru, transfekci hostitelských buněk, selekci transformantů, kultivaci hostitelských buněk a izolaci protilátky z kultivačního media, se používají standardní techniky molekulární biologie.

III. Selektce rekombinantních lidských protilátek

Rekombinantní lidské protilátky podle vynálezu, vedle D2E7 nebo jejich antigen vázajících částí či s D2E7 příbuzných protilátek zde popisovaných, mohou být izolovány screeningem z rekombinantní, kombinatorické knihovny protilátek, přednostně knihovny ukázek scFv řádu, připravené za použití lidských VL a VH cDNA získaných z mRNA pocházejících z lidských lymfocytů. Metodologie pro přípravu a screening takových knihoven jsou v praxi známy. Kromě komerčně dostupných sad ke generování knihoven ukázek řádu (např. Pharmacia, *Recombinant Antibody System*, katalog 27-9400-01 a Stratagene *SuriZAP*TM sada ukázek řádu, katalog 240612), příklady metod a reagentů obzvláště přístupných pro použití a screening knihoven displeje protilátek, lze nalézt na příklad v Ladner a spol., US patent 5223409; PCT publikace WO 92/18619; Dower a spol., PCT publikace WO 91/17271; Winter a spol., PCT publikace WO 92/20791; Markland a spol., PCT publikace WO 92/15679; Breitling a spol., PCT publikace WO 93/01288; McCafferty a spol., PCT publikace WO 92/01047; Garrad a spol., PCT publikace WO 92/09690; Fuchs a spol., *Bio/Technology* 9, 1370-1372 (1991); Hay a spol., *Hum. Antibod. Hybridomas* 3, 81-85 (1992); Huse a spol., *Science* 246, 1275-1281 (1989); McCafferty a spol., *Nature* 348, 552-554 (1990); Griffiths a spol., *EMBO J.* 12, 725-734 (1993); Hawkins a spol., *J. Mol. Biol.* 226, 889-896 (1992); Clackson a spol., *Nature* 352, 624-628 (1991); Gram a spol., *PNAS* 89, 3576-3580 (1992); Griffiths a spol., *EMBO J.* 12, 725-734 (1993); Garrad a spol., *Bio/Technology* 9, 1373-1377 (1991); Hoogenboom a spol., *Nuc. Acid Res.* 19, 4133-4137 (1991) a Barbas a spol., *PNAS* 88, 7978-7982 (1991).

V preferovaném provedení pro izolaci lidské protilátky s vysokou afinitou a nízkou konstantou rychlosti zániku pro hTNF α , byla myši anti-hTNF α protilátka mající vysokou afinitu a nízkou konstantu rychlosti zániku pro hTNF α (např. MAK 195, hybridom pro který má depozitní číslo ECACC 87 050801), nejprve použita k selekci sekvencí lidského těžkého a lehkého řetězce majících podobnou vazebnou aktivitu vůči pro hTNF α za použití metod vtiskování epitopu, popisovaných v Hoogenboom a spol., PCT publikace WO 93/06213. Při této metodě používané knihovny jsou především scFv knihovny připravené a screeningované, jak je popsáno v McCafferty a spol., PCT publikace WO 92/01047a Griffiths a spol., *EMBO J.* 12, 725-734 (1993). Knihovny scFv protilátek jsou přednostně screeningovány za použití rekombinantního lidského TNF α jako antigenu.

Jakmile jsou lidské VL a VH segmenty vybrány, provedou se "mix and maten" experimenty, ve kterých jsou různé páry počátečně vybraných VL a VH segmentů screeningovány pro hTNF α vazbu, aby byly vybrány preferované kombinace VL/VH párů. Kromě toho, aby se dále zlepšila afinita a/nebo snížila konstanta rychlosti zániku pro hTNF α vazbu, mohou být VL a VH segmenty preferovaných VL/VH páru(ů) náhodně mutovány, nejlépe v CDR3 oblasti VH a/nebo VL, v postupu analogickém procesu somatické mutace *in vivo*, zodpovědném za vyžrání afinity protilátek během přirozené imunitní odezvy. Toto vyžrání afinity *in vitro* může být dosaženo amplifikací VH a VL oblastí pomocí PCR primem komplementárních k VH CDR3 nebo respektive VL CDR3, kteréžto primery byly "říznuty" náhodnou směsí čtyř nukleotidových bází v určitých polohách tak, že výsledný PCR produkt kóduje VH a VL segmenty, ve kterých byly do VH a/nebo VL CDR3 oblastí zavedeny náhodné mutace. Tyto náhodně mutované VH a VL segmenty mohou být znovu screeningovány pro vazbu na hTNF α a mohou být vybrány sekvence, které projevují vysokou afinitu a nízkou konstantu rychlosti zániku pro hTNF α vazbu.

Po screeningu a izolaci anti-hTNF α podle vynálezu z knihovny ukázek rekombinantního imunoglobulinu, může být z komplexu ukázek (např. z genomu řádu) izolována nukleová kyselina kódující vybranou protilátku a subklonována na jiné expresní vektory pomocí standardních rekombinantních DNA technik. Pokud se žádá, může být nukleová kyselina dále zpracována, aby vytvořila jiné formy protilátek podle vynálezu (např. spojena s nukleovou kyselinou kódující další imunoglobulinové domény, např. další konstantní oblasti). K exprimování rekombinantní lidské protilátky izolované screeningem z kombinatorické knihovny,

se DNA kódující protilátku klonuje na rekombinantní expresní vektor a zavede do savčích hostitelských buněk jak se podrobněji popisuje v oddíle II shora.

IV. Farmaceutické kompozice a farmaceutická administrace

5

Protilátky nebo části protilátek podle vynálezu mohou být zahrnuty do farmaceutických kompozic vhodných pro podávání subjektu podle zde popisovaných způsobů, např. čtrnáctidenními, subkutánními dávkami. Farmaceutická kompozice typicky obsahuje protilátku (nebo část protilátky) podle vynálezu a/nebo methotrexat a farmaceuticky přijatelný nosič. Jak se zde používá "farmaceuticky přijatelný nosič", zahrnuje jakékoliv a všechna rozpouštědla, disperzní media, povlaky, antibakteriální a antifungální prostředky, izotonická a absorpci zpochybňující činidla a podobně, která jsou fyziologicky kompatibilní a jsou vhodná pro podávání subjektu způsoby zde popisovanými. Příklady farmaceuticky přijatelných nosičů představují jeden nebo více příkladů jako je voda, solanka, fosfáty pufrovaná solanka, dextrosa, glycerol, ethanol a podobně, právě tak jako jejich kombinace. V mnoha případech bude výhodnější zahrnout do směsi izotonická činidla, např. cukry, polyalkoholy jako mannitol, sorbitol nebo chlorid sodný. Farmaceuticky přijatelné nosiče mohou dále obsahovat menší množství pomocných látek jako smáčecích nebo emulzifikačních prostředků, konzervačních prostředků nebo pufů, které zvyšují skladovatelnost nebo účinnost protilátky nebo části protilátky.

20

Kompozice podle tohoto vynálezu mohou existovat v rozličných formách. Patří sem například kapalná, polotuhá a tuhá formy dávek jako kapalná roztoky (např. injekční a infuzní roztoky), disperze nebo suspenze, tablety, pilulky, prášky, liposomy a čípky. Preferovaná forma závisí na zamýšleném způsobu administrace a terapeutické aplikace. Typicky preferované kompozice jsou ve formě injekčních nebo infuzních roztoků, například kompozice podobné těm, které se používají na pasivní imunizaci lidí jinými protilátkami. Preferovaný způsob administrace je parenterální (např. intravenózní, subkutánní, intraperitoneální, intramuskulární). V jednom z preferovaných provedení je protilátka podávána intravenózní infuzí nebo injekcí. Při jiném preferovaném provedení se protilátka podává intramuskulární injekcí. Při zvlášť preferovaném provedení je látka podávána subkutánní injekcí (např. čtrnáctidenní subkutánní injekce).

30

Terapeutické kompozice musí typicky být sterilní a stabilní za podmínek výroby a skladování. Kompozice může být formulována jako roztok, mikroemulze, disperze, liposom nebo jiná uspořádaná struktura vhodná pro vysokou koncentraci léčiva. Sterilní injektovatelné roztoky mohou být připravovány začleněním aktivní sloučeniny (tj. protilátky nebo části protilátky) v požadovaném množství do vhodného rozpouštědla podle potřeby s jednou nebo s kombinací shora vyjmenovaných ingrediencí a následující filtrací a sterilizací. Disperze se zpravidla připravují vložením aktivní sloučeniny do sterilního vehikula, které obsahuje základní disperzní medium a požadované další ingredience z těch, jež jsou shora jmenovány. V případě sterilních prášků k přípravě sterilních injektovatelných roztoků jsou preferovanými metodami přípravy sušení ve vakuu a lyofilizace, které z jejich předem sterilně zfiltrovaného roztoku, poskytují prášek aktivního ingredientu plus jakoukoliv dále požadovanou ingredienci. Vhodná tekutost roztoku může být udržována například pomocí povlaku jako je lecitin, v případě disperze udržováním vhodné velikosti částic a pomocí povrchově aktivních látek. Prolongované absorpce injektovatelných kompozic může být dosahováno tak, že se do kompozice přidává činidlo, které absorpci zpochybňuje, na příklad soli monostearátu a želatina.

45

Protilátky a části protilátek podle předkládaného vynálezu mohou být aplikovány nejrozumnějšími, z praxe známými metodami, i když pro mnohé terapeutické aplikace preferovanou cestou/způsobem podání je subkutánní injekce. Jak zkušenosti odborníci uznají, bude se cesta a/nebo způsob aplikace lišit v závislosti na požadovaných výsledcích. U určitých provedení může být účinná komponenta připravována s nosičem, který bude sloučeninu chránit před rychlým uvolňováním, jako jsou formulace s kontrolovaným uvolňováním, včetně implantátů, transdermálních náplastí a mikroenkapsulovaných systémů uvolňování. Použity mohou být biodegradabilní, biokompatibilní polymery jako ethylenvinylacetát, polyethylenglykol (PEG),

55

polyanhydridy, polyglykolová kyselina, kolagen, polyorthoestery a kyselina poly(mléčná). Mnohé metody pro přípravu takových formulací jsou patentovány nebo jsou zkušeným odborníkům obecně známy. Viz např. Robinso, J. R. (editor), *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, Marcel Dekkerinc., New York, 1978.

5

U určitých provedení může být protilátka nebo část protilátky podle vynálezu podávána orálně, například s inertním ředidlem nebo asimilovatelným, jedlým nosičem. Sloučenina (a jiné ingredience, žádají-li se) mohou být rovněž uzavřeny do tvrdého nebo měkkého obalu želatinové kapsle, slisovány do tablet nebo přidány přímo do stravy subjektu. Pro orální terapeutickou administraci mohou být sloučeniny inkorporovány do excipientů a použity ve formě ingestivních tablet, buklálních tablet, pastilek, tinktur, suspenzí, sirupů, oplátek a podobně. Pro podávání sloučeniny podle vynálezu jinou než parenterální aplikací, může být nezbytné sloučeninu potáhnout nebo podávat spolu s materiálem, aby se předešlo její inaktivaci.

Do kompozic mohou být rovněž včleněny doplňující účinné sloučeniny. Při určitých provedeních je protilátka nebo část protilátky podle vynálezu spolu-formulována a/nebo spolu-podávána s jedním nebo více dalšími terapeutickými prostředky. Na příklad hTNF α protilátka nebo část protilátky podle vynálezu může být spolu-formulována a/nebo spolu-podávána s methotrexatem, jednou nebo více dalšími protilátkami, které se vážou na jiné cíle (např. protilátky, které vážou jiné cytokiny, nebo které vážou molekuly buněčného povrchu), na jeden nebo více cytokinů, rozpustné TNF α receptory (viz např. PCT publikaci 94/06476) a/nebo na jedno nebo více chemických činidel, která inhibují produkci nebo účinnost hTNF α (jako cyklohexanylidén deriváty, jak je popsáno v PCT publikaci 93/19751). Mimo to jedna nebo více protilátek podle vynálezu mohou být užity v kombinaci se dvěma nebo více z předcházejících terapeutických prostředků. Takové kombinované terapie mohou výhodně využívat nižší dávky aplikovaných terapeutických prostředků, a tak se vyhýbat možným toxicitám nebo komplikacím spojeným s různými mono-terapiemi. Užívání protilátek nebo částí protilátek podle vynálezu v kombinaci s jinými terapeutickými prostředky je diskutováno dále v oddíle IV.

Neomezující příklady terapeutických prostředků pro reumatoidní artritidu, se kterými může být protilátka nebo část protilátky podle vynálezu kombinována, zahrnují následující: nesteroidní protizánětlivé(á) léčivo(a) (NSAID); cytokin-supresivní protizánětlivé(á) léčivo(a) (CSAID); CDP-571/BAY-10-3356 (humanizovaná anti-hTNF α protilátka, Celltech/Bayer); cA2 (chimerová anti-hTNF α protilátka, Centocor); 75 kDTNFR-IgG [75 kD TNF receptor-IgG fúzního proteinu, Immunex; viz např. *Arthritis & Rheumatism* 37, S295 (1994); *J. Invest. Med.* Vol. 44 235A (1996)]; 55 kDTNFR-IgG (55 kD TNF receptor-IgG fúzního proteinu, Hoffman-LaRoche); IDEC-C9.1/SB 210396 [neodepleční primatizovaná anti-CD4 protilátka, IDEC/SmithKline; viz např. *Arthritis & Rheumatism* 38, S185 (1995)]; DAB 486-IL-2 a/nebo DAB 389-IL-2 [IL-2 fúzní proteiny, Seragen; viz např. *Arthritis & Rheumatism* 36, 1233 (1993)]; Anti-Tag (humanizovaný anti-IL-2Ra; Protein Design Labs/Roche); IL-4 (protizánětlivý cytokin, DNAX/Schering); IL 10 (SCH 52000, rekombinantní IL-10 protizánětlivý cytokin, DNAX/Schering); IL-4; IL-10 a/nebo agonisty IL-4 (např. agonistní protilátky); IL-1RA (antagonistický IL-1 receptor, Synergen/Amgen); TNF-bp/s-TNFR [rozpustný TNF vázající protein; viz např. *Arthritis & Rheumatism* 39, No. 9 (supplement) S284 (1996); *Amer. J. Physiol. – Heart and Circulatory Physiology* 268, 37-42 (1995)]; R973401 [inhibitor fosfodiesterázy Typ IV; viz např. *Arthritis & Rheumatism* 39, No. 9 (supplement) S282 (1996)]; MK-966 [COX-2 inhibitor; viz např. *Arthritis & Rheumatism* 39, No. 9 (supplement) S81 (1996)]; Iloprost [viz např. *Arthritis & Rheumatism* 39, No. 9 (supplement) S82 (1996)]; methotrexat; thalidomid [viz např. *Arthritis & Rheumatism* 39, No. 9 (supplement) S282 (1996)] a thalidomidu příbuzná léčiva (např. Celgen); leflunomid [proti zánětům a inhibitor cytokinu; viz např. *Arthritis & Rheumatism* 39, No. 9 (supplement) S131 (1996); *Inflammation Research* 45, 103-107 (1996)]; tranexamovou kyselinu [inhibitor aktivace plazminogenu; viz např. *Arthritis & Rheumatism* 39, No. 9 (supplement) S284 (1996)]; T-614 [inhibitor cytokinu; viz např. *Arthritis & Rheumatism* 39, No. 9 (supplement) S284 (1996)]; prostaglandin E1 [viz např. *Arthritis & Rheumatism* 39, No. 9 (supplement) S282 (1996)]; tenidap [nesteroidní protizánětlivé léčivo; viz např. *Arthritis &*

Rheumatism 39, No. 9 (supplement) S280 (1996)]; naproxen [nesteroidní protizánětlivé léčivo; viz např. *Neuro Report* 7, 1209-1213 (1996)]; meloxicam (nesteroidní protizánětlivé léčivo); ibuprofen (nesteroidní protizánětlivé léčivo); piroxicam (nesteroidní protizánětlivé léčivo); diclofenac (nesteroidní protizánětlivé léčivo); indomethacin (nesteroidní protizánětlivé léčivo);
 5 sulfasalazine [viz např. *Arthritis & Rheumatism* 39, No. 9 (supplement) S281 (1996)]; azathioprine [viz např. *Arthritis & Rheumatism* 39, No. 9 (supplement) S281 (1996)]; ICE inhibitor (inhibitor enzymu konvertujícího interleukin-1 β); zap-70 a/nebo lek inhibitor (inhibitor tyrosinkinázy zap-70 nebo Ick); VEGF inhibitor a/nebo VEGF-R inhibitor (inhibitor růstového faktoru vaskulárních endotelových buněk nebo receptoru vaskulárních endotelových buněk;
 10 inhibitory angiogeneze); kortikosteroidní protizánětlivé léky (např. SB203580); inhibitory TNF konvertázy; anti-IL12 protilátky; interleukin-11 [viz např. *Arthritis & Rheumatism* 39, No. 9 (supplement) S286 (1996)]; interleukin-13 [viz např. *Arthritis & Rheumatism* 39, No. 9 (supplement) S308 (1996)]; inhibitory interleukinu-17 [viz např. *Arthritis & Rheumatism* 39, No. 9 (supplement) S120 (1996)]; zlato; penicillamin; chlorochin; hydroxychlorochin; chlorambucil;
 15 cyklofosfamid; cyklosporin; totální lymfoidní ozáření; anti-tymocytový globulin; anti-CD4 protilátky; CD5-toxiny; orálně podávané peptidy a kolagen; lobenzarit disodný, cytokin regulující agens (CRA) HP228 a HP466 (Houghten Pharmaceuticals, inc); ICAM-1 antimeidiátorové fosforothioátové oligodeoxynukleotidy (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); rozpustný komplementní receptor 1 (TP10; T Cell Sciences, Inc.); prednison, orgotein;
 20 glykosaminoglykan-polysulfát; minocyklin; anti-IL2R protilátky, mořské a botanické lipidy [mastné kyseliny z ryb a semen rostlin; viz např. DeLuca a spol., *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 21, 759-777 (1995)]; auranofin; fenylobutazon; meklofenamová kyselina; flufenamová kyselina; intravenózní imunoglobulin; zileuton; mykofenolová kyselina (RS-61443); tacrolimus (FK-506); sirolimus (rapamycin); amiprilose (therafektin); kladribin (2-chlordeoxyadenosin) a azaribin.

Neomezující příklady terapeutických prostředků pro zánětlivou chorobu vnitřností, se kterými může být protilátka nebo část protilátky podle vynálezu kombinována, zahrnují následující: budenosid; epidermální růstový faktor; kortikosteroidy; cyklosporin; sulfasalazin; aminosalicyláty; 6-merkaptopurin; azathioprin; metronidazol; inhibitory lipoxygenázy;
 30 mesalamin; olsalazin; balsalazid; antioxidanty; inhibitory tromboxanu; antagonisty IL-1 receptoru; anti-IL-1 β monoklonální protilátky; růstové faktory; inhibitory elastázy; pyridyl-imidazolové sloučeniny; CDP-571/BAY-10-3356 (humanizovaná anti-TNF α protilátka, Celltech/Bayer); cA2 (chimerová anti-TNF α protilátka, Centocor); 75 kD TNFR-IgG [75 kD TNF receptor-IgG fúzního proteinu, Immunex; viz např. *Arthritis & Rheumatism* 37, S295 (1994); *J. Invest. Med.* Vol. 44 235A (1996)]; 55 kD TNFR-IgG (55 kD TNF receptor-IgG fúzního proteinu, Hoffman-LaRoche); interleukin-10 (SCH 52000, Schering Plough); IL-4; agonisty IL-10 a/nebo IL-4 (např. agonistní protilátky); interleukin-11; prekursor prednisonu, dexamethasonu nebo budenosidu konjugované s glukuronidem nebo dextranem; ICAM-1 antimeidiátorové fosforothioátové oligodeoxynukleotidy (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.);
 40 rozpustný komplementní receptor 1 (TP10; T Cell Sciences, Inc.); mesalazin s pomalým uvolňováním; methotrexat; antagonisté faktoru aktivace krevních destiček (PAF); ciprofloxacin a lignokain.

Neomezující příklady terapeutických prostředků pro roztroušenou sklerózu, se kterými může být protilátka nebo část protilátky podle vynálezu kombinována, zahrnují následující: kortikosteroidy; prednison; methylprednison; azathioprin; cyklofosfamid; cyklosporin, methotrexat; 4-aminopyridin; tizanidin; interferon- β 1a (AvonexTM, Biogen); interferon- β 1b (BetaseronTM, Chiron/Berlex); Copolymer 1 (Cop-1, CopaxoneTM, Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); hyperbarický kyslík; intravenózní imunoglobulin; clabribine; CDP-571/BAY-10-3356 (humanizovaná anti-hTNF α protilátka, Celltech/Bayer); cA2 (chimerová anti-hTNF α protilátka, Centocor); 75 kD TNFR-IgG [75 kD TNF receptor-IgG fúzního proteinu, Immunex; viz např. *Arthritis & Rheumatism* 37, S295 (1994); *J. Invest. Med.* Vol. 44 235A (1996)]; 55 kD TNFR-IgG (55 kD TNF receptor-IgG fúzního proteinu, Hoffman-LaRoche); IL-10; IL-4 a agonisté IL-10 a/nebo IL-4 (např. agonistní protilátky).

Neomezující příklady terapeutických prostředků pro sepsi, se kterými může být protilátka nebo část protilátky podle vynálezu kombinována, zahrnují následující: hypertonické roztoky solanky; antibiotika, intravenózní gamma globulin, kontinuální hemofiltraci; karbapenem (např. meropenem); antagonisty cytokinu jako TNF α , IL-1 β , IL-6 a/nebo IL-8; CDP-571/BAY-10-3356 (humanizovaná anti-hTNF α protilátka, Celltech/Bayer); cA2 (chimerová anti-hTNF α protilátka, Centocor); 75 kDTNFR-IgG [75 kD TNF receptor-IgG fúzního proteinu, Immunex; viz např. *Arthritis & Rheumatism* Vol. 37, S295 (1994); *J. Invest. Med.* Vol. 44 235A (1996)]; 55 kDTNFR-IgG (55 kD TNF receptor-IgG fúzního proteinu, Hoffman-LaRoche); regulační činidla cytokinu (CRA) HP228 a HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); SK&F 107647 (nízkomolekulární peptid, SmithKline Beecham); tetravalentní guanylhydrazon CNI-1493 (Picower Institute); inhibitor cesty tkáňového faktoru (TFPI, Chiron); PHP (chemicky modifikovaný hemoglobin, APEX Bioscience); chelátory a cheláty železa včetně komplexu trojmocného železa s kyselinou diethylenetriaminpentaocetovou [DTPA iron (III), Molichem Medicines); lysofyllin (syntetická malá molekula methylxanthinu, Cell Therapeutics, Inc.); PGG-Glucan (ve vodě rozpustný β 1,3 glukan, Alpha-Beta technology); apolipoprotein A-1 rekonstituovaný s lipidy; chirální hydroxamové kyseliny (syntetické antibakteriální látky, které inhibují biosyntézu lipidu A); protilátky anti-endotoxinu; E5531 (syntetický antagonist lipidu A, Eisai America, Inc.); rBPI₂₁ (rekombinantní N-terminální fragment lidského proteinu baktericidního/permeabilitu zvyšujícího proteinu a syntetické anti-endotoxinové peptidy (SAEP, BiosYnth Research Laboratories).

Neomezující příklady terapeutických prostředků pro syndrom dechové obstrukce dospělých, se kterými může být protilátka nebo část protilátky podle vynálezu kombinována, zahrnují následující: anti-IL-8 protilátky; terapii náhrady povrchově aktivních látek; CDP-571/BAY-10-3356 (humanizovaná anti-hTNF α protilátka, Celltech/Bayer) cA2 (chimerová anti-hTNF α protilátka, Centocor); 75 kDTNFR-IgG [75 kD TNF receptor-IgG fúzního proteinu, Immunex; viz např. *Arthritis & Rheumatism* Vol. 37, S295 (1994); *J. Invest. Med.* Vol. 44 235A (1996)] a 55 kDTNFR-IgG (55 kD TNF receptor-IgG fúzního proteinu, Hoffman-LaRoche).

Farmaceutické kompozice podle vynálezu mohou obsahovat "terapeuticky efektivní množství" nebo "profylakticky efektivní množství" protilátky nebo části protilátky podle vynálezu. "Terapeuticky efektivní množství" se týká množství efektivního pro dosažení požadovaného terapeutického výsledku při dávkách a nutných časových periodách. Terapeuticky efektivní množství protilátky nebo části protilátky podle vynálezu může kolísat podle faktorů jako je stav choroby, věk, pohlaví a hmotnost jednotlivce a schopnosti protilátky nebo části protilátky vyvolat u jednotlivce požadovanou odezvu. Terapeuticky efektivní množství je také takové, při němž jakékoliv toxické nebo škodlivé účinky protilátky nebo části protilátky jsou převažovány účinky terapeuticky prospěšnými. "Profylakticky efektivní množství" se týká množství efektivního pro dosažení požadovaného profylaktického výsledku při dávkách a nutných časových periodách. Protože profylaktická dávka bývá podávána subjektu před nebo v ranějším období choroby, je typické, že profylakticky efektivní množství bude menší než terapeuticky efektivní množství.

Režim dávkování může být upraven, aby poskytoval optimum požadované odezvy (např. terapeutické nebo profylaktické odezvy). Například může být administrován jediný bolus, může být podáno několik rozdělených dávek po čase, nebo dávka může být proporcionálně snižována nebo zvyšována podle potřeb terapeutické situace. Je zvláště výhodné formulovat parenterální kompozice ve formě jednotek pro usnadnění administrace a jednotnost dávkování. Zde používaná forma jednotky dávky se vztahuje na fyzikálně samostatné celky, vhodné jako jednotkové dávky pro savčí objekty, které mají být ošetřovány; každá jednotka obsahuje předem stanovené množství účinné sloučeniny vypočtené, aby poskytovalo požadovaný terapeutický efekt ve spojení s požadovaným farmaceutickým nosičem. Specifikace pro jednotkové formy dávky podle vynálezu jsou diktovány a přímo závisí na (a) jedinečných vlastnostech účinné sloučeniny a zejména na terapeutickém nebo profylaktickém účinku, který má být dosažen a (b) omezeních sensitivity u jednotlivců, inherentních druhu namísení takové účinné sloučeniny k ošetřování.

Příkladné neomezující rozpětí pro terapeuticky nebo „profylakticky účinné množství protilátky nebo části protilátky podle vynálezu, je 10 až 100 mg, raději 20 až 80 mg a nejlépe kolem 40 mg. Je třeba poznamenat, že hodnoty dávek mohou kolísat podle typu a vážnosti stavu, v němž má dojít k úlevě. Dále je třeba pochopit, že pro každý jednotlivý subjekt by měly být časově upravovány specifické režimy dávkování podle individuální potřeby a profesionálního posouzení osoby, která podává nebo dohlíží na podávání kompozic, a že rozpětí zde uváděné dávky jsou pouze jako příklad a nejsou myšleny, aby omezovaly rozsah nebo praktikování nárokové kompozice.

V. Využití protilátek podle vynálezu

Anti-hTNF α protilátky nebo jejich části podle vynálezu mohou být svojí danou schopností vázat hTNF α využity k detekci hTNF α (např. v biologickém vzorku, jako je sérum nebo plazma) při použití konvenčního imunotestu, jako jsou testy s enzymem spojeného imunosorbentu (ELISA), radioimunotest (RIA) nebo imunohistochemie tkáně. Vynález poskytuje způsob pro detekci hTNF α v biologickém vzorku zahrnující navázání styku biologického vzorku s protilátkou nebo částí protilátky podle vynálezu a detekování buď protilátky (či části protilátky) vázané na hTNF α anebo nevázané protilátky (či části protilátky), aby se takto zjistila hTNF α v biologickém vzorku. Protilátka je přímo nebo nepřímo označena detekovatelnou substancí, aby se usnadnila detekce vázané nebo nevázané protilátky. Vhodné detekovatelné substance představují různé enzymy, prostetické skupiny, fluorescenční materiály, luminiscenční materiály a radioaktivní materiály. Příklady vhodných enzymů zahrnují křenovou pyroxidázu, alkalickou fosfatázu, β -galaktosidázu nebo acetylcholinesterázu; příklady vhodných komplexů prostetických skupin představuje streptavidin/biotin a avidin/biotin; příklady vhodných fluorescenčních materiálů jsou umbelliferon, fluorescein, fluorescein-isokyanát, rhodamin, dichlorotriazinylaminofluorescein, dansylchlorid, fykoerythrin; příkladem luminiscenčního materiálu je luminol a příklady vhodných radioaktivních materiálů jsou ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S nebo ^3H .

Alternativně k označování protilátky může být hTNF α v biologických tekutinách analyzována kompetičním imunotestem využívajícím rhTNF α standardy označené detekovatelnou substancí a neoznačenou anti-hTNF α protilátkou. Při tomto esaji se kombinují rhTNF α standardy a anti-hTNF α protilátka a stanoví se množství rhTNF α standardu vázaného na neoznačenou protilátku. Množství hTNF α v biologickém vzorku je nepřímo úměrné množství označeného hTNF α standardu vázaného na anti-hTNF α protilátku.

Pro detekci TNF α z jiných než lidských species, zejména TNF α z primátů (např. šimpanz, pavián, kosman, cynomolgus a makak), vepře a myši může být použita také D2E7 protilátka, protože D2E7 se může vázat ke každému z těchto TNF α .

Protilátky a části protilátek podle vynálezu jsou schopné neutralizovat účinnost hTNF α jak *in vitro*, tak *in vivo* (viz US patent 6090382). Navíc alespoň některé z protilátek podle vynálezu, jako D2E7, mohou neutralizovat účinnost hTNF α z jiných species. Protilátky a části protilátek podle vynálezu mohou být podle toho využity pro inhibici účinnosti hTNF α např. v kultuře buněk obsahující hTNF α u lidských subjektů nebo u jiných savčích subjektů majících TNF α , se kterým protilátka podle vynálezu křížově reaguje (např. šimpanz, pavián, kosman, cynomolgus a makak, vepř nebo myš). U jednoho provedení poskytuje vynález způsob inhibice účinnosti TNF α představující kontaktování TNF α s protilátkou nebo částí protilátky podle vynálezu tak, že je účinnost TNF α inhibována. TNF α je přednostně lidským TNF α . Například do buněčné kultury obsahující, nebo domněle obsahující TNF α , může být do kultivačního média přidána protilátka nebo část protilátky podle vynálezu, aby byla účinnost hTNF α v kultuře inhibována.

V preferovaném provedení poskytuje vynález způsoby ošetřování zdravotních potíží, při kterých je podávání anti-TNF α protilátky prospěšné, zahrnující čtrnáctidenně subkutánní administraci protilátky nebo části protilátky podle vynálezu subjektu tak, že je zdravotní potíže léčena. Při zvlášť preferovaném provedení je protilátka aplikována subkutánně ve čtrnáctidenním harmonogramu. Při jiném zejména preferovaném provedení je protilátka podávána před, během nebo po aplikaci methotrexatu. Přednostně je subjektem subjekt lidský. Alternativně může být subjektem savec exprimující TNF α , se kterým protilátka podle vynálezu reaguje křížově. Dále může ještě být subjektem savec, do něhož byl zaveden hTNF α (např. podáním hTNF α nebo exprese hTNF α transgenu). Protilátka podle vynálezu může být lidskému subjektu podávána za terapeutickými účely (diskutováno dále, níže). Mimoto kvůli veterinárním účelům nebo jako model lidské choroby na zvířeti může být protilátka podle vynálezu podávána jinému než lidskému savci exprimujícímu TNF α , se kterým protilátka reaguje křížově (např. primátovi, vepři nebo myši). Vzhledem k tomu mohou být takové modely na zvířatech užitečné pro hodnocení terapeutické účinnosti protilátek podle vynálezu (např. testování dávek a časových průběhů administrace).

Pod zde užívaným výrazem "zdravotní potíže, při které je podávání anti-TNF α protilátky prospěšné" se rozumí, že zahrnuje choroby a jiné zdravotní potíže, při kterých se prokázalo, že přítomnost TNF α u subjektu trpícího chorobou je, nebo existuje domněnka, že je, buď zodpovědná za patofyziologii choroby, nebo je faktorem, který přispívá ke zhoršování choroby, anebo kde bylo prokázáno, že jiná anti-TNF α protilátka nebo její biologicky účinná část byla úspěšně použita k léčení choroby. Tudíž zdravotní potíže, při které účinnost TNF α škodí, je potíže u které se očekává, že inhibice účinnosti TNF α uleví symptomům a/nebo progresi zdravotní potíže. Takové potíže mohou být dosvědčeny, např. zvýšením koncentrace TNF α v biologické tekutině subjektu trpícího chorobou (např. zvýšení koncentrace TNF α v séru, plazmě, synoviálním mazu atd. u subjektu), které může být detekováno např. za použití anti-TNF α protilátky, jak je shora popsáno. Existují početné příklady potíží, při nichž je účinnost TNF α na újmu. Využití protilátek a částí protilátek podle vynálezu při léčení specifických potíží je diskutováno níže dále:

A. Seps

Faktor nekrotizující tumor v patofyziologii sepse hraje nepopíratelnou roli s biologickými účinky, mezi něž patří hypotenze, myokardiální suprese, syndrom vaskulární propustnosti, nekróza orgánů, stimulace uvolňování toxických sekundárních mediátorů a aktivace kaskády srážení [viz např. Tracey K. J. a Cerami A., *Annu. Rev. Med.* 45, 491-503 (1994); Russell D. a Thompson R. C. *Curr. Opin. Biotech.* 4, 714-721 (1993)]. Podle toho lidské protilátky a části protilátek podle vynálezu mohou být využity k léčení sepse v každé její klinické situaci, včetně septického šoku, endotoxického šoku, gramnegativní sepse, a syndromu toxického šoku.

Dále navíc, anti-TNF α protilátka nebo její část podle vynálezu může být pro léčení sepse administrována spolu s jedním nebo více dalšími terapeutickými prostředky, které mohou sepsi dále zmírňovat, jako je inhibitor interleukinu-1 (jako ty, popisované v PCT publikaci WO 92/16221 a WO 92/17583), cytokin interleukin-6 (viz např. PCT publikaci WO 93/11793) nebo antagonistu faktoru aktivace krevních destiček (viz např. publikaci Evropské patentové přihlášky EP 374510).

Dodatečně je anti-TNF α protilátka nebo její část podle vynálezu v preferovaném provedení administrována lidskému subjektu v podskupině pacientů se sepsí majících v době ošetřování koncentraci IL-6 v séru nebo plazmě nad 500 pg/ml nebo přednostněji 1000 pg/ml (viz Daum L. a spol., PCT publikace WO 95/20978).

B. Autoimunitní choroby

Faktoru nekrotizujícímu tumor byla prokázána aktivní role při patofyziologii různých autoimunitních chorob. TNF α byla například prokázána účast na vyvolávání zánětu tkáně a 5
příčině destrukce kloubu při reumatoidní artritidě [viz např. Tracey a Cerami, *shora*; Arend W. P. a Dayer J-M., *Arth. Rheum.* 38, 151-160 (1995); Fava R. A. a spol., *Clin. Exp. Immunol.* 94, 261-266 (1993)]. TNF α byl také účasten na vyvolávání smrti buněčných ostrůvků a zprostředkování inzulínové rezistence při diabetes (viz např. Tracey a Cerami, *shora*; PCT publikace WO 10
94/08609). TNF α byl rovněž prokázán jako mediátor cytotoxicity vůči oligodendrocytům a indukce zánětlivých nákaz při roztroušené skleróze (viz např. Tracey a Cerami, *shora*). Chimerové a humanizované myši anti-hTNF α protilátky byly podrobeny klinickému testování pro léčbu reumatoidní artritidy [viz např. Elliott M. J. a spol., *Lancet* 344, 1125-1127 (1994); Elliott M. J. a spol., *Lancet* 344, 1105-1110 (1994); Rankin E. O a spol., *Br. J. Rheumatol.* 34, 15
334-342 (1995)].

Lidské protilátky a části protilátek podle vynálezu mohou být využity pro léčení autoimunitních chorob, zejména těch, které jsou spojeny se zánětem, včetně reumatoidní artritidy, reumatoidní spondylitis, osteoartritidy a artritické dny, alergie, roztroušené sklerózy, autoimunitní diabetes, 20
autoimunitní uveitis a nefrotického syndromu. Typické je protilátku nebo část protilátky administrovat systémově, i když pro určité nemoci může být prospěšná lokální administrace protilátky nebo části protilátky v místě zánětu (např. lokální administrace do kloubů při reumatoidní artritidě nebo topická administrace k diabetickým vředům, samotná nebo v kombinaci s cyklohexanylidenderivátem, jak je popsáno v PCT publikaci WO 93/19751).

25

C. Infekční choroby

Faktor nekrózy tumoru byl prokázán jako mediátor biologických účinků pozorovaných při různých infekčních chorobách. TNF α byl například prokázán jako mediátor zánětu mozku a 30
kapilární trombózy a poškození infarktem při malárii (viz např. Tracey a Cerami, *shora*). TNF α byl také prokázán jako mediátor zánětu mozku, při indukovaní porušení hematoencefalické bariéry, při spouštění septického šokového syndromu a při aktivaci žilního infarktu při meningitidě (viz např. Tracey a Cerami, *shora*). TNF α byl rovněž prokázán při vyvolání kachexie, stimulaci proliferace viru a mediaci poškození centrálního nervového systému při syndromu získané imunitní nedostatečnosti (AIDS) (viz např. Tracey a Cerami, *shora*). Protilátky a části protilátek podle vynálezu mohou být tedy využity k léčení infekčních chorob, včetně bakteriální meningitidy (viz např. publikaci Evropské patentové přihlášky EP 585705), cerebrální 35
malariae, AIDS a AIDS příbuzného komplexu (ARC) (viz např. publikaci evropské patentové přihlášky EP 230574), stejně jako infekce cytomegalovirem sekundární po transplantaci [viz např. Fietze E. a spol., *Transplantation* 58, 675-680 (1994)]. Protilátky a části protilátek podle 40
vynálezu mohou být také využity ke zmírnění symptomů spojených s infekčními chorobami včetně horečky a myalgie vlivem infekce (jako při chřipce) a kachexie druhotné k infekci (např. druhotné k AIDS nebo ARC).

45

D. Transplantace

Faktor nekrotizující tumor byl prokázán jako klíčový mediátor odmítání allo-štěpů a nemoci transplantát verus hostitel (GVHD) a při mediaci nepříznivé reakce, která byla pozorována, když, aby se inhibovalo odmítání ledvinových transplantátů, se použije kryší protilátka OKT3, 50
zacílená proti komplexu CD3 receptoru T buněk [viz např. Tracey a Cerami, *shora*; Eason J. D. a spol., *Transplantation* 59, 300-305 (1995); Suthanthiran M. a Strom T. B., *New Engl. J. Med.* 331, 365-375 (1994)]. Protilátky a části protilátek podle vynálezu mohou být tedy využity k inhibici odmítání transplantátů včetně odmítání allotransplantátů i xenotransplantátů a k inhibování GVHD. I když protilátka nebo část protilátky může být používána samotná, více se

preferuje užívat ji v kombinaci s jedním nebo více jinými prostředky, které inhibují imunitní odezvu proti allotransplantátů nebo inhibují GVHD. Například při jednom provedení je protilátka nebo část protilátky podle vynálezu použita v kombinaci s OKT3, aby se inhibovaly reakce, které OKT3 indukuje. Při jiném provedení je protilátka nebo část protilátky podle vynálezu použita v kombinaci s jednou nebo více protilátkami zaměřenými na jiné cíle zapojené do regulování imunitních odpovědí, např. na CD25 molekuly buněčného povrchu (α -receptor interleukinu-2), CD11a (LFA-1), CD54 (ICAM-1), CD4, CD45, CD28/CTLA4, CD80 (B7-1) a/nebo CD86 (B7-2). Při ještě jiném provedení je protilátka nebo část protilátky podle vynálezu použita v kombinaci s jedním nebo více obvyklými supresivními činidly jako je cyklosporin A nebo FK506.

E. Zhoubné bujení

Faktor nekrotizující tumor byl prokázán při vzniku kachexie, ve stimulování růstu nádoru, při zvyšování metastatického potenciálu a mediaci cytotoxicity při zhoubném bujení (viz např. Tracey a Cerami, *shora*). Podle toho protilátky nebo části protilátek podle vynálezu mohou být použity při léčbě zhoubných nádorů k inhibici růstu nádoru nebo metastáze a/nebo ke zmírnění kachexie, druhotně ke zhoubnému bujení. Protilátka nebo část protilátky může být podávána systémově nebo lokálně na místě tumoru.

F. Plicní potíže

Faktor nekrotizující tumor byl prokázán v patofyziologii syndromu dechové obstrukce dospělých, včetně stimulování leukocyt-endoteliální aktivity, zaměření cytotoxicity na pneumocyty a indukování syndromu vaskulární propustnosti (viz např. Tracey a Cerami, *shora*). Podle toho mohou být protilátky nebo části protilátek podle vynálezu použity při léčbě různých plicních potíží, včetně syndromu dechové obstrukce dospělých (viz např. PCT publikaci WO 91/04054), plicního šoku, chronické plicní zánětlivé choroby, pulmonární sarkoidózy, pulmonární fibrózy a silikózy. Protilátka nebo část protilátky může být podávána systémově nebo lokálně na povrch plic na příklad jako aerosol.

G. Střevní potíže

Faktor nekrotizující tumor byl prokázán v patofyziologii zánětlivých střevních potíží [viz např. Tracy K. J. a spol., *Science* 234, 470-474 (1986); Sun X-M. a spol., *J. Clin. Invest.* 81, 1328-1331 (1988); MacDonald T. T. a spol., *Clin. Exp. Immunol.* 81, 301-305 (1990)]. Chimerové myši anti-hTNF α protilátky byly podrobeny klinickému testování pro léčení Crohnovy choroby [Dulleman H. M. a spol., *Gastroenterology* 109, 129-135 (1995)]. Lidské protilátky nebo části protilátek podle vynálezu mohou být pro léčení střevních potíží použity rovněž, např. u idiopatické zánětlivé střevní choroby, která zahrnuje dva syndromy, Crohnovu chorobu a ulcerózní kolitidu.

H. Srdeční potíže

Protilátky a části protilátek podle vynálezu mohou být také použity k léčení různých kardiálních potíží včetně ischemie srdce (viz např. publikaci evropské patentové přihlášky EP 453898) a srdeční nedostatečnosti (slabost srdečního svalu) (viz např. PCT publikaci WO 94/20139).

I. Jiné

Protilátky a části protilátek podle vynálezu mohou být také použity k léčení různých jiných potíží, u nichž je aktivita TNF α na újmu. Příklady jiných chorob a potíží, u kterých byla v patofyziologii aktivita TNF α prokázána, a které tedy mohou být ošetřovány za použití protilátky nebo části protilátky podle vynálezu, zahrnují zánětlivé kostní potíže a chorobu kostní resorpce [viz např. Bertolini D. R. a spol., *Nature* 319, 516-518 (1986); König A. a spol., *J. Bone Miner. Res.* 3, 621-627 (1988); Lerner U.H. a Ohlin A., *J. Bone Miner. Res.* 8, 147-155 (1993) a Shankar

G. a Stern P. H., *Bone* 14, 871-876 (1993)], hepatitidu včetně alkoholické hepatitidy [viz např. McClain C. J. a Cohen D. A., *Hepatology* 9, 349-351 (1989); Felver M. E. a spol., *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 14, 255-259 (1990) a Hansen J., a spol., *Hepatology* 20, 461-474 (1994)] a virovou hepatitidu [Sheron N. a spol., *J. Hepatol.* 12, 241-245 (1991) a Hussain M. J. a spol., *J. Clin. Pathol.* 47, 1112-1115 (1994)], poruchy koagulace [viz např. van der Poli a spol., *Prog. Clin. Biol. Res.* 367, 55-60 (1991)], spáleniny [viz např. Giroir B. P. a spol., *Am. J. Physiol.* 267, H118-124 (1994) a Liu X. S. a spol., *Burns* 20, 40-44 (1994)], poškození reperfuze [(viz např. Scales W. E. a spol., *Am. J. Physiol.* 267, G1122-1127 (1994); Serrick a spol., *Transplantation* 58, 1158-1162 (1994) a Yao Y. M. a spol., *Resuscitation* 29, 157-168 (1995)], tvorbu keloidů [viz např. McCauley R. L. a spol., *J. Clin. Immunol.* 12, 300-308 (1992)], tvorbu zjizvené tkáně a horečku.

Objasnění výkresů

Obrázky 1A a 1B popisují odezvy na American College of Rheumatology 20 (ACR20) a ACR 50 u pacientů trpících reumatoidní artritidou (RA) po subkutánním dávkování protilátky D2E7 každý týden celkem po dvanáct týdnů (1A) nebo po subkutánním dávkování protilátky D2E7 a methotrexatu každý druhý týden (1B) celkem po dvacet čtyři týdnů. Data ukazují, že dávkování každý druhý týden je účinné stejně jako dávkování každý týden.

Obrázek 2 popisuje odezvy na ACR20, ACR50 a ACR70 u pacientů trpících RA po subkutánním dávkování protilátky D2E7 a methotrexatu každý druhý týden po dvacet čtyři týdnů.

Obrázky 3A a 3B popisují časové průběhy počtu bolestivých kloubů (3A) a počtu oteklých kloubů (3B) po dvacet čtyři týdnů u pacientů trpících RA po subkutánním dávkování protilátky D2E7 a methotrexatu každý druhý týden po dvacet čtyři týdnů.

Obrázek 4 popisuje výsledky krátké formy zdravotního vyšetření (SF-6) pacientů trpících RA po subkutánním dávkování protilátky D2E7 a methotrexatu každý druhý týden po dvacet čtyři týdnů. RP = fyzická role, PF = fyzická funkce, BP = tělesná bolest, GH = celkové zdraví, V = vitalita, SF = sociální činnost, RE = emoční role a ME = duševní zdraví.

Obrázek 5 popisuje procenta subjektů odpovídajících na ACR po jediné intravenózní injekci protilátky D2E7 a methotrexatu u pacientů trpících RA.

Tento vynález je dále objasňován následujícími příklady, které nejsou chápány jako omezující. Obsahy všech odvolávek, patentů a publikovaných patentových přihlášek citované všude v této přihlášce jsou tímto zahrnovány v odkazech.

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1

Ošetření anti-TNF α protilátkou Účinnost D2E7 po subkutánní administraci

V této studii bylo dvacet čtyři pacientů s aktivní RA ošetřováno v týdenních dávkách s 0,5 mg/kg D2E7 (n = 18) nebo s placebo (n = 6) subkutánními injekcemi po tři měsíce. Pacienti zúčastňující se na této studii měli před vstupem do studie střední dobu trvání choroby 10,1 roku při skóre aktivity choroby (DAS) v počtu 4,87 a průměrem 3,4 DMARD (chorobu modifikujících antireumatických léků) a znovu procházeli značnou aktivitou nemoci. Ti, kdož projeví odezvu, pokračovali v základním ošetřování s D2E7, zatímco u pacientů, u nichž odezva na 0,5 mg/kg

dávky selhala, nebo kteří ztratili DAS odezvu na 0,5 mg/kg dávky, bylo po dvanáctém týdnu studie zvýšeno dávkování subkutánní injekcí na 1 mg/kg.

První zaregistrovaní pacienti obdrželi až šedesát injekcí a byli tudíž šedesát týdnů se studovaným lékem. Účinnost subkutánního dávkování byla podobná intravenózním injekcím. Až 78 % pacientů dosáhlo DAS a ACR20 odezvu během prvních týdnů ošetřování. Subkutánní D2E7 při dávce 0,5 mg/kg/týden snížila po dvanácti týdnech ve srovnání se základní linií počet oteklých kloubů (SWJ) o 54 %, počet bolestivých kloubů (TJC) o 61 % a CPR o 39 %, zatímco ve skupině s placebo všechny parametry vzrostly. Po ukončení placebem kontrolované doby v této studii, pokračovali pacienti v ošetřování až po čtrnáct měsíců s trvalou účinností. Tyto výsledky ukazují, že subkutánní D2E7 o dávce 0,5 mg/kg/týden může být tedy bezpečně, soběstačně administrována s dobrou lokální snášenlivostí.

Administrace D2E7 a methotrexatu

V této studii pacienti obdrželi subkutánně nebo intravenózně placebo nebo D2E7 v dávce 1 mg/kg vedle jejich stále pokračujícího ošetřování MTX (methotrexatem). Do studie bylo zaregistrováno padesát čtyři pacientů a osmnáct pacientů obdrželo intravenózně D2E7 a subkutánně placebo, osmnáct pacientů obdrželo intravenózně placebo a subkutánně D2E7 a osmnáct pacientů obdrželo placebo intravenózně a subkutánně. Pacienti dostali svoji druhou dávku teprve, až když ztratili svůj status slepé odezvy, ne dříve než čtyři týdny po první dávce. Od té doby dostávali všichni pacienti čtrnáctidenně základní dávku subkutánní injekce D2E7.

Demografická charakteristika studované populace v této studii představovala průměrné trvání RA 11,1 let, před expozicí průměrně 3,6 DMARD (jiné než MTX) a průměrné DAS při vstupu do studie 4,81. Dvacátý devátý den 72 % intravenózně ošetřených pacientů a 44 % subkutánně ošetřených pacientů dosáhlo odezvy podle DAS kritéria při srovnání s pouze 28 % pacienty ošetřenými placebo (uvedeno dále na obrázku 5). Z těch, kteří se podrobili této studii 28 % placebem ošetřených pacientů vytrvalo na ACR20 odezvě do 29 dne, ve srovnání se 72 % intravenózně D2E7 ošetřenými pacienty a 67 % subkutánně D2E7 ošetřenými pacienty, kteří udržovali své odezvy mezi jedním a třemi měsíci.

Příklad 2

Celková tělesná dávka subkutánně administrované anti-TNF α protilátky
Subkutánní administrace D2E7 týdně

V této studii bylo zaregistrováno sto osmdesát čtyři pacientů s RA a bylo určeno stanovit optimální celkovou tělesnou dávku subkutánně podávaného D2E7. Pacienti byli náhodně vybráni a dostávali buď 20, 40 nebo 80 mg D2E7 anebo placebo týdně po 12 týdnů, a po tomto čase byli placebem ošetření pacienti naslepo převedeni na 40 mg D2E7/týden.

Přibližně 49 % pacientů dosáhlo ACR20 při 20 mg, 55 % pacientů dosáhlo ACR20 při 40 mg a 54 % pacientů dosáhlo ACR20 při 80 mg, zatímco pouze 10 % pacientů přijímajících placebo dosáhlo ACR20 (uvedeno dále na obrázku 1A). Přibližně 23 % pacientů dosáhlo ACR50 při 20 mg, 27 % pacientů dosáhlo ACR50 při 40 mg a 20 % pacientů dosáhlo ACR50 při 80 mg, a pouze 2 % pacientů přijímajících placebo dosáhlo ACR50. Tato data ukazují, že subkutánní D2E7, zvláště při dávce 40 mg/týden vyvolává dobrou odezvu.

Příklad 3

Čtrnáctidenní subkutánní administrace anti-TNF α protilátky
Subkutánní administrace D2E7 čtrnáctidenně

Byly zkoumány klinické efekty, bezpečnost, imunogenicita a tolerance RA pacientů s parciální odezvou na MTX po každém druhém týdnu po subkutánních (s. c.) injekcích placebo nebo D2E7 při několika úrovních dávek po dvacet čtyři týdnů ve spojení s pokračujícím ošetřováním s MTX.

5 Provedení studie

Byla provedena placebem kontrolovaná, dvojmo naslepo, randomizovaná, mnohacentrická studie u pacientů, u nichž byla nedostatečná účinnost nebo snášenlivost MTX. V průběhu pokusu pokračovali pacienti při stabilní dávce MTX v rozsahu dávek specifikovaném v započítávaných kritériích popisovaných níže.

Tato studie sestává ze dvou částí: 1) "vymývací periody" čtyř týdnů před podáním první dávky medikace, přičemž během této doby byly odstraněny DMARD (s výjimkou MTX); a 2) "placebem kontrolované periody", přičemž během této doby byli pacienti randomizováni do jedné ze čtyř skupin po šedesáti sedmi pacientech, kteří obdrželi placebo, 20, 40 nebo 80 mg D2E7 (jako celkovou tělesnou dávku) podávané každý druhý týden s. c. po 24 týdnů. Každá dávka léku při studii byla podávána jako dvě s. c. injekce, každá po 1,6 ml. První dávka byla pacientovi administrována zdravotním personálem jako součást pacientova tréninku. Následující dávky byly administrovány samotným pacientem při studii za přímého dohledu školeného personálu po první čtyři týdny. Poté byly dávky administrovány mimo dějiště studie pacientem, školeným subjektem určeným pacientem nebo zdravotnickým personálem. Medikace pro čtyři nebo pět týdnů byla rozdělována pokaždé po klinickém ohodnocení. Pacienti byli sériově prohlíženi v prvním, druhém, třetím, čtvrtém, šestém, osmém, dvanáctém a dvacátém čtvrtém týdnu studie s prohlídkami kloubů, jež byly prováděny inkognito konzultantem nezávislým na ošetřujícím lékařem.

V této studii bylo zaregistrováno dvě stě sedmdesát jedna pacientů s RA. Populace studie zastupovala od umírněné do silné RA v populaci Severní Ameriky: přibližně ze 70 % ženskou populaci a převážně starší čtyřiceti let. Populace byla zvolena pomocí předem stanovených započítávaných a vylučovaných kritérií, která jsou zkušeným odborníkům známa, např. pacient musí získat diagnózu RA, jak je definována kritérii American College of Rheumatology (ACR) (uvedeno dále v Příloze A) revidovanými v roce 1967.

Obrázky 1 B a 2 až 4 ukazují, že subkutánní, čtrnáctidenní ošetřování D2E7 kombinované s methotrexatem, bylo ve snižování příznaků a symptomů RA ve dvaceti čtyřech týdnech výrazně lepší než placebo. Všechny tři dávky D2E7 byly statisticky signifikantně účinnější než placebo podávané týdně. Dále navíc, D2E7 při 40 mg a 80 mg má lepší účinnost než 20 mg dávka.

40 Ekvivalenty

Zkušením odborníci připustí nebo jsou schopni zjistit mnohé ekvivalenty ke zde popisovaným specifickým provedením, když není užíváno nic víc než rutinní experimentování. O takových ekvivalentech se má za to, že jsou zahrnuty v následujících nárocích.

ACR definice RA

Klasifikační soubor kritérií a funkcí pro reumatoidní artritidu (RA) z roku 1987

<i>Kriterium</i>	<i>Definice</i>
1. Arthritis 3 nebo více oblastí kloubu	Nejméně 3 oblasti kloubu měly současně otok měkkých tkání nebo výpotek (nejen samotné přerůstání kostí), zjištěné lékařem. 14 možných oblastí kloubů jsou levé nebo pravé PIP, MOP, zápěstí, loket, koleno, kotník a MTP klouby.
2. Arthritis kloubů ruky Zápěstí MCP MCP nebo zápěstí MCP a zápěstí	Otok měkkých tkání nebo výpotek (nejen samotné přerůstání kostí) ve specifikované oblasti, zjištěný lékařem. Kde jsou specifikovány 2 oblasti muselo být postižení současné.
3. Symetrický otok (arthritis)	Současné postižení týchž kloubních oblastí (jak je definováno pod 1. na obou stranách těla (bilaterální zahrnutí PIP, MCP nebo MTP je přípustné bez absolutní symetrie)
4. Reumatoidní faktor séra	Demonstrace abnormálních množství reumatoidního faktoru séra jakoukoliv metodou, pro kterou byl výsledek pozitivní u < 5 % normálních kontrolních subjektů.
5. Radiografické změny reumatoidní artritidy	Radiografické změny typické pro reumatoidní artritidu na radiografech posteroanteriorní ruky a zápěstí, které musí zahrnovat eroze nebo nepochybné dekalifikace kostí lokalizované uvnitř nebo nejzřetelněji přilehlé poškozeným kloubům (Samotné změny osteoartritidy nekvalifikují)

Říká se, že pacient má RA, pokud je zahrnut do jedné z 5 RA podskupin uvedených v tabulce 7 a má lékařem stanovenou klinickou diagnózu. Kritéria 1, 2 a 3 musela být přítomná nejméně 6 týdnů.

Arthritis and Rheumatism, Vol. 31, No. 2 (březen 1988)

SEQ ID NO:1:

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

SEQ ID NO:2:

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

SEQ ID NO:3:

Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Xaa
 1 5

Příloha B

SEQ ID NO:4:

Val	Ser	Tyr	Leu	Ser	Thr	Ala	Ser	Ser	Leu	Asp	Val
1					5					10	

SEQ ID NO:5:

Ala	Ala	Ser	Thr	Leu	Gln	Ser
1					5	

SEQ ID NO:6:

Ala	Ile	Thr	Tyr	Asn	Ser	Gly	Ile	Ile	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Glu
1				5					10					15	

Gly

SEQ ID NO:7:

Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Arg	Asn	Tyr	Leu	Ala
1				5					10	

SEQ ID NO:8:

Asp	Tyr	Ala	Met	Val
1				5

SEQ ID NO:9:

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

SEQ ID NO:10:

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Glu Gly Arg Phe Ala Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Gln Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Lys Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asn Trp Gly
 100 105 110
 Glu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

SEQ ID NO:11:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Ala
 1 5

SEQ ID NO:12:

Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala
 1 5

SEQ ID NO:13:

Gln Lys Tyr Glu Arg Ala Pro Tyr Thr
 1 5

SEQ ID NO:14:

Gln Lys Tyr Ser Ser Ala Pro Tyr Thr
 1 5

SEQ ID NO:15:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Thr
 1 5

SEQ ID NO:16:

Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr

1 5

SEQ ID NO:17:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Tyr
1 5

SEQ ID NO:18:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Asn
1 5

SEQ ID NO:19:

Gln Lys Tyr Thr Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

SEQ ID NO:20:

Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Asn
1 5

SEQ ID NO:21:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Ala Tyr Ser
1 5

SEQ ID NO:22:

Gln Gln Tyr Asn Ser Ala Pro Asp Thr
1 5

SEQ ID NO:23:

Gln Lys Tyr Asn Ser Asp Pro Tyr Thr
1 5

SEQ ID NO:24:

Gln Lys Tyr Ile Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

SEQ ID NO:25:

Gln Lys Tyr Asn Arg Pro Pro Tyr Thr
1 5

SEQ ID NO:26:

Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala
1 5

SEQ ID NO:27:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asn
1 5 10

SEQ ID NO:28:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Lys
1 5 10

SEQ ID NO:29:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Tyr
1 5 10

SEQ ID NO:30:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asp
1 5 10

SEQ ID NO:31:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Phe Ser Leu Asp Tyr
1 5 10

SEQ ID NO:32:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu His Tyr
1 5 10

SEQ ID NO:33:

Ala Ser Phe Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Glu Tyr
1 5 10

SEQ ID NO:34:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Glu Tyr
1 5 10

SEQ ID NO:35:

Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Asn
1 5 10

SEQ ID NO:36:

GACATCCGGA TGACCGAGTC TCCATCCCTCC CTCTCTGCAAT CTCTAGGGGA CAGAGTCACC	60
ATGACTTATC GAGCAAGTCA GGGCATCGA AATTACTTAG CTTGGTATCA GCGAAGCCA	120
GGGAGGTC CTAGCTCTCT GATCTTCTCT GCTCCACTT TGCATTCAGG GTTCCATCT	180
CGTTCACTG GCGTGGATC TGGAGAGAT TTGATCTCT CCAACAGCAG CTACAGCCT	240
GAAGATCTTC GAATTATTA CTCTCAAGG GATAACGTC CAGCTATAC TTTTACAGG	300
GCGATCTGAG TCGCATCA A	321

SEQ ID NO:37:

GAGTTCAGC TGGTGGAGTC TGGGGAGGC TTGGTACAG CCGGAGCTC CTGAGACTC	60
TCTGTGCGG CCTCTGATT CAGCTTAT GATTAGCCA TGACTGCTT CCGAGACTT	120
CCAGGAGAG GCTGGGATG GCTCTCACT ATCACTGCA ATATGCTCA CATAGACTAT	180
GCGAGCTTG TGGAGGCGA ATTGAGTTC TCGAGAGCA AGCTGAGAA CTCTCTGAT	240
..TGGAGCA AGCTCTGAG AGCTGAGAT AGGCGCTAT ATTCTGTC GAGAGCTCG	300
TACTTAGCA CTGCGCTGTC CTCTGACTT TGGGGCAGG CTACCTCTT CAGCGCTCT	360
AGT	383

Přehled sekvencí

<110> Abbott Laboratories (Bermuda) Ltd. et al.

<120> ZPŮSOBY ADMINISTRACE anti-TNF α PROTILÁTEK

<130> SBI-168PC

<140> PCT/US82/17790

<141> 2002-06-05

<150> 60/296961

<151> 2001-06-08

<160> 37

<170> Rychlá SEQ pro Windows verze 4.0

<210> 1

<211> 107

<212> FRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Mutovaná lidská protilátka

<220>

<223> Mutovaná lidská protilátka

<400> 1

```

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

```

<210> 2

<211> 121

<212> FRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Mutovaná lidská protilátka

<400> 2

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20           25           30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

```

```

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

```

<210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Mutovaná lidská protilátka
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> {9}
 <223> Xaa = Thr or Ala

<400> 3
 Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Xaa
 1 5

<210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Mutovaná lidská protilátka
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> {12}
 <223> Xaa = Tyr or Asn

<400> 4
 Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Xaa
 1 5 10

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Mutovaná lidská protilátka

<400> 5
 Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Umělá sekvence

<220>

<223> Mutovaná lidská protilátka

<400> 5
 Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Glu
 1 5 10 15
 Gly

<210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Umělá sekvence

<220>

<223> Mutovaná lidská protilátka

<400> 7
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 8
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Umělá sekvence

<220>

<223> Mutovaná lidská protilátka

<400> 8
 Asp Tyr Ala Met His
 1 5

<210> 9
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Umělá sekvence

<220>

<223> Mutovaná lidská protilátka

<400> 9
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr
 85 90 95
 Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Gln Ile Lys
 100 105

<215> 10
 <215> 121
 <215> FRT
 <215> Umělá sekvence

<220>
 <220> Mutovaná lidská protilátka

<400> 10
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Glu Gly Arg Phe Ala Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Trp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Lys Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asn Asn Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<215> 11
 <215> 9
 <215> FRT
 <215> Umělá sekvence

<220>
 <220> Mutovaná lidská protilátka

<400> 11
 Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Ala
 1 5

<215> 12
 <215> 9
 <215> FRT
 <215> Umělá sekvence

<220>
 <220> Mutovaná lidská protilátka

<400> 12
 Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala
 1 5

<215> 13
 <215> 1

<211> PRT
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Mutovaná lidská protilátka

<400> 11
 Gln Lys Tyr Gln Arg Ala Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Mutovaná lidská protilátka

<400> 11
 Gln Lys Tyr Ser Ser Ala Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Mutovaná lidská protilátka

<400> 15
 Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Mutovaná lidská protilátka

<400> 16
 Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Mutovaná lidská protilátka

<400> 17
 Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Tyr
 1 5

```

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Mutovaná lidská profilátka

<400> 18
Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Asn
 1                      5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Mutovaná lidská profilátka

<400> 19
Gln Lys Tyr Thr Ser Ala Pro Tyr Thr
 1                      5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Mutovaná lidská profilátka

<400> 20
Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Asn
 1                      5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Mutovaná lidská profilátka

<400> 21
Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Ala Tyr Ser
 1                      5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Mutovaná lidská profilátka

```

<400> 22
 Gln Gln Tyr Asn Ser Ala Pro Asp Thr
 1 5

<210> 23
 <211> 3
 <212> FRT
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Mutovaná lidská protislátka

<400> 23
 Gln Lys Tyr Asn Ser Asp Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 24
 <211> 9
 <212> FRT
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Mutovaná lidská protislátka

<400> 24
 Gln Lys Tyr Ile Ser Ala Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 25
 <211> 9
 <212> FRT
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Mutovaná lidská protislátka

<400> 25
 Gln Lys Tyr Asn Arg Pro Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 26
 <211> 9
 <212> FRT
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Mutovaná lidská protislátka

<400> 26
 Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala
 1 5

<210> 27
 <211> 12
 <212> FRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Mutovaná lidská protilátka

<400> 27

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asp
1 5 10

<210> 28

<211> 12

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Mutovaná lidská protilátka

<400> 28

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Lys
1 5 10

<210> 29

<211> 12

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Mutovaná lidská protilátka

<400> 29

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 30

<211> 12

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Mutovaná lidská protilátka

<400> 30

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asp
1 5 10

<210> 31

<211> 12

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Mutovaná lidská protilátka

<400> 31

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Phe Ser Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 32
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Mutovaná lidská protilátka

<400> 32
 Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu His Tyr
 1 5 10

<210> 33
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Mutovaná lidská protilátka

<400> 33
 Ala Ser Phe Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Glu Tyr
 1 5 10

<210> 34
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Mutovaná lidská protilátka

<400> 34
 Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Glu Tyr
 1 5 10

<210> 35
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Mutovaná lidská protilátka

<400> 35
 Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Asn
 1 5 10

<210> 36
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Mutovaná lidská protilátka

<400> 36

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtagggga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcaagtca gggcatcaga aattacttag cctgggtatca gcaaaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcattccactt tgcaatcagg ggtcccatct 180
cggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctacagcct 240
gaagatgttg caacttatta ctgtcaaagg tataaccgtg caccgtatac ttttggccag 300
gggaccaagg tggaatcaa a                                     321

```

<210> 37

<211> 363

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Mutovaná lidská protilátka

<400> 37

```

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ccggcaggtc cctgagactc 60
tctctgtcgg cctctggatt cacttttgat gattatgcca tgcactgggt ccggcaagct 120
ccagggaagg gcctggaatg ggtctcagct atcacttgga atagtgggtca catagactat 180
gcggactctg tggagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcasatga acagtctgag agctgaggat acggccgtat attactgtgc gaaagtctcg 300
taccttagca ccgcgtcttc ccttgactat tggggccaag gtaccctgggt caccgtctcg 360
agt                                     363

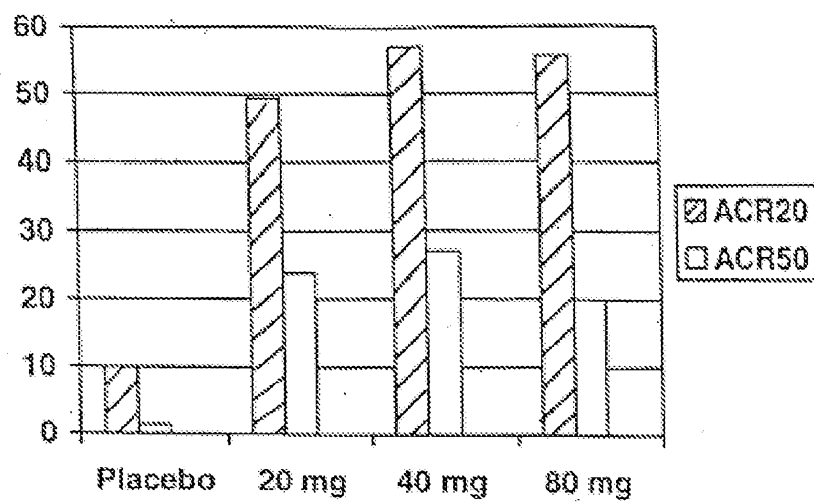
```

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Použití izolované lidské anti-TNF α protilátky, kde uvedená protilátka
- a. obsahuje variabilní oblast lehkého řetězce (LCVR) s CDR3 doménou obsahující sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 3, CDR2 doménou obsahující sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 5 a CDR1 doménou obsahující sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 7 a
- 10 b. obsahuje variabilní oblast těžkého řetězce (HCVR) s CDR3 doménou obsahující sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 4, CDR2 doménou obsahující sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 6 a CDR1 doménou obsahující sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 8,
- 15 pro výrobu léčiva pro léčbu revmatoidní artritidy u lidského subjektu, kde uvedené léčivo je upraveno pro subkutánní podávání, kde dávkování je 40 mg podle kontinuálního režimu s intervalem 13 až 15 dní každý druhý týden a kde uvedené léčivo je pro podávání v kombinaci s dalším terapeutickým činidlem, kterým je methotrexát.
- 20 2. Použití podle nároku 1, kde uvedená protilátka má variabilní oblast lehkého řetězce (LCVR) obsahující sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 1 a variabilní oblast těžkého řetězce (HCVR) obsahující sekvenci aminokyselin SEQ ID NO: 2.
3. Použití podle nároku 1 nebo 2, kde uvedená protilátka má konstantní oblast těžkého řetězce IgG1.
- 25 4. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, kde uvedenou protilátkou je D2E7.
5. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, pro léčbu poškození kloubů při revmatoidní artritidě.
- 30 6. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5, kde uvedené léčivo je ve formě předplněné injekční stříkačky.

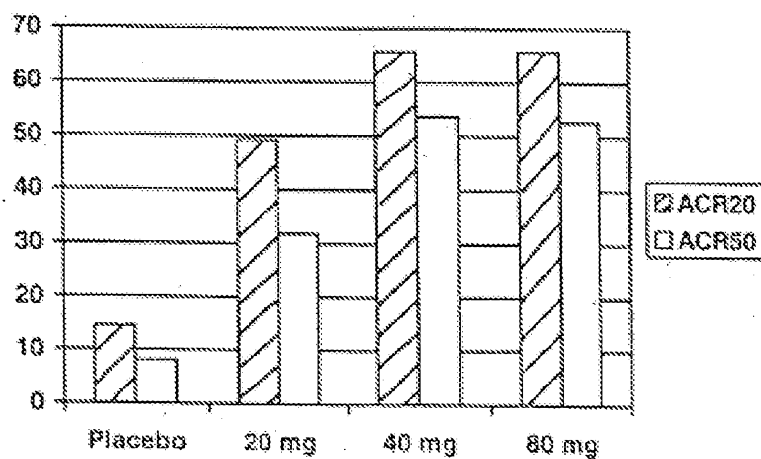
6 výkresů

35



Studie DE007

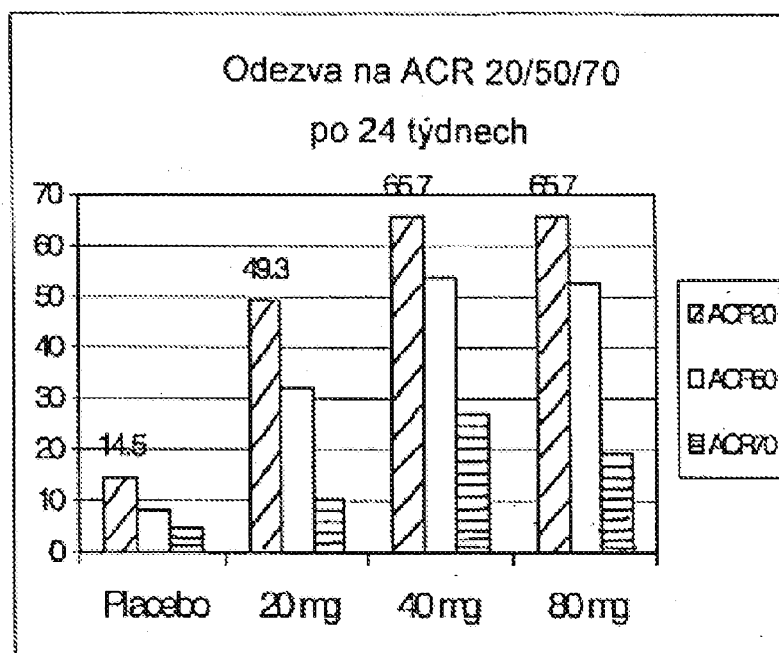
Dávkování každý týden



Studie DE009

Dávkování každý druhý týden

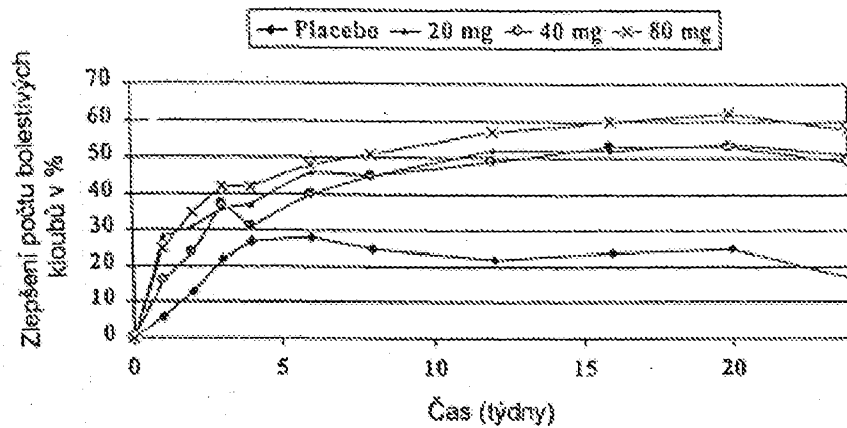
Obr. 1



Obr. 2

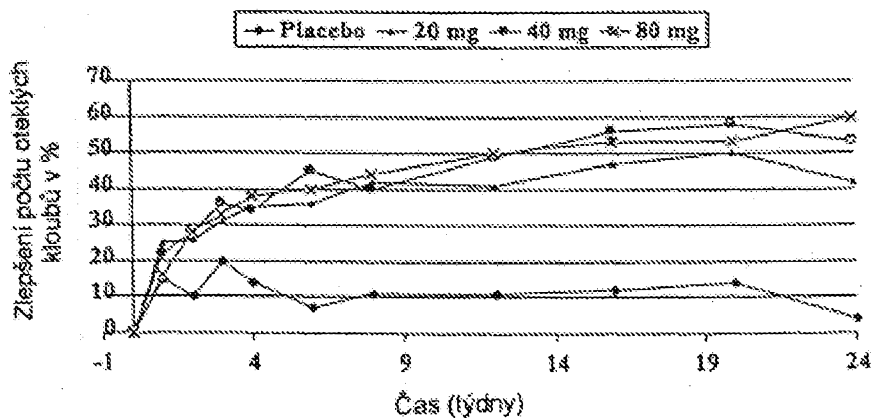
A

Průběh počtu bolestivých kloubů po 24 týdnech



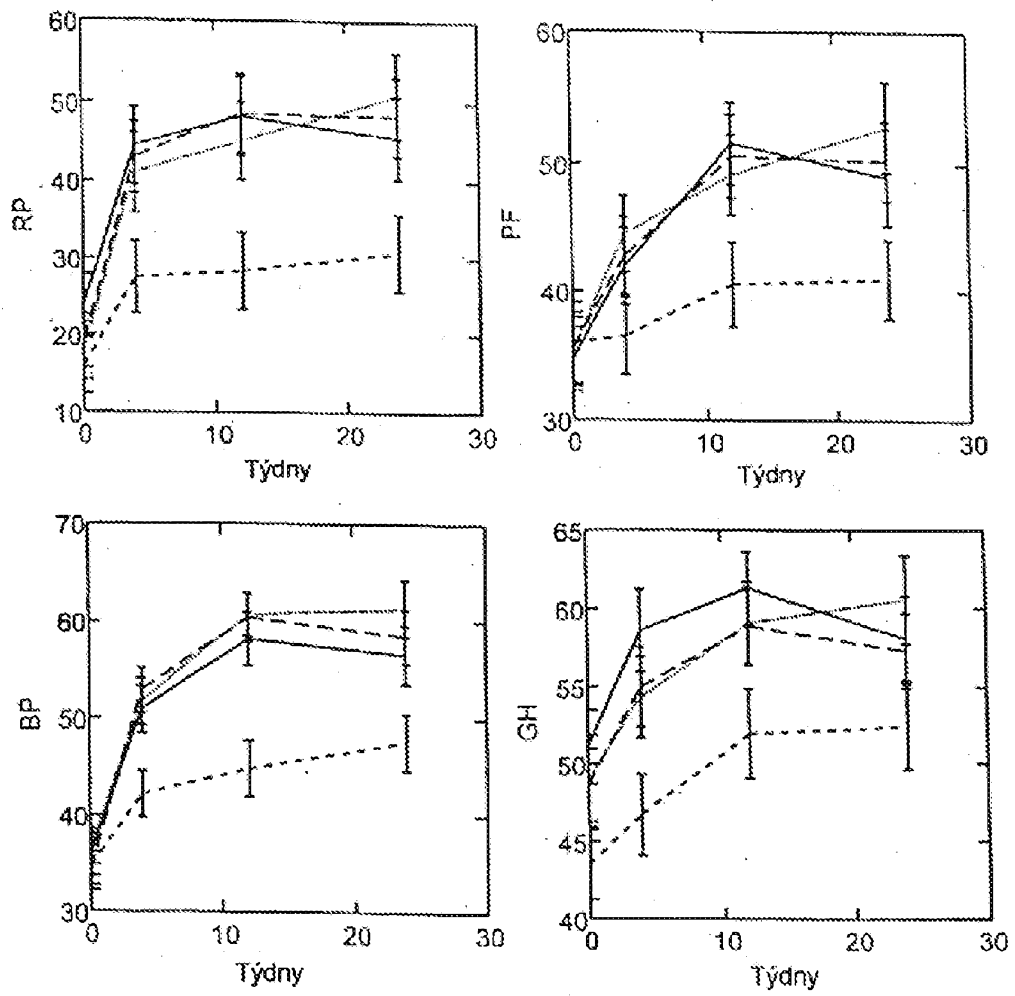
B

Průběh počtu oteklých kloubů po 24 týdnech

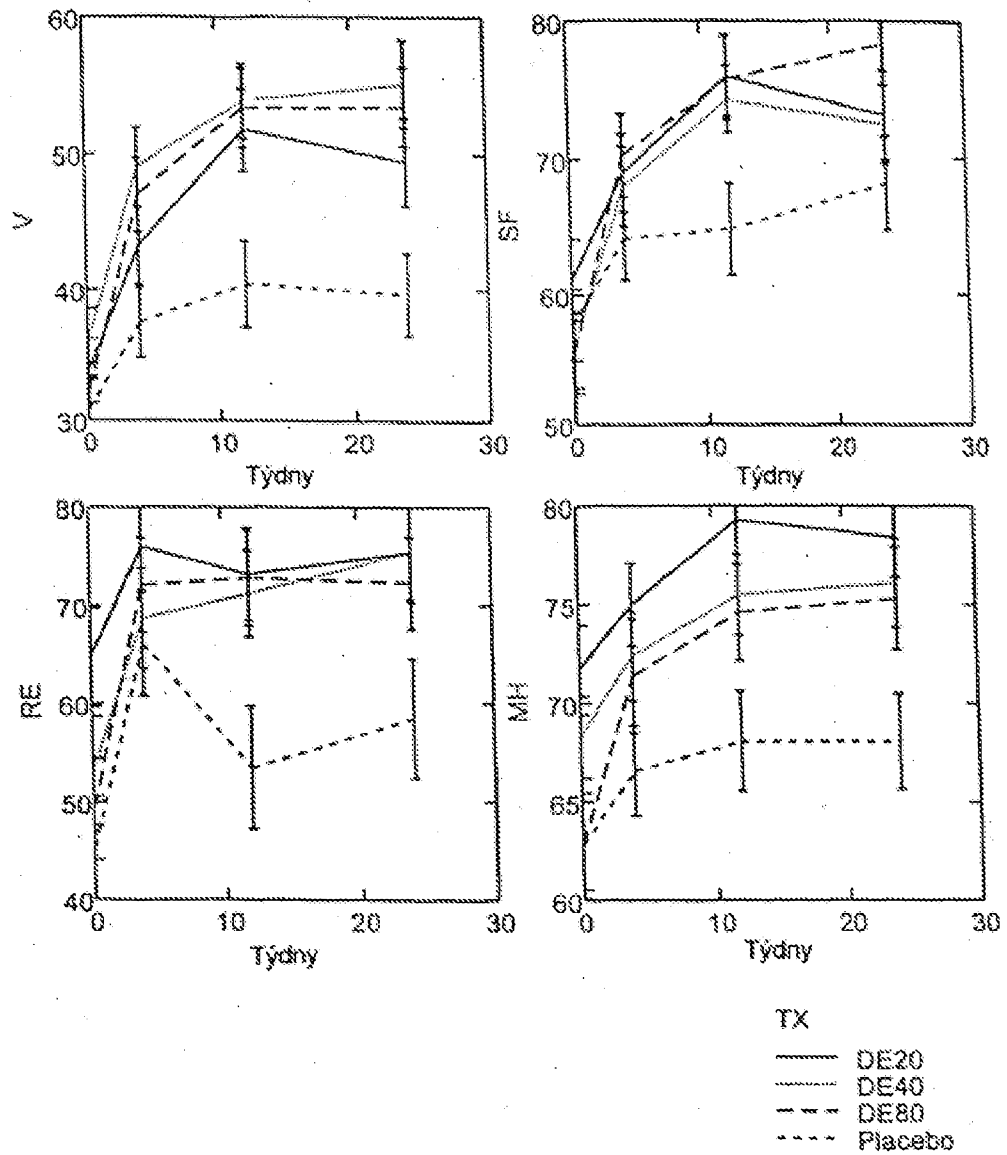


Obr. 3

STUPNICE SF-36

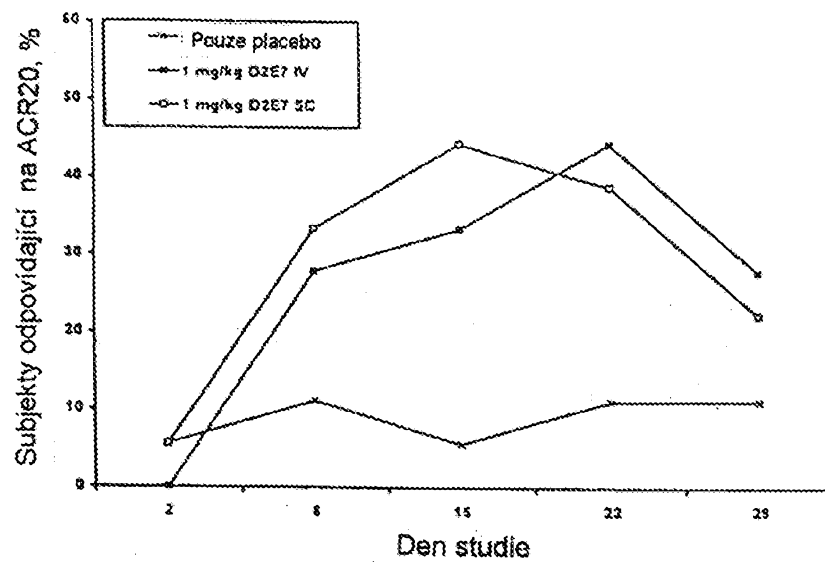


Obr. 4



Obr. 4

**Procenta subjektů odpovídajících na ACR20 po jediné
i. v. injekci D2E7 a/nebo placebo (DE010)**



Obr. 5