

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **015860**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2011.12.30

(21) Номер заявки
200801071

(22) Дата подачи заявки
2006.10.05

(51) Int. Cl. *C12P 21/06* (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ АНТАГОНИСТА НЕЙТРОКИНА-АЛЬФА

(31) 60/725,625; 60/725,626; 60/725,627; 60/725,629;
60/725,628; 60/735,964; 60/735,988; 60/735,963;
60/735,967; 60/735,987; 60/776,665; 60/776,660;
60/776,658; 60/776,664; 60/776,659; 60/781,387;
60/787,557; 60/797,351; 60/797,360; 60/814,869;
60/814,870; 60/815,559; 60/815,558; 60/815,827;
60/834,152; 60/834,150

(32) 2005.10.13; 2005.10.13; 2005.10.13; 2005.10.13;
2005.10.13; 2005.11.14; 2005.11.14; 2005.11.14;
2005.11.14; 2005.11.14; 2006.02.27; 2006.02.27;
2006.02.27; 2006.02.27; 2006.03.13;
2006.03.31; 2006.05.04; 2006.05.04; 2006.06.20;
2006.06.20; 2006.06.22; 2006.06.22; 2006.06.23;
2006.07.31; 2006.07.31

(33) US

(43) 2008.10.30

(86) PCT/US2006/038756

(87) WO 2007/142667 2007.12.13

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ХЬЮМАН ДЖЕНОМ САЙЕНСИЗ,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Чеврир Марк, Фримут Уилльям,
Чжун Чженшао, Оденхеймер Дэниел,
Перкинс Мелисса Д. (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) BRAM et al. US Patent 5969102, issued 19
October 1999 (19.10.1999)
RUBEN et al. US 2003/0223996 A1, published
4 December 2003 (04.12.2003)
GROSS et al. WO 200040716 A2, published 13
July 2000 (13.07.2000)
GROSS et al. WO 200238766, Published 16
may 2002 (16.05.2002)
Arthritis and Rheumatism, Volume 50(11),
published November 2004, pages 3418-3426
LOONEY R.J. Rheumatology, Volume 44,
Supplement 2, pages ii13-ii17

(57) Настоящее изобретение относится к способам и композициям для применения в целях лечения пациентов с положительным по аутоантителам заболеванием. В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, который обладает титром ANA 1:80 или выше и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл в его/ее плазме или сыворотке крови, включающему введение терапевтически эффективного количества иммуномодулирующего средства, такого как антагонист нейтрокина-альфа. Кроме того, предусмотрен способ снижения частоты введения и/или количества кортикостероида у пациента. В предпочтительных вариантах осуществления пациент обладает системной красной волчанкой. Также предусмотрены способы определения наличия ответа на лечение у пациента с волчанкой.

B1**015860****015860****B1**

Предпосылки изобретения

Белок нейтрокина-альфа (SEQ ID NO: 2) является членом семейства лигандов TNF, который обладает идентичностью аминокислотной последовательности с APRIL (28,7%, SEQ ID NO: 4), TNF α (16,2%) и лимфотоксином- α (LT α) (14,1%) (Moore, et al., (1999) Science 285:260-263). Нейтрокин-альфа известен в научной и патентной литературе под многими названиями, включая стимулятор В-лимфоцитов (BLyS), активирующий фактор В-клеток (BAFF), TNF- и ApoL-связанный экспрессируемый лейкоцитами лиганд-1 (TALL-1) (Moore, et al., (1999) Science 285:260-263; Schneider et al., (1999) J. Exp. Med. 189:1747-1756 и Khare et al., (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. 97:3370-3375). По официальной номенклатуре нейтрокин-альфа представляет собой член суперсемейства фактора некроза опухоли (лиганд) 13В (TNFSF13b). Полноразмерный ген нейтрокина-альфа кодирует полипептид из 285 аминокислот, который обладает трансмембранным доменом между аминокислотами 47 и 73, которому предшествует негидрофобная последовательность, свойственная мембраносвязанным белкам II типа. Аналогично другим членам семейства TNF, нейтрокин-альфа функционирует в качестве тримерного белка. При экспрессии нейтрокина-альфа на поверхности клетки, внеклеточный домен отщепляется по 134 аминокислоте с высвобождением биологически активного тримера.

Известно, что нейтрокин-альфа связывается с тремя различными рецепторами суперсемейства рецепторов для фактора некроза опухоли. Они представляют собой трансмембранную активирующую и взаимодействующую с CAML молекулу (TACI, регистрационный номер GenBank AAC51790, SEQ ID NO: 6), рецептор для фактора активации В-клеток, антиген созревания В-клеток (BCMA, регистрационный номер GenBank NP_001183 SEQ ID NO: 8) и (BAFF-R, регистрационный номер GenBank NP_443177 SEQ ID NO: 10) (Gross, et al., (2000) Nature 404:995-999; Thompson et al., (2001) Science 293:2108-2111 и Yan et al., (2000) Nature Immunol. 1:252-256). Экспрессия рецепторов, в основном, ограничена В-лимфоцитами (Moore, et al., (1999) Science 285:260-263). Полагают, что большая часть эффектов нейтрокина-альфа опосредуется BAFF-R вследствие выраженных дефектов в В-клеточных отделах у мышей с дефектной экспрессией нейтрокина-альфа или экспрессией BAFF-R, которые не наблюдаются у мышей, дефицитных по TACI или BCMA (Schieman, et al., (2001) Science 292:2111-2114; Gross et al., (2001) Immunity 15:289-302 и Yan et al., (2000) Nature Immunol. 1:252-256).

Когда белок нейтрокина-альфа оценивали *in vitro* и *in vivo*, было показано, что нейтрокин-альфа обеспечивает пролиферацию, дифференцировку и выживание В-клеток. Кроме того, было показано, что нейтрокин-альфа также оказывает некоторый эффект на Т-клетки (MacKay et al., (1999) J. Exp. Med. 190:1697-1710; Huard et al., (2001) J. Immunol. 167:6225-6231; Huard et al., (2004) Int. Immunol. 16:467-475; Ng et al., (2004) J. Immunol. 173:807-817). Мыши, которых получали способами инженерии для трансгенной сверхэкспрессии нейтрокина-альфа, обладали повышенными количествами периферических В-клеток и повышенными концентрациями иммуноглобулинов в сыворотке. Кроме того, трансгенные по нейтрокину-альфа мыши обладали аутоиммунным фенотипом, сходным с фенотипом при системной красной волчанке человека, включающим образование аутоантител и симптомы, ассоциированные с гломерулонефритом (Moore, et al., (1999) Science 285:260-263; MacKay, et al., (1999) J. Exp. Med. 192:129-135). Более поздние исследования показали, что уровни нейтрокина-альфа в сыворотке и/или синовиальной жидкости также повышены у пациентов с аутоиммунными заболеваниями, такими как системная красная волчанка, ревматоидный артрит и синдром Шегрена (Cheema et al., (2001) Arthritis Rheum. 44:1313-1319; Groom et al., (2002) J. Clin. Invest. 109:59-68; Mariette et al., (2003) Ann. Rheum. Dis 62:168-171). Таким образом, в научном сообществе существует распространенное мнение, что антагонисты нейтрокина-альфа обладают терапевтическим потенциалом в отношении лечения аутоиммунных заболеваний.

Системная красная волчанка (SLE или "волчанка") представляет собой аутоиммунное заболевание, симптомы которого являются чрезвычайно гетерогенными. Современный стандарт диагностики пациента SLE включает 11 критериев: (1) высыпание в области скуловой кости по типу "бабочки", (2) дискоидное высыпание, (3) чувствительность к свету, (4) язвы полости рта, (5) артрит, (6) серозит, (7) нарушение почек, (8) неврологическое нарушение, (9) гематологическое нарушение, (10) иммунологическое нарушение и (11) наличие противоядерного антитела. Эти критерии разъяснены более подробно в Tan et al., (1982) Arthritis Rheum. 25:1271-1277 и Hochberg et al., Arthritis Rheum. (1997) 40:1725, которые включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме. Лицу, обладающему любыми 4 из этих одиннадцати критериев, может быть поставлен диагноз SLE. Таким образом, индивиды, обладающие клиническим диагнозом SLE, могут обладать перекрывающимися симптомами. Более того, многие симптомы волчанки перекрываются с симптомами других заболеваний. Например, ревматоидный артрит, полимиозит-дерматомиозит, системная склеродермия (или склеродермия), синдром Шегрена и различные формы васкулита обладают общими симптомами с волчанкой, включая один или более из следующих признаков: наличие аутоантител, включая противоядерные антитела и антитела против дцДНК, боль и распухание суставов и кожная сыпь, и вовлечение органов. Таким образом, на практике часто трудно поставить точный диагноз пациентам с волчанкой и пациентам с другим сходным заболеванием. Дополнительные факторы, которые приводят к трудности диагностирования волчаночного заболевания, вклю-

чают тот факт, что заболевание не развивается быстро; вместо этого у пациентов происходит постепенное накопление симптомов с течением времени. Кроме того, SLE представляет собой заболевание с переменной активностью у пациента. Иногда заболевание является бессимптомным, тогда как в другое время пациенты испытывают увеличение количества и/или тяжести их симптомов, в эпизоде "обострения". В заключение, не существует ни одного лабораторного теста, который окончательно диагностирует волчанку. Таким образом, в данной области существует необходимость в возможности определения подгрупп пациентов с волчанкой с конкретными симптомами и в проведении корреляций между этими подгруппами пациентов и способами лечения, которые с наибольшей вероятностью принесут пользу пациентам в этих подгруппах.

В настоящей заявке идентифицированы конкретные подгруппы пациентов с аутоиммунным заболеванием, которые с большей вероятностью получают пользу от лечения иммуномодулирующими средствами.

Сущность изобретения

В клиническом испытании 2 фазы было выявлено, что лечение пациентов с волчанкой посредством антитела, которое нейтрализует белок нейтрокина-альфа, вводимого в качестве внутривенной инфузии на 0, 14, 28 сутки, а затем каждые четыре недели до 52 недели, значительно смягчает обусловленные волчанкой симптомы в подгруппе пациентов, обладающих титром ANA 1:80 или выше и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл в его/ее плазме или сыворотке крови (см. пример 1). Удивительно, статистически значимое улучшение клинических результатов, определяющих активность заболевания (такое как снижение показателя SELENA SLEDAI, разъясненного более подробно ниже) было получено только в подгруппе пациентов, в противоположность всей совокупности пациентов, включенных в клиническое испытание. Таким образом, настоящее изобретение относится к идентификации подгрупп пациентов, которые обладают наибольшей вероятностью ответа на лечение иммуномодулирующим средством, таким как антагонист нейтрокина-альфа.

Таким образом, в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, который обладает титром ANA 1:80 или выше и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл в его/ее плазме или сыворотке крови, включающему введение терапевтически эффективного количества иммуномодулирующего средства.

Иммуномодулирующие средства описаны более подробно ниже. В конкретном варианте осуществления иммуномодулирующее средство представляет собой антагонист нейтрокина-альфа, включая, но не ограничиваясь ими, антитело против нейтрокина-альфа или его антигенсвязывающий фрагмент, белок рецептора для нейтрокина-альфа или его фрагмент или вариант, антитело, которое связывает рецептор нейтрокина-альфа или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающий нейтрокин-альфа пептид или полипептид, вариант полипептида нейтрокин-альфа и/или APRIL (например, доминантно-негативную форму нейтрокина-альфа и/или APRIL). Дополнительные антагонисты нейтрокина-альфа включают низкомолекулярные антагонисты нейтрокина-альфа, пептидные миметики нейтрокина-альфа, бессмысловые РНК и короткие интерферирующие РНК (siRNA), которые нацелены на нейтрокин-альфа, бессмысловые РНК и короткие интерферирующие РНК (siRNA), которые нацелены на APRIL, бессмысловые РНК и короткие интерферирующие РНК (siRNA), которые нацелены на рецепторы для нейтрокина-альфа и/или рецепторы для APRIL. Рецепторы для нейтрокина-альфа включают, например, трансмембранную активирующую и взаимодействующую с CAML молекулу (TACI, регистрационный номер GenBank AAC51790, SEQ ID NO: 6), рецептор фактора активации В-клеток, антиген созревания В-клеток (BCMA, регистрационный номер GenBank NP_001183 SEQ ID NO: 8) и (BAFF-R, регистрационный номер GenBank NP_443177 SEQ ID NO: 10).

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения пациента с аутоиммунным заболеванием, который обладает титром ANA 1:80 или выше и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл, в его/ее плазме или сыворотке крови, включающему введение терапевтически эффективного количества иммуномодулирующего средства. Примеры аутоиммунного заболевания, при котором можно идентифицировать пациентов с титром ANA 1:80 или выше и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл, в его/ее плазме или сыворотке крови, включают, но не ограничиваются ими, системную красную волчанку (SLE), ревматоидный артрит, синдром Шегрена, склеродермию, полимиозит-дерматомиозит, синдром Фелти, смешанное заболевание соединительной ткани, синдром Рейно, ювенильный хронический артрит, гломерулонефрит, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру и IgA-нефропатию.

В конкретном варианте осуществления это изобретение относится к способу лечения пациента с синдромом Шегрена, который обладает титром ANA 1:80 или выше и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл, в его/ее плазме или сыворотке крови, включающему введение терапевтически эффективного количества иммуномодулирующего средства. В другом конкретном варианте осуществления это изобретение относится к способу лечения пациента с синдромом Шегрена, который обладает титром ANA 1:80 или выше и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл, в его/ее плазме или сыворотке крови, включающему введение терапевтически эффективного количества антагониста нейтрокина-альфа.

В конкретном варианте осуществления это изобретение относится к способу лечения пациента с

ревматоидным артритом, который обладает титром ANA 1:80 или выше и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл, в его/ее плазме или сыворотке крови, включающему введение терапевтически эффективного количества иммуномодулирующего средства. В другом конкретном варианте осуществления это изобретение относится к способу лечения пациента с ревматоидным артритом, который обладает титром ANA 1:80 или выше и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл, в его/ее плазме или сыворотке крови, включающему введение терапевтически эффективного количества антагониста нейтрокина-альфа.

В конкретном варианте осуществления это изобретение относится к способу лечения пациента с системной красной волчанкой (SLE), который обладает титром ANA 1:80 или выше и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл, в его/ее плазме или сыворотке крови, включающему введение терапевтически эффективного количества иммуномодулирующего средства. В другом конкретном варианте осуществления это изобретение относится к способу лечения пациента с системной красной волчанкой (SLE), который обладает титром ANA 1:80 или выше и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл, в его/ее плазме или сыворотке крови, включающему введение терапевтически эффективного количества антагониста нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления пациент с волчанкой будет обладать клиническим диагнозом SLE в соответствии с критериями Американского колледжа ревматологии (ACR) (см., например, Tan et al., *Arthritis Rheum.* 25:1271-7, (1982) и Hochberg et al., *Arthritis Rheum.* 40:1725, (1997), которые включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме).

Также настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, включающему проведение определения, перед введением иммуномодулирующего средства, наличия у пациента титра ANA 1:80 или выше и/или уровня антител против дцДНК, превышающего или равного 30 МЕ/мл, в его/ее плазме или сыворотке крови. Также настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, включающему проведение определения, перед введением антагониста нейтрокина-альфа, наличия у пациента титра ANA 1:80 или выше и/или уровня антител против дцДНК, превышающего или равного 30 МЕ/мл, в его/ее плазме или сыворотке крови.

В других вариантах осуществления это изобретение относится к способу лечения пациента с волчанкой, включающему проведение определения, перед введением иммуномодулирующего средства, наличия у пациента с волчанкой одной или нескольких из следующих характеристик: клинический диагноз SLE в соответствии с критериями Американского колледжа ревматологии (ACR) (см., например, Tan et al., *Arthritis Rheum.* 25:1271-7, (1982) и Hochberg et al., *Arthritis Rheum.* 40:1725, (1997)); показатель SELENA SLEDAI ≥ 6 ; сниженные уровни C4-комплемента в его/ее плазме или сыворотке крови; сниженные уровни C3-комплемента в его/ее плазме или сыворотке крови; титр ANA 1:80 или выше; уровень антител против дцДНК, превышающий или равный 30 МЕ/мл в его/ее плазме или сыворотке крови; он получает $\geq 7,5$ мг/сутки преднизона или другого кортикостероида в целях лечения связанных с волчанкой симптомов; и/или он получает или ранее получал терапию иммунодепрессантами в целях лечения связанных с волчанкой симптомов. В конкретном варианте осуществления определение проводит врач, исходя из оценки медицинской карты пациента. В другом конкретном варианте осуществления определение проводит врач, исходя из результатов лабораторных тестов. В конкретном варианте осуществления определение проводит врач, исходя из результатов лабораторных тестов, полученных после последнего лечения пациента (включая лечение иммуномодулирующими средствами) от волчанки, если такие результаты имеются, и перед началом лечения, включающего введение терапевтически эффективного количества иммуномодулирующего средства (включая антагонист нейтрокина-альфа), как описано в настоящем описании.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу снижения частоты введения и/или количества кортикостероида, вводимого пациенту, который обладает титром ANA 1:80 или выше и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл, в его/ее плазме или сыворотке крови, включающему введение терапевтически эффективного количества иммуномодулирующего средства.

В конкретном варианте осуществления это изобретение относится к способу снижения частоты введения и/или количества кортикостероида, вводимого пациенту с синдромом Шегрена, который обладает титром ANA 1:80 или выше и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл, в его/ее плазме или сыворотке крови, включающему введение терапевтически эффективного количества иммуномодулирующего средства. В другом конкретном варианте осуществления это изобретение относится к способу снижения частоты введения и/или количества кортикостероида, вводимого пациенту с синдромом Шегрена, который обладает титром ANA 1:80 или выше и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл, в его/ее плазме или сыворотке крови, включающему введение терапевтически эффективного количества антагониста нейтрокина-альфа.

В конкретном варианте осуществления это изобретение относится к способу снижения частоты введения и/или количества кортикостероида, вводимого пациенту с ревматоидным артритом, который обладает титром ANA 1:80 или выше и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным

30 МЕ/мл, в его/ее плазме или сыворотке крови, включающему введение терапевтически эффективного количества иммуномодулирующего средства. В другом конкретном варианте осуществления это изобретение относится к способу снижения частоты введения и/или количества кортикостероида, вводимого пациенту с ревматоидным артритом, который обладает титром ANA 1:80 или выше и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл, в его/ее плазме или сыворотке крови, включающему введение терапевтически эффективного количества антагониста нейтрокина-альфа.

В конкретном варианте осуществления это изобретение относится к способу снижения частоты введения и/или количества кортикостероида, вводимого пациенту с системной красной волчанкой (SLE), который обладает титром ANA 1:80 или выше и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл, в его/ее плазме или сыворотке крови, включающему введение терапевтически эффективного количества иммуномодулирующего средства. В другом конкретном варианте осуществления это изобретение относится к способу снижения частоты введения и/или количества кортикостероида, вводимого пациенту с системной красной волчанкой (SLE), который обладает титром ANA 1:80 или выше и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл, в его/ее плазме или сыворотке крови, включающему введение терапевтически эффективного количества антагониста нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления пациент с волчанкой будет обладать клиническим диагнозом SLE в соответствии с критериями Американского колледжа ревматологии (ACR) (см., например, Tan et al., *Arthritis Rheum.* 25:1271-7, (1982) и Hochberg et al., *Arthritis Rheum.* 40:1725, (1997), которые включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме).

В следующем варианте осуществления это изобретение относится к способу снижения количества кортикостероида, вводимого пациенту, который обладает титром ANA 1:80 или выше и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл, в его/ее плазме или сыворотке крови, где количество снижают по меньшей мере на 25% до $\leq 7,5$ мг/сутки. В конкретном варианте осуществления кортикостероид выбран из группы, состоящей из преднизона, преднизолона, гидрокортизона, метилпреднизолона и дексаметазона. В следующем конкретном варианте осуществления кортикостероид представляет собой преднизон. В другом варианте осуществления предусмотрен способ снижения частоты введения и/или количества кортикостероида, вводимого пациенту с аутоиммунным заболеванием, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела против нейтрокина-альфа.

В другом клиническом испытании 2 фазы (пример 3), в котором пациенты с ревматоидным артритом получали лечение антителом, которое нейтрализует белок нейтрокин-альфа, вводимым в качестве внутривенной инфузии на 0, 14, 28 сутки, а затем каждые четыре недели до 24 недели, лечение с большей вероятностью смягчает симптомы, обусловленные ревматоидным артритом, у пациентов, которые обладают показателем DAS28 выше 5,1, у пациентов, которым ранее не проводили терапию против TNF, и/или у пациентов, которые обладают ревматоидным фактором в его/ее плазме крови и/или сыворотке перед началом лечения антителом, которое нейтрализует белок нейтрокина-альфа. Дополнительные подгруппы или пациенты с ревматоидным артритом, которые, по-видимому, обладают большей вероятностью ответа на лечение антителом, которое нейтрализует белок нейтрокина-альфа, включали пациентов мужского пола, пациентов, которые обладают антителами против ССР (циклического цитруллинированного пептида) в его/ее плазме крови и/или сыворотке, пациентов, которые получали метотрексат одновременно с антителом, которое нейтрализует белок нейтрокина-альфа, пациентов, у которых ранее оказалось безуспешным лечение метотрексатом, и/или пациентов, у которых ранее оказалась безуспешной терапия метотрексатом и по меньшей мере одним другим лекарственным средством DMARD.

В другом варианте осуществления это изобретение относится к способу определения наличия у пациента с волчанкой ответа на лечение, включающему определение у пациента показателей SELENA SLEDAI, BILAG и PGA перед проведением лечения; проведение лечения и определение у пациента показателей SELENA SLEDAI, BILAG и PGA после проведения лечения. В этом способе пациента будут считать отвечающим лечению, если показатель SELENA SLEDAI пациента, определенный после проведения лечения, составляет на 4 или более баллов ниже, чем показатель SELENA SLEDAI перед проведением лечения; показатель индекса BILAG у пациента, определенный после проведения лечения, не включает вновь появившегося показателя органного домена BILAG A или 2 вновь появившихся показателя органного домена BILAG B по сравнению с показателем BILAG, определенным перед проведением лечения, и показатель PGA, определенный после проведения лечения на $< 0,3$ балла выше, чем показатель PGA, определенный перед проведением лечения.

Таким образом, в одном варианте осуществления это изобретение относится к способу лечения пациента с ревматоидным артритом, включающему проведение определения перед введением иммуномодулирующего средства, наличия у пациента с ревматоидным артритом одной или нескольких характеристик: пациенту ранее не проводили терапию против TNF, например, инфликсимабом (также известным как Remicade™ Centocor, Inc.), адалимумабом (Humira® от Abbott Laboratories) или этанерцептом (Enbrel®); пациент обладает ревматоидным фактором в его/ее плазме крови и/или сыворотке; пациент обладает поддающимися определению антителами против ССР (циклического цитруллинированного пептида) в его/ее плазме крови и/или сыворотке; пациент обладает повышенным уровнем CRP (С-реактивного

протеина) в его/ее плазме крови и/или сыворотке; у пациента ранее оказалось безуспешным лечение одним или несколькими модифицирующими заболевание антиревматическими лекарственными средствами; этот пациент обладает высоким модифицированным показателем активности заболевания (DAS28); пациент обладает увеличенными и болезненными суставами; пациент страдает скованностью по утрам; пациент обладает повышенной скоростью оседания эритроцитов (СОЭ) и/или пациент представляет собой мужчину.

В другом варианте осуществления это изобретение относится к водному фармацевтическому составу, содержащему терапевтически эффективное количество антитела, буфер в количестве от приблизительно 5 до приблизительно 50 мМ, NaCl в количестве от приблизительно 150 до приблизительно 500 мМ, поверхностно-активное вещество в количестве от приблизительно 0,003 до приблизительно 0,05%, с pH от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,5. В конкретном варианте осуществления антитело в описанном выше составе представляет собой антитело, обладающее изотипом IgG1/λ. В следующем варианте осуществления антитело в описанном выше составе представляет собой антитело человека, обладающее изотипом IgG1/λ, буфер в описанном выше составе представляет собой 10 мМ гистидин или цитрат натрия, поверхностно-активное вещество в описанном выше составе представляет собой полисорбат 80 в количестве 0,01% мас./об., NaCl в описанном выше составе находится в концентрации приблизительно 150 мМ, и состав обладает pH 6,0. В других конкретных вариантах осуществления описанные выше составы являющиеся стабильными при температуре приблизительно 2-8°C в течение по меньшей мере одного года. В другом варианте осуществления антитело в описанном выше составе представлено в количестве 100 мг/мл.

В конкретном варианте осуществления это изобретение относится к водному фармацевтическому составу, содержащему 100 мг/мл антитела IgG1/λ, 0,74 мг/мл L-гистидина, 1,1 мг/мл моногидрохлорида L-гистидина, 8,8 мг/мл NaCl и 0,1 мг/мл полисорбата 80, и где состав обладает pH 6,0.

Краткое описание чертежей

Следующие чертежи являются иллюстративными для вариантов осуществления этого изобретения, и подразумевается, что они не ограничивают объем этого изобретения, охватываемый формулой изобретения.

На фиг. 1 представлено среднее процентное снижение SELENA SLEDAI на 52 неделе у пациентов, которые на исходном уровне обладали титром ANA 1:80 или выше и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл. Значения P определяли с использованием t-теста.

Определения

В одном аспекте настоящее изобретение относится, в общем, к способам лечения пациента с положительным по аутоантителам заболеванием посредством введения терапевтически эффективного количества иммуномодулирующего средства. Пациент с положительным по аутоантителу заболеванием представляет собой пациента, который обладает поддающимися детекции титрами аутоантитела в одном или нескольких образцах биологической жидкости, таких как плазма, или сыворотка крови, или синовиальная жидкость.

В настоящем описании указание на "иммуномодулирующее средство" представляет собой указание на общий класс фармацевтических соединений, которые могут стимулировать или ингибировать иммунную систему. В демонстративных примерах настоящего описания описано успешное применение антагонистического антитела против нейтрокина-альфа для лечения подгруппы пациентов с волчанкой. Таким образом, подразумевают, что термин "иммуномодулирующее средство" охватывает конкретно фармацевтические соединения или молекулы, которые могут действовать в качестве антагониста нейтрокина-альфа.

Антагонисты нейтрокина-альфа включают, но не ограничиваются ими, композиции, содержащие антитело против нейтрокина-альфа или его антигенсвязывающие фрагменты, белки рецепторов для нейтрокина-альфа или их фрагменты или варианты, антитело, которое связывает рецептор нейтрокина-альфа, или его антигенсвязывающий фрагмент, и связывающий нейтрокин-альфа пептид или полипептиды. Рецепторы для нейтрокина-альфа включают, например, трансмембранную активирующую и взаимодействующую с CAML молекулу (TACI, регистрационный номер GenBank AAC51790), BAFF-R (регистрационный номер GenBank NP_443177) и антиген созреваия В-клеток (BCMA, регистрационный номер GenBank NP_001183). Особенно пригодные формы рецепторов для нейтрокина-альфа включают растворимые формы внеклеточных доменов. Рецепторы для нейтрокина-альфа или их фрагменты или варианты и связывающие нейтрокин-альфа полипептиды можно применять в качестве слитых белков, например белков, слитых с Fc или сывороточным альбумином человека (HSA). Дополнительные антагонисты нейтрокина-альфа включают низкомолекулярные антагонисты нейтрокина-альфа, пептидные миметики нейтрокина-альфа, варианты полипептида нейтрокина-альфа и/или APRIL (например, доминантно-негативные формы нейтрокина-альфа и/или APRIL). Такие варианты полипептида нейтрокина-альфа и/или APRIL могут быть антагонистами функции нейтрокина-альфа, например, препятствуя гомо- или гетеромультимеризации нейтрокина-альфа и/или APRIL. Альтернативно варианты полипептида нейтрокина-альфа и/или APRIL будут препятствовать связыванию содержащих их полипептидов с рецепторами

для нейтрокина-альфа, такими как TACI, BCMA и BAFF-R, и/или они будут препятствовать передаче сигнала через них. Дополнительные антагонисты нейтрокина-альфа включают низкомолекулярные антагонисты нейтрокина-альфа, пептидные миметики нейтрокина-альфа, бессмысловые РНК и короткие интерферирующие РНК (siRNA), которые нацелены на нейтрокин-альфа, бессмысловые РНК и короткие интерферирующие РНК (siRNA), которые нацелены на APRIL, бессмысловые РНК и короткие интерферирующие РНК (siRNA), которые нацелены на рецепторы для нейтрокина-альфа и/или рецепторы для APRIL. Антагонисты нейтрокина-альфа описаны более подробно ниже.

Полагают, что антитело против нейтрокина-альфа действует, снижая количество В-клеток и/или активность В-клеток, такую как секреция иммуноглобулинов. Таким образом, также подразумевают, что термин "иммуномодулирующее средство" охватывает конкретно модулирующие В-клетки средства и, в частности, фармацевтические молекулы и соединения, которые прямо или непрямо ингибируют или снижают активность В-клеток (например, пролиферацию, дифференцировку, выживание В-клеток или секрецию ими иммуноглобулинов) и/или количество В-клеток. В конкретном варианте осуществления модулирующее В-клетки средство, которое можно применять совместно со способами по настоящему изобретению, представляют собой средство, которое снижает активность или количество всех В-клеток, активированных В-клеток, наивных В-клеток, В-клеток памяти, плазматических В-клеток и плазматических В-клеток, CD19+ В-клеток и/или CD20+ В-клеток.

Иммунная система представляет собой комплексную сеть взаимодействующих клеток и цитокинов. Например, антигенпредставляющие клетки (АПК, такие как макрофаги и дендритные клетки) и Т-клетки, в частности CD4+ Т-хелперные (Th) клетки, участвуют в активации пролиферации В-клеток и секреции ими антител (включая аутоантитела, в некоторых случаях при заболевании). Таким образом, активность В-клеток можно ингибировать, снижая или ингибируя количества или активность АПК или Th-клеток. Аналогично, известно, что существуют различные типы иммунного ответа, такие как Th1- и Th2-ответы. Иммуномодулирующие средства, которые можно применять в способах по этому изобретению, могут обеспечивать один тип иммунного ответа в большей степени, чем другой, и, таким образом, приводить к благоприятным эффектам при лечении пациентов с положительным по аутоантителу заболеванием. Таким образом, подразумевают, что в широком смысле термин "иммуномодулирующее средство" охватывает фармацевтические молекулы или соединения, которые стимулируют или ингибируют активность или количество одной или нескольких клеток, молекул клеточной поверхности (например, молекул передачи сигнала клеточной поверхности) и/или цитокинов иммунной системы, включая клетки, молекулы клеточной поверхности (например, молекулы передачи сигнала клеточной поверхности) и цитокины, которые являются частью врожденной и/или адаптивной иммунной системы. Клетки иммунной системы включают, но не ограничиваются ими, В-клетки, Т-клетки, дендритные клетки, моноциты, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, тучные клетки и естественные киллерные (NK) клетки. Молекулы клеточной поверхности на поверхности клеток иммунной системы, которые можно стимулировать или ингибировать с помощью иммуномодулирующего средства, включают, но не ограничиваются ими, CD-антигены, такие как CD20. Цитокины, важные для иммунной системы, включают, но не ограничиваются ими, члены суперсемейства лигандов TNF, включая, но не ограничиваясь ими, нейтрокин-альфа, APRIL и CD40L.

Подробное описание

При клиническом испытании II фазы у пациентов с системной красной волчанкой заявители обнаружили, что лечение пациентов с волчанкой посредством антитела, которое нейтрализует белок нейтрокина-альфа, вводимого в качестве внутривенной инфузии на 0, 14, 28 сутки, а затем каждые четыре недели до 52 недели, значительно смягчает симптомы, обусловленные волчанкой, у пациентов, обладающих титром ANA 1:80 или выше и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл, в его/ее плазме или сыворотке крови (см. пример 1).

Таким образом, конкретный вариант осуществления настоящего изобретения относится к способу лечения пациента с системной красной волчанкой, который обладает титром ANA $\geq 1:80$ и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл, в его/ее плазме или сыворотке крови, посредством антитела-антагониста нейтрокина-альфа. Однако специалист в данной области легко поймет, что молекулы антитела являются только одним из множества типов молекул, которые могут действовать в качестве антагонистов нейтрокина-альфа. Таким образом, другой конкретный вариант осуществления настоящего изобретения относится к способу лечения пациента с системной красной волчанкой, который обладает титром ANA $\geq 1:80$ и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл, в его/ее плазме или сыворотке крови, посредством антагониста нейтрокина-альфа.

Антагонисты нейтрокина-альфа включают, но не ограничиваются ими, композиции, содержащие антитело против нейтрокина-альфа или его антигенсвязывающие фрагменты, белки рецепторов для нейтрокина-альфа или их фрагменты или варианты, антитело, которое связывает рецептор нейтрокина-альфа, или его антигенсвязывающий фрагмент, или пептид или полипептиды, связывающие нейтрокин-альфа. Рецепторы для нейтрокина-альфа включают, например, трансмембранную активирующую и взаимодействующую с CAML молекулу (TACI, регистрационный номер GenBank AAC51790), BAFF-R (ре-

гистрационный номер GenBank NP_443177) и антиген созревания В-клеток (BCMA, регистрационный номер GenBank NP_001183. Особенно пригодные формы рецепторов для нейтрокина-альфа включают растворимые формы внеклеточных доменов, способных связывать нейтрокин-альфа. Рецепторы для нейтрокина-альфа или их фрагменты или варианты и связывающие нейтрокин-альфа полипептиды можно использовать в качестве слитых белков, например белков, слитых с Fc или сывороточным альбумином человека (HSA). В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок TACI-Fc. Одним примером белка TACI-Fc являются аминокислоты 1-154 SEQ ID NO: 6, слитые с Fc-участком молекулы иммуноглобулина IgG1. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок BAFF-R-Fc. Одним примером белка BAFF-R-Fc являются аминокислоты 1-70 SEQ ID NO: 10, слитые с Fc-участком молекулы иммуноглобулина IgG1. Необязательно, аминокислота 20 (валин) в BAFF-R замещена аспарагином и аминокислота 27 (лейцин) в BAFF-R замещена пролином. В SEQ ID NO: 26 представлены аминокислоты 1-70 BAFF-R с этими двумя аминокислотными заменами.

Дополнительные антагонисты нейтрокина-альфа включают низкомолекулярные антагонисты нейтрокина-альфа, пептидные миметики нейтрокина-альфа, варианты полипептида нейтрокина-альфа и/или APRIL (например, доминантно-негативные формы нейтрокина-альфа и/или APRIL). Такие варианты полипептида нейтрокина-альфа и/или APRIL могут быть антагонистами функции нейтрокина-альфа, например, препятствуя гомо- или гетеромультимеризации нейтрокина-альфа и/или APRIL. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой фрагмент или вариант белка нейтрокина-альфа, который функционирует в качестве доминантно-негативной формы. Альтернативно, варианты полипептида нейтрокина-альфа и/или APRIL будут препятствовать связыванию полипептидов, содержащих их, с рецепторами для нейтрокина-альфа, такими как TACI, BCMA и BAFF-R, и/или передачу сигнала через них. Дополнительные антагонисты нейтрокина-альфа включают низкомолекулярные антагонисты нейтрокина-альфа, пептидные миметики нейтрокина-альфа, антисмысловые РНК и короткие интерферирующие РНК (siRNA), которые нацелены на нейтрокин-альфа, антисмысловые РНК и короткие интерферирующие РНК (siRNA), которые нацелены на APRIL, антисмысловые РНК и короткие интерферирующие РНК (siRNA), которые нацелены на рецепторы для нейтрокина-альфа и/или рецепторы для APRIL. Антагонисты нейтрокина-альфа описаны более подробно ниже.

Аналогично, специалист в данной области поймет, что для настоящего изобретения могут быть пригодны другие иммуномодулирующие средства, включая, в частности, молекулы, которые могут модулировать активность или количество В-клеток. В конкретных вариантах осуществления модулирующее В-клетки средство, которое можно применять совместно со способами по настоящему изобретению представляет собой средство, которое прямо или непрямо ингибирует или снижает активность В-клеток (например, пролиферацию, дифференцировку, выживание В-клеток или секрецию ими иммуноглобулинов) и/или количество В-клеток. В другом варианте осуществления модулирующие В-клетки средства, которые можно использовать совместно со способами по настоящему изобретению, представляют собой средства, которые снижают активность или количество всех В-клеток, активированных В-клеток, наивных В-клеток, В-клеток памяти, плазматических В-клеток и плазматикоидных В-клеток, CD19+ В-клеток и/или CD20+ В-клеток. Иммуномодулирующие и модулирующие В-клетки молекулы, которые можно применять для настоящего изобретения, известны специалистам в данной области и описаны более подробно ниже.

В другом варианте осуществления это изобретение относится к способу лечения пациента, который относится к подгруппе пациентов с системной красной волчанкой, которые обладают "активным" заболеванием системной красной волчанки (SLE или "волчанки"), включающему введение терапевтически эффективного количества антитела-антагониста нейтрокина-альфа. В конкретных вариантах осуществления это изобретение относится к способу лечения пациента, у которого ранее была диагностирована волчанка и который обладает активной волчанкой, включающему введение терапевтически эффективного количества антитела-антагониста нейтрокина-альфа. Это изобретение относится к способу лечения пациента, который относится к группе пациентов с системной красной волчанкой, которые обладают активным заболеванием системной красной волчанки (SLE или "волчанки"), включающему проведение определения наличия у пациента "активной волчанки" перед введением терапевтически эффективного количества антитела-антагониста нейтрокина-альфа. В конкретных вариантах осуществления это изобретение относится к способу лечения пациента, у которого ранее диагностировали волчанку и который обладает активной волчанкой, включающему проведение определения того, что у пациента ранее диагностировали волчанку и что он обладает активной волчанкой, перед введением терапевтически эффективного количества антитела-антагониста нейтрокина-альфа.

В другом варианте осуществления это изобретение относится к способу лечения пациента, который относится к группе пациентов с системной красной волчанкой, которые обладают "активным" заболеванием системной красной волчанки (SLE или "волчанки"), включающему введение терапевтически эффективного количества антагониста нейтрокина-альфа или другого иммуномодулирующего средства, известного в данной области и/или описанного в настоящем описании. В конкретных вариантах осуществления это изобретение относится к способу лечения пациента, у которого ранее была диагностирована

волчанка и который обладает активной волчанкой, включающему введение терапевтически эффективного количества антагониста нейтрокина-альфа или другого иммуномодулирующего средства, известного в данной области и/или описанного в настоящем описании. Это изобретение относится к способу лечения пациента, который относится к группе пациентов с системной красной волчанкой, которые обладают активным заболеванием системной красной волчанки, включающему проведение определения наличия у пациента "активной волчанки", перед введением терапевтически эффективного количества антагониста нейтрокина-альфа или другого иммуномодулирующего средства, известного в данной области и/или описанного в настоящем описании. В конкретных вариантах осуществления это изобретение относится к способу лечения пациента, у которого ранее диагностировали волчанку и который обладает активной волчанкой, включающему проведение определения того, что у пациента ранее диагностировали волчанку и он обладает активной волчанкой, перед введением терапевтически эффективного количества антагониста нейтрокина-альфа или другого иммуномодулирующего средства, известного в данной области и/или описанного в настоящем описании.

В конкретных вариантах осуществления пациента с активной волчанкой определяют как пациента, имеющего клинический диагноз SLE в соответствии с критериями Американского колледжа ревматологии (ACR) (см., например, Tan et al., *Arthritis Rheum.* 25:1271-7, (1982) и Hochberg et al., *Arthritis Rheum.* 40:1725, (1997), которые включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме).

В конкретных вариантах осуществления пациента с активной волчанкой определяют как пациента, имеющего показатель SELENA SLEDAI ≥ 4 . SELENA SLEDAI означает индекс активности заболевания системной красной волчанки, модифицированный по безопасности эстрогена в национальном испытании по оценке системной красной волчанки. Показатели SELENA SLEDAI определяют стандартными способами врачи/терапевты с использованием способов и технологий, известных в данной области, см., например, Bombardier, et al., *Arthritis Rheum.* Jun; 35 (6): 630-40, 1992 и Strand, et al., *J Rheumatol.* Feb; 26(2): 490-7, 1999, которые включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме. В кратком изложении, показатель SELENA SLEDAI определяют с учетом активности заболевания SLE по 24 категориям, охватывающим 9 систем органов. Показатели заболевания в некоторых системах органов обладают большим значением, чем показатели заболевания в других системах органов. В частности, признакам активности заболевания SLE в центральной нервной системе и сосудах, если они есть, приписывают 8 баллов, признакам активности заболевания SLE в почках и скелетных мышцах, если они есть, приписывают 4 балла, серозным, кожным и иммунологическим признакам активности заболевания SLE, если они есть, приписывают 2 балла и конституциональным и гематологическим признакам активности заболевания SLE, если они есть, приписывают 1 балл. Максимальный теоретический показатель SELENA SLEDAI составляет 105, однако, на практике немногие пациенты обладают показателями, превышающими 45.

В стандартной оценочной системе SELENA SLEDAI 4 балла приписывают, если субъект обладает вновь возникшей или последней повышенной протеинурией, превышающей 0,5 г/24 ч. Иными словами, если показатель протеинурии, полученный в одном 24-часовом образце мочи, более чем на 0,5 г превышает показатель, определенный у пациента в непосредственно предшествующем 24-часовом образце мочи, будет приписано 4 балла за протеинурию по шкале SELENA SLEDAI. Это повышение обычно описывают как повышение или появление протеинурии $>0,5$ г/24 ч. Таким образом, в стандартной оценочной системе SELENA SLEDAI субъект, которому приписано 4 балла на исходном уровне вследствие протеинурии, будет обладать улучшением SELENA SLEDAI при последующем посещении, если показатель протеинурии в текущем 24-часовом образце не более чем на 0,5 г превышает показатель протеинурии, определенный у пациентов в непосредственно предшествующем 24-часовом образце мочи. Иными словами, у пациентов будут вычтены 4 балла из их общего показателя даже с учетом стабильной протеинурии или повышения протеинурии $\leq 0,5$ г/24 ч. Модификация правил оценки протеинурии SELENA SLEDAI описана в примере 2. В примере 2 оценку протеинурии модифицируют таким образом, что 4 балла продолжают приписывать до тех пор, пока протеинурия, определенная в данном 24-часовом образце мочи, не будет более чем на 0,5 г ниже показателя протеинурии, определенного у этого пациента в непосредственно предшествующем 24-часовом образце мочи. Кроме того, если вновь появляется протеинурия или происходит повышение протеинурии, которое $>0,5$ г/24 ч, приписывают 4 балла. В настоящем описании, когда ссылаются на SELENA SLEDAI, оценка протеинурии может быть проведена в соответствии со стандартной шкалой SELENA SLEDAI. Предпочтительно оценку протеинурии при определении показателя SELENA SLEDAI у пациента проводят в соответствии с системой оценки протеинурии, описанной в примере 2.

В других конкретных вариантах осуществления пациента с активной волчанкой определяют как пациента, имеющего показатель SELENA SLEDAI ≥ 5 . В дополнительных конкретных вариантах осуществления пациента с активной волчанкой определяют как пациента, имеющего показатель SELENA SLEDAI ≥ 6 . В следующих конкретных вариантах осуществления пациента с активной волчанкой определяют как пациента, имеющего показатель SELENA SLEDAI ≥ 7 . В дополнительных конкретных вариантах осуществления пациента с активной волчанкой определяют как пациента, имеющего показатель SELENA

SLEDAI ≥ 8 . В других конкретных вариантах осуществления пациента с активной волчанкой определяют как пациента, имеющего показатель SELENA SLEDAI ≥ 9 . В других конкретных вариантах осуществления пациента с активной волчанкой определяют как пациента, имеющего показатель SELENA SLEDAI ≥ 10 . В дополнительных конкретных вариантах осуществления пациента с активной волчанкой определяют как пациента, имеющего показатель SELENA SLEDAI ≥ 11 . В дополнительных конкретных вариантах осуществления пациента с активной волчанкой определяют как пациента, имеющего показатель SELENA SLEDAI ≥ 12 .

В других вариантах осуществления пациента с активной волчанкой определяют как пациента, который обладает антителами против дцДНК в его/ее плазме или сыворотке крови. Титры, концентрации или уровни антител против дцДНК могут определять общепринятыми способами врачи/терапевты с использованием способов и технологий, известных в данной области. Одним примером анализа для определения титров, концентраций или уровней антител против дцДНК является твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), основанный на специфичном связывании антител против дцДНК с иммобилизованной дцДНК, см., например, Halbert, et al., *J Lab Clin Med.* 97:97-111, (1981). Другим примером анализа для определения титров, концентраций или уровней антител против дцДНК является непрямой иммунофлуоресцентный анализ, основанный на специфичном связывании антител против дцДНК с дцДНК клетки *Crithidia luciliae*, см., например, Whiteside, et al., *Am J Clin Pathol.* 72:829-35, (1979). Другим примером анализа для определения титров, концентраций или уровней антител против дцДНК является анализ Fagг, основанный на специфичном связывании антител против дцДНК с меченной радиоактивной меткой дцДНК, с последующим осаждением комплексов антитело против дцДНК-меченная радиоактивной меткой дцДНК, см., например, Davis, et al., *Am J Clin Pathol.*, 67:374-8, (1977). В конкретных вариантах осуществления пациента с активной волчанкой определяют как пациента, который обладает уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл в его/ее плазме или сыворотке крови, где международная единица (МЕ, IU) основана на контрольном препарате антитела против дцДНК Всемирной организации здравоохранения, см., например, Feltkamp, et al., *Ann. Rheum. Dis.*, 47:740-746, (1988). Все ссылки, приведенные в этом абзаце, включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме.

В дополнительном конкретном варианте осуществления пациента с активной волчанкой определяют как пациента, который обладает уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 40 МЕ/мл, в его/ее плазме или сыворотке крови. В дополнительном конкретном варианте осуществления пациента с активной волчанкой определяют как пациента, который обладает уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 50 МЕ/мл, в его/ее плазме или сыворотке крови. В дополнительном конкретном варианте осуществления пациента с активной волчанкой определяют как пациента, который обладает уровнем антитела против дцДНК, превышающим или равным 60 МЕ/мл, в его/ее плазме или сыворотке крови. В дополнительном конкретном варианте осуществления пациента с активной волчанкой определяют как пациента, который обладает уровнем антитела против дцДНК, превышающим или равным 75 МЕ/мл, в его/ее плазме или сыворотке крови. В дополнительном конкретном варианте осуществления пациента с активной волчанкой определяют как пациента, который обладает уровнем антитела против дцДНК, превышающим или равным 100 МЕ/мл, в его/ее плазме или сыворотке крови. В дополнительном конкретном варианте осуществления пациента с активной волчанкой определяют как пациента, который обладает уровнем антитела против дцДНК, превышающим или равным 125 МЕ/мл, в его/ее плазме или сыворотке крови. В дополнительном конкретном варианте осуществления пациента с активной волчанкой определяют как пациента, который обладает уровнем антитела против дцДНК, превышающим или равным 150 МЕ/мл, в его/ее плазме или сыворотке крови. В дополнительном конкретном варианте осуществления пациента с активной волчанкой определяют как пациента, который обладает уровнем антитела против дцДНК, превышающим или равным 200 МЕ/мл, в его/ее плазме или сыворотке крови. В дополнительном конкретном варианте осуществления пациента с активной волчанкой определяют как пациента, который обладает уровнем антитела против дцДНК, превышающим или равным 300 МЕ/мл, в его/ее плазме или сыворотке крови.

В других вариантах осуществления пациента с активной волчанкой определяют как пациента, который обладает противоядерными антителами (ANA+) в его/ее плазме или сыворотке крови. Титр противоядерных антител могут определять общепринятыми способами врачи/терапевты с использованием способов и технологий, известных в данной области. Одним примером анализа для определения титра противоядерных антител является непрямой иммунофлуоресцентный анализ, основанный на связывании противоядерных антител с эпителиальными клетками человека HEp-2, см., например, Osborn, et al., *Arthritis Rheum.*, 27:1286-9, (1984). В другом примере анализа концентрации и уровни противоядерных антител можно определять с использованием ELISA, основанного на специфичном связывании ANA с иммобилизованными антигенами ANA, например дцДНК, Ro/SS-A, La/SS-B, Sm, RNP, см., например, Fenger, et al., *Clin Chem.*, 50:2141-7, (2004). Кроме того, тесты для ANA описаны в Kavanaugh et al., *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* (2000) 124:71-81 и Greidinger, E.L. and Hoffman, R.W., *Laboratory Medicine* (2003) 34:113-117. Все ссылки, приведенные в этом абзаце, включены в настоящее описа-

ние в качестве ссылок в полном объеме.

В предпочтительных конкретных вариантах осуществления пациента с активной волчанкой определяют как пациента, который обладает титром ANA 1:80 или выше (например, положительный по ANA тест получают, когда фактор разведения плазмы или сыворотки крови пациента составляет 80 или выше). Титры 1:160, 1:320 и 1:640, например, являются более высокими, чем титр 1:80. В других предпочтительных вариантах осуществления пациента с активной волчанкой определяют как пациента, который обладает титром ANA 1:160 или выше. В дополнительном предпочтительном варианте осуществления пациента с активной волчанкой определяют как пациента, который обладает титром ANA 1:320 или выше. В дополнительном предпочтительном варианте осуществления пациента с активной волчанкой определяют как пациента, который обладает титром ANA 1:640 или выше. В конкретном варианте осуществления титр ANA определяют с использованием не прямой иммунофлуоресценции на клетках HEp-2. В другом конкретном варианте осуществления титр ANA определяют с использованием анализа ELISA против дцДНК.

В других вариантах осуществления пациента с активной волчанкой определяют как пациента, который обладает подающимися детекции аутоантителами, включая, но не ограничиваясь ими, антитела против Ro/SS-A, антитела против La/SS-B, антитела против RNP, антитела против кардиолипина (против фосфолипидов), антитела против дцДНК, антитела против Sm. Титры, концентрации и уровни аутоантител могут определять общепринятыми способами врачи/терапевты с использованием способов и технологий, известных в данной области.

В других вариантах осуществления пациента с активной волчанкой определяют как пациента, который обладает сниженными уровнями C3- и/или C4-комплемента в его/ее плазме или сыворотке крови. Специалист в данной области поймет, что нормальный уровень C3 и/или C4 может варьировать в зависимости от анализа, используемого для измерения C3 и/или C4. Таким образом, нормальный уровень C3-комплемента в плазме или сыворотке может составлять от приблизительно 90 до приблизительно 180 мг/дл. В других конкретных вариантах осуществления нормальный уровень C3-комплемента в плазме или сыворотке также может варьировать от приблизительно 88 до приблизительно 206 мг/дл или от приблизительно 88 до приблизительно 252 мг/дл. Нормальный уровень C4-комплемента в плазме или сыворотке может составлять от приблизительно 16 до приблизительно 47 мг/дл. В других конкретных вариантах осуществления нормальный уровень C4-комплемента в плазме или сыворотке также может варьировать от приблизительно 12 до приблизительно 72 мг/дл или от приблизительно 13 до приблизительно 75 мг/дл. В конкретных вариантах осуществления сниженный уровень C3-комплемента в плазме или сыворотке определяют как менее чем 90 мг/дл. В конкретных вариантах осуществления сниженный уровень C3-комплемента в плазме или сыворотке определяют как менее чем 88 мг/дл. В конкретных вариантах осуществления сниженный уровень C3-комплемента в плазме или сыворотке определяют как менее чем 85 мг/дл. В конкретных вариантах осуществления сниженный уровень C3-комплемента в плазме или сыворотке определяют как менее чем 80 мг/дл. В конкретных вариантах осуществления сниженный уровень C3-комплемента в плазме или сыворотке определяют как менее чем 75 мг/дл. В конкретных вариантах осуществления сниженный уровень C4-комплемента в плазме или сыворотке определяют как менее чем 16 мг/дл. В конкретных вариантах осуществления сниженный уровень C4-комплемента в плазме или сыворотке определяют как менее чем 15 мг/дл. В конкретных вариантах осуществления сниженный уровень C4-комплемента в плазме или сыворотке определяют как менее чем 14 мг/дл. В конкретных вариантах осуществления сниженный уровень C4-комплемента в плазме или сыворотке определяют как менее чем 13 мг/дл. В конкретных вариантах осуществления сниженный уровень C4-комплемента в плазме или сыворотке определяют как менее чем 12 мг/дл. В конкретных вариантах осуществления сниженный уровень C4-комплемента в плазме или сыворотке определяют как менее чем 11 мг/дл. В конкретных вариантах осуществления сниженный уровень C4-комплемента в плазме или сыворотке определяют как менее чем 10 мг/дл. В конкретных вариантах осуществления сниженный уровень C4-комплемента в плазме или сыворотке определяют как менее чем 9 мг/дл. Уровни комплемента могут определять общепринятыми способами врачи/терапевты с использованием способов и технологий, известных в данной области, например с использованием анализа радиальной иммунодиффузии.

В других вариантах осуществления пациента с активной волчанкой определяют как пациента, который обладает одной или несколькими из следующих характеристик: клинический диагноз SLE в соответствии с критериями Американского колледжа ревматологии (ACR) (см., например, Tan et al., *Arthritis Rheum.* 25:1271-7, (1982) и Hochberg et al., *Arthritis Rheum.* 40:1725, (1997)); показатель SELENA SLEDAI ≥ 6 ; сниженные уровни C4-комплемента в его/ее плазме или сыворотке крови; сниженные уровни C3-комплемента в его/ее плазме или сыворотке крови; титр ANA 1:80 или выше; уровень антител против дцДНК, превышающий или равный 30 МЕ/мл, в его/ее плазме или сыворотке крови; он получает $\geq 7,5$ мг/сутки преднизона или другого кортикостероида в целях лечения связанных с волчанкой симптомов; и/или он получает или ранее получал терапию иммунодепрессантом в целях лечения связанных с волчанкой симптомов.

В других вариантах осуществления пациента с активной волчанкой определяют как пациента, кото-

рый обладает одной или несколькими из следующих характеристик: клинический диагноз SLE в соответствии с критериями Американского колледжа ревматологии (ACR); показатель SELENA SLEDAI ≥ 8 ; сниженные уровни C4-комплемента в его/ее плазме или сыворотке крови; сниженные уровни C3-комплемента в его/ее плазме или сыворотке крови; титр ANA 1:80 или выше; уровень антител против дцДНК, превышающий или равный 30 МЕ/мл, в его/ее плазме или сыворотке крови; он получает вплоть до 40 мг/сутки преднизона или другого кортикостероида в целях лечения связанных с волчанкой симптомов; и/или он получает или ранее получал терапию иммунодепрессантом в целях лечения связанных с волчанкой симптомов.

Многочисленные признаки активности заболевания хорошо известны врачам/терапевтам в данной области и их можно применять для определения степени активности ревматического заболевания, такой как активность заболевания SLE (см., например, Strand, et al., *J. Rheumatol.*, 26:490-7, (1999)). В одном варианте осуществления в качестве индекса активности заболевания (DAI) используют SELENA SLEDAI (см., например, Bombardier, et al., *Arthritis Rheum.* 35:630-40, (1992)). В другом варианте осуществления в качестве DAI используют индекс обострений SLE (см., например, Petri, et. al, *Lupus*, 8:685-91, (1999)). В следующем варианте осуществления в качестве DAI используют индекс повреждения Клиники международного сотрудничества по системной красной волчанке/Американского колледжа ревматологии (SLICC/ACR) (см., например, Gladman, et al., *Arthritis Rheum.*, 39:363-9, (1996)). В другом варианте осуществления в качестве DAI используют общую оценку терапевтом (PGA). PGA представляет собой визуальную аналоговую шкалу с диапазоном от 0 до 3, где 0 представляет собой отсутствие активности заболевания, 1 - мягкую активность заболевания, 2 - умеренную активность заболевания и 3 - тяжелую активность заболевания. В другом варианте осуществления в качестве DAI используют короткую форму исследования клинических результатов 36 (SF-36). SF-36 представляет собой инструмент, связанный с характерным связанным со здоровьем качеством жизни (HRQOL), который, как было показано, отражает влияние SLE на все домены HRQOL в исследованиях наблюдаемых групп, а также в рандомизированных испытаниях (Cook, et al., *J. Rheumatol.*, 27:1892-1895, (2000); Thumboo, et al., *J. Rheumatol.*, 26:97-102, (1999); Thumboo, et al., *J. Rheumatol.*, 27:1414-1420, (2000); Ware J.E., et al., *Med Care*, 30:473-483, (1992); Smolen J.S., et al., *J. Rheumatol.*, 26:504-507, (1999); Gladman, et al., *Lupus*, 5:190-195, (1996); Alonso J., et al., *Qual Life Res.*, 13:283-298, 2004 и Gladman et al., *J. Rheumatol.*, 27:377-9, (1995), все из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме).

В следующем варианте осуществления в качестве DAI используют EQ-5D (также известный как инструмент EuroQol). EQ-5D представляет собой общий показатель связанного со здоровьем качества жизни. Подразумевают, что он представляет собой простую анкету, заполняемую опрашиваемым лицом, которая не только включает описательную систему классификации, но также способна формировать суммарный балл или индекс, отражающий преобладающий показатель, ассоциированный с данным состоянием здоровья. Описательная система EQ-5D состоит из пяти показателей: подвижность, уход за собой, обычные виды активности, боль/дискомфорт и тревога/депрессия. Каждый показатель обладает тремя уровнями, отражающими "нет проблем со здоровьем", "умеренные проблемы со здоровьем" и "значительные проблемы со здоровьем" (см., например, *Health Policy*. 1990 Dec; 16(3):199-208, который включен в настоящее описание в качестве ссылки).

В следующем варианте осуществления в качестве DAI используют дополнительную шкалу функциональной оценки терапии хронического заболевания-утомляемости (FACIT-F) Системы определения функциональной оценки терапии хронического заболевания (FACIT). Дополнительная шкала FACIT-F представляет собой обобщение из 27 пунктов основных вопросов, разделенных на четыре основных домена QOL: физическое благополучие, социальное/семейное благополучие, эмоциональное благополучие и функциональное благополучие. Этот инструмент для определения объединяет мнение пациента относительно уровня энергии, вялости и способности начинать или заканчивать действия (см., например, Yellen, S.B., et al., *Journal of Pain and Symptom Management*, 13: 63-74, (1997); Cella, D., et al., 94 (2): 528-538, (2002) и Cella, D., et al., *Journal of Pain & Symptom Management*, 24 (6): 547-561, (2002), все из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме).

В следующем варианте осуществления в качестве DAI используют показатель активности заболевания (DAS28). DAS28 представляет собой стандартный инструмент, используемый ревматологами для оценки активности ревматического заболевания. Этот инструмент для определения вычисляет показатель индекса на основе оценки: количества суставов, чувствительных к прикосновению (TEN), количества увеличенных суставов (SW), скорости оседания эритроцитов (СОЭ) и оценки пациентом активности заболевания (VAS; мм) (см., например, Van der Heijde D.M.F.M., et al., *J. Rheumatol.*, 20:579-8, (1993); Prevoo M.L.L., et al., *Arthritis Rheum.*, 38:44-8, (1995), все из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме).

В следующем варианте осуществления в качестве DAI используют группу оценки волчанки Британских островов (BILAG) (см., например, Isenberg, et al., *Rheumatology*, 44:902-6, (2005); Gordon, et al., *Rheumatology*, 42(11): 1372-9, (2003); Isenberg, et al., *Lupus*, 9(9): 651-4, (2000); Hay et al., *Q J Med.*, 86: 447-58, (1993); и руководство для пользователя программы BLIPS™ Version 3.0 Software, вышедшей 4

апреля 2004 г., ADS-Limathon Ltd., все из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме). Индекс BILAG включает 8 органов/систем организма, о которых известно, что они поражаются при волчанке, и показатели, все из которых зависят от того, являются ли клинические признаки новыми, ухудшенными, такими же или улучшенными по сравнению с предыдущими показателями. Для каждого из 8 органов/систем организма тяжесть проявлений заболевания SLE представляет собой показатель A, B, C, D или E, где A является наиболее тяжелым (см., например, Нау, ниже). Индекс BILAG обеспечивает суммарный балл для оценки тяжести заболевания и эффективности лечения. Этот суммарный балл отражает вклад каждого из 8 органов/систем организма, пораженных при волчанке. С использованием BILAG или других показателей, известных в данной области, лечение можно нацеливать на пациентов с волчанкой с проявлениями заболевания в конкретных подгруппах органов/систем.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описанным в настоящем описании, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если у пациента было достигнуто снижение его показателя SELENA SLEDAI. В конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описанным в настоящем описании, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если у пациента было достигнуто снижение его показателя SELENA SLEDAI по сравнению с показателем SELENA SLEDAI того же пациента на исходном уровне, показателем SELENA SLEDAI, определенным перед началом лечения пациента иммуномодулирующим средством. В конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описанным в настоящем описании, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если у пациента было достигнуто снижение его показателя SELENA SLEDAI по меньшей мере на 4 балла. В конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описанным в настоящем описании, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если у пациента было достигнуто снижение его показателя SELENA SLEDAI по меньшей мере на 4 балла по сравнению с исходным показателем SELENA SLEDAI у того же пациента, показателем SELENA SLEDAI, определенным непосредственно перед началом лечения пациента иммуномодулирующим средством.

В другом конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описанным в настоящем описании, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если пациент не испытывает ухудшения активности заболевания, как определяют посредством общей оценки терапевтом (PGA). В конкретном варианте осуществления пациент не испытывает ухудшения активности заболевания, если показатель PGA снижается, остается стабильным или повышается менее чем на 0,3 балла. В конкретном варианте осуществления пациент не испытывает ухудшения активности заболевания, если показатель PGA снижается, остается стабильным или повышается менее чем на 0,3 балла по сравнению с исходным показателем PGA того же пациента, показателем PGA, определяемым непосредственно перед началом лечения пациента иммуномодулирующим средством.

В другом конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описанным в настоящем описании, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если пациент не испытывает ухудшения активности заболевания, как определяют посредством индекса активности заболевания группы оценки волчанки Британских островов (BILAG). В конкретном варианте осуществления пациент не испытывает ухудшения активности заболевания, если у пациента не появляется новый показатель органного домена BILAG A или не появляются 2 новых показателя органного домена BILAG B. В конкретном варианте осуществления пациент не испытывает ухудшения активности заболевания, если у пациента не появляется новый показатель органного домена BILAG A или не появляются 2 новых показателя органного домена BILAG B по сравнению с исходной оценкой BILAG у пациента, оценкой BILAG, определенной непосредственно перед началом лечения пациента иммуномодулирующим средством.

В другом конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описанным в настоящем описании, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если у пациента было достигнуто снижение его показателя SELENA SLEDAI, не было последующего ухудшения его показателя PGA, и он не испытывал ухудшения активности заболевания, как определяют по индексу активности заболевания группы оценки волчанки Британских островов (BILAG), по сравнению с его исходным показателем SELENA SLEDAI, показателем PGA и оценкой BILAG соответственно. В конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описанным в настоящем описании, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если у пациента было достигнуто снижение показателя SELENA SLEDAI по меньшей мере 4 балла, он не обладал повышением его показателя PGA более чем на 0,30 балла и у него не появляется новый показатель органного домена BILAG A или не появляются 2 новых показателя органного домена BILAG B, по сравнению с их исходным показателем SELENA SLEDAI, показателем PGA и оценкой BILAG соответственно.

В конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описанным в настоящем описании, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если пациент обладает улучшенным показателем EQ-5D. В другом конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описанным в настоящем описании, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если пациент обладает улучшенным показателем EQ-5D по сравнению с исходным показателем EQ-5D у пациента.

В конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описанным в настоящем описании, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если у пациента определяют снижение утомляемости, как показывают по показателю FACIT-F пациента. В другом конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описанным в настоящем описании, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если у пациента определяют снижение утомляемости, как показывают по показателю FACIT-F пациента, по сравнению с исходным показателем FACIT-F у пациента.

В конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описанным в настоящем описании, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если пациент обладает улучшенным показателем DAS28. В другом конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описанным в настоящем описании, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если пациент обладает улучшенным показателем DAS28 по сравнению с исходным показателем DAS28 у пациента.

- 13 -

иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описанным в настоящем описании, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если пациент обладает сниженной частотой и/или длительностью обострений. В другом конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описанным в настоящем описании, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если пациент обладает сниженной частотой и/или длительностью обострений по сравнению с частотой и/или длительностью обострений перед лечением иммуномодулирующим средством. В другом конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описанным в настоящем описании, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если пациент обладает сниженной тяжестью обострений. В другом конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описанным в настоящем описании, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если пациент обладает сниженной частотой и/или тяжестью обострений по сравнению с частотой и/или тяжестью обострений перед лечением иммуномодулирующим средством. Индекс обострения SLE оценивает частоту и тяжесть ухудшений симптомов волчанки (обострений). Обострения классифицируют как "мягкие или умеренные" или "тяжелые". Мягкие или умеренные обострения вовлекают один или несколько из следующих признаков: изменение показателя SELENA SLEDAI, составляющее 3 балла или более; вновь появившийся/ухудшенный дискоидный, фоточувствительный, глубокий, кожный васкулит или буллезная волчанка; носоглоточные язвы; плеврит; перикардит; артрит; лихорадка (SLE); повышение дозы преднизона, но не более чем 0,5 мг/кг/сутки; дополнительный NSAID или плаквенил в случае активности заболевания; и повышение показателя PGA более чем на 1,0, но не более чем на 2,5. Тяжелое обострение включает один или несколько из следующих признаков: изменение показателя SELENA SLEDAI более чем на 12; вновь появившаяся/ухудшенная CNS-SLE; васкулит; нефрит; миозит; Plt <60000; железодефицитная анемия (<7% или снижение Hb >3%); удвоение дозировки преднизона; повышение преднизона до более чем 0,5 мг/кг/сутки; назначение цитоксана; назначение азатиоприна; назначение метотрексата; госпитализация (SLE) и повышение показателя PGA более чем на 2,5. В другом конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описанным в настоящем описании, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если пациент обладает сниженной частотой и/или тяжестью обострений, как определяют по индексу обострений SLE. В другом конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описанным в настоящем описании, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если пациент обладает сниженной частотой и/или тяжестью обострений, как определяют с помощью индекса обострений SLE, по сравнению с предшествующей частотой и/или тяжестью обострений у пациента. В другом конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описанным в настоящем описании, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если пациент обладает сниженной частотой и/или тяжестью обострений, как определяют с помощью модифицированной версии индекса обострений SLE. В другом конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описанным в настоящем описании, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если пациент обладает сниженной частотой и/или тяжестью обострений, как определяют с помощью модифицированной версии индекса обострений SLE по сравнению с предшествующей частотой и/или тяжестью обострений у пациента. Модифицированная версия индекса обострений SLE исключает тяжелые обострения, вызванные изменением только показателя SELENA SLEDAI.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа, включая, но не ограничиваясь ими, антитело против нейтрокина-альфа или его антигенсвязывающий фрагмент, белок рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его фрагмент или вариант, антитело против рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или их антигенсвязывающий фрагмент, связывающие нейтрокин-альфа полипептиды, варианты полипептида нейтрокина-альфа и/или APRIL, и антисмысловые или siRNA, которые нацелены на нейтрокин-альфа, APRIL, TACI, BCMA, BAFF-R или другой рецептор для нейтрокина-альфа и/или APRIL, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если у пациента было достигнуто снижение его/ее показателя SELENA SLEDAI. В конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если у пациента достигнуто снижение его/ее показателя SELENA SLEDAI, по сравнению с исходным показателем SELENA SLEDAI того же пациента, показателем SELENA SLEDAI, определенным непосредственно перед началом лечения пациента антагонистом нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если у пациента достигнуто снижение его/ее показателя SELENA SLEDAI по меньшей мере на четыре балла. В конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если у пациента достигнуто снижение его/ее показателя SELENA

SLEDAI по меньшей мере на четыре балла по сравнению с исходным показателем SELENA SLEDAI того же пациента, показателем SELENA SLEDAI, определенным непосредственно перед началом лечения пациента антагонистом нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок TACI-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок BAFF-R-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой пептидное антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой фрагмент или вариант белка нейтрокина-альфа, который функционирует в качестве доминантно-негативной формы.

В другом конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа, включая, но не ограничиваясь ими, антитело против нейтрокина-альфа или его антигенсвязывающий фрагмент, белок рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его фрагмент или вариант, антитело против рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие нейтрокин-альфа полипептиды, варианты полипептида нейтрокина-альфа и/или APRIL, и антисмысловые или siRNA, которые нацелены на нейтрокин-альфа, APRIL, TACI, BCMA, BAFF-R или другой рецептор для нейтрокина-альфа и/или APRIL, считают отвечающим/отващавшим на лечение, если пациент не испытывает ухудшения активности заболевания, как определяют посредством общей оценки терапевтом (PGA). В конкретном варианте осуществления пациент не испытывает ухудшения активности заболевания, если показатель PGA снижается, остается стабильным или повышается менее чем на 0,3 балла. В конкретном варианте осуществления пациент не испытывает ухудшения активности заболевания, если показатель PGA снижается, остается стабильным или повышается менее чем на 0,3 балла по сравнению с исходным показателем PGA у того же пациента, показателем PGA, определенным непосредственно перед началом лечения пациента антагонистом нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок TACI-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок BAFF-R-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой пептидное антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой фрагмент или вариант белка нейтрокина-альфа, который функционирует в качестве доминантно-негативной формы.

В другом конкретном варианте осуществления пациента, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа, включая, но не ограничиваясь этим, антитело против нейтрокина-альфа или его антигенсвязывающий фрагмент, белок рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его фрагмент или вариант, антитело против рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие нейтрокин-альфа полипептиды, варианты полипептида нейтрокина-альфа и/или APRIL, и антисмысловые или siRNA, которые нацелены на нейтрокин-альфа, APRIL, TACI, BCMA, BAFF-R или другой рецептор для нейтрокина-альфа и/или APRIL, считают отвечающим/отващавшим на лечение, если пациент не испытывает ухудшения активности заболевания, как определяют по индексу активности заболевания группы оценки волчанки Британских островов (BILAG). В конкретном варианте осуществления пациент не испытывает ухудшения активности заболевания, если у пациента не появляется новый показатель органного домена BILAG A или не появляется 2 новых показателя органного домена BILAG B. В конкретном варианте осуществления пациент не испытывает ухудшения активности заболевания, если у пациента не появляется новый показатель органного домена BILAG A или не появляется 2 новых показателя органного домена BILAG B по сравнению с исходной оценкой BILAG у пациента, показателем BILAG, определенным непосредственно перед началом лечения пациента антагонистом нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок TACI-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок BAFF-R-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой пептидное антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой фрагмент или вариант белка нейтрокина-альфа, который функционирует в качестве доминантно-негативной формы.

В другом конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа, включая, но не ограничиваясь ими, антитело против нейтрокина-альфа или его антигенсвязывающий фрагмент, белок рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его фрагмент или вариант, антитело против рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие нейтрокин-альфа полипептиды, варианты полипептида нейтрокина-альфа и/или APRIL и антисмысловые или siRNA, которые нацелены на нейтрокин-альфа, APRIL, TACI, BCMA, BAFF-R или другой рецептор для нейтрокина-альфа и/или APRIL, считают отвечающим/отващавшим на лечение, если у пациента достигнуто сни-

жение его/ее показателя SELENA SLEDAI, если он не имеет существенного ухудшения его/ее показателя PGA и если он не испытывает ухудшения активности заболевания, как определяют по индексу активности заболевания группы оценки волчанки Британских островов (BILAG), по сравнению с его/ее исходным показателем SELENA SLEDAI, показателем PGA и показателем BILAG соответственно. В конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если у пациента достигнуто снижение его/ее показателя SELENA SLEDAI по меньшей мере на 4 балла, если он не обладает повышением его/ее показателя PGA более чем 0,30 балла и если у него не появляется новый показатель органного домена BILAG А или не появляется 2 новых показателя органного домена BILAG В по сравнению с его/ее исходным показателем SELENA SLEDAI, показателем PGA и показателем BILAG соответственно. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок TACI-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок BAFF-R-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой пептидное антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой фрагмент или вариант белка нейтрокина-альфа, который функционирует в качестве доминантно-негативной формы.

В другом конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа, включая, но не ограничиваясь ими, антитело против нейтрокина-альфа или его антигенсвязывающий фрагмент, белок рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его фрагмент или вариант, антитело против рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие нейтрокин-альфа полипептиды, варианты полипептида нейтрокина-альфа и/или APRIL и антисмысловые или siRNA, которые нацелены на нейтрокин-альфа, APRIL, TACI, BCMA, BAFF-R или другой рецептор для нейтрокина-альфа и/или APRIL, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если доза преднизона у пациента была снижена. В другом конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если доза преднизона у пациента была снижена по сравнению с исходной дозой преднизона у пациента, где пациент принимает дозу преднизона непосредственно перед началом лечения антагонистом нейтрокина-альфа. В другом конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если доза преднизона у пациента была снижена по меньшей мере на 25%. В другом конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если доза преднизона у пациента была снижена по меньшей мере на 25% до дозы, меньшей или равной 7,5 мг/сутки. В другом конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если доза преднизона у пациента была снижена по меньшей мере на 25% по сравнению с исходной дозой преднизона у пациента до дозы, меньшей или равной 7,5 мг/сутки. В другом конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если доза преднизона у пациента была снижена по меньшей мере на 50%. В другом конкретном варианте осуществления пациента, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если доза преднизона у пациента была снижена по меньшей мере на 50% до дозы, меньшей или равной 7,5 мг/сутки. В другом конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если доза преднизона у пациента была снижена по меньшей мере на 50% по сравнению с исходной дозой преднизона у пациента до дозы, меньшей или равной 7,5 мг/сутки. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок TACI-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок BAFF-R-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой пептидное антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой фрагмент или вариант белка нейтрокина-альфа, который функционирует в качестве доминантно-негативной формы.

Для определения качества ответа пациента с волчанкой на лечение можно использовать другие показатели. В конкретном варианте осуществления пациента, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа, включая, но не ограничиваясь ими, антитело против нейтрокина-альфа или его антигенсвязывающий фрагмент, белок рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его фрагмент или вариант, антитело против рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие нейтрокин-альфа полипептиды, варианты полипептида нейтрокина-альфа и/или APRIL и антисмысловые или siRNA, которые нацелены на нейтрокин-альфа, APRIL, TACI, BCMA, BAFF-R или другой рецептор для нейтрокина-альфа и/или APRIL, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если пациент обладает улучшенным показа-

В конкретном варианте осуществления пациента, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа, включая, но не ограничиваясь ими, антитело против нейтрокина-альфа или его антигенсвязывающий фрагмент, белок рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его фрагмент или вариант, антитело против рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие нейтрокин-альфа полипептиды, варианты полипептида нейтрокина-альфа и/или APRIL и антисмысловые или siRNA, которые нацелены на нейтрокин-альфа, APRIL, TACI, BCMA, BAFF-R или другой рецептор для нейтрокина-альфа и/или APRIL, считают отвечающим/отвачавшим на лечение, если у пациента определяют сниженную утомляемость, как показывают с помощью показателя FACIT-F. В другом конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа, включая, но не ограничиваясь ими, антитело против нейтрокина-альфа или его антигенсвязывающий фрагмент, белок рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его фрагмент или вариант, антитело против рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие нейтрокин-альфа полипептиды, варианты полипептида нейтрокина-альфа и/или APRIL и антисмысловые или siRNA, которые нацелены на нейтрокин-альфа, APRIL, TACI, BCMA, BAFF-R или другой рецептор для нейтрокина-альфа и/или APRIL, считают отвечающим/отвачавшим на лечение, если у пациента определяют сниженную утомляемость, как показывают с помощью показателя FACIT-F, по сравнению с исходным показателем FACIT-F у пациента. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок TACI-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой

белок BAFF-R-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой пептидное антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой фрагмент или вариант белка нейтрокина-альфа, который функционирует в качестве доминантно-негативной формы.

В конкретном варианте осуществления пациента, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа, включая, но не ограничиваясь ими, антитело против нейтрокина-альфа или его антигенсвязывающий фрагмент, белок рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его фрагмент или вариант, антитело против рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие нейтрокин-альфа полипептиды, варианты полипептида нейтрокина-альфа и/или APRIL и антисмысловые или siRNA, которые нацелены на нейтрокин-альфа, APRIL, TACI, BCMA, BAFF-R или другой рецептор для нейтрокина-альфа и/или APRIL, считают отвечающим/отвавшим на лечение, если пациент обладает улучшенным показателем DAS28. В другом конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа, включая, но не ограничиваясь ими, антитело против нейтрокина-альфа или его антигенсвязывающий фрагмент, белок рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его фрагмент или вариант, антитело против рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие нейтрокин-альфа полипептиды, варианты полипептида нейтрокина-альфа и/или APRIL и антисмысловые или siRNA, которые нацелены на нейтрокин-альфа, APRIL, TACI, BCMA, BAFF-R или другой рецептор для нейтрокина-альфа и/или APRIL, считают отвечающим/отвавшим на лечение, если пациент обладает улучшенным показателем DAS28 по сравнению с исходным показателем DAS28 у пациента. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок TACI-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок BAFF-R-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой пептидное антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой фрагмент или вариант белка нейтрокина-альфа, который функционирует в качестве доминантно-негативной формы.

В другом конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа, включая, но не ограничиваясь ими, антитело против нейтрокина-альфа или его антигенсвязывающий фрагмент, белок рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его фрагмент или вариант, антитело против рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие нейтрокин-альфа полипептиды, варианты полипептида нейтрокина-альфа и/или APRIL, и антисмысловые или siRNA, которые нацелены на нейтрокин-альфа, APRIL, TACI, BCMA, BAFF-R или другой рецептор для нейтрокина-альфа и/или APRIL, считают отвечающим/отвавшим на лечение, если пациент обладает сниженной частотой и/или длительностью обострений. В другом конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа, считают отвечающим/отвавшим на лечение, если пациент обладает сниженной частотой и/или длительностью обострений по сравнению с частотой и/или длительностью обострений перед лечением антагонистом нейтрокина-альфа. В другом конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа, считают отвечающим/отвавшим на лечение, если пациент обладает сниженной частотой обострений. В другом конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа, считают отвечающим/отвавшим на лечение, если пациент обладает сниженной тяжестью обострений по сравнению с тяжестью обострений перед лечением антагонистом нейтрокина-альфа. Индекс обострений SLE оценивает частоту и тяжесть ухудшений симптомов волчанки (обострения). Обострения классифицируют как "мягкие или умеренные" или "тяжелые". Мягкие или умеренные обострения вовлекают один или несколько из следующих признаков: измерение показателя SELENA SLEDAI, составляющее 3 балла или более; вновь появившийся/ухудшенный дискоидный, фоточувствительный, глубокий, кожный васкулит или буллезная волчанка; носоглоточные язвы; плеврит; перикардит; артрит; лихорадка (SLE); повышение дозы преднизона, но не более чем 0,5 мг/кг/сутки; дополнительный NSAID или плаквенил в случае активности заболевания; и повышение показателя PGA более чем на 1,0, но не более чем на 2,5. Тяжелое обострение включает один или несколько из следующих признаков: изменение показателя SELENA SLEDAI более чем на 12; вновь появившаяся/ухудшенная CNS-SLE; васкулит; нефрит; миозит; Plt <60000; железодефицитная анемия (<7% или снижение Hb >3%); удвоение дозировки преднизона; повышение преднизона до более чем 0,5 мг/кг/сутки; назначение цитоксана; назначение азатиоприна; назначение метотрексата; госпитализация (SLE) и повышение показателя PGA более чем на 2,5. В другом конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа, считают отвечающим/отвавшим на лечение, если пациент обладает сниженной частотой и/или тяжестью обострений, как определяют с помощью индекса обострений SLE. В другом конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа, считают отвечающим/отвавшим на лечение, если пациент обладает сниженной частотой и/или тяжестью обострений, как определяют с помощью индекса обострений SLE.

щим/отвечавшим на лечение, если пациент обладает сниженной частотой и/или тяжестью обострений, как определяют с помощью индекса обострений SLE, по сравнению с частотой и/или тяжестью обострений перед лечением антагонистом нейтрокина-альфа. В другом конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если пациент обладает сниженной частотой и/или тяжестью обострений, как определяют с помощью модифицированной версии индекса обострений SLE. В другом конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если пациент обладает сниженной частотой и/или тяжестью обострений, как определяют с помощью модифицированной версии индекса обострений SLE, по сравнению с частотой и/или тяжестью обострений перед лечением антагонистом нейтрокина-альфа. Модифицированная версия индекса обострений SLE исключает тяжелые обострения, вызываемые только изменением показателя SELENA SLEDAI. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок TACI-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок BAFF-R-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой пептидное антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой фрагмент или вариант белка нейтрокина-альфа, который функционирует в качестве доминантно-негативной формы.

Описанные выше индексы активности заболевания (например, SELENA SLEDAI, PGA, BILAG, индекс обострения SLE, показатель наблюдения за здоровьем SF-36, EQ-5D, FACIT-F, DAS28) можно использовать для оценки состояния пациента с волчанкой отдельно или в сочетании. Улучшение здоровья пациента, как определяют посредством этих индексов активности заболевания, также можно оценивать после начала лечения антагонистом нейтрокина-альфа или другим иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описанным в настоящем описании, включая, но не ограничиваясь ими, антитело против нейтрокина-альфа или его антигенсвязывающий фрагмент, белок рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его фрагмент или вариант, антитело против рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие нейтрокин-альфа полипептиды, варианты полипептида нейтрокина-альфа и/или APRIL, и антисмысловые или siRNA, которые нацелены на нейтрокин-альфа, APRIL, TACI, BCMA, BAFF-R или другой рецептор для нейтрокина-альфа и/или APRIL, относительно одного или нескольких предшествующих определений показателей индексов активности заболевания пациента. Кроме того, в конкретном варианте осуществления пациента, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа или другим иммуномодулирующим средством, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если у пациента сохраняется улучшенный показатель активности заболевания относительно предыдущего определения. В конкретном варианте осуществления один или несколько показателей индекса активности заболевания оценивают перед началом лечения антагонистом нейтрокина-альфа или другим иммуномодулирующим средством и через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 недель, месяцев и/или лет после начала лечения антагонистом нейтрокина-альфа или другим иммуномодулирующим средством. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок TACI-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок BAFF-R-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой пептидное антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой фрагмент или вариант белка нейтрокина-альфа, который функционирует в качестве доминантно-негативной формы.

В конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой с проявлениями заболевания в одном или нескольких органах/системах лечат антагонистом нейтрокина-альфа и/или другим иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описанным в настоящем описании, включая, но не ограничиваясь ими, антитело против нейтрокина-альфа или его антигенсвязывающий фрагмент, белок рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его фрагмент или вариант, антитело против рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие нейтрокин-альфа полипептиды, варианты полипептида нейтрокина-альфа и/или APRIL, и антисмысловые или siRNA, которые нацелены на нейтрокин-альфа, APRIL, TACI, BCMA, BAFF-R или другой рецептор для нейтрокина-альфа и/или APRIL. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок TACI-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок BAFF-R-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой пептидное антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой фрагмент или вариант белка нейтрокина-альфа, который функционирует в качестве доминантно-негативной формы. В конкретных вариантах осуществления пациента с волчанкой с проявлениями заболевания в одной или нескольких системах внутренних органов с вовлечени-

ем системы кожи и слизистой оболочки и/или системы скелетных мышц или без него лечат антагонистом нейтрокина-альфа и/или другим иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описанным в настоящем описании. В конкретных вариантах осуществления пациента с волчанкой с проявлениями заболевания в одной или нескольких системах внутренних органов без вовлечения системы кожи и слизистой оболочки и/или системы скелетных мышц лечат антагонистом нейтрокина-альфа и/или другим иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описанным в настоящем описании. При волчанке проявления заболевания, вовлекающие систему кожи и слизистой оболочки и/или систему скелетных мышц, включают, но не ограничиваются ими, дискоидное высыпание, высыпание в области скуловой кости или другую кожную сыпь, изъязвление слизистой оболочки, панникулит, кожный васкулит, кожный тромбоз, инфаркты в пальцах, тромбоз в пальцах, алопецию, околоногтевую эритему, ознобления, кровоизлияние у основания ногтей, миозит, полиартрит, артрит, тендинит, артралгию и миалгию. При волчанке системы внутренних органов, которые могут быть поражены волчанкой, включают, но не ограничиваются ими, нервную систему, кровеносную систему, дыхательную систему, мочевую/выделительную систему, пищеварительную систему и глаза. Проявления заболевания при волчанке в нервной системе включают, но не ограничиваются ими, асептический менингит, церебральный васкулит, демиелинизирующий синдром, миелопатию, острый психоз, психоз, острую воспалительную демиелинизирующую полирадикулоневропатию, мононевропатию, черепную невропатию, плексопатию, полиневропатию, судорожное нарушение, эпилептический статус, цереброваскулярное заболевание, не являющееся следствием васкулита, когнитивную дисфункцию, нарушение движения, автономное нарушение, мозжечковую атаксию, головную боль, мигрень, нарушение настроения и тревожное нарушение. Проявления заболевания при волчанке в кровеносной системе включают, но не ограничиваются ими, миокардит, сердечную недостаточность, аритмию, вновь появившуюся дисфункцию клапанов, серозит, тампонаду сердца, плевральный выпот с диспноэ, геморрагию в легких, легочный васкулит, интерстициальный альвеолит, интерстициальный пневмонит, синдром сдавления легких, аортит и коронарный васкулит. Проявления заболевания при волчанке в пищеварительной системе включают, но не ограничиваются ими, перитонит, брюшной серозит, асцит, волчаночный энтерит, волчаночный колит, мальабсорбцию, связанную с потерей белка энтеропатию, гепатит, псевдообструкцию кишечника, острый холецистит и острый панкреатит. Проявления заболевания при волчанке, ассоциированные с глазом, включают, но не ограничиваются ими, глазничное воспаление, кератит, передний увеит, задний увеит, васкулит сетчатки, эписклерит, склерит, ретинальное/хориоидальное сосудисто-окклюзионное заболевание, клеточные тельца, оптический неврит и переднюю ишемическую оптическую невропатию.

Ответ пациента на лечение антагонистом нейтрокина-альфа или другим иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описанным в настоящем описании, включая, но не ограничиваясь ими, антитело против нейтрокина-альфа или его антигенсвязывающий фрагмент, белок рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его фрагмент или вариант, антитело против рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие нейтрокин-альфа полипептиды, варианты полипептида нейтрокина-альфа и/или APRIL, и антисмысловые или siRNA, которые нацелены на нейтрокин-альфа, APRIL, TACI, BCMA, BAFF-R или другой рецептор для нейтрокина-альфа и/или APRIL, также можно подвергать мониторингу посредством оценки биомаркеров через один или несколько промежутков времени после начала лечения и сравнения оценки биомаркеров пациента с исходным уровнем у пациента и/или предшествующим определением того же биомаркера(ов). Биомаркеры, которые можно оценивать, включают, но не ограничиваются ими, уровни иммуноглобулинов (например, общий сывороточный иммуноглобулин, а также сывороточные уровни IgM, IgG, IgA и/или IgE), уровни аутоантител (например, уровни антитела против дцДНК, антитела против CCP, антитела против Ro/SS-A, антитела против La/SS-B, антитела против RNP, антитела против кардиолипина (антифосфолипидное антитело) и антитела против Sm, а также титр ANA), количества В-клеток (например, количества всех В-клеток, количества активированных В-клеток, количества наивных В-клеток, количества В-клеток памяти, количества плазматических В-клеток и количества плазматитоидных В-клеток, количества общих CD19+ В-клеток и/или CD20+ В-клеток), уровень C4-комплемента, уровень C3-комплемента. В конкретном варианте осуществления показатели биомаркеров оценивают перед началом лечения антагонистом нейтрокина-альфа или другим иммуномодулирующим средством и/или через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 недель, месяцев и/или лет после начала лечения антагонистом нейтрокина-альфа или другим иммуномодулирующим средством. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок TACI-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок BAFF-R-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой пептидное антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой фрагмент или вариант белка нейтрокина-альфа, который функционирует в качестве доминантно-негативной формы.

В конкретном варианте осуществления пациента, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа или другим иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описан-

ным в настоящем описании, включая, но не ограничиваясь ими, антитело против нейтрокина-альфа или его антигенсвязывающий фрагмент, белок рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его фрагмент или вариант, антитело против рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие нейтрокин-альфа полипептиды, варианты полипептида нейтрокина-альфа и/или APRIL, и антисмысловые или siRNA, которые нацелены на нейтрокин-альфа, APRIL, TACI, BCMA, BAFF-R или другой рецептор для нейтрокина-альфа и/или APRIL, считают отвечающим/отважавшим на лечение, если пациент обладает сниженным уровнем иммуноглобулинов (например, уровнями общих сывороточных иммуноглобулинов, а также уровнями сывороточных IgM, IgG, IgA и/или IgE) по сравнению с исходными показателями иммуноглобулинов у пациента. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок TACI-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок BAFF-R-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой пептидное антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой фрагмент или вариант белка нейтрокина-альфа, который функционирует в качестве доминантно-негативной формы. В конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа или другим иммуномодулирующим средством, считают отвечающим/отважавшим на лечение, если пациент обладает сниженным уровнем иммуноглобулинов (например, уровнями общих сывороточных иммуноглобулинов, а также уровнями сывороточных IgM, IgG, IgA и/или IgE) по сравнению с одним или несколькими предыдущими показателями иммуноглобулинов у пациента. В конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа или другим иммуномодулирующим средством, считают отвечающим/отважавшим на лечение, если у пациента сохраняется сниженный уровень иммуноглобулинов (например, уровни общих сывороточных иммуноглобулинов, а также уровни сывороточных IgM, IgG, IgA и/или IgE) по сравнению с одним или несколькими предыдущими показателями иммуноглобулинов у пациента. В конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа или другим иммуномодулирующим средством, считают отвечающим/отважавшим на лечение, если у пациента достигнут нормальный уровень иммуноглобулинов (например, уровни общих сывороточных иммуноглобулинов, а также уровни сывороточных IgM, IgG, IgA и/или IgE).

В конкретном варианте осуществления пациента, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа, включая, но не ограничиваясь ими, антитело против нейтрокина-альфа или его антигенсвязывающий фрагмент, белок рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его фрагмент или вариант, антитело против рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие нейтрокин-альфа полипептиды, варианты полипептида нейтрокина-альфа и/или APRIL, и антисмысловые или siRNA, которые нацелены на нейтрокин-альфа, APRIL, TACI, BCMA, BAFF-R или другой рецептор для нейтрокина-альфа и/или APRIL, считают отвечающим/отважавшим на лечение, если пациент обладает сниженным уровнем аутоантитела (например, уровнями антитела против дцДНК, антитела против CCP, антитела против Ro/SS-A, антитела против La/SS-B, антитела против RNP, антитела против кардиолипина (антифосфолипидное антитело) и антитела против Sm, а также титром ANA), по сравнению с исходными показателями аутоантитела у пациента. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок TACI-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок BAFF-R-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой пептидное антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой фрагмент или вариант белка нейтрокина-альфа, который функционирует в качестве доминантно-негативной формы. В конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа или другим иммуномодулирующим средством, считают отвечающим/отважавшим на лечение, если пациент обладает сниженным уровнем аутоантитела (например, уровнями антитела против дцДНК, антитела против CCP, антитела против Ro/SS-A, антитела против La/SS-B, антитела против RNP, антитела против кардиолипина (антифосфолипидное антитело) и антитела против Sm, а также титром ANA), по сравнению с одним или несколькими предыдущими показателями аутоантитела у пациента. В конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа или другим иммуномодулирующим средством, считают отвечающим/отважавшим на

лечение, если у пациента достигнут нормальный уровень аутоантитела (например, уровни антитела против дцДНК, антитела против ССР, антитела против Ro/SS-A, антитела против La/SS-B, антитела против RNP, антитела против кардиолипина (антифосфолипидное антитело) и антитела против Sm, а также титр ANA). В конкретном варианте осуществления определяют аутоантитела изотипа IgG.

В конкретном варианте осуществления пациента, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа или другим иммуномодулирующим средством, включая, но не ограничиваясь ими, антитело против нейтрокина-альфа или его антигенсвязывающий фрагмент, белок рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его фрагмент или вариант, антитело против рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие нейтрокин-альфа полипептиды, варианты полипептида нейтрокина-альфа и/или APRIL, и антисмысловые или siRNA, которые нацелены на нейтрокин-альфа, APRIL, TACI, BCMA, BAFF-R или другой рецептор для нейтрокина-альфа и/или APRIL, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если пациент обладает сниженным количеством В-клеток (например, количествами всех В-клеток, количествами активированных В-клеток, количествами наивных В-клеток, количествами В-клеток памяти, количествами плазматических В-клеток и количествами плазматоидных В-клеток, общими количествами CD19+ В-клеток и/или CD20+ В-клеток) по сравнению с исходным показателем количества В-клеток у пациента. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок TACI-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок BAFF-R-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой пептидное антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой фрагмент или вариант белка нейтрокина-альфа, который функционирует в качестве доминантно-негативной формы. В конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа или другим иммуномодулирующим средством, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если пациент обладает сниженным количеством В-клеток (например, количествами всех В-клеток, количествами активированных В-клеток, количествами наивных В-клеток, количествами В-клеток памяти, количествами плазматических В-клеток и количествами плазматоидных В-клеток, общими количествами CD19+ В-клеток и/или CD20+ В-клеток) по сравнению с одним или несколькими предыдущими показателями количества В-клеток у пациента. В конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа или другим иммуномодулирующим средством, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если у пациента сохраняется сниженное количество В-клеток (например, количества всех В-клеток, количества активированных В-клеток, количества наивных В-клеток, количества В-клеток памяти, количества плазматических В-клеток и количества плазматоидных В-клеток, общие количества CD19+ В-клеток и/или CD20+ В-клеток) по сравнению с одним или несколькими предыдущими показателями количества В-клеток у пациента. В конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа или другим иммуномодулирующим средством, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если у пациента достигнуто нормальное количество В-клеток (например, количества всех В-клеток, количества активированных В-клеток, количества наивных В-клеток, количества В-клеток памяти, количества плазматических В-клеток и количества плазматоидных В-клеток, общие количества CD19+ В-клеток и/или CD20+ В-клеток).

В конкретном варианте осуществления пациента, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа или другим иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описанным в настоящем описании, включая, но не ограничиваясь ими, антитело против нейтрокина-альфа или его антигенсвязывающий фрагмент, белок рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его фрагмент или вариант, антитело против рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие нейтрокин-альфа полипептиды, варианты полипептида нейтрокина-альфа и/или APRIL, и антисмысловые или siRNA, которые нацелены на нейтрокин-альфа, APRIL, TACI, BCMA, BAFF-R или другой рецептор для нейтрокина-альфа и/или APRIL, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если пациент обладает повышенным уровнем фактора системы комплемента C4, по сравнению с исходными показателями C4 у пациента. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок TACI-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок BAFF-R-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой пептидное антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой фрагмент или вариант белка нейтрокина-альфа, который функционирует в качестве доминантно-негативной формы. В конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа или другим иммуномодулирующим средством, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если пациент обладает повышенным уровнем C4, по сравнению с одним или несколькими предыдущими показателями C4 у пациента. В

конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа или другим иммуномодулирующим средством, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если у пациента сохраняется повышенный уровень С4, по сравнению с одним или несколькими предыдущими показателями С4 у пациента. В конкретном варианте осуществления пациента, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа или другим иммуномодулирующим средством, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если у пациента достигнут нормальный уровень С4.

В конкретном варианте осуществления пациента, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа или другим иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описанным в настоящем описании, включая, но не ограничиваясь ими, антитело против нейтрокина-альфа или его антигенсвязывающий фрагмент, белок рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его фрагмент или вариант, антитело против рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие нейтрокин-альфа полипептиды, варианты полипептида нейтрокина-альфа и/или APRIL, и антисмысловые или siRNA, которые нацелены на нейтрокин-альфа, APRIL, TACI, BCMA, BAFF-R или другой рецептор для нейтрокина-альфа и/или APRIL, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если пациент обладает повышенным уровнем фактора системы комплемента С3, по сравнению с исходным показателем С3 у пациента. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок TACI-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок BAFF-R-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой пептидное антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой фрагмент или вариант белка нейтрокина-альфа, который функционирует в качестве доминантно-негативной формы. В конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа или другим иммуномодулирующим средством, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если пациент обладает повышенным уровнем С3, по сравнению с одним или несколькими предыдущими показателями С3 у пациента. В конкретном варианте осуществления пациента с волчанкой, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа или другим иммуномодулирующим средством, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если у пациента сохраняется повышенный уровень С3, по сравнению с одним или несколькими предыдущими показателями С3 у пациента. В конкретном варианте осуществления пациента, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа или другим иммуномодулирующим средством, считают отвечающим/отвечавшим на лечение, если у пациента достигнут нормальный уровень С3.

В конкретных вариантах осуществления это изобретение относится к способу лечения пациента, которого ранее лечили одним или несколькими иммунодепрессантами, включающему введение терапевтически эффективного количества антагониста нейтрокина-альфа или другого иммуномодулирующего средства, известного в данной области и/или описанного в настоящем описании, включая, но не ограничиваясь ими, антитело против нейтрокина-альфа или его антигенсвязывающий фрагмент, белок рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его фрагмент или вариант, антитело против рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие нейтрокин-альфа полипептиды, варианты полипептида нейтрокина-альфа и/или APRIL, и антисмысловые или siRNA, которые нацелены на нейтрокин-альфа, APRIL, TACI, BCMA, BAFF-R или другой рецептор для нейтрокина-альфа и/или APRIL. В конкретных вариантах осуществления это изобретение относится к способу лечения пациента, у которого ранее была диагностирована системная красная волчанка (волчанка) и которого ранее лечили одним или несколькими иммунодепрессантами, включающему введение терапевтически эффективного количества антагониста нейтрокина-альфа или другого иммуномодулирующего средства. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок TACI-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок BAFF-R-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой пептидное антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой фрагмент или вариант белка нейтрокина-альфа, который функционирует в качестве доминантно-негативной формы. В конкретных вариантах осуществления иммунодепрессант, которым ранее лечили пациента, представляет собой азатиоприн (например, IMURANTM), циклофосфамид (например, Cytoxan®, Neosar®, CTX), ингибитор кальциневрина, например, FK506, такролимус или циклоспорин (например, PROGRAF®) и/или CELLCEPT® (микофенолата мофетил, активным метаболитом которого является микофеноловая кислота).

В большинстве современных способов лечения волчанки и других аутоиммунных заболеваний используют лекарственные средства, которые неспецифично блокируют различные каскады воспаления. Возможно, наиболее опасными лекарственными средствами, используемыми в этом способе лечения, являются кортикостероиды. Несмотря на то что кортикостероиды, такие как преднизон, необходимы для

контроля проявлений заболевания, они также обладают множеством неблагоприятных эффектов на здоровье пациента, таких как общая иммуносуппрессия, ведущая к инфекции, остеопороз, ведущий к переломам, и атеросклероз, ведущий к сердечным приступам и инсультам с ранним началом. В клиническом испытании заявители обнаружили, что лечение антителом, которое нейтрализует белок нейтрокина-альфа, вводимым в качестве внутривенной инфузии на 0, 14, 28 сутки, а затем каждые четыре недели до 52 недели, было эффективным в отношении снижения дозировки кортикостероида преднизона, который был необходим для смягчения проявлений заболевания у пациентов с волчанкой. Конкретно, оказалось, что лечение антителом против нейтрокина-альфа ассоциировано со сниженным применением преднизона в ходе последних трех месяцев периода лечения. Среди пациентов, которые обладали титром ANA 1:80 или выше и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл, у большего процентного количества субъектов, получавших антитело против нейтрокина-альфа, была снижена их доза преднизона, тогда как в противоположность этому у большего количества субъектов, получавших лечение плацебо, доза преднизона была повышена более чем до 7,5 мг/сутки.

Таким образом, в одном варианте осуществления это изобретение относится к способу снижения частоты введения кортикостероидных лекарственных средств и/или количества кортикостероида, вводимого пациенту, включающему введение терапевтически эффективного количества антагониста нейтрокина-альфа или другого иммуномодулирующего средства, известного в данной области и/или описанного в настоящем описании, включая, но не ограничиваясь ими, антитело против нейтрокина-альфа или его антигенсвязывающий фрагмент, белок рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его фрагмент или вариант, антитело против рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие нейтрокин-альфа полипептиды, варианты полипептида нейтрокина-альфа и/или APRIL, и антисмысловые или siRNA, которые нацелены на нейтрокин-альфа, APRIL, TACI, BCMA, BAFF-R или другой рецептор для нейтрокина-альфа и/или APRIL. В конкретных вариантах осуществления кортикостероид представляет собой преднизон, преднизолон, гидрокортизон, метилпреднизолон или дексаметазон. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок TACI-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок BAFF-R-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой пептидное антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой фрагмент или вариант белка нейтрокина-альфа, который функционирует в качестве доминантно-негативной формы. В конкретном варианте осуществления пациент, у которого снижают терапию кортикостероидом, представляет собой пациента, страдающего от воспаления. В другом конкретном варианте осуществления пациент, у которого снижают терапию кортикостероидом, представляет собой пациента, страдающего аутоиммунным заболеванием, включая, но не ограничиваясь ими, ревматоидный артрит, волчанку, синдром Шегрена или другое аутоиммунное заболевание, такое как одно из перечисленных в настоящем описании заболеваний.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления это изобретение относится к способу снижения частоты введения кортикостероида и/или количества кортикостероида, вводимого пациенту с системной красной волчанкой (волчанкой), включающему введение терапевтически эффективного количества антагониста нейтрокина-альфа или другого иммуномодулирующего средства, известного в данной области и/или описанного в настоящем описании, включая, но не ограничиваясь ими, антитело против нейтрокина-альфа или его антигенсвязывающий фрагмент, белок рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его фрагмент или вариант, антитело против рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие нейтрокин-альфа полипептиды, варианты полипептида нейтрокина-альфа и/или APRIL, и антисмысловые или siRNA, которые нацелены на нейтрокин-альфа, APRIL, TACI, BCMA, BAFF-R или другой рецептор для нейтрокина-альфа и/или APRIL. В другом конкретном варианте осуществления это изобретение относится к способу снижения частоты введения преднизона и/или количества преднизона, вводимого пациенту с системной красной волчанкой (волчанкой), включающему введение терапевтически эффективного количества антагониста нейтрокина-альфа или другого иммуномодулирующего средства, включая, но не ограничиваясь ими, антитело против нейтрокина-альфа или его антигенсвязывающий фрагмент, белок рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его фрагмент или вариант, антитело против рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие нейтрокин-альфа полипептиды, варианты полипептида нейтрокина-альфа и/или APRIL, и антисмысловые или siRNA, которые нацелены на нейтрокин-альфа, APRIL, TACI, BCMA, BAFF-R или другой рецептор для нейтрокина-альфа и/или APRIL. В этом контексте "терапевтически эффективное количество" относится к количеству, которое снижает количество кортикостероида, необходимое для смягчения проявлений заболевания, от которого, как правило, назначают кортикостероиды. Эти проявления хорошо известны терапевтам/врачам, так же как технологии определения количества антитела/композиции, эффективного для снижения тяжести этих проявлений. В предпочтительных вариантах осуществления дозировка антитела по этому изобретению,

В конкретном варианте осуществления количества кортикостероида (например, преднизона), вводимого пациенту, снижается от ранее более высокой дозы до $\leq 7,5$ мг/сутки, когда пациенту одновременно проводят схему лечения, включающую введение антагониста нейтрокина-альфа или другого иммуномодулирующего средства, известного в данной области и/или описанного в настоящем описании. В конкретном варианте осуществления количество кортикостероида (например, преднизона), вводимого пациенту, в конечном итоге снижается по меньшей мере на 25%, когда пациенту одновременно проводят схему лечения, включающую введение антагониста нейтрокина-альфа или другого иммуномодулирующего средства, по сравнению с дозой преднизона, которую пациент получал перед началом схемы лечения, включающей введение антагониста нейтрокина-альфа или другого иммуномодулирующего средства. В конкретном варианте осуществления количество кортикостероида (например, преднизона), вводимого пациенту, в конечном итоге снижается по меньшей мере на 50%, когда пациенту одновременно проводят схему лечения, включающую введение антагониста нейтрокина-альфа или другого иммуномодулирующего средства, по сравнению с дозой преднизона, которую пациент получал перед началом схемы лечения, включающей введение антагониста нейтрокина-альфа или другого иммуномодулирующего средства. В конкретном варианте осуществления количество кортикостероида (например, преднизона), вводимого пациенту, в конечном итоге снижается по меньшей мере на 25% до дозы $\leq 7,5$ мг/сутки, когда пациенту одновременно проводят схему лечения, включающую введение антагониста нейтрокина-альфа или другого иммуномодулирующего средства, по сравнению с дозой преднизона, которую пациент получал

перед началом схемы лечения, включающей введение антагониста нейтрокина-альфа или другого иммуномодулирующего средства. В конкретном варианте осуществления количество кортикостероида (например, преднизона), вводимого пациенту, в конечном итоге снижается по меньшей мере на 50% до дозы $\leq 7,5$ мг/сутки, когда пациенту одновременно проводят схему лечения, включающую введение антагониста нейтрокина-альфа или другого иммуномодулирующего средства, по сравнению с дозой преднизона, которую пациент получал перед началом схемы лечения, включающей введение антагониста нейтрокина-альфа или другого иммуномодулирующего средства. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок TACI-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок BAFF-R-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой пептидное антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой фрагмент или вариант белка нейтрокина-альфа, который функционирует в качестве доминантно-негативной формы.

В конкретном варианте осуществления пациенту прекращают проводить, либо временно либо постоянно, терапию кортикостероидом (например, преднизолоном), когда указанному пациенту одновременно проводят схему лечения, включающую введение антагониста нейтрокина-альфа или другого иммуномодулирующего средства. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок TACI-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок BAFF-R-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой пептидное антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой фрагмент или вариант белка нейтрокина-альфа, который функционирует в качестве доминантно-негативной формы.

В конкретных вариантах осуществления антагонисты нейтрокина-альфа или другие иммуномодулирующие средства, известные в данной области и/или описанные в настоящем описании, применяют для лечения пациентов с клиническим диагнозом ревматоидного артрита (РА). В конкретных вариантах осуществления пациенты с ревматоидным артритом, подвергающиеся лечению, не будут обладать В-клеточной злокачественной опухолью. Более того, пациента с ревматоидным артритом необязательно далее лечат одним или несколькими средствами, применяемыми для лечения РА, такими как салицилат; нестероидные противовоспалительные лекарственные средства, такие как индометацин, фенилбутазон, производные фенилуксусной кислоты (например, ибупрофен и фенопрофен), нафталинуксусные кислоты (напроксен), пирролалкановая кислота (тометин), индолуксусные кислоты (сулиндак), галогенированная антралиловая кислота (меклофенамат натрия), пироксикам, зомепирак и дифлунизал; антималярийные средства, такие как хлороквин; соли золота; пеницилламин, или иммунодепрессивные средства, такие как метотрексат или кортикостероиды, в дозировках, известных для таких лекарственных средств, или в сниженных дозировках. Однако предпочтительно пациента с ревматоидным артритом лечат только антагонистом нейтрокина-альфа или другим иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описанным в настоящем описании. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок TACI-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок BAFF-R-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой пептидное антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой фрагмент или вариант белка нейтрокина-альфа, который функционирует в качестве доминантно-негативной формы. Такие иммуномодулирующие средства вводят пациенту с РА в соответствии со схемой дозирования, описанной ниже, которую может легко определить специалист в данной области. Первичный ответ определяют по индексу Paulus (Paulus et al. Arthritis Rheum. 33:477-484 (1990)), т.е. по улучшению в скованности по утрам, количестве болезненных и воспаленных суставов, скорости оседания эритроцитов (СОЭ) и по улучшению по меньшей мере на 2 балла по 5-бальной шкале тяжести заболевания, оцененной пациентом и терапевтом. Введение антагониста нейтрокина-альфа или другого иммуномодулирующего средства, известного в данной области и/или описанного в настоящем описании, будет смягчать один или несколько симптомов РА у пациента, подвергающегося лечению, как описано выше.

В клиническом испытании 2 фазы (пример 3), в котором пациенту с ревматоидным артритом проводили лечение антителом, которое нейтрализует белок нейтрокина-альфа, вводимым в качестве внутривенной инфузии на 0, 14, 28 сутки, а затем каждые четыре недели до 24 недели, лечение с большей вероятностью смягчало симптомы, ассоциированные с ревматоидным артритом, у пациентов, которые обладают показателем DAS28, превышающим 5,1, у пациентов, которым ранее не проводили терапию против TNF, и/или у пациентов, которые обладают ревматоидным фактором в его/ее плазме крови и/или сыворотке перед началом лечения антителом, которое нейтрализует белок нейтрокина-альфа. Дополнительные подгруппы, которые, как оказалось, обладают большей вероятностью ответа на лечение антителом, которое нейтрализует белок нейтрокина-альфа, включали пациентов мужского пола, пациентов, которые

обладали антителами против ССР (циклического цитруллинированного пептида) в его/ее плазме крови и/или сыворотке, пациентов, которые получали метотрексат одновременно с антителом, которое нейтрализует белок нейтрокина-альфа, пациентов, у которых ранее оказалось безуспешным лечение метотрексатом, и/или пациентов, у которых ранее оказалась безуспешной терапия метотрексатом и по меньшей мере одним другим лекарственным средством DMARD.

Таким образом, это изобретение относится к способу лечения пациента с ревматоидным артритом антагонистом нейтрокина-альфа или другим иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описанным в настоящем описании, где указанный пациент с ревматоидным артритом обладает любым одним или несколькими из следующих характеристик: пациенту ранее не проводили терапию против TNF, например, инфликсимабом (также известным как Remicade™ Centocor, Inc.), адалимумабом (Humira® от Abbott Laboratories) или этанерцептом (Enbrel®); пациент обладает ревматоидным фактором в его/ее плазме крови и/или сыворотке; пациент обладает поддающимся измерению уровнем антител против ССР (циклического цитруллинированного пептида) в его/ее плазме крови и/или сыворотке; пациент обладает повышенным уровнем CRP (С-реактивного протеина) в его/ее плазме крови и/или сыворотке; у пациента ранее оказалось безуспешным лечение одним или несколькими модифицирующими заболевание антиревматическими лекарственными средствами; этот пациент обладает высоким показателем модифицированной активности заболевания (DAS28); пациент обладает увеличенными и болезненными суставами; пациент страдает скованностью по утрам; пациент обладает повышенной скоростью оседания эритроцитов (СОЭ) и/или пациент представляет собой мужчину. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок TACI-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок BAFF-R-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой пептидное антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой фрагмент или вариант белка нейтрокина-альфа, который функционирует в качестве доминантно-негативной формы. В конкретных вариантах осуществления пациент с ревматоидным артритом обладает уровнем ревматоидного фактора, равным или превышающим 12 МЕ/мл в его/ее плазме крови и/или сыворотке. В конкретных вариантах осуществления повышенный уровень CRP определяют как уровень, составляющий по меньшей мере 1,5 мг/л. В конкретных вариантах осуществления повышенный уровень CRP определяют как уровень, составляющий по меньшей мере 5 мг/л. В конкретных вариантах осуществления повышенный уровень CRP определяют как уровень, составляющий по меньшей мере 6 мг/л. В конкретных вариантах осуществления повышенный уровень CRP определяют как уровень, составляющий по меньшей мере 9 мг/л. В конкретных вариантах осуществления повышенный уровень CRP определяют как уровень, составляющий по меньшей мере 10 мг/л. В конкретных вариантах осуществления повышенный уровень CRP определяют как уровень, составляющий по меньшей мере 20 мг/л. В конкретных вариантах осуществления пациент с ревматоидным артритом обладает уровнем антитела против ССР, равным или превышающим 10 единиц в его/ее плазме крови и/или сыворотке. В конкретных вариантах осуществления пациент с ревматоидным артритом обладает уровнем антитела против ССР, равным или превышающим 20 единиц в его/ее плазме крови и/или сыворотке. В конкретных вариантах осуществления у пациента ранее оказалось безуспешным лечение одним или несколькими DMARD, включая, но не ограничиваясь ими, метотрексат, аминохинолон, сульфасалазин и лефлуномид. В конкретных вариантах осуществления у пациента ранее оказалось безуспешным лечение метотрексатом. В конкретных вариантах осуществления пациент обладает показателем DAS28, превышающим 5,1. В конкретных вариантах осуществления пациент имеет по меньшей мере 6 увеличенных суставов и по меньшей мере 8 чувствительных суставов. В конкретных вариантах осуществления пациент обладает СОЭ, превышающей 28 мм/ч. В конкретных вариантах осуществления пациент страдает скованностью по утрам в течение по меньшей мере 45 мин. В конкретных вариантах осуществления пациент страдает скованностью по утрам в течение по меньшей мере 1 ч. В конкретных вариантах осуществления пациент страдает скованностью по утрам в течение по меньшей мере 1,5 ч. В конкретных вариантах осуществления пациент страдает скованностью по утрам в течение по меньшей мере 2 ч. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок TACI-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок BAFF-R-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой пептидное антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой фрагмент или вариант белка нейтрокина-альфа, который функционирует в качестве доминантно-негативной формы.

Таким образом, это изобретение относится к способу лечения пациента с ревматоидным артритом антагонистом нейтрокина-альфа или другим иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описанным в настоящем описании, включая, но не ограничиваясь ими, антитело против нейтрокина-альфа или его антигенсвязывающий фрагмент, белок рецептора для нейтрокина-альфа (напри-

мер, TACI, BCMA или BAFF-R) или его фрагмент или вариант, антитело против рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или их антигенсвязывающий фрагмент, связывающие нейтрокин-альфа полипептиды, варианты полипептида нейтрокина-альфа и/или APRIL, и антисмысловые или siRNA, которые нацелены на нейтрокин-альфа, APRIL, TACI, BCMA, BAFF-R или другой рецептор для нейтрокина-альфа и/или APRIL, где указанный пациент с ревматоидным артритом обладает любым одним или несколькими из следующих характеристик: пациенту ранее не проводили терапию против TNF, например, инфликсимабом (также известным как Remicade™ Centocor, Inc.), адалимумабом (Humira® от Abbott Laboratories) или этанерцептом (Enbrel®); пациент обладает ревматоидным фактором в его/ее плазме крови и/или сыворотке; пациент обладает поддающимся измерению уровнем антител против ССР (циклического цитруллинированного пептида) в его/ее плазме крови и/или сыворотке; пациент обладает повышенным уровнем CRP (С-реактивного протеина) в его/ее плазме крови и/или сыворотке; у пациента ранее оказалось безуспешным лечение одним или несколькими модифицирующими заболевание антиревматическими лекарственными средствами; этот пациент обладает высоким показателем модифицированной активности заболевания (DAS28); пациент обладает увеличенными и болезненными суставами; пациент страдает скованностью по утрам; пациент обладает повышенной скоростью оседания эритроцитов (СОЭ) и/или пациент представляет собой мужчину. В конкретных вариантах осуществления пациент с ревматоидным артритом обладает уровнем ревматоидного фактора, равным или превышающим 12 МЕ/мл в его/ее плазме крови и/или сыворотке. В конкретных вариантах осуществления повышенный уровень CRP определяют как уровень, составляющий по меньшей мере 1,5 мг/л. В конкретных вариантах осуществления повышенный уровень CRP определяют как уровень, составляющий по меньшей мере 5 мг/л. В конкретных вариантах осуществления повышенный уровень CRP определяют как уровень, составляющий по меньшей мере 6 мг/л. В конкретных вариантах осуществления повышенный уровень CRP определяют как уровень, составляющий по меньшей мере 9 мг/л. В конкретных вариантах осуществления повышенный уровень CRP определяют как уровень, составляющий по меньшей мере 10 мг/л. В конкретных вариантах осуществления повышенный уровень CRP определяют как уровень, составляющий по меньшей мере 20 мг/л. В конкретных вариантах осуществления пациент с ревматоидным артритом обладает уровнем антитела против ССР, равным или превышающим 10 единиц в его/ее плазме крови и/или сыворотке. В конкретных вариантах осуществления пациент с ревматоидным артритом обладает уровнем антитела против ССР, равным или превышающим 20 единиц в его/ее плазме крови и/или сыворотке. В конкретных вариантах осуществления у пациента ранее оказалось безуспешным лечение одним или несколькими DMARD, включая, но не ограничиваясь ими, метотрексат, аминохинолон, сульфасалазин и лефлуномид. В конкретных вариантах осуществления у пациента ранее оказалось безуспешным лечение метотрексатом. В конкретных вариантах осуществления пациент обладает показателем DAS28, превышающим 5,1. В конкретных вариантах осуществления пациент имеет по меньшей мере 6 увеличенных суставов и по меньшей мере 8 чувствительных суставов. В конкретных вариантах осуществления пациент обладает СОЭ, превышающей 28 мм/ч. В конкретных вариантах осуществления пациент страдает скованностью по утрам в течение по меньшей мере 45 мин. В конкретных вариантах осуществления пациент страдает скованностью по утрам в течение по меньшей мере 1 ч. В конкретных вариантах осуществления пациент страдает скованностью по утрам в течение по меньшей мере 1,5 ч. В конкретных вариантах осуществления пациент страдает скованностью по утрам в течение по меньшей мере 2 ч.

В другом конкретном варианте осуществления пациента с ревматоидным артритом, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа или другим иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описанным в настоящем описании, включая, но не ограничиваясь ими, антитело против нейтрокина-альфа или его антигенсвязывающий фрагмент, белок рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его фрагмент или вариант, антитело против рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие нейтрокин-альфа полипептиды, варианты полипептида нейтрокина-альфа и/или APRIL, и антисмысловые или siRNA, которые нацелены на нейтрокин-альфа, APRIL, TACI, BCMA, BAFF-R или другой рецептор для нейтрокина-альфа и/или APRIL, считают отвечающим/отвавшим на лечение, если у пациента достигнут ответ ACR20. ACR20 представляет собой индекс, разработанный Американским колледжем ревматологии (ACR) для оценки ответа у пациента на лечение от ревматоидного артрита. Ответ ACR20 определяют, как по меньшей мере 20% снижение количества чувствительных суставов и количества увеличенных суставов, в дополнение к улучшению по меньшей мере 20% трех из пяти других показателей симптомов или проявлений заболевания (т.е. оценки пациентом боли, общей оценки пациентом, общей оценки врачом, собственной оценки пациентом нетрудоспособности, реактантов острой фазы [СОЭ или CRP]). В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок TACI-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок BAFF-R-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой пептидное антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой фрагмент или вариант белка нейтро-

кина-альфа, который функционирует в качестве доминантно-негативной формы.

В другом конкретном варианте осуществления пациент с ревматоидным артритом, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа или другим иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описанным в настоящем описании, включая, но не ограничиваясь ими, антитело против нейтрокина-альфа или его антигенсвязывающий фрагмент, белок рецептора для нейтрокина-альфа или его фрагмент или вариант, связывающие нейтрокин-альфа полипептиды, варианты полипептида нейтрокина-альфа и/или APRIL, и антисмысловые или siRNA, которые нацелены на нейтрокин-альфа, APRIL, TACI, BCMA, BAFF-R или другой рецептор для нейтрокина-альфа и/или APRIL, считают отвечающим/отвавшим на лечение, если у пациента достигнут ответ ACR50. ACR50 представляет собой индекс, разработанный Американским колледжем ревматологии (ACR) для оценки ответа у пациента на лечение от ревматоидного артрита. Ответ ACR50 определяют, как по меньшей мере 50% снижение количества чувствительных суставов и количества увеличенных суставов, в дополнение к улучшению по меньшей мере 50% трех из пяти других показателей симптомов или проявлений заболевания (т.е. оценки пациентом боли, общей оценки пациентом, общей оценки врачом, собственной оценки пациентом нетрудоспособности, реактантов острой фазы [СОЭ или CRP]). В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок TACI-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок BAFF-R-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой пептидное антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой фрагмент или вариант белка нейтрокина-альфа, который функционирует в качестве доминантно-негативной формы.

В другом конкретном варианте осуществления пациент с ревматоидным артритом, которого лечат или лечили антагонистом нейтрокина-альфа или другим иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описанным в настоящем описании, включая, но не ограничиваясь ими, антитело против нейтрокина-альфа или его антигенсвязывающий фрагмент, белок рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его фрагмент или вариант, антитело против рецептора для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA или BAFF-R) или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие нейтрокин-альфа полипептиды, варианты полипептида нейтрокина-альфа и/или APRIL, и антисмысловые или siRNA, которые нацелены на нейтрокин-альфа, APRIL, TACI, BCMA, BAFF-R или другой рецептор для нейтрокина-альфа и/или APRIL, считают отвечающим/отвавшим на лечение, если у пациента достигнут ответ ACR70. ACR70 представляет собой индекс, разработанный Американским колледжем ревматологии (ACR) для оценки ответа у пациента на лечение от ревматоидного артрита. Ответ ACR70 определяют как по меньшей мере 70% снижение количества чувствительных суставов и количества увеличенных суставов, в дополнение к улучшению по меньшей мере 70% трех из пяти других показателей симптомов или проявлений заболевания (т.е. оценки пациентом боли, общей оценки пациентом, общей оценки врачом, собственной оценки пациентом нетрудоспособности, реактантов острой фазы [СОЭ или CRP]). В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок TACI-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок BAFF-R-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой пептидное антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой фрагмент или вариант белка нейтрокина-альфа, который функционирует в качестве доминантно-негативной формы.

Иммуномодулирующие средства

Настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, который обладает титром ANA 1:80 или выше и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл, в его/ее плазме или сыворотке крови, иммуномодулирующим средством. Значение термина "иммуномодулирующее средство", используемое в настоящем описании, рассмотрено выше. В конкретном варианте осуществления иммуномодулирующее средство представляет собой антагонист нейтрокина-альфа. Под "антагонистом" подразумевают средства, способные ингибировать или препятствовать функциональному и/или биологическому действию нейтрокина-альфа *in vitro* и/или *in vivo* (например, стимуляции дифференцировки, пролиферации и/или выживания В-клеток; стимуляции продукции Ig В-клетками и связыванию с рецептором для нейтрокина-альфа). Это ингибирование может происходить с прямым физическим контактом между антагонистом и полипептидом нейтрокина-альфа (например, антагонист может модулировать предшествующий эффектор активности нейтрокина-альфа в каскаде в целях снижения указанной активности) или без него. Анализы для тестирования способности антагонистов нейтрокина-альфа ингибировать активность В-клеток описаны в настоящем описании. Антагонисты нейтрокина-альфа включают, но не ограничиваются ими, антитело против нейтрокина-альфа или его антигенсвязывающий фрагмент, белок рецептора для нейтрокина-альфа или его фрагмент или вариант, антитело, которое связывает рецептор нейтрокина-альфа или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающий нейтрокин-альфа пептид или полипептид, вариант полипептида нейтрокина-альфа и/или APRIL (например, доминантно-

негативная форма нейтрокина-альфа и/или APRIL). Дополнительные антагонисты нейтрокина-альфа включают низкомолекулярные антагонисты нейтрокина-альфа, пептидные миметики нейтрокина-альфа, антисмысловые РНК и короткие интерферирующие РНК (siRNA), которые нацелены на нейтрокин-альфа, антисмысловые РНК и короткие интерферирующие РНК (siRNA), которые нацелены на APRIL, антисмысловые РНК и короткие интерферирующие РНК (siRNA), которые нацелены на рецепторы для нейтрокина-альфа и/или рецепторы для APRIL. Каждый из них описан более подробно ниже.

Антагонисты нейтрокина-альфа

А. Полипептиды нейтрокина-альфа и APRIL.

В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа для применения в способах по настоящему изобретению представляет собой полипептид, фрагмент или вариант нейтрокина-альфа или APRIL. Полипептиды нейтрокина-альфа, полипептиды APRIL и их фрагменты и варианты описаны более подробно ниже. Белок нейтрокина-альфа (SEQ ID NO: 2) является членом семейства лигандов TNF, который обладает идентичностью аминокислотной последовательности с APRIL (SEQ ID NO: 4; регистрационный номер GenBank No. AF046888; Международная публикация PCT номер WO 97/33902; Nahne, M., et al., J. Exp. Med. (1998) 188(6): 1185-90), TNF α и лимфотоксина- α (LT α) (Moore, et al., 1999). Полноразмерный ген нейтрокина-альфа кодирует полипептид из 285 аминокислот, который обладает внутриклеточным доменом между остатками 1 и 46, трансмембранным доменом между аминокислотами 47 и 73, которому предшествует не гидрофобная последовательность, свойственная мембраносвязанным белкам II типа, и внеклеточным доменом между остатками 74 и 285. Подобно другим членам семейства TNF, нейтрокин-альфа функционирует в качестве тримерного белка. При экспрессии нейтрокина-альфа на поверхности клетки внеклеточный домен отщепляется по 134 аминокислоте с высвобождением биологически активного тримера. Структурная охарактеризация показала, что несмотря на то, что лиганды семейства TNF демонстрируют многообразие последовательностей, они показывают высокую структурную гомологию. Белок нейтрокина-альфа, подобно другим членам семейства лигандов TNF, представляет собой 2-слойную β -сэндвич-структуру, которая образует TNF-подобную форму рулета с джемом. Белок нейтрокина-альфа является сходным с другими лигандами семейства TNF по общей структуре и размерам. Однако связывающий рецептор участок нейтрокина-альфа представляет собой более выраженную бороздку, чем было выявлено для других цитокинов (Oren, et al., (2002) Nature Structural Biology 9:288-292). Полипептиды нейтрокина-альфа более подробно описаны, например, в международных публикациях номер WO 98/18921, WO 00/50597, WO 02/1820 и WO 03/033658, все из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме.

Как описано выше, полипептиды нейтрокина-альфа функционируют, стимулируя пролиферацию, дифференцировку, выживание В-клеток и секрецию ими Ig. Таким образом, в способах по настоящему изобретению не предполагается применение нативной формы нейтрокина-альфа. Однако нативную форму нейтрокина-альфа можно применять в качестве направляющего средства для доставки других средств, которые могут ингибировать активность В-клеток (например, цитотоксических групп или белков), вблизи В-клетки (см., например, пример 12 и 13 WO 00/033658, где меченный радиоактивной меткой нейтрокин-альфа применяют для нацеливания и уничтожения клеток, экспрессирующих рецепторы для нейтрокина-альфа, которые являются, главным образом, В-клетками по происхождению). Альтернативно в качестве антагониста нейтрокина-альфа можно применять фрагменты или варианты нейтрокина-альфа, которые связываются с одним или несколькими рецепторами для нейтрокина-альфа, но не индуцируют передачи сигнала. Фрагменты или варианты нейтрокина-альфа, которые влияют на способность нейтрокина-альфа образовывать или поддерживать стабильные гомотримеры или гетеротримеры, также можно использовать в качестве антагониста нейтрокина-альфа в способах по этому изобретению. Таким образом, полипептиды нейтрокина-альфа, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению, включают полипептидные фрагменты или варианты белка нейтрокина-альфа SEQ ID NO: 2. Полипептидные фрагменты или варианты могут быть "свободными" или находящимися в более крупном полипептиде, в котором фрагмент образует часть или участок, наиболее предпочтительно в качестве отдельного непрерывного участка. В конкретных вариантах осуществления полипептиды нейтрокина-альфа, которые можно использовать в способах по этому изобретению, включают полипептидные фрагменты, содержащие предсказанный внеклеточный домен нейтрокина-альфа (аминокислотные остатки 73-285 SEQ ID NO: 2) и растворимый фрагмент нейтрокина-альфа (аминокислотные остатки 134-285 SEQ ID NO: 2), или альтернативно состоящие из них. В другом варианте осуществления полипептидные фрагменты или варианты, которые можно использовать в способах по этому изобретению, содержат полипептидный фрагмент или вариант, по меньшей мере на 80, 85, 90, 92, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичный полипептидным фрагментам нативного нейтрокина-альфа, описанного выше, или альтернативно состоят из них.

В другом варианте осуществления полипептидные варианты нейтрокина-альфа, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению, включают пептидные миметики. Миметики представляют собой содержащие пептид молекулы, которые имитируют вторичную структуру белка. См., например, Johnson et al., "Peptide Turn Mimetics" в BIOTECHNOLOGY AND PHARMACY, Pezzuto et al.,

Eds., Chapman and Hall, New York (1993), включенную в настоящее описание в качестве ссылки. Основопологающее объяснение применения пептидных миметиков состоит в том, что пептидный остов белков существует, главным образом, с ориентацией боковых цепей аминокислот таким образом, чтобы упростить молекулярные взаимодействия, такие как взаимодействия антитела и антигена. Ожидается, что пептидный миметик позволяет молекулярные взаимодействия, аналогично природной молекуле. Эти принципы можно использовать для конструирования молекул второго поколения, имеющих природные свойства пептидов для нацеливания, описанных в настоящем описании, но с измененными и даже улучшенными свойствами.

APRIL (SEQ ID NO: 4) является членом семейства лигандов TNF, который обладает идентичностью аминокислотной последовательности с нейтрокином-альфа (SEQ ID NO: 2; регистрационный номер GenBank No. NM_006573; Moore, et al., (1999) Science 285:260-263; Schneider et al., (1999) J. Exp. Med. 189:1747-1756 и Khare et al., (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. 97:3370-3375), TNF α и лимфотоксином- α (LT α) (Moore, et al., 1999). Полноразмерный ген APRIL кодирует полипептид из 250 аминокислот, который обладает внутриклеточным доменом между остатками 1 и 28, трансмембранным доменом между остатками 29 и 49 и внеклеточным доменом между остатками 50 и 250. Подобно другим членам семейства TNF, APRIL функционирует в качестве тримерного белка. При экспрессии APRIL на поверхности клетки внеклеточный домен отщепляется по аминокислоте 105 с высвобождением биологически активного тримера.

В конкретном варианте осуществления полипептид APRIL, который можно использовать в способах по настоящему изобретению, включает полипептидные фрагменты или варианты белка APRIL SEQ ID NO: 4. Полипептидные фрагменты или варианты могут быть "свободными" или находящимися в более крупном полипептиде, в котором фрагмент образует часть или участок, наиболее предпочтительно в качестве отдельного непрерывного участка. В конкретных вариантах осуществления полипептиды APRIL, которые можно использовать в способах по этому изобретению, включают полипептидные фрагменты, содержащие предсказанный внеклеточный домен APRIL (аминокислотные остатки 50-250 SEQ ID NO: 4) и растворимый фрагмент APRIL (аминокислотные остатки 105-250 SEQ ID NO: 4), или альтернативно состоящие из них. В другом варианте осуществления полипептидные фрагменты или варианты, которые можно использовать в способах по этому изобретению, содержат полипептидный фрагмент или вариант, по меньшей мере на 80, 85, 90, 92, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичный полипептидным фрагментам нативного APRIL, описанного выше, или альтернативно состоят из них.

В другом варианте осуществления варианты полипептида APRIL, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению, включают пептидные миметики. Миметики представляют собой содержащие пептид молекулы, которые имитируют вторичную структуру белка. См., например, Johnson et al., "Peptide Turn Mimetics" в BIOTECHNOLOGY AND PHARMACY, Pezzuto et al., Eds., Chapman и Hall, New York (1993), включенную в настоящее описание в качестве ссылки. Основопологающее объяснение применения пептидных миметиков состоит в том, что пептидный остов белков существует, главным образом, с ориентацией боковых цепей аминокислот таким образом, чтобы упростить молекулярные взаимодействия, такие как взаимодействия антитела и антигена. Ожидается, что пептидный миметик позволяет молекулярные взаимодействия, аналогично природной молекуле. Эти принципы можно использовать для конструирования молекул второго поколения, имеющих природные свойства пептидов для нацеливания, описанных в настоящем описании, но с измененными и даже улучшенными свойствами.

Полипептиды нейтрокина-альфа и APRIL, которые можно использовать в способах по этому изобретению, можно экспрессировать или синтезировать в модифицированной форме, такой как слитый белок (содержащий полипептид, связанный пептидной связью с гетерологичной белковой последовательностью (другого белка)), и они могут включать не только сигналы для секреции, но также дополнительные гетерологичные функциональные участки. Такой слитый белок можно получать лигированием полинуклеотидов нейтрокина-альфа или APRIL и требуемой последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей требуемую аминокислотную последовательность, друг с другом, способами, известными в данной области, в надлежащей рамке считывания, и экспрессией слитого белкового продукта способами, известными в данной области. Альтернативно, такой слитый белок можно получать способами синтеза белков, например, с использованием устройства для синтеза пептидов. Таким образом, например, участок дополнительных аминокислот, в частности заряженных аминокислот, можно присоединять к N-концу полипептида для повышения стабильности и устойчивости в клетке-хозяине в ходе очистки или в ходе последующей обработки и хранения. Также к полипептиду можно присоединять пептидные группы для упрощения очистки. Такие участки можно удалять перед окончательным получением полипептида. Присоединение пептидных групп к полипептидам для обеспечения секреции и выделения, для повышения стабильности и упрощения очистки, среди прочих, является известным и общепринятым способом в данной области.

Предпочтительный белок для слияния с нейтрокином-альфа или APRIL, который можно использовать в способах по этому изобретению, включает гетерологичный участок из иммуноглобулина, который является пригодным для стабилизации и очистки белков. Например, в EP-A-0464533 (канадский эквивалент 2045869) и WO 00/024782 описаны слитые белки, содержащие различные фрагменты константного

участка молекул иммуноглобулинов совместно с другим белком человека или его частью. Слитые белки нейтрокина-альфа и иммуноглобулина описаны, например, в Yu, et al., (2000) Nat Immunol 1:252-256, включенной в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Слитые белки APRIL и иммуноглобулина описаны, например, в публикации PCT WO 01/087977, включенной в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Во многих случаях Fc-часть в слитом белке является высокопреимуществом для применения в целях терапии и диагностики и, таким образом, приводит, например, к улучшенным фармакокинетическим свойствам (EP-A 0232262). С другой стороны, для некоторых способов применения может быть желательной возможность удаления Fc-части после экспрессии, детекции и очистки слитого белка описанным преимущественным способом. Это желательно в случае, когда оказывается, что Fc-часть препятствует применению в целях лечения и диагностики, например, когда слитый белок подлежит применению в качестве антигена для иммунизации. При разработке лекарственных средств, например, белки человека, такие как hIL-5, подвергали слиянию с Fc-участками для целей высокопроизводительных скрининговых анализов с целью идентификации антагонистов hIL-5. См. D. Bennett et al., J. Molecular Recognition 8:52-58 (1995) и K. Johanson et al., J. Biol. Chem. 270:9459-9471 (1995).

Как поймет специалист в данной области и как рассмотрено выше, полипептиды нейтрокина-альфа и полипептиды APRIL можно подвергать слиянию с последовательностями других полипептидов. Например, полипептиды нейтрокина-альфа, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению, можно подвергать слиянию с константным доменом иммуноглобулинов (IgA, IgE, IgG, IgM), или их частями (CH1, CH2, CH3 или любым их сочетанием и их частями), или альбумином (включая, но не ограничиваясь ими, рекомбинантный альбумин человека или его фрагменты или варианты (см., например, патент США № 5876969, выданный 2 марта 1999 г., патент EP 0413622 и патент США № 5766883, выданный 16 июня 1998 г., включенные в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме)) с получением в результате химерных полипептидов.

Такие слитые белки могут упрощать очистку, могут продлевать срок хранения и могут повышать время полужизни *in vivo*. Это было показано для химерных белков, состоящих из первых двух доменов CD4-полипептида человека и различных доменов константных участков тяжелой или легкой цепи иммуноглобулинов млекопитающих. См., например, EP 394827; Traunecker et al., Nature, 331:84-86 (1988). Повышенная доставка антигена через эпителиальный барьер в иммунную систему была показана для антигенов (например, инсулина), конъюгированных с партнером для связывания FcRn, таким как IgG или Fc-фрагменты (см., например, публикации PCT WO 96/22024 и WO 99/04813). Также было показано, что слитые белки IgG, которые обладают связанной дисульфидными связями димерной структурой вследствие дисульфидных связей IgG-части, являются более эффективными в отношении связывания и нейтрализации других молекул, чем мономерные полипептиды или их фрагменты отдельно. См., например, Fountoulakis et al., J. Biochem., 270:3958-3964 (1995).

Сывороточный альбумин человека (HSA или HA), белок из 585 аминокислот в его зрелой форме (SEQ ID NO: 11), отвечает за значительную часть осмотического давления в сыворотке, а также функционирует в качестве носителя эндогенных и экзогенных лигандов. В настоящее время HA для клинического применения получают экстракцией из крови человека. Продукция рекомбинантного HA (rHA) в микроорганизмах описана в EP 330451 и EP 361991.

Роль альбумина в качестве молекулы-переносчика и его инертная структура являются желательными свойствами для применения в качестве носителя и переносчика полипептидов *in vivo*. Применение альбумина в виде компонента слитого белка альбумина в качестве носителя для различных белков было предложено в WO 93/15199, WO 93/15200 и EP 413622. Также было предложено применение N-концевых фрагментов HA для слияния с полипептидами (EP 399666). Слияние альбумина с терапевтическим белком можно проводить генетическим манипулированием, при котором ДНК, кодирующую HA или его фрагмент, связывают с ДНК, кодирующей терапевтический белок. Затем пригодного хозяина трансформируют или трансфицируют слитыми нуклеотидными последовательностями, расположенными на пригодной плазмиде таким образом, чтобы происходила экспрессия слитого полипептида. Экспрессию можно проводить *in vitro*, например, из прокариотических или эукариотических клеток, или *in vivo*, например, из трансгенного организма.

Слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержит, по меньшей мере, фрагмент или вариант полипептида нейтрокина-альфа и, по меньшей мере, фрагмент или вариант сывороточного альбумина человека, которые связаны друг с другом предпочтительно генетическим слиянием (т.е. слитый белок альбумина получают трансляцией нуклеиновой кислоты, в которой полинуклеотид, кодирующий весь нейтрокин-альфа или его часть, связан в рамке считывания с полинуклеотидом, кодирующим весь альбумин или его часть) или химической конъюгацией друг с другом. Полипептид нейтрокина-альфа и белок альбумина, являющиеся частью слитого белка альбумина, могут быть обозначены как "часть", "участок" или "группа" слитого белка альбумина (например, "часть нейтрокина-альфа" или "часть белка альбумина").

В одном варианте осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит полипептид нейтрокина-альфа и белок сывороточного альбумина или альтернативно состоит из них. В других вариантах осуществления слитый белок альбумина, который

можно использовать в способах по этому изобретению, содержит фрагмент нейтрокина-альфа и белок сывороточного альбумина или альтернативно состоит из них. В других вариантах осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит вариант нейтрокина-альфа и белок сывороточного альбумина или альтернативно состоит из них. В предпочтительных вариантах осуществления компонент белка сывороточного альбумина в слитом белке альбумина представляет собой зрелую часть сывороточного альбумина.

В следующих вариантах осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит полипептид нейтрокина-альфа и биологически активный и/или терапевтически активный фрагмент сывороточного альбумина или альтернативно состоит из них. В следующих вариантах осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит полипептид нейтрокина-альфа и биологически активный и/или терапевтически активный вариант сывороточного альбумина или альтернативно состоит из них. В предпочтительных вариантах осуществления часть нейтрокина-альфа в слитом белке альбумина представляет собой полноразмерный полипептид нейтрокина-альфа. В следующем предпочтительном варианте осуществления часть белка нейтрокина-альфа в слитом белке альбумина представляет собой зрелый растворимый домен полипептида нейтрокина-альфа.

В следующих вариантах осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит фрагмент или вариант нейтрокина-альфа и биологически активный и/или терапевтически активный фрагмент или вариант сывороточного альбумина или альтернативно состоит из них. В предпочтительных вариантах осуществления это изобретение относится к слитому белку альбумина, содержащему зрелую часть полипептида нейтрокина-альфа и зрелую часть сывороточного альбумина (включая, но не ограничиваясь ими, рекомбинантный сывороточный альбумин человека или его фрагменты или варианты (см., например, патент США № 5876969, выданный 2 марта 1999 г., патент EP 0413622 и патент США № 5766883, выданный 16 июня 1998 г., включенные в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме)) или альтернативно состоящему из них. В предпочтительном варианте осуществления полипептиды нейтрокина-альфа (включая их фрагменты или варианты) являются слитыми со зрелой формой сывороточного альбумина человека (т.е. аминокислотами 1-585 сывороточного альбумина человека, как показано на фиг. 1 и 2 патента EP 0322094, который включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). В другом предпочтительном варианте осуществления антитела по настоящему изобретению (включая их фрагменты или варианты) являются слитыми с полипептидными фрагментами, содержащими аминокислотные остатки 1-х сывороточного альбумина человека, где x представляет собой целое число от 1 до 585 и фрагмент альбумина обладает активностью сывороточного альбумина человека, или альтернативно состоящими из них. В другом предпочтительном варианте осуществления полипептиды нейтрокина-альфа (включая их фрагменты или варианты) являются слитыми с полипептидными фрагментами, содержащими аминокислотные остатки 1-z сывороточного альбумина человека, где z представляет собой целое число от 369 до 419, как описано в патенте США 5766883, включенном в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме, или альтернативно состоящими из них. Полипептиды нейтрокина-альфа (включая их фрагменты или варианты) могут быть слитыми либо с N-, либо с C-концом гетерологичного белка (например, Fc-полипептида иммуноглобулина или полипептида сывороточного альбумина человека).

В предпочтительных вариантах осуществления белок сывороточного альбумина человека, используемый в слитых белках альбумина, которые можно использовать в способах по этому изобретению, содержит один или оба из следующих наборов точковых мутаций относительно SEQ ID NO: 11: Leu-407 на Ala, Leu-408 на Val, Val-409 на Ala и Arg-410 на Ala или Arg-410 на A, Lys-413 на Gln и Lys-414 на Gln (см., например, международную публикацию № WO 95/23857, включенную в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). В более предпочтительных вариантах осуществления слитые белки альбумина, которые можно использовать в способах по этому изобретению, которые содержат один или оба из описанных выше наборов точковых мутаций, обладают повышенной стабильностью/устойчивостью к протеолитическому расщеплению посредством YарЗр дрожжей, что обеспечивает повышенную продукцию рекомбинантных слитых белков альбумина, экспрессируемых в дрожжевых клетках-хозяевах.

Предпочтительно слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит НА в качестве N-концевой части, и полипептид нейтрокина-альфа в качестве C-концевой части. Альтернативно, также можно использовать слитый белок альбумина, содержащий НА в качестве C-концевой части и полипептид нейтрокина-альфа в качестве N-концевой части.

В других вариантах осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, имеет полипептид нейтрокина-альфа, слитый как с N-концом, так и с C-концом альбумина. В конкретном варианте осуществления полипептиды нейтрокина-альфа, слитые с N- и C-концами, являются одинаковыми. В другом варианте осуществления полипептиды нейтрокина-альфа, слитые с N- и C-концами, представляют собой разные полипептиды нейтрокина-альфа. В другом варианте осуществления полипептид нейтрокина-альфа является слитым либо с N-, либо с C-концом альбумина, а с другим концом слит гетерологичный полипептид.

Кроме того, слитые белки альбумина, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут включать линкерный пептид между слитыми частями для обеспечения большего физического разделения между группами. Линкерный пептид может состоять из таких аминокислот, чтобы он был более гибким или более жестким.

Как правило, слитые белки альбумина, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут иметь один образованный из НА участок и один участок нейтрокина-альфа. Однако для получения слитого белка альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, можно использовать несколько участков каждого белка. Аналогично, для получения слитого белка альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, можно использовать более одного белка. Например, белок может быть слитым как с N-, так и с C-концом НА. В такой конфигурации части белка могут представлять собой одинаковые или различные белковые молекулы. Структуру бифункциональных слитых белков альбумина можно представить как X-НА-Y или Y-НА-X.

В конкретном варианте осуществления белок нейтрокина-альфа или его фрагмент или вариант, который можно использовать в способах по этому изобретению, может быть конъюгирован с цитотоксическим (например, цитостатическим или цитотоксическим средством). Цитотоксин или цитотоксическое средство включает любое средство, которое является вредным для клеток. Их примеры включают паклитаксел, цитохалазин В, грамицидин D, бромид этидия, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубин, даунорубин, дигидроксиантрацидин, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромидин и их аналоги или гомологи.

В другом варианте осуществления белок нейтрокина-альфа или его фрагмент или вариант, который можно использовать в способах по этому изобретению, может быть конъюгирован с токсином.

Под "токсином" подразумевают одно или несколько соединений, которые связывают и активируют эндогенные цитотоксические эффекторные системы, радиоизотопы, голотоксины, модифицированные токсины, каталитические субъединицы токсинов, или любые молекулы или ферменты, в норме не представленные в клетке или на поверхности клетки, которые при определенных условиях вызывают гибель клетки. Токсины, которые можно использовать, включают, но не ограничиваются ими, радиоизотопы, известные в данной области, соединения, например, такие как антитела (или обладающие фиксацией комплемента их участки), которые связывают врожденную или индуцируемую эндогенную цитотоксическую эффекторную систему, тимидинкиназа, эндонуклеаза, РНКазы, альфа-токсин, ризин, абрин, экзотоксин A, *Pseudomonas*, дифтерийный токсин, сапорин, момордин, гелонин, противовирусный белок лактоноса, альфа-сарцин и холерный токсин. "Токсин" также включает цитостатическое или цитотоксическое средство, лекарственное средство или ион радиоактивного металла, например альфа-эмиттеры, например, такие как ^{213}Bi , или другие радиоизотопы, например, такие как ^{103}Pd , ^{133}Xe , ^{131}I , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{35}S , ^{90}Y , ^{153}Sm , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn , $^{90}\text{Yttrium}$, ^{117}O Олово, ^{186}Re Рений, ^{166}Gd Гольмий и ^{188}Re Рений.

В дополнительном примере полипептиды APRIL, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению, могут быть слитыми с константным доменом иммуноглобулинов (IgA, IgE, IgG, IgM), или его частями (CH1, CH2, CH3 или любым их сочетанием и их частями), или альбумином (включая, но не ограничиваясь ими, рекомбинантный человеческий альбумин или его фрагменты или варианты (см., например, патент США № 5876969, выданный 2 марта 1999 г., патент EP 0413622 и патент США № 5766883, выданный 16 июня 1998 г., включенные в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме)) с получением в результате химерных полипептидов.

Такие слитые белки могут упрощать очистку, могут продлевать срок хранения и могут повышать время полужизни *in vivo*. Это было показано для химерных белков, состоящих из первых двух доменов CD4-полипептида человека и различных доменов константных участков тяжелой или легкой цепей иммуноглобулинов млекопитающих. См., например, EP 394827; Traunecker et al., *Nature*, 331:84-86 (1988). Повышенная доставка антигена через эпителиальный барьер к иммунной системе была показана для антигенов (например, инсулина), конъюгированных с партнером для связывания FcRn, таким как IgG или Fc-фрагменты (см., например, публикации PCT WO 96/22024 и WO 99/04813). Также было выявлено, что слитые белки IgG, которые обладают связанной дисульфидными связями димерной структурой, вследствие дисульфидных связей IgG-части, являются более эффективными в отношении связывания и нейтрализации других молекул, чем мономерные полипептиды или их фрагменты отдельно. См., например, Fountoulakis et al., *J. Biochem.*, 270:3958-3964 (1995).

Слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержит, по меньшей мере, фрагмент или вариант полипептида APRIL и, по меньшей мере, фрагмент или вариант сывороточного альбумина человека, которые связаны друг с другом предпочтительно генетическим слиянием (т.е. слитый белок альбумина получают трансляцией нуклеиновой кислоты, в которой полинуклеотид, кодирующий весь APRIL или его часть, связан в рамке считывания с полинуклеотидом, кодирующим весь альбумин или его часть) или химической конъюгацией друг с другом. Полипептид APRIL и белок альбумина, являющиеся частью слитого белка альбумина, могут быть обозначены как "часть", "участок" или "группа" слитого белка альбумина (например, "часть APRIL" или "часть белка альбумина").

В одном варианте осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит полипептид APRIL и белок сывороточного альбумина или альтернативно состоит из них. В других вариантах осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит фрагмент APRIL и белок сывороточного альбумина или альтернативно состоит из них. В других вариантах осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит вариант APRIL и белок сывороточного альбумина или альтернативно состоит из них. В предпочтительных вариантах осуществления компонент белка сывороточного альбумина в слитом белке альбумина представляет собой зрелую часть сывороточного альбумина.

В следующих вариантах осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит полипептид APRIL и биологически активный и/или терапевтически активный фрагмент сывороточного альбумина или альтернативно состоит из них. В следующих вариантах осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит полипептид APRIL и биологически активный и/или терапевтически активный вариант сывороточного альбумина или альтернативно состоит из них. В предпочтительных вариантах осуществления часть APRIL в слитом белке альбумина представляет собой полноразмерный полипептид APRIL. В следующем предпочтительном варианте осуществления часть белка APRIL в слитом белке альбумина представляет собой зрелый растворимый домен полипептида APRIL.

В следующих вариантах осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит фрагмент или вариант APRIL и биологически активный и/или терапевтически активный фрагмент или вариант сывороточного альбумина или альтернативно состоит из них. В предпочтительных вариантах осуществления это изобретение относится к слитому белку альбумина, содержащему зрелую часть полипептида APRIL и зрелую часть сывороточного альбумина.

В следующих вариантах осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит фрагмент или вариант APRIL и биологически активный и/или терапевтически активный фрагмент или вариант сывороточного альбумина или альтернативно состоит из них. В предпочтительных вариантах осуществления это изобретение относится к слитому белку альбумина, содержащему зрелую часть полипептида APRIL и зрелую часть сывороточного альбумина (включая, но не ограничиваясь ими, рекомбинантный сывороточный альбумин человека или его фрагменты или варианты (см., например, патент США № 5876969, выданный 2 марта 1999 г., патент EP 0413622 и патент США № 5766883, выданный 16 июня 1998 г., включенные в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме)) или альтернативно состоящему из них. В предпочтительном варианте осуществления полипептиды APRIL (включая их фрагменты или варианты) являются слитыми со зрелой формой сывороточного альбумина человека (т.е. аминокислотами 1-585 сывороточного альбумина человека, как показано на фиг. 1 и 2 патента EP 0322094, который включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). В другом предпочтительном варианте осуществления антитела по настоящему изобретению (включая их фрагменты или варианты) являются слитыми с полипептидными фрагментами, содержащими аминокислотные остатки 1-x сывороточного альбумина человека, где x представляет собой целое число от 1 до 585 и фрагмент альбумина обладает активностью сывороточного альбумина человека, или альтернативно состоящими из них. В другом предпочтительном варианте осуществления полипептиды APRIL (включая их фрагменты или варианты) являются слитыми с полипептидными фрагментами, содержащими аминокислотные остатки 1-z сывороточного альбумина человека, где z представляет собой целое число от 369 до 419, как описано в патенте США 5766883, включенном в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме, или альтернативно состоящими из них. Полипептиды APRIL (включая их фрагменты или варианты) могут быть слитыми либо с N-, либо с C-концом гетерологичного белка (например, Fc-полипептида иммуноглобулина или полипептида сывороточного альбумина человека).

В предпочтительных вариантах осуществления белок сывороточного альбумина человека, используемый в слитых белках альбумина, которые можно использовать в способах по этому изобретению, содержит один или оба из следующих наборов точковых мутаций относительно SEQ ID NO: 11: Leu-407 на Ala, Leu-408 на Val, Val-409 на Ala и Arg-410 на Ala или Arg-410 на A, Lys-413 на Gln и Lys-414 на Gln (см., например, международную публикацию WO 95/23857, включенную в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). В более предпочтительных вариантах осуществления слитые белки альбумина, которые можно использовать в способах по этому изобретению, которые содержат один или оба из описанных выше наборов точковых мутаций, обладают повышенной стабильностью/устойчивостью к протеолитическому расщеплению посредством Yap3p дрожжей, что обеспечивает повышенную продукцию рекомбинантных слитых белков альбумина, экспрессируемых в дрожжевых клетках-хозяевах.

Предпочтительно слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит HA в качестве N-концевой части, и полипептид APRIL в качестве C-концевой части. Альтернативно, также можно использовать слитый белок альбумина, содержащий HA в качестве C-концевой части и полипептид APRIL в качестве N-концевой части.

В других вариантах осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в спо-

собах по этому изобретению, имеет полипептид APRIL, слитый как с N-концом, так и с C-концом альбумина. В конкретном варианте осуществления полипептиды APRIL, слитые с N- и C-концами, являются одинаковыми. В другом варианте осуществления полипептиды APRIL, слитые с N- и C-концами, представляют собой разные полипептиды APRIL. В другом варианте осуществления полипептид APRIL является слитым либо с N-, либо с C-концом альбумина, а с другим концом слит гетерологичный полипептид.

Кроме того, слитые белки альбумина, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут включать линкерный пептид между слитыми частями для обеспечения большего физического разделения между группами. Линкерный пептид может состоять из таких аминокислот, чтобы он был более гибким или более жестким.

Как правило, слитые белки альбумина, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут иметь один образованный из НА участок и один участок APRIL. Однако для получения слитого белка альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, можно использовать несколько участков каждого белка. Аналогично, для получения слитого белка альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, можно использовать более одного белка. Например, белок может быть слитым как с N-, так и с C-концом НА. В такой конфигурации части белка могут представлять собой одинаковые или различные белковые молекулы. Структуру бифункциональных слитых белков альбумина можно представить как X-НА-Y или Y-НА-X.

В конкретном варианте осуществления белок APRIL или его фрагмент или вариант, который можно использовать в способах по этому изобретению, может быть конъюгирован с цитотоксином (например, цитостатическим или цитотоксическим средством). Цитотоксин или цитотоксическое средство включает любое средство, которое является вредным для клеток. Их примеры включают паклитаксол, цитохалазин В, грамицидин D, бромид этидия, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубин, даунорубин, дигидроксиантрацидион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, татракаин, лидокаин, пропранолол и пуромицин, и их аналоги или гомологи.

В другом варианте осуществления белок APRIL или его фрагмент или вариант, который можно использовать в способах по этому изобретению, может быть конъюгирован с токсином.

Под "токсином" подразумевают одно или несколько соединений, которые связывают и активируют эндогенные цитотоксические эффекторные системы, радиоизотопы, голотоксины, модифицированные токсины, каталитические субъединицы токсинов, или любые молекулы или ферменты, в норме не представленные в клетке или на поверхности клетки, которые при определенных условиях вызывают гибель клетки. Токсины, которые можно использовать, включают, но не ограничиваются ими, радиоизотопы, известные в данной области, соединения, например, такие как антитела (или обладающие фиксацией комплемента их участки), которые связывают врожденную или индуцируемую эндогенную цитотоксическую эффекторную систему, тимидинкиназа, эндонуклеаза, РНКазы, альфа-токсин, рицин, абрин, экзотоксин А. *Pseudomonas*, дифтерийный токсин, сапорин, момордин, гелонин, противовирусный белок лаконоса, альфа-сарцин и холерный токсин. "Токсин" также включает цитостатическое или цитотоксическое средство, лекарственное средство или ион радиоактивного металла, например альфа-эмиттеры, например, такие как ^{213}Bi , или другие радиоизотопы, например, такие как ^{103}Pd , ^{133}Xe , ^{131}I , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{35}S , ^{90}Y , ^{153}Sm , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn , $^{90}\text{Иттрий}$, $^{117}\text{Олово}$, $^{186}\text{Рений}$, $^{166}\text{Гольмий}$ и $^{188}\text{Рений}$.

Для изменения свойств полипептидов нейтрокина-альфа и APRIL в целях получения полипептидов, которые можно использовать в способах по этому изобретению, можно использовать способы белковой инженерии. Технологию рекомбинантных ДНК, известную специалистам в данной области, можно использовать для создания новых мутантных белков или "мутеинов", включающих единичные или множественные аминокислотные замены, делеции, вставки или слитые белки. Такие модифицированные полипептиды могут демонстрировать, например, повышенную активность, сниженную активность или повышенную стабильность. Кроме того, их можно очищать с более высоким выходом и они могут обладать лучшей растворимостью, чем соответствующий природный полипептид, по меньшей мере, в определенных условиях очистки и хранения. Например, для многих белков, включая внеклеточный домен или зрелую форму(ы) секретируемого белка, в данной области известно, что с N-конца или C-конца можно удалять одну или несколько аминокислот без существенной потери биологической функции. Например, Ron et al., *J. Biol. Chem.*, 268:2984-2988 (1993) описали модифицированные белки KGF, которые обладали гепаринсвязывающей активностью, даже если отсутствовало 3, 8 или 27 N-концевых аминокислотных остатков.

Полипептиды нейтрокина-альфа и APRIL, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению, могут представлять собой момеры или мультимеры (т.е. димеры, тримеры, тетрамеры и более высокие мультимеры). В конкретных вариантах осуществления полипептиды нейтрокина-альфа и APRIL, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут представлять собой гомомеры или гетеромеры. Гомомер нейтрокина-альфа относится к мультимеру, содержащему только полипептиды нейтрокина-альфа (включая фрагменты, варианты и слитые белки нейтрокина-альфа, как описано в настоящем описании). Эти гомомеры могут содержать полипептиды нейтрокина-альфа, имеющие идентичные или отличающиеся аминокислотные последовательности. В конкретных вариантах осуществ-

вления полипептиды нейтрокина-альфа, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению, представляют собой гомодимеры нейтрокина-альфа (например, содержащие два полипептида нейтрокина-альфа, имеющих идентичные или отличающиеся аминокислотные последовательности) или представляют собой гомотримеры нейтрокина-альфа (например, содержащие три полипептида нейтрокина-альфа, имеющих идентичные или отличающиеся аминокислотные последовательности). В предпочтительном варианте осуществления полипептиды нейтрокина-альфа, которые можно использовать в способах по этому изобретению, представляют собой гомотримеры нейтрокина-альфа. В дополнительных вариантах осуществления полипептид нейтрокина-альфа, который можно использовать в способах по этому изобретению, представляет собой, по меньшей мере, гомодимер, по меньшей мере, гомотример или, по меньшей мере, гомотетрамер. Гомомер APRIL относится к мультимеру, содержащему только полипептиды APRIL (включая фрагменты, варианты и слитые белки APRIL, как описано в настоящем описании). Эти гомомеры могут содержать полипептиды APRIL, имеющие идентичные или отличающиеся аминокислотные последовательности. В конкретных вариантах осуществления полипептиды APRIL, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению, представляют собой гомодимеры APRIL (например, содержащие два полипептида APRIL, имеющих идентичные или отличающиеся аминокислотные последовательности) или представляют собой гомотримеры APRIL (например, содержащие три полипептида APRIL, имеющих идентичные или отличающиеся аминокислотные последовательности). В предпочтительном варианте осуществления полипептиды APRIL, которые можно использовать в способах по этому изобретению, представляют собой гомотримеры APRIL. В дополнительных вариантах осуществления полипептид APRIL, который можно использовать в способах по этому изобретению, представляет собой, по меньшей мере, гомодимер, по меньшей мере, гомотример или, по меньшей мере, гомотетрамер.

Гетеромерный нейтрокин-альфа относится к мультимеру, содержащему гетерологичные полипептиды (т.е. полипептиды другого белка), в дополнение к полипептидам нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления полипептид нейтрокина-альфа, который можно использовать в способах по этому изобретению, представляет собой гетеродимер, гетеротример или гетеротетрамер. В дополнительных вариантах осуществления полипептид нейтрокина-альфа, который можно использовать в способах по этому изобретению, представляет собой мультимер, который представляет собой, по меньшей мере, гетеродимер, по меньшей мере, гетеротример или, по меньшей мере, гетеротетрамер. Гетеромерный APRIL относится к мультимеру, содержащему гетерологичные полипептиды (т.е. полипептиды другого белка), в дополнение к полипептидам APRIL. В конкретном варианте осуществления полипептид APRIL, который можно использовать в способах по этому изобретению, представляет собой гетеродимер, гетеротример или гетеротетрамер. В дополнительных вариантах осуществления полипептид APRIL, который можно использовать в способах по этому изобретению, представляет собой мультимер, который представляет собой, по меньшей мере, гетеродимер, по меньшей мере, гетеротример или, по меньшей мере, гетеротетрамер. В дополнительных вариантах осуществления полипептид нейтрокина-альфа, который можно использовать в способах по этому изобретению, представляет собой гетеротример, содержащий как полипептиды нейтрокина-альфа, так и полипептиды APRIL, или их фрагменты или варианты. В дополнительных вариантах осуществления полипептид нейтрокина-альфа, который можно использовать в способах по этому изобретению, представляет собой гетеротример, содержащий один полипептид нейтрокина-альфа (включая фрагменты или варианты) и два полипептида APRIL (включая фрагменты или варианты). В дополнительных вариантах осуществления полипептид нейтрокина-альфа, который можно использовать в способах по этому изобретению, представляет собой гетеротример, содержащий два полипептида нейтрокина-альфа (включая фрагменты или варианты) и один полипептид APRIL (включая фрагменты или варианты).

В дополнительных вариантах осуществления полипептиды нейтрокина-альфа, которые можно использовать в способах по этому изобретению, представляют собой гомомерные, особенно гомотримерные, полипептиды нейтрокина-альфа, где отдельные белковые компоненты мультимеров содержат зрелую форму нейтрокина-альфа (например, аминокислотные остатки 134-285 SEQ ID NO: 2) или ее фрагменты или варианты, или альтернативно состоят из них. В других конкретных вариантах осуществления полипептиды нейтрокина-альфа, которые можно использовать в способах по этому изобретению, представляют собой гетеромерные, особенно гетеротримерные, полипептиды нейтрокина-альфа, такие как гетеротример, содержащий два полипептида нейтрокина-альфа и один полипептид APRIL, или гетеротример, содержащий один полипептид нейтрокина-альфа и два полипептида APRIL, и где отдельные белковые компоненты гетеромера нейтрокина-альфа содержат либо зрелую внеклеточную растворимую часть нейтрокина-альфа (например, аминокислотные остатки 134-285 SEQ ID NO: 2) или ее фрагменты или варианты, либо зрелую внеклеточную растворимую часть APRIL (например, аминокислотные остатки 105-250 SEQ ID NO: 4) или ее фрагменты или варианты, или альтернативно состоят из них.

В дополнительных вариантах осуществления полипептиды APRIL, которые можно использовать в способах по этому изобретению, представляют собой гомомерные, особенно гомотримерные, полипептиды APRIL, где отдельные белковые компоненты мультимеров содержат зрелую форму APRIL (например, аминокислотные остатки 105-250 SEQ ID NO: 4) или ее фрагменты или варианты, или альтернатив-

но состоят из них. В других конкретных вариантах осуществления полипептиды APRIL, которые можно использовать в способах по этому изобретению, представляют собой гетеромерные, особенно гетеротримерные, полипептиды APRIL, такие как гетеротример, содержащий два полипептида APRIL и один полипептид нейтрокина-альфа, или гетеротример, содержащий один полипептид APRIL и два полипептида нейтрокина-альфа, и где отдельные белковые компоненты гетеромера нейтрокина-альфа содержат либо зрелую внеклеточную растворимую часть APRIL (например, аминокислотные остатки 105-250 SEQ ID NO: 4) или ее фрагменты или варианты, либо зрелую внеклеточную растворимую часть нейтрокина-альфа (например, аминокислотные остатки 134-285 SEQ ID NO: 2) или ее фрагменты или варианты, или альтернативно состоят из них.

Мультимеры, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут быть образованы в результате гидрофобных, гидрофильных, ионных и/или ковалентных связей и/или они могут быть непрямо связаны, например, посредством образования липосом. Таким образом, в одном варианте осуществления мультимеры, например, такие как гомодимеры или гомотримеры, образуются, когда полипептиды контактируют друг с другом в растворе. В другом варианте осуществления гетеромультимеры, например, такие как гетеротримеры или гетеротетрамеры, образуются, когда полипептиды контактируют друг с другом в растворе. В других вариантах осуществления мультимеры образуются посредством ковалентных связей с полипептидами нейтрокина-альфа и/или между ними. В других вариантах осуществления мультимеры образуются посредством ковалентных связей с полипептидами APRIL и/или между ними. Такие ковалентные связи могут вовлекать один или несколько аминокислотных остатков, находящихся в последовательности полипептида (например, остатков, представленных в SEQ ID NO: 2 для нейтрокина-альфа или остатков, представленных в SEQ ID NO: 4 для APRIL). В одном примере ковалентные связи представляют собой поперечные связи между остатками цистеина, расположенными в полипептидных последовательностях, которые взаимодействуют в нативном (т.е. встречающемся в природе) полипептиде. В другом примере ковалентные связи являются следствием химического или рекомбинантного манипулирования. Альтернативно, такие ковалентные связи могут вовлекать один или несколько аминокислотных остатков, содержащихся в гетерологичной полипептидной последовательности в слитом белке нейтрокина-альфа или APRIL (см., например, патент США № 5478925). В конкретном примере ковалентные связи представляют собой связи с гетерологичной последовательностью, находящейся в слитом белке нейтрокин-альфа-Fc (как описано в настоящем описании). В конкретном примере ковалентные связи представляют собой связи с гетерологичной последовательностью, находящейся в слитом белке APRIL-Fc (как описано в настоящем описании). В другом конкретном примере ковалентные связи в слитых белках, которые можно использовать в способах по этому изобретению, представляют собой связи с гетерологичной полипептидной последовательностью другого члена семейства лигандов/рецепторов TNF, которая способна образовывать ковалентно связанные мультимеры, например, такой как остеопротегерин (см., например, международную публикацию WO 98/49305, содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). В другом варианте осуществления два или более полипептида нейтрокина-альфа и/или полипептида APRIL связаны через синтетические линкеры (например, линкеры из пептидов, углеводов или растворимых полимеров). Их примеры включают пептидные линкеры, описанные в патенте США № 5073627 (включенном в настоящее описание в качестве ссылки). Белки, содержащие несколько полипептидов нейтрокина-альфа и/или полипептидов APRIL, разделенных пептидными линкерами, можно получать с использованием общепринятой технологии рекомбинантных ДНК.

В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа, который можно использовать в способах по этому изобретению, представляет собой доминантно-негативную форму нейтрокина-альфа и/или APRIL. В частности, варианты нейтрокина-альфа и/или APRIL, включая доминантно-негативные формы, описаны, например, в международных публикациях патентов WO 06/034106, WO 05/113598, WO 04/089982, WO 04/081043 и WO 03/057856 и публикациях патентов США US 20060014248, US 20050221443, US 20050130892, US 20050048626, US 2005003480 и US 20030166559. Все упомянутые выше ссылки включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме. Такие варианты полипептида нейтрокина-альфа и/или APRIL могут быть антагонистами функции нейтрокина-альфа, например, препятствуя гомо- или гетеромультимеризации нейтрокина-альфа и/или APRIL. Альтернативно, варианты полипептида нейтрокина-альфа и/или APRIL могут препятствовать связыванию и/или передаче сигнала полипептидами, содержащими их, через рецепторы для нейтрокина-альфа, такие как TACI, BCMA и BAFF-R.

В другом варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой мутантную форму белка нейтрокина-альфа, описанную в Gao et al., (2006) Biotechnol. Lett. 28:1649-54, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

В другом варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа, который можно использовать в способах по этому изобретению, представляет собой Δ BAFF (SEQ ID NO: 12).

В. Антитела против нейтрокина-альфа.

В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой антитело против нейтрокина-альфа или его антигенсвязывающий фрагмент. Антитела против нейтрокина-альфа и

их фрагменты описаны, например, в публикациях PCT WO 01/087977, WO 03/016468, WO 01/60397, WO 02/02641 и WO 03/55979; публикациях US №№ 2005/0070694 и 2005/0255532 и Cao et al., (2005) *Immunol Lett* 101:87-94; Ch'en et al., (2005) *Cell Immunol* 236:78-85; Liu et al., (2005) *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 37:415-420; Schneider et al., (1999) *J. Exp. Med.* 189:1747-1756; Sun et al., (2006) *Hybridoma* 25:80-85; Sun et al., (2006) *Hybridoma* 25:238-242; и описаны более подробно ниже. Все упомянутые выше ссылки включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме.

Как используют в настоящем описании, термин "антитело" относится к молекулам иммуноглобулинов и иммунологически активным частям молекул иммуноглобулинов, т.е. к молекулам, которые содержат антигенсвязывающий участок, который иммуноспецифично связывает антиген. По существу, термин "антитело" включает не только целые молекулы антител, но также фрагменты антитела и варианты (включая производные) антитела и фрагменты антитела. Примеры молекул, которые описывают термином "антитело" в настоящей заявке, включают, но не ограничиваются ими, одноцепочечные Fv (scFv), Fab-фрагменты, Fab'-фрагменты, F(ab')₂, связанные дисульфидной связью Fv (sdFv), Fv, и фрагменты, содержащие либо VL-, либо VH-домен или альтернативно состоящие из них. Как используют в настоящем описании, термин "одноцепочечный Fv" или "scFv" относится к полипептиду, содержащему VL-домен антитела, связанный с VH-доменом антитела. Антитела, которые специфично связываются с конкретным антигеном (например, нейтрокином-альфа), могут обладать перекрестной реактивностью в отношении других антигенов. Предпочтительно антитела, которые иммуноспецифично связываются с конкретным антигеном, не реагируют перекрестно с другими антигенами. Антитела, которые иммуноспецифично связываются с конкретным антигеном, можно идентифицировать, например, посредством способов иммунологического анализа или других способов, известных специалистам в данной области, например способов иммунологического анализа, описанных в патентной заявке США № 60/834152, поданной 31 июля 2006 г., которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Антитела, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются ими, моноклональные, полиспецифичные, человеческие или химерные антитела, одноцепочечные антитела, Fab-фрагменты, F(ab')-фрагменты, антиидиотипические (anti-Id) антитела и связывающие эпитоп фрагменты любого из указанных выше. Молекулы иммуноглобулинов по этому изобретению могут представлять собой молекулы иммуноглобулинов любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂) или подкласса.

Антитела, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению, также могут включать мультимерные формы антител. Например, антитела, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению, могут обладать формой димеров, тримеров или мультимеров большего порядка мономерных молекул иммуноглобулинов антитела. Димеры целых молекул иммуноглобулинов или F(ab')₂-фрагментов являются четырехвалентными, в то время как димеры Fab-фрагментов или молекул scFv являются двухвалентными. Отдельные мономеры в мультимере антитела могут быть идентичными или они могут отличаться, т.е. они могут представлять собой гетеромерные или гомомерные мультимеры антитела. Например, отдельные антитела в мультимере могут обладать одинаковыми или отличающимися характеристиками связывания. Мультимеризацию антител можно проводить посредством природной агрегации антител или с помощью химических или рекомбинантных способов связывания, известных в данной области. Например, некоторая процентная доля препаратов очищенного антитела (например, очищенных молекул IgG1) спонтанно образует белковые агрегаты, содержащие гомодимеры антитела, и другие мультимеры антитела более высокого порядка. Альтернативно, гомодимеры антитела могут быть образованы химическими способами присоединения, известными в данной области. Например, для образования мультимеров антитела можно использовать гетеробифункциональные поперечно-сшивающие средства, включая, но не ограничиваясь ими, SMCC [сукцинимидил-4-(maleimido-methyl)циклогексан-1-карбоксилат] и SATA [N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат] (доступные, например, от Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL)). Иллюстративный протокол для образования гомодимеров антитела приведен в Ghetie et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (1997) 94:7509-7514, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Гомодимеры антитела можно превращать в гомодимеры Fab'₂ посредством расщепления пепсином. Другим способом образования гомодимеров антитела является образование посредством применения аутофильного пептида T15, описанного в Zhao and Kohler, *The Journal of Immunology* (2002) 25:396-404, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Альтернативно, мультимеризацию антител можно проводить способами рекомбинантных ДНК. IgM и IgA в природных условиях образуют мультимеры антитела через взаимодействие с полипептидом J-цепи. Молекулы, не являющиеся IgA или IgM, такие как молекулы IgG, можно конструировать таким образом, чтобы они содержали домен для взаимодействия с J-цепью IgA или IgM, придавая посредством этого им способность образовывать мультимеры более высокого порядка из молекул, не являющихся IgA или IgM (см., например, Chintalacharuvu et al., (2001) *Clinical Immunology* 101:21-31 и Frigerio et al., (2000) *Plant Physiology* 123:1483-94, обе из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме). Димеры ScFv также могут быть образованы с помощью рекомбинантных способов, известных в данной области; пример конструирования димеров scFv приведен в Goel et al., (2000) *Cancer*

Research 60:6964-6971, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Мультимеры антитела можно очищать с использованием любого пригодного способа, известного в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, гель-фильтрацию.

Если в описании нет иных указаний, специфичное связывание или иммуносpezifичное связывание антителом означает, что антитело связывает антиген-мишень, но, по существу, не связывается (т.е. не реагирует перекрестно) с белками, отличными от антигена-мишени, такими как другие белки того же семейства белков (например, другие лиганды семейства TNF). Антитело, которое связывает антиген-мишень и не реагирует перекрестно с другими белками, не обязательно представляет собой антитело, которое не связывает указанные другие белки в любых условиях; скорее, специфичное в отношении антигена-мишени антитело предпочтительно связывает антиген-мишень, по сравнению с его способностью связывать указанные другие белки, так что оно является пригодным для применения по меньшей мере в одном типе анализа или лечения, т.е. оно приводит к низким уровням фона или не вызывает чрезмерных неблагоприятных эффектов при лечении. Хорошо известно, что часть белка, связываемая антителом, известна как эпитоп. Эпитоп может быть либо линейным (т.е. состоящим из последовательных аминокислотных остатков в последовательности белка), либо конформационным (т.е. состоящим из одного или нескольких аминокислотных остатков, которые не являются соседними в первичной структуре белка, но которые расположены рядом во вторичной, третичной или четвертичной структуре белка). С учетом того, что специфичные к антигену-мишени антитела связываются с эпитопами антигена-мишени, антитело, которое специфично связывает антиген-мишень, может связывать фрагменты антигена мишени и/или варианты антигена-мишени (например, белки, которые по меньшей мере на 90% идентичны антигену-мишени) или может не связывать их в зависимости от наличия или отсутствия эпитопа, связываемого данным специфичным к антигену-мишени антителом во фрагменте или варианте антигена мишени. Аналогично, специфичные к антигену-мишени антитела могут связывать видовые ортологи антигена-мишени (включая их фрагменты) в зависимости от наличия или отсутствия эпитопа, распознаваемого антителом, в ортологе. Кроме того, специфичные к антигену-мишени антитела могут связывать модифицированные формы антигена-мишени, например слитые белки антигена-мишени. В таком случае, когда антитела связывают слитые белки антигена-мишени для того, чтобы связывание было специфичным, антитело для связывания должно вступить в контакт с группой антигена-мишени в слитом белке.

Антитела, которые специфично связываются с любым конкретным антигеном-мишенью, можно идентифицировать, например, с помощью способов иммунологического анализа или других способов, известных специалистам в данной области, например способов иммунологического анализа, описанных в патентной заявке США № 60/834152, поданной 31 июля 2006 г., которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Антитела, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению, могут быть "специфичными" к нейтрокину-альфа, однако, это не является необходимым условием. Антитела против нейтрокина-альфа, которые можно использовать в способах по этому изобретению, можно описать или определить с точки зрения их перекрестной реактивности. Антитела, которые не связывают другой аналог, ортолог или гомолог полипептида нейтрокина-альфа, можно использовать в способах по этому изобретению. В конкретном варианте осуществления антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, перекрестно реагируют с APRIL. В конкретных вариантах осуществления антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, перекрестно реагируют с гомологами мыши, крысы и/или кролика для белков человека и соответствующими им эпитопами.

В конкретном варианте осуществления антитела, которые связываются с полипептидом нейтрокина-альфа, полипептидным фрагментом или вариантом SEQ ID NO: 2 и/или эпитопом нейтрокина-альфа (как определяют способами иммунологического анализа специфичного связывания антитело-антиген, хорошо известными в данной области оценки), можно использовать в способах по этому изобретению. В конкретном варианте осуществления антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут связывать полипептиды нейтрокина-альфа, слитые с другими полипептидными последовательностями. Например, полипептиды нейтрокина-альфа можно подвергать слиянию с константным доменом иммуноглобулинов (IgA, IgE, IgG, IgM), или их частей (CH1, CH2, CH3 или любым их сочетанием и их частями), или альбумином (включая, но не ограничиваясь ими, рекомбинантный альбумин человека или его фрагменты или варианты (см., например, патент США № 5876969, выданный 2 марта 1999 г., патент EP 0413622 и патент США № 5766883, выданный 16 июня 1998 г., включенные в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме)) с получением в результате химерных полипептидов. Такие слитые белки могут упрощать очистку, могут продлевать срок хранения и могут повышать время полужизни *in vivo*. Это было показано для химерных белков, состоящих из первых двух доменов CD4-полипептида человека и различных доменов константных участков тяжелой или легкой цепи иммуноглобулинов млекопитающих. См., например, EP 394827; Traunecker et al., *Nature*, 331:84-86 (1988). Повышенная доставка антигена через эпителиальный барьер в иммунную систему была показана для антигенов (например, инсулина), конъюгированных с партнером для связывания FcRn, таким как IgG или Fc-фрагменты (см., например, публикации PCT WO 96/22024 и WO 99/04813). Также было показано, что слитые белки IgG, которые обладают связанной дисульфидными связями димерной структурой вследст-

вие дисульфидных связей IgG-части, являются более эффективными в отношении связывания и нейтрализации других молекул, чем мономерные полипептиды или их фрагменты отдельно. См., например, Fountoulakis et al., J. Biochem., 270:3958-3964 (1995).

В другом варианте осуществления антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, связывают мутантные полипептиды нейтрокина-альфа, которые получены случайным мутагенезом полинуклеотида, кодирующего полипептид нейтрокина-альфа, посредством ПЦР с пониженной точностью, встраивания случайных нуклеотидов или других способов, предшествующих рекомбинации. В другом варианте осуществления антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, связывают один или несколько компонентов, мотивов, участков, частей, доменов, фрагментов и т.д., нейтрокина-альфа, рекомбинированных с одним или несколькими компонентами, мотивами, участками, частями, доменами, фрагментами и т.д. одной или нескольких гетерологичных молекул. В предпочтительных вариантах осуществления гетерологичные молекулы представляют собой, например, TNF-альфа, лимфотоксин-альфа (LT-альфа, также известный как TNF-бета), LT-бета (находящийся в комплексе гетеротримера LT-альфа2-бета), OPGL, FasL, CD27L, CD30L, CD40L, 4-1BBL, DcR3, OX40L, TNF-гамма (международная публикация WO 96/14328), AIM-I (международная публикация WO 97/33899), AIM-II (международная публикация WO 97/34911), APRIL (J. Exp. Med. 188(6):1185-1190), эндокин-альфа (международная публикация WO 98/07880), OPG, OX40, и фактор роста нервов (NGF), и растворимые формы Fas, CD30, CD27, CD40 и 4 IBB, TR2 (международная публикация WO 96/34095), DR3 (международная публикация WO 97/33904), DR4 (международная публикация WO 98/32856), TR5 (международная публикация WO 98/30693), TR6 (международная публикация WO 98/30694), TR7 (международная публикация WO 98/41629), TRANK, TR9 (международная публикация WO 98/56892), TR10 (международная публикация WO 98/54202), 312C2 (международная публикация WO 98/06842), TR12, CAD и v-FLIP. В следующих вариантах осуществления гетерологичные молекулы представляют собой любой член семейства TNF.

В конкретных вариантах осуществления антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, связывают гомомерные, особенно гомотримерные, полипептиды нейтрокина-альфа. В других конкретных вариантах осуществления антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, связывают гетеромерные, особенно гетеротримерные, полипептиды нейтрокина-альфа, такие как гетеротример, содержащий два полипептида нейтрокина-альфа и один полипептид APRIL, или гетеротример, содержащий один полипептид нейтрокина-альфа и два полипептида APRIL. В конкретном варианте осуществления антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, связывают гомомерные, особенно гомотримерные, полипептиды нейтрокина-альфа, где отдельные белковые компоненты мультимеров состоят из зрелой формы нейтрокина-альфа (например, аминокислотных остатков 134-285 SEQ ID NO: 2). В других конкретных вариантах осуществления антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, связывают гетеромерные, особенно гетеротримерные, полипептиды нейтрокина-альфа, такие как гетеротример, содержащий два полипептида нейтрокина-альфа и один полипептид APRIL, или гетеротример, содержащий один полипептид нейтрокина-альфа и два полипептида APRIL, и где отдельные белковые компоненты гетеромера нейтрокина-альфа состоят либо из зрелой внеклеточной растворимой части нейтрокина-альфа (например, аминокислотных остатков 134-285 SEQ ID NO: 2), либо из зрелой внеклеточной растворимой части APRIL (например, аминокислотных остатков 105-250 SEQ ID NO: 4).

В конкретных вариантах осуществления антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, связывают конформационные эпитопы мономерного белка нейтрокина-альфа. В конкретных вариантах осуществления антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, связывают конформационные эпитопы мультимерного, особенно тримерного, белка нейтрокина-альфа. В других вариантах осуществления антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, связывают конформационные эпитопы, которые образуются вследствие соседнего расположения нейтрокина-альфа и гетерологичного полипептида, как может происходить, когда нейтрокин-альфа формирует гетеротримеры (например, с полипептидами APRIL), или в слитых белках между нейтрокином-альфа и гетерологичным полипептидом.

Антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, включают, но не ограничиваются ими, поликлональные, моноклональные, полиспецифичные, человеческие, гуманизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, Fab-фрагменты, F(ab')-фрагменты, фрагменты, продуцируемые экспрессирующей Fab библиотекой, антиидиотипические (anti-Id) антитела (включая, например, anti-id антитела к антителам против нейтрокина-альфа) и связывающие эпитоп фрагменты любого из указанных выше. В предпочтительных вариантах осуществления иммуноглобулин представляет собой иммуноглобулин изотипа IgG1 или IgG4. Иммуноглобулины могут иметь как тяжелую, так и легкую цепь. Ряд тяжелых цепей IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY может образовывать пару с легкой цепью форм каппа или ламбда.

В конкретном варианте осуществления антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, представляют собой связывающие нейтрокин-альфа фрагменты антитела и включают, но не ограничиваются ими, Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечные антитела, свя-

занные дисульфидной связью Fv (sdFv), и фрагменты, содержащие либо VL-, либо VH-домен. Связывающие нейтрокин-альфа фрагменты антитела, включая одноцепочечные антитела, могут содержать вариабельный участок(участки) отдельно или в сочетании с всеми или частью из следующих: шарнирная область, CH1-, CH2- и CH3-домены. В конкретном варианте осуществления связывающие нейтрокин-альфа фрагменты, которые можно использовать в способах по этому изобретению, содержат любое сочетание вариабельного участка(ов) с шарнирной областью, CH1-, CH2- и CH3-доменами. Антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут быть животного происхождения, включая птиц и млекопитающих. Предпочтительно антитела представляют собой антитела человека, мыши (например, мыши и крысы), осла, овцы, кролика, козы, морской свинки, верблюда, лошади или курицы. Как используют в настоящем описании, "человеческие" антитела включают антитела, обладающие аминокислотной последовательностью иммуноглобулина человека, и включают антитела, выделенные из библиотек иммуноглобулинов человека или из животных, трансгенных по одному или нескольким иммуноглобулинам человека и которые не экспрессируют эндогенные иммуноглобулины, как описано, например, в патенте США № 5939598, выданном Kucherlapati et al., содержание которого включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут быть моноспецифичными, биспецифичными, триспецифичными или более полиспецифичными. Полиспецифичные антитела могут быть специфичными к различным эпитопам полипептида нейтрокина-альфа или они могут быть специфичными как к полипептиду нейтрокина-альфа, так и к гетерологичному эпитопу, такому как гетерологичный полипептид или материал твердой подложки. См., например, публикации PCT WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, et al., J. Immunol. 147:60-69 (1991); патенты США №№ 4474893; 4714681; 4925648; 5573920; 5601819; Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-1553 (1992).

Антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут быть описаны или определены с точки зрения их аффинности связывания с полипептидом нейтрокина-альфа. В конкретных вариантах осуществления антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, связывают полипептиды нейтрокина-альфа или их фрагменты или варианты, с константой диссоциации или K_D , меньшей или равной 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M или 10^{-12} M. В конкретном варианте осуществления антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, связывают полипептиды нейтрокина-альфа с константой диссоциации или K_D , находящейся в любом одном из диапазонов, который находится между каждым из отдельных приведенных показателей.

Антитела против нейтрокина-альфа, которые препятствуют взаимодействиям рецептора/лиганда с полипептидами нейтрокина-альфа либо частично, либо полностью, можно использовать в способах по этому изобретению. Также предусмотрены специфичные к нейтрокину-альфа антитела, которые не препятствуют связыванию лиганда, но препятствуют активации рецептора. Активацию рецептора (например, передачу сигнала) можно определять способами, описанными в настоящем описании или в ином случае известными в данной области. Например, активацию рецептора можно определять посредством детекции активации факторов транскрипции NF-AT, AP-1, MAPK8/JNK и/или NF- κ B (включая неканонический каскад передачи сигнала NF- κ B) с использованием способов, известных в данной области, и/или фосфорилирования (например, тирозина или серина/треонина) рецептора или его субстрата посредством иммунопреципитации с последующим вестерн-блот анализом.

Указанные выше антитела против нейтрокина-альфа можно получать с использованием способов, известных в данной области. См., например, публикацию PCT WO 96/40281; патент США № 5811097; Deng et al., Blood 92 (6): 1981-1988 (1998); Chen et al., Cancer Res. 58(16):3668-3678 (1998); Harrop et al., J. Immunol. 161 (4):1786-1794 (1998); Zhu et al., Cancer Res. 58 (15):3209-3214 (1998); Yoon et al., J. Immunol. 160(7):3170-3179 (1998); Prat et al., J. Cell. Sci. 111(Pt2):237-247 (1998); Pitard et al., J. Immunol. Methods 205 (2):177-190 (1997); Liautard et al., Cytokine 9(4):233-241 (1997); Carlson et al., J. Biol. Chem. 272(17): 11295-11301 (1997); Taryman et al., Neuron 14 (4):755-762 (1995); Muller et al., Structure 6(9):1153-1167 (1998); Bartunek et al., Cytokine 8(1):14-20 (1996) (все из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме).

В конкретном варианте осуществления антитела против нейтрокина-альфа (включая молекулы, содержащие фрагменты антитела или их варианты или альтернативно состоящие из него), которые можно использовать в способах по этому изобретению, специфично связываются с нейтрокином-альфа или фрагментом или вариантом нейтрокина-альфа. В частности, в способах по этому изобретению можно использовать антитела, например, такие как одноцепочечные Fv (scFv), имеющие аминокислотную последовательность любого из SEQ ID NO: 13-18, как указано в табл. 1.

Таблица 1

scFv, которые иммуноспецифично связываются с нейтрокином-альфа

ID клона	scFv SEQ ID NO	A.K. VL	A.K. VL CDR1	A.K. VL CDR2	A.K. VL CDR3	A.K. VH	A.K. VH CDR1	A.K. VH CDR2	A.K. VH CDR3
I006D08	13	141- 249	163- 173	189- 195	228- 238	1-123	26-35	50-66	99-112
I050B11	14	143- 251	166- 177	193- 199	232- 240	1-125	26-35	50-66	99-114
I050A12	15	142- 250	164- 174	190- 196	229- 239	1-124	26-35	50-66	99-113
I050B11-15	16	143- 251	166- 177	193- 199	232- 240	1-125	26-35	50-66	99-114
I116A01	17	141- 249	163- 173	189- 195	228- 238	1-123	26-35	50-66	99-112
I026C04-K	18	142- 250	164- 176	192- 198	231- 239	1-125	26-35	50-66	99-114

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, связываются с нейтрокином-альфа и содержат полипептид, имеющий аминокислотную последовательность любого из VH-доменов, приведенных в табл. 1, и/или любого из VL-доменов, указанных в табл. 1. В предпочтительных вариантах осуществления антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, содержат аминокислотную последовательность VH-домена и VL-домена из одного scFv, указанного в табл. 1. В альтернативном варианте осуществления антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, содержат аминокислотную последовательность VH-домена и VL-домена из различных scFv, указанных в табл. 1. В другом варианте осуществления антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, специфично связываются с нейтрокином-альфа и содержат полипептид, имеющий аминокислотную последовательность любого одного, двух, трех или более CDR VH, указанных в табл. 1, и/или любого одного, двух, трех или более CDR VL, указанных в табл. 1. В предпочтительных вариантах осуществления антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, содержат аминокислотную последовательность CDR VH и CDR VL из одного scFv, указанного в табл. 1. В альтернативных вариантах осуществления антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, содержат аминокислотную последовательность CDR VH и CDR VL из различных scFv, указанных в табл. 1. Молекулы, содержащие фрагменты или варианты антител scFv, указанных в табл. 1, которые иммуноспецифично связываются с нейтрокином-альфа, или альтернативно состоящие из них, также можно использовать в способах по этому изобретению.

В конкретном варианте осуществления антитело против нейтрокина-альфа, которое можно использовать в способах по этому изобретению, содержит VH- и VL-домены SEQ ID NO: 13, как представлено в табл. 1. В другом конкретном варианте осуществления антитело, которое можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержит участки VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3 и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3 SEQ ID NO: 13, как представлено в табл. 1.

В конкретном варианте осуществления антитело против нейтрокина-альфа, которое можно использовать в способах по этому изобретению, содержит VH- и VL-домены SEQ ID NO: 14, как представлено в табл. 1. В другом конкретном варианте осуществления антитело, которое можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержит участки VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3 и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3 SEQ ID NO: 13, как представлено в табл. 1.

В конкретном варианте осуществления антитело против нейтрокина-альфа, которое можно использовать в способах по этому изобретению, содержит VH- и VL-домены SEQ ID NO: 13, как представлено в табл. 1. В другом конкретном варианте осуществления антитело, которое можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержит участки VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3 и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3 SEQ ID NO: 14, как представлено в табл. 1.

В конкретном варианте осуществления антитело против нейтрокина-альфа, которое можно использовать в способах по этому изобретению, содержит VH- и VL-домены SEQ ID NO: 15, как представлено в табл. 1. В другом конкретном варианте осуществления антитело, которое можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержит участки VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3 и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3 SEQ ID NO: 15, как представлено в табл. 1.

В конкретном варианте осуществления антитело против нейтрокина-альфа, которое можно использовать в способах по этому изобретению, содержит VH- и VL-домены SEQ ID NO: 16, как представлено в табл. 1. В другом конкретном варианте осуществления антитело, которое можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержит участки VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3 и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3 SEQ ID NO: 16, как представлено в табл. 1.

В конкретном варианте осуществления антитело против нейтрокина-альфа, которое можно исполь-

зовать в способах по этому изобретению, содержит VH- и VL-домены SEQ ID NO: 17, как представлено в табл. 1. В другом конкретном варианте осуществления антитело, которое можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержит участки VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3 и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3 SEQ ID NO: 17, как представлено в табл. 1.

В конкретном варианте осуществления антитело против нейтрокина-альфа, которое можно использовать в способах по этому изобретению, содержит VH- и VL-домены SEQ ID NO: 18, как представлено в табл. 1. В другом конкретном варианте осуществления антитело, которое можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержит участки VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3 и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3 SEQ ID NO: 18, как представлено в табл. 1.

В конкретном варианте осуществления антитело против нейтрокина-альфа, которое можно использовать в способах по этому изобретению, содержит VH- и VL-домены 15C10, нейтрализующего антитела против нейтрокина-альфа, которое описано, например, в публикации патента США № 20050186637. Аминокислотная последовательность VH-домена 15C10 приведена в SEQ ID NO: 19. Аминокислотная последовательность VL-домена 15C10 приведена в SEQ ID NO: 20. В конкретном варианте осуществления антитело против нейтрокина-альфа, которое можно использовать в способах по этому изобретению, представляет собой антигенсвязывающий фрагмент или вариант 15C10. В конкретном варианте осуществления антитело, которое можно использовать в способах по настоящему изобретению, представляет собой гуманизированный вариант 15C10. В другом конкретном варианте осуществления антитело, которое можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержит участки VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3 и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3 15C10.

В другом конкретном варианте осуществления антитело против нейтрокина-альфа, которое можно использовать в способах по этому изобретению, содержит VH- и VL-домены антитела против нейтрокина-альфа 4A5-3.1.1-B4, описанного в международной публикации патента номер WO 03/0164468, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. В WO 03/0164468 нейтрокин-альфа обозначают как hTNFSF13b. Аминокислотная последовательность VH-домена 4A5-3.1.1-B4 приведена в SEQ ID NO: 21. Аминокислотная последовательность VL-домена 4A5-3.1.1-B4 приведена в SEQ ID NO: 22. В конкретном варианте осуществления антитело против нейтрокина-альфа, которое можно использовать в способах по этому изобретению, представляет собой антигенсвязывающий фрагмент или вариант 4A5-3.1.1-B4. В другом конкретном варианте осуществления антитело, которое можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержит участки VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3 и VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3 4A5-3.1.1-B4.

В конкретном варианте осуществления антитела против нейтрокина-альфа, которые можно использовать в способах по этому изобретению, специфично связывают нативный полипептид нейтрокина-альфа, экспрессируемый клеткой.

С. Связывающие нейтрокин-альфа полипептиды.

В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой связывающий нейтрокин-альфа пептид или полипептид. Связывающие нейтрокин-альфа пептиды или полипептиды описаны, например, в международных публикациях патентов WO 05/005462, WO 05/000351, WO 02/092620, WO 02/16412, WO 02/02641 и WO 02/16411 и публикациях патентов США №№ US 2006135430, US 2006084608, US 2003194743, US 20030195156 и US 2003091565, все из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме. Связывающие нейтрокин-альфа пептиды или полипептиды описаны, например, в Sun et al., (2006) Biochem. Biophys. Res. Commun. 346:1158-1162, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Связывающие нейтрокин-альфа пептиды, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению, включают короткие полипептиды, идентифицированные из случайных пептидных последовательностей, воспроизводимых посредством слияния с белками оболочки нитевидного фага. Для описания технологии фагового дисплея пептидных библиотек, см., например, Scott et al. (1990), Science 249: 386; Devlin et al. (1990), Science 249: 404; патент США № 5223409, выданный 29 июня 1993 г.; патент США № 5733731, выданный 31 марта 1998 г.; патент США № 5498530, выданный 12 марта 1996 г.; патент США № 5432018, выданный 11 июля 1995 г.; патент США № 5338665, выданный 16 августа 1994 г.; патент США № 5922545, выданный 13 июля 1999 г.; WO 96/40987, опубликованная 19 декабря 1996 г.; и WO 98/15833, опубликованная 16 апреля 1998 г. (все из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме). Фаг, экспрессирующий пептиды, выделяют последовательными раундами аффинной очистки против иммобилизованного пептида-мишени нейтрокина-альфа с последующим повторным размножением. Кандидатов с наивысшим связыванием с нейтрокином-альфа можно секвенировать с целью определения структуры каждого связывающего пептида. Затем такой идентифицированный связывающий нейтрокин-альфа пептид можно присоединять к "носителю" с последующим получением связывающего нейтрокин-альфа пептида для применения в способах настоящего эксперимента. Термин "носитель" относится к молекуле, которая предотвращает деградацию и/или повышает время полужизни, снижает токсичность, снижает иммуногенность или повышает биологическую активность связывающего нейтрокин-альфа пептида. Иллюстративные носители включают Fc-домен и его варианты ("пептидное антитело", которое является предпочтительным); линейный полимер (например, полиэтиленгликоль (PEG), включая

PEG массой 5, 20 и 30 кДа, полилизин, декстран и т.д.); полимер с разветвленной цепью (см., например, патенты США № 4289872, выданный Denkenwalter et al. 15 сентября 1981 г.; № 5229490, выданный Tam 20 июля 1993 г.; WO 93/21259, Frechet et al., опубликованную 28 октября 1993 г.); липид; группу холестерина (такую как стероид); углевод или олигосахарид (например, декстран); любой природный или синтетический белок, полипептид или пептид, который связывается с рецептором "спасения"; альбумин, включая, но не ограничиваясь ими, рекомбинантный альбумин человека или его фрагменты или варианты (см., например, патент США № 5876969, выданный 2 марта 1999 г., патент EP 0413622 и патент США № 5766883, выданный 16 июня 1998 г., включенные в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме); и домен "лейциновой молнии" и другие такие белки и фрагменты белков. Для связывающих нейтрокин-альфа полипептидов, которые можно использовать в способах по этому изобретению, необходимо наличие по меньшей мере одного носителя, присоединенного к пептиду через N-конец, C-конец или боковую цепь одного из аминокислотных остатков. Также можно использовать несколько носителей; например Fc на каждом конце или Fc на одном конце и группу PEG на другом конце или боковой цепи. Для связывающих нейтрокин-альфа пептидов предпочтительным носителем является Fc-домен. Fc-домен может быть слитым с N- или C-концами пептидов или как с N-, так и с C-концами. Слияние с N-концом является предпочтительным.

Как указано выше, Fc-варианты являются пригодными носителями для связывающих нейтрокин-альфа пептидов, которые можно использовать в способах по этому изобретению. Нативный Fc можно значительно модифицировать с образованием Fc-варианта при условии сохранения связывания с рецептором "спасения"; см., например, WO 97/34631 и WO 96/32478. В таких Fc-вариантах можно удалять один или несколько участков нативного Fc, которые обеспечивают структурные признаки или функциональную активность, не требующиеся для связывающих нейтрокин-альфа пептидов, которые можно использовать в способах по этому изобретению. Эти участки можно удалять, например, замещением или делецией остатков, встраиванием остатков в участок или укорочением на фрагменты, содержащие участок. Встроенные или замещенные остатки также могут представлять собой измененные аминокислоты, такие как пептидомиметики или D-аминокислоты. Fc-варианты могут быть желательными по многим причинам, некоторые из которых описаны ниже. Иллюстративные Fc-варианты включают молекулы и последовательности, в которых:

1) удалены участки, вовлеченные в образование дисульфидных связей. Такое удаление может препятствовать реакции с другими содержащими цистеин белками, имеющимися в клетке-хозяине, используемой для продукции молекул по этому изобретению. Для этой цели можно укорачивать содержащий цистеин фрагмент на N-конце или можно удалять остатки цистеина или заменять их другими аминокислотами (например, аланином, серином). Даже когда остатки цистеина удалены, одноцепочечные Fc-домены могут по-прежнему образовывать димерный Fc-домен, который связан нековалентно;

2) нативный Fc модифицирован в целях его большей совместимости с выбранной клеткой-хозяином. Например, можно удалять последовательность PA вблизи N-конца типичного нативного Fc, которую может распознавать гидролизующий фермент в *E. coli*, такой как пролиноминопептидаза. Также можно добавлять N-концевой остаток метионина, особенно когда молекула экспрессируется рекомбинантно в бактериальной клетке, такой как *E. coli*;

3) участок с N-конца нативного Fc удален для предотвращения N-концевой гетерогенности при экспрессии в выбранной клетке-хозяине. Для этой цели можно удалять любые из первых 20 аминокислотных остатков на N-конце;

4) удалены один или несколько участков гликозилирования. Остатки, которые обычно гликозилируются (например, аспарагин), могут обеспечивать цитолитический ответ. Такие остатки можно удалять или заменять другими негликозилированными остатками (например, аланином);

5) удалены участки, вовлеченные во взаимодействие с комплементом, такие как участок связывания C1q. Например, можно удалять или заменять последовательность EKK IgG1 человека. Привлечение комплемента может не быть преимущественным для молекул, которые можно использовать в способах по этому изобретению, и, таким образом, его можно избегать с помощью такого варианта Fc;

6) удалены участки, которые нарушают связывание с Fc-рецепторами, отличными от рецептора "спасения". Нативный Fc может обладать участками для взаимодействия с определенными лейкоцитами, которые не являются необходимыми для слитых молекул связывающего нейтрокин-альфа пептида, которые можно использовать в способах по этому изобретению, и, таким образом, их можно удалять;

7) удален участок ADCC. Участки ADCC известны в данной области; см., например, Molec. Immunol. 29 (5): 633-9 (1992) в отношении участков ADCC в IgG1. Эти участки также не являются необходимыми для слитых молекул, которые можно использовать в способах по этому изобретению, и, таким образом, их можно удалять;

8) когда источником нативного Fc является нечеловеческое антитело, нативный Fc можно гуманизировать. Как правило, для гуманизации нативного Fc выбранные остатки в нечеловеческом нативном Fc заменяют остатками, которые в норме встречаются в нативном человеческом Fc. Способы гуманизации антитела хорошо известны в данной области.

Альтернативным носителем для связывающих нейтрокин-альфа пептидов, которые можно исполь-

зовать в способах по этому изобретению, может быть белок, полипептид, пептид, антитело, фрагмент антитела или низкомолекулярная молекула (например, соединение пептидомиметика), способные связываться с рецептором "спасения". Например, в качестве носителя можно использовать полипептид, как описано в патенте США № 5739277. Также пептиды можно выбирать посредством фагового дисплея или скрининга РНК-пептид в отношении связывания с рецептором "спасения". Такие связывающие рецептор "спасения" соединения также включены в значение термина "носитель" и их можно использовать для связывающих нейтрокин-альфа пептидов, которые можно применять в способах по этому изобретению. Такие носители следует выбирать для повышения времени полужизни (например, избегая последовательностей, распознаваемых протеазами) и снижения иммуногенности (например, отдавая предпочтение неиммуногенным последовательностям, как обнаружено при гуманизации антитела).

Как указано выше, также в связывающих нейтрокин-альфа пептидах, которые можно использовать в способах по этому изобретению, можно использовать полимерные носители. В настоящее время доступны различные способы присоединения химических групп, пригодных в качестве носителей, см., например, международную публикацию по договору о патентной кооперации (PCT) WO 96/11953, включенную в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. В этой публикации PCT описано, помимо прочего, селективное присоединение растворимых в воде полимеров к N-концу белков.

В конкретном варианте осуществления предпочтительным полимерным носителем является полиэтиленгликоль (PEG). Группа PEG может обладать любой пригодной молекулярной массой и она может быть линейной или разветвленной. Средняя молекулярная масса PEG предпочтительно будет варьировать от приблизительно 2 до приблизительно 100 кДа, более предпочтительно от приблизительно 5 до приблизительно 50 кДа, наиболее предпочтительно от приблизительно 5 до приблизительно 10 кДа. Группы PEG, главным образом, будут присоединять к связывающим нейтрокин-альфа пептидам, которые можно использовать в способах по этому изобретению посредством ацилирования или восстановительного алкилирования через реакционноспособную группу на группе PEG (например, альдегидную, амино, тиольную или сложноэфирную группу) реакционноспособной группы соединения по настоящему изобретению (например, альдегидной, амино или сложноэфирной группы).

Пригодная стратегия для пегилирования синтетических пептидов состоит из объединения, через образование конъюгирующей связи в растворе, пептида и группы PEG, каждый из которых обладает определенной функциональной группой, которая является взаимно реакционноспособной в отношении другой. Пептиды можно легко получать общепринятым твердофазным синтезом. Пептиды "предварительно активируют" пригодной функциональной группой в конкретном участке. Перед реакцией с группой PEG предшественников очищают и полностью охарактеризовывают. Лигирование пептида с PEG, как правило, происходит в водной фазе, и его мониторинг можно легко проводить посредством обращенно-фазовой аналитической ВЭЖХ. Пегилированные пептиды можно легко очищать препаративной ВЭЖХ и охарактеризовывать аналитической ВЭЖХ, анализом аминокислот и лазерной десорбционной масс-спектрометрией.

Полисахаридные полимеры представляют собой другой тип растворимого в воде полимера, который можно использовать для связывающих нейтрокин-альфа пептидов, которые можно использовать в способах по этому изобретению. Декстраны представляют собой полисахаридные полимеры, состоящие из отдельных субъединиц глюкозы, главным образом, связанных α 1-6-связями. Сам декстран доступен во многих диапазонах молекулярной массы, и он широко доступен с молекулярной массой от приблизительно 1 до приблизительно 70 кДа. Декстран является растворимым в воде полимером, пригодным для применения в связывающих нейтрокин-альфа пептидах, которые можно использовать в способах по этому изобретению, в качестве отдельного носителя или в сочетании с другим носителем (например, Fc). См., например, WO 96/11953 и WO 96/05309. Описано применение декстрана, конъюгированного с терапевтическими или диагностическими иммуноглобулинами; см., например, публикацию европейского патента № 0315456, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Когда в качестве носителя в соответствии с настоящим изобретением используют декстран, предпочтительным является декстран массой от приблизительно 1 до приблизительно 20 кДа.

В конкретном варианте осуществления связывающие нейтрокин-альфа пептиды, которые можно использовать в способах по этому изобретению, необязательно включают "линкер". В случае его наличия его химическая структура не является важной, поскольку он служит, главным образом, в качестве спейсера. Линкер предпочтительно состоит из аминокислот, связанных друг с другом пептидными связями. Таким образом, в предпочтительных вариантах осуществления линкер состоит из от 1 до 30 аминокислот, связанных пептидными связями, где аминокислоты выбраны из 20 встречающихся в природе аминокислот. Некоторые из этих аминокислот могут быть гликозилированными, как хорошо понятно специалисту в данной области. В более предпочтительном варианте осуществления от 1 до 20 аминокислот выбирают из глицина, аланина, пролина, аспарагина, глутамина и лизина. Более предпочтительно линкер состоит из большинства аминокислот, которые не являются пространственно затрудненными, таких как глицин и аланин. Таким образом, предпочтительными линкерами являются полиглицины (в частности (Gly)₄, (Gly)₅), поли(Gly-Ala) и полиаланины. Предпочтительными линкерами являются аминокислотные линкеры, содержащие более 5 аминокислот, с пригодными линкерами, имеющими вплоть до приблизи-

тельно 500 аминокислот, выбранных из глицина, аланина, пролина, аспарагина, глутамина, лизина, треонина, серина или аспартата.

Линкеры приблизительно из от 20 до 50 аминокислот являются наиболее предпочтительными.

Непептидные линкеры также пригодны для связывающих нейтрокин-альфа пептидов, которые можно использовать в способах по этому изобретению. Например, можно использовать алкильные линкеры, такие как $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_n-\text{C}(\text{O})-$, где $n=2-20$. Эти алкильные линкеры можно далее замещать любыми пространственно незатрудненными группами, такими как низший алкил (например, C_1-C_6), низший ацил, галоген (например, Cl, Br), CN, NH_2 , фенил и т.д.

В предпочтительных вариантах осуществления связывающие нейтрокин-альфа пептиды, которые можно использовать в способах по этому изобретению, включают аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25. В особенно предпочтительном варианте осуществления связывающий нейтрокин-альфа пептид, который можно использовать в способах по этому изобретению, представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23 (AMG 623; пептидное антитело AGP3).

Рецепторы для нейтрокина-альфа

В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок рецептора для нейтрокина-альфа или его фрагмент или вариант. Рецепторы для нейтрокина-альфа включают, например, трансмембранную активирующую и взаимодействующую с CAML молекулу (TACI, регистрационный номер GenBank AAC51790, SEQ ID NO: 6), рецептор фактора активации В-клеток (BAFFR, регистрационный номер GenBank NP_443177 SEQ ID NO: 10) и антиген созреваия В-клеток (BCMA, регистрационный номер GenBank NP_001183 SEQ ID NO: 8). Рецепторные белки для нейтрокина-альфа, их фрагменты и варианты, а также антитела к ним, описаны, например, в публикациях PCT WO 03/014294, WO 02/066516, WO 02/024909, WO 03/014294, WO 03/024991, WO 02/094852 и WO 04/011611 и публикациях патентов США № US 20030148445, US 20030099990, US 2005070689, US 2005043516 и US 2003012783, и более подробно описаны ниже. Все из упомянутых выше ссылок включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме.

D. Рецепторы для нейтрокина-альфа, TACI.

Полипептиды TACI, такие как полипептиды, описанные ниже, действуют в качестве антагонистов нейтрокина-альфа и/или APRIL и их также можно использовать в способах по настоящему изобретению. TACI, также известный как TR17, представляет собой белок из 293 аминокислотных остатков (SEQ ID NO: 6) с вычисленной молекулярной массой приблизительно 31,8 кДа. Нуклеотидная последовательность кДНК, которая кодирует TACI, приведена в SEQ ID NO: 5. Предсказанные аминокислоты от приблизительно 1 до приблизительно 165 составляют внеклеточный домен (SEQ ID NO: 6); аминокислоты от приблизительно 166 до приблизительно 186 составляют трансмембранный домен (SEQ ID NO: 6); и аминокислоты от приблизительно 187 до приблизительно 293 составляют внутриклеточный домен (SEQ ID NO: 6).

Таким образом, в одном варианте осуществления белок TACI, который можно использовать в способах по настоящему изобретению представляет собой выделенный полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или альтернативно состоящий из нее, или полипептид, содержащий часть SEQ ID NO: 6, например, такую как внеклеточный домен TACI (содержащий аминокислоты с 1 по 165 SEQ ID NO: 6) и/или богатый цистеином домен TACI (содержащий аминокислоты с 33 по 104 SEQ ID NO: 6) или альтернативно состоящий из нее; а также полипептиды, которые по меньшей мере на 80% идентичны, более предпочтительно по меньшей мере на 90 или 95% идентичны, более предпочтительно по меньшей мере на 96, 97, 98, 99 или 100% идентичны полипептидам, описанным выше.

В другом варианте осуществления белок TACI, который можно использовать в способах по настоящему изобретению, представляет собой выделенный полипептид, содержащий аминокислоты с 1 по 154 SEQ ID NO: 6, а также полипептиды, которые по меньшей мере на 80% идентичны, более предпочтительно по меньшей мере на 90 или 95% идентичны, более предпочтительно по меньшей мере на 96, 97, 98, 99 или 100% идентичны полипептидам, описанным выше.

Под полипептидом, имеющим аминокислотную последовательность по меньшей мере, например, на 95% "идентичную" эталонной аминокислотной последовательности полипептида TACI, подразумевают, что аминокислотная последовательность полипептида является идентичной эталонной последовательности, за исключением того, что полипептидная последовательность может включать вплоть до пяти изменений аминокислот на каждые 100 аминокислот эталонной аминокислотной последовательности рецептора TACI. Иными словами, для получения полипептида, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную эталонной аминокислотной последовательности, вплоть до 5% аминокислотных остатков в эталонной последовательности могут быть удалены или заменены другими аминокислотами, или в эталонную последовательность может быть встроено количество аминокислот, составляющее вплоть до 5% от общего количества аминокислотных остатков в эталонной последовательности. Эти изменения эталонной последовательности могут встречаться на N- или C-концевых положениях эталонной аминокислотной последовательности или в любом положении между этими концевыми положениями, встроенные либо отдельно среди остатков в эталонной последовательности, либо

в виде одной или нескольких соседних групп в эталонной последовательности.

Полипептидные фрагменты TAC1 включают полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность, содержащуюся в SEQ ID NO: 6, или альтернативно состоящие из нее. Полипептидные фрагменты могут быть "свободными" или находящимися в более крупном полипептиде, в котором фрагмент формирует часть или участок, наиболее предпочтительно в качестве отдельного непрерывного участка. В дополнительных вариантах осуществления полипептидные фрагменты содержат один или несколько доменов TAC1 или альтернативно состоят из них. Предпочтительные полипептидные фрагменты включают компонент, выбранный из группы: (a) полипептид, содержащий внеклеточный домен TAC1 (для которого предсказано, что он состоит из аминокислотных остатков от приблизительно 1 до приблизительно 165 SEQ ID NO: 6) или альтернативно состоящий из него; (b) полипептид, содержащий богатый цистеином домен TAC1 (для которого предсказано, что он состоит из аминокислотных остатков от приблизительно 33 до приблизительно 104 SEQ ID NO: 6) или альтернативно состоящий из него; (c) полипептид, содержащий трансмембранный домен TAC1 (для которого предсказано, что он состоит из аминокислотных остатков от приблизительно 166 до приблизительно 186 SEQ ID NO: 6) или альтернативно состоящий из него; (d) полипептид, содержащий внутриклеточный домен TAC1 (для которого предсказано, что он состоит из аминокислотных остатков от приблизительно 187 до приблизительно 293 SEQ ID NO: 6) или альтернативно состоящий из него; или (e) любое сочетание полипептидов (a)-(d).

Полагают, что внеклеточные богатые цистеином мотивы TAC1 являются важными для взаимодействий между TAC1 и его лигандами, нейтрокином-альфа и APRIL. Таким образом, в предпочтительных вариантах осуществления полипептидные фрагменты TAC1, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержат аминокислотные остатки с 33 по 66 и/или с 70 по 104 SEQ ID NO: 6, или альтернативно состоят из них. В конкретном варианте осуществления полипептиды TAC1, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержат один или несколько богатых цистеином внеклеточных мотивов (остатки с 33 по 66 и остатки с 70 по 104 SEQ ID NO: 6), или альтернативно состоят из них. Также являются предпочтительными белки, содержащие полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична полипептидным последовательностям одного или нескольких из этих богатых цистеином мотивов, или альтернативно состоящие из нее.

Другие фрагменты белка TAC1, которые можно использовать в способах по этому изобретению, представляют собой фрагменты, характеризующиеся структурными или функциональными признаками TAC1. Такие фрагменты включают аминокислотные остатки, которые содержат альфа-спираль и образующие альфа-спираль участки ("альфа-участки"), бета-слой и образующие бета-слой участки ("бета-участки"), поворот и образующие поворот участки ("участки поворота"), виток и образующие виток участки ("участки витка"), гидрофильные участки, гидрофобные участки, альфа-амфипатические участки, бета-амфипатические участки, формирующие поверхность участки, и участки с высоким антигенным индексом (т.е. содержащие четыре или более соседних аминокислоты, имеющих антигенный индекс, превышающий или равный 1,5, как определенное посредством программы Jameson-Wolf с использованием параметров по умолчанию) полного (т.е. полноразмерного) TAC1 (SEQ ID NO: 6), как рассмотрено в патенте США № 6969519. Определенные предпочтительные участки включают, но не ограничиваются ими, альфа-участки, бета-участки, участки поворота и участки витка, предсказанные Garnier-Robson; альфа-участки, бета-участки и участки поворота, предсказанные Chou-Fasman; гидрофильные участки, предсказанные Kyte-Doolittle; гидрофобные участки, предсказанные Hopp-Woods; альфа- и бета-амфипатические участки Eisenberg; формирующие поверхность участки Emin и участки с высоким антигенным индексом Jameson-Wolf, как предсказывают, с использованием параметров по умолчанию этой компьютерной программы.

Полипептид TAC1 для применения в способах по этому изобретению можно экспрессировать в модифицированной форме, такой как слитый белок (содержащий полипептид, связанный пептидной связью с гетерологичной белковой последовательностью (другого белка)), и он может включать не только сигналы для секреции, но также дополнительные гетерологичные функциональные участки. Альтернативно, такой слитый белок можно получать способами синтеза белков, например, с использованием устройства для синтеза пептидов. Таким образом, например, участок дополнительных аминокислот, в частности заряженных аминокислот, можно присоединять к N-концу полипептида для повышения стабильности и устойчивости в клетке-хозяине в ходе очистки или в ходе последующей обработки и хранения. Также к полипептиду можно присоединять пептидные группы для упрощения очистки. Такие участки можно удалять перед окончательным получением полипептида. Присоединение пептидных групп к полипептидам для обеспечения секреции и выделения, для повышения стабильности и упрощения очистки, среди прочих, является известным и общепринятым способом в данной области.

Предпочтительный белок для слияния с TAC1, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит гетерологичный участок из иммуноглобулина, который является пригодным для растворения белков. Например, в EP-A-0464533 (канадский эквивалент 2045869) и WO 00/024782 описаны слитые белки, содержащие различные фрагменты константного участка молекул иммуноглобулинов совместно с другим белком человека или его частью. Слитые белки TAC1 и иммуноглобулина описаны,

например, в публикациях PCT WO 01/60397, WO 01/81417, WO 01/087977 и WO 02/94852; публикациях США №№ US 2003103986 и US 2006034852 и Gross, et al., (2000) Nature 404:995-999 и Yu, et al., (2000) Nat Immunol 1:252-256, включенных в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме. Во многих случаях Fc-часть в слитом белке является высокопреимущественной для применения в целях терапии и диагностики и, таким образом, приводит, например, к улучшенным фармакокинетическим свойствам (EP-A 0232262). С другой стороны, для некоторых способов применения может быть желательной возможность удаления Fc-части после экспрессии, детекции и очистки слитого белка описанным преимущественным способом. Это желательно в случае, когда оказывается, что Fc-часть препятствует применению в целях лечения и диагностики, например, когда слитый белок подлежит применению в качестве антигена для иммунизации. При разработке лекарственных средств, например, белки человека, такие как hIL-5, подвергали слиянию с Fc-участками в целях высокопроизводительных скрининговых анализов для идентификации антагонистов hIL-5. См. D. Bennett et al., Journal of Molecular Recognition 8:52-58 (1995) и K. Johanson et al., The Journal Biological Chemistry 270:9459-9471 (1995). В конкретном варианте осуществления слитый белок TACI-Fc, который можно использовать в способах по этому изобретению, представляет собой Atacicept (TACI-Ig).

Как поймет специалист в данной области и как рассмотрено выше, полипептиды TACI можно подвергать слиянию с последовательностями других полипептидов. Например, полипептиды TACI можно подвергать слиянию с константным доменом иммуноглобулинов (IgA, IgE, IgG, IgM) или их частями (CH1, CH2, CH3 или любым их сочетанием и их частями), или альбумином (включая, но не ограничиваясь ими, рекомбинантный альбумин человека или его фрагменты или варианты (см., например, патент США № 5876969, выданный 2 марта 1999 г., патент EP 0413622 и патент США № 5766883, выданный 16 июня 1998 г., включенные в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме)) с получением в результате химерных полипептидов.

Такие слитые белки могут упрощать очистку, могут продлевать срок хранения и могут повышать время полужизни *in vivo*. Это было показано для химерных белков, состоящих из первых двух доменов CD4-полипептида человека и различных доменов константных участков тяжелой или легкой цепи иммуноглобулинов млекопитающих. См., например, EP 394827; Traunecker et al., Nature, 331:84-86 (1988). Повышенная доставка антигена через эпителиальный барьер в иммунную систему была показана для антигенов (например, инсулина), конъюгированных с партнером для связывания FcRn, таким как IgG или Fc-фрагменты (см., например, публикации PCT WO 96/22024 и WO 99/04813). Также было показано, что слитые белки IgG, которые обладают связанной дисульфидными связями димерной структурой вследствие дисульфидных связей IgG-части, являются более эффективными в отношении связывания и нейтрализации других молекул, чем мономерные полипептиды или их фрагменты отдельно. См., например, Fountoulakis et al., J. Biochem., 270:3958-3964 (1995).

Слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержит, по меньшей мере, фрагмент или вариант полипептида TACI и, по меньшей мере, фрагмент или вариант сывороточного альбумина человека, которые связаны друг с другом предпочтительно генетическим слиянием (т.е. слитый белок альбумина получают трансляцией нуклеиновой кислоты, в которой полинуклеотид, кодирующий весь TACI или его часть, связывают в рамке считывания с полинуклеотидом, кодирующим весь альбумин или его часть) или химической конъюгацией друг с другом. Полипептид TACI и белок альбумина, являющиеся частью слитого белка альбумина, могут быть обозначены как "часть", "участок" или "группа" слитого белка альбумина (например, "часть TACI" или "часть белка альбумина").

В одном варианте осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит полипептид TACI и белок сывороточного альбумина или альтернативно состоит из них. В других вариантах осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит фрагмент TACI и белок сывороточного альбумина или альтернативно состоит из них. В других вариантах осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит вариант TACI и белок сывороточного альбумина или альтернативно состоит из них. В предпочтительных вариантах осуществления компонент белка сывороточного альбумина в слитом белке альбумина представляет собой зрелую часть сывороточного альбумина.

В следующих вариантах осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит полипептид TACI и биологически активный и/или терапевтически активный фрагмент сывороточного альбумина или альтернативно состоит из них. В следующих вариантах осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит полипептид TACI и биологически активный и/или терапевтически активный вариант сывороточного альбумина или альтернативно состоит из них. В предпочтительных вариантах осуществления часть TACI в слитом белке альбумина представляет собой полноразмерный полипептид TACI. В следующем предпочтительном варианте осуществления часть белка TACI в слитом белке альбумина представляет собой зрелый растворимый домен полипептида TACI.

В следующих вариантах осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в

способах по этому изобретению, содержит фрагмент или вариант TAC1 и биологически активный и/или терапевтически активный фрагмент или вариант сывороточного альбумина или альтернативно состоит из них. В предпочтительных вариантах осуществления это изобретение относится к слитому белку альбумина, содержащему зрелую часть полипептида TAC1 и зрелую часть сывороточного альбумина.

В следующих вариантах осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит фрагмент или вариант TAC1 и биологически активный и/или терапевтически активный фрагмент или вариант сывороточного альбумина или альтернативно состоит из них. В предпочтительных вариантах осуществления это изобретение относится к слитому белку альбумина, содержащему зрелую часть полипептида TAC1 и зрелую часть сывороточного альбумина (включая, но не ограничиваясь ими, рекомбинантный сывороточный альбумин человека или его фрагменты или варианты (см., например, патент США № 5876969, выданный 2 марта 1999 г., патент EP 0413622 и патент США № 5766883, выданный 16 июня 1998 г., включенные в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме)) или альтернативно состоящему из них. В предпочтительном варианте осуществления полипептиды TAC1 (включая их фрагменты или варианты) являются слитыми со зрелой формой сывороточного альбумина человека (т.е. аминокислотами 1-585 сывороточного альбумина человека, как показано на фиг. 1 и 2 патента EP 0322094, который включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). В другом предпочтительном варианте осуществления антитела по настоящему изобретению (включая их фрагменты или варианты) являются слитыми с полипептидными фрагментами, содержащими аминокислотные остатки 1-x сывороточного альбумина человека, где x представляет собой целое число от 1 до 585 и фрагмент альбумина обладает активностью сывороточного альбумина человека, или альтернативно состоящими из них. В другом предпочтительном варианте осуществления полипептиды TAC1 (включая их фрагменты или варианты) являются слитыми с полипептидными фрагментами, содержащими аминокислотные остатки 1-z сывороточного альбумина человека, где z представляет собой целое число от 369 до 419, как описано в патенте США 5766883, включенном в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме, или альтернативно состоящими из них. Полипептиды TAC1 (включая их фрагменты или варианты) могут быть слитыми либо с N-, либо с C-концом гетерологичного белка (например, Fc-полипептида иммуноглобулина или полипептида сывороточного альбумина человека).

В предпочтительных вариантах осуществления белок сывороточного альбумина человека, используемый в слитых белках альбумина, которые можно использовать в способах по этому изобретению, содержит один или оба из следующих наборов точковых мутаций относительно SEQ ID NO: 11: Leu-407 на Ala, Leu-408 на Val, Val-409 на Ala и Arg-410 на Ala или Arg-410 на A, Lys-413 на Gln и Lys-414 на Gln (см., например, международную публикацию WO 95/23857, включенную в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). В более предпочтительных вариантах осуществления слитые белки альбумина, которые можно использовать в способах по этому изобретению, которые содержат один или оба из описанных выше наборов точковых мутаций, обладают повышенной стабильностью/устойчивостью к протеолитическому расщеплению посредством YарЗр дрожжей, что обеспечивает повышенную продукцию рекомбинантных слитых белков альбумина, экспрессируемых в дрожжевых клетках-хозяевах.

Предпочтительно слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит НА в качестве N-концевой части и полипептид TAC1 в качестве C-концевой части. Альтернативно, также можно использовать слитый белок альбумина, содержащий НА в качестве C-концевой части и полипептид TAC1 в качестве N-концевой части.

В других вариантах осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, имеет полипептид TAC1, слитый как с N-концом, так и с C-концом альбумина. В конкретном варианте осуществления полипептиды TAC1, слитые с N- и C-концами, являются одинаковыми. В другом варианте осуществления полипептиды TAC1, слитые с N- и C-концами, представляют собой разные полипептиды TAC1. В другом варианте осуществления полипептид TAC1 является слитым либо с N-, либо с C-концом альбумина, а с другим концом слит гетерологичный полипептид.

Кроме того, слитые белки альбумина, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут включать линкерный пептид между слитыми частями для обеспечения большего физического разделения между группами. Линкерный пептид может состоять из таких аминокислот, чтобы он был более гибким или более жестким.

Как правило, слитые белки альбумина, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут иметь один образованный из НА участок и один участок TAC1. Однако для получения слитого белка альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, можно использовать несколько участков каждого белка. Аналогично, для получения слитого белка альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, можно использовать более одного белка. Например, белок может быть слитым как с N-, так и с C-концом НА. В такой конфигурации части белка могут представлять собой одинаковые или различные белковые молекулы. Структуру бифункциональных слитых белков альбумина можно представить как: X-НА-Y или Y-НА-X.

В конкретном варианте осуществления белок TAC1 или его фрагмент или вариант, который можно использовать в способах по этому изобретению, может быть конъюгирован с цитотоксином (например, цитостатическим или цитотоксичным средством). Цитотоксин или цитотоксическое средство включает лю-

бое средство, которое является вредным для клеток. Их примеры включают паклитаксол, цитохалазин В, грамицидин D, бромид этидия, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубин, даунорубин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, татракаин, лидокаин, пропранолол и пуромицин и их аналоги или гомологи.

В другом варианте осуществления белок TACI или его фрагмент или вариант, который можно использовать в способах по этому изобретению, может быть конъюгирован с токсином.

Под "токсином" подразумевают одно или несколько соединений, которые связывают и активируют эндогенные цитотоксические эффекторные системы, радиоизотопы, голотоксины, модифицированные токсины, каталитические субъединицы токсинов, или любые молекулы или ферменты, в норме не представленные в клетке или на поверхности клетки, которые при определенных условиях вызывают гибель клетки. Токсины, которые можно использовать, включают, но не ограничиваются ими, радиоизотопы, известные в данной области, соединения, например, такие как антитела (или обладающие фиксацией комплемента их участки), которые связывают врожденную или индуцируемую эндогенную цитотоксическую эффекторную систему, тимидинкиназа, эндонуклеаза, РНКаза, альфа-токсин, ридин, абрин, экзотоксин A *Pseudomonas*, дифтерийный токсин, сапорин, момордин, гелонин, противовирусный белок лакноса, альфа-сарцин и холерный токсин. "Токсин" также включает цитостатическое или цитотоксическое средство, лекарственное средство или ион радиоактивного металла, например альфа-эмиттеры, например, такие как ^{213}Bi , или другие радиоизотопы, например, такие как ^{103}Pd , ^{133}Xe , ^{131}I , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{35}S , ^{90}Y , ^{153}Sm , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn , $^{90}\text{Иттрий}$, $^{117}\text{Олово}$, $^{186}\text{Рений}$, $^{166}\text{Гольмий}$ и $^{188}\text{Рений}$.

Для улучшения или изменения свойств полипептидов TACI, которые можно использовать в способах по этому изобретению, можно использовать белковую инженерию. Технологию рекомбинантных ДНК, известную специалистам в данной области, можно использовать для создания новых мутантных белков или "мутеинов", включающих единичные или множественные аминокислотные замены, делеции, вставки, или слитых белков. Такие модифицированные полипептиды могут демонстрировать, например, повышенную активность или увеличенную стабильность. Кроме того, их можно очищать с более высоким выходом и они показывают лучшую растворимость, чем соответствующий природный полипептид, по меньшей мере, в определенных условиях очистки и хранения.

Белки TACI, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут быть в форме мономеров или мультимеров (т.е. димеров, тримеров, тетрамеров и более высоких мультимеров). В конкретных вариантах осуществления полипептиды по этому изобретению представляют собой момеры, димеры, тримеры или тетрамеры. В дополнительных вариантах осуществления мультимеры по этому изобретению представляют собой, по меньшей мере, димеры, по меньшей мере, тримеры или, по меньшей мере, тетрамеры. Полагают, что определенные члены белков семейства TNF существуют в тримерной форме (Beutler and Huffel, *Science* 264:667, 1994; Banner et al., *Cell* 73:431, 1993). Таким образом, тримерные TACI могут обеспечивать преимущественную и повышенную биологическую активность.

В конкретных вариантах осуществления мультимеры могут представлять собой гомомеры или гетеромеры. Как используют в настоящем описании, термин гомомер относится к мультимеру, содержащему только белки TACI (включая фрагменты, варианты и слитые белки TACI, как описано в настоящем описании). Эти гомомеры могут содержать белки TACI, имеющие идентичные или отличающиеся полипептидные последовательности. В конкретном варианте осуществления гомомер представляет собой мультимер, содержащий только белки TACI, имеющие идентичную полипептидную последовательность. В другом конкретном варианте осуществления гомомер представляет собой мультимер, содержащий белки TACI, имеющие различные полипептидные последовательности.

Как используют в настоящем описании, термин гетеромер относится к мультимеру, содержащему гетерологичные белки (т.е. белки, содержащие только полипептидные последовательности, которые не соответствуют полипептидным последовательностям, кодируемым геном TACI) в дополнение к белкам TACI. Мультимеры, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут быть образованы в результате гидрофобных, гидрофильных, ионных и/или ковалентных связей и/или они могут быть непрямо связаны, например, посредством образования липосом. Таким образом, в одном варианте осуществления мультимеры, например, такие как гомодимеры, гомотримеры, гетеротримеры, гетеротетрамеры, образуются, когда белки контактируют друг с другом в растворе. В других вариантах осуществления мультимеры образуются посредством ковалентных связей с полипептидами TACI и/или между ними. Такие ковалентные связи могут вовлекать один или несколько аминокислотных остатков, находящихся в полипептидной последовательности белка. В одном примере ковалентные связи представляют собой поперечные связи между остатками цистеина, расположенными в полипептидных последовательностях, которые взаимодействуют в нативном (т.е. встречающемся в природе) полипептиде. В другом примере ковалентные связи являются следствием химического или рекомбинантного манипулирования.

Альтернативно, такие ковалентные связи могут вовлекать один или несколько аминокислотных остатков, содержащихся в гетерологичной полипептидной последовательности в слитом белке TACI. В одном примере ковалентные связи представляют собой связи с гетерологичной последовательностью, находящейся в слитом белке (см., например, патент США № 5478925, содержание которого включено в

настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). В конкретном примере ковалентные связи представляют собой связи с гетерологичной последовательностью, находящейся в слитом белке TACI-Fc (как описано в настоящем описании). В другом конкретном примере ковалентные связи в слитых белках представляют собой связи с гетерологичной полипептидной последовательностью из другого члена семейства лигандов/рецепторов TNF, который способен образовывать ковалентно связанные мультимеры, например, такой как остеопротегерин (см., например, международную публикацию WO 98/49305, содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). В другом варианте осуществления два или более полипептидов TACI связаны через синтетические линкеры (например, линкеры из пептидов, углеводов или растворимых полимеров). Их примеры включают пептидные линкеры, описанные в патенте США № 5073627 (включенном в настоящее описание в качестве ссылки). Белки, содержащие несколько полипептидов TACI, разделенных пептидными линкерами, можно получать с использованием общепринятой технологии рекомбинантных ДНК.

В конкретном варианте осуществления антитела, которые связываются с полипептидом TACI, полипептидным фрагментом, вариантом SEQ ID NO: 6 и/или полипептидным эпитопом TACI (как определяются способами иммунологического анализа для оценки специфичного связывания антитело-антиген, хорошо известными в данной области), можно использовать в способах по этому изобретению. Антитела против TACI и их фрагменты описаны, например, в публикациях PCT WO 04/011611, WO 01/087977, WO 01/60397 и WO 02/66516; публикациях патентов США US 2005043516 и US 2003012783; и Ch' en, et al., (2005) *Cell Immunol*, 236:78-85 и Liu, et al., (2003) *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 19:168-169. Все из упомянутых выше ссылок включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме. Антитела включают, но не ограничиваются ими, поликлональные, моноклональные, полиспецифичные, человеческие, гуманизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, Fab-фрагменты, F(ab')-фрагменты, фрагменты, продуцируемые экспрессирующей Fab библиотекой, антиидиотипические (anti-Id) антитела (включая, например, anti-Id антитела к антителам против TACI) и связывающие эпитоп фрагменты любого из указанных выше. Как используют в настоящем описании, термин "антитело" относится к молекулам иммуноглобулинов и иммунологически активным частям молекул иммуноглобулинов, т.е. к молекулам, которые содержат антигенсвязывающий участок, который иммуноспецифично связывает антиген. Молекулы иммуноглобулинов по этому изобретению могут представлять собой молекулы иммуноглобулинов любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса. В конкретных вариантах осуществления молекулы иммуноглобулинов представляют собой IgG1. В других конкретных вариантах осуществления молекулы иммуноглобулинов представляют собой IgG4.

Связывающие TACI фрагменты антител, которые можно использовать в способах по этому изобретению, включают, но не ограничиваются ими, Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечные антитела, связанные дисульфидной связью Fv (sdFv), и фрагменты, содержащие либо VL-, либо VH-домен. Антигенсвязывающие фрагменты антитела, включая одноцепочечные антитела, могут содержать вариабельный участок(участки) отдельно или в сочетании со всеми или частью из следующих: шарнирная область, CH1-, CH2- и CH3-домены. Также предусмотрены антигенсвязывающие фрагменты, также содержащие любое сочетание вариабельного участка(ов) с шарнирной областью, CH1-, CH2- и CH3-доменами. Антитела по происхождению могут быть из любого животного, включая птиц и млекопитающих. Предпочтительно антитела представляют собой антитела человека, мыши (например, мыши и крысы), ослы, овцы, кролика, козы, морской свинки, верблюда, лошади или курицы. Как используют в настоящем описании, "человеческие" антитела включают антитела, обладающие аминокислотной последовательностью иммуноглобулина человека, и включают антитела, выделенные из библиотек иммуноглобулинов человека или из животных, трансгенных по одному или нескольким иммуноглобулинам человека, и которые не экспрессируют эндогенные иммуноглобулины, как описано, например, в патенте США № 5939598, выданном Kucherlapati et al., содержание которого включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Антитела против TACI, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут быть моноспецифичными, биспецифичными, триспецифичными или более полиспецифичными. Полиспецифичные антитела могут быть специфичными к различным эпитопам полипептида TACI, или они могут быть специфичными как к полипептиду TACI, так и к гетерологичному эпитопу, такому как гетерологичный полипептид или материал твердой подложки. См., например, публикации PCT WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, et al., *J. Immunol.* 147:60-69 (1991); патенты США №№ 4474893; 4714681; 4925648; 5573920; 5601819; Kostelny et al., *J. Immunol.* 148:1547-1553 (1992), содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме.

Антитела против TACI можно описать или определить с точки зрения их перекрестной реактивности. Антитела, которые не связывают какой-либо другой аналог, ортолог или гомолог полипептида TACI, можно использовать в способах по этому изобретению. В конкретных вариантах осуществления антитела против TACI перекрестно реагируют с гомологами мыши, крысы и/или кролика для белков TACI человека и их соответствующими эпитопами. В конкретном варианте осуществления антитело против TACI, которое можно использовать в способах по этому изобретению, связывается не только с

TACI, но также оно связывается с BCMA и BAFF-R.

Антитела против TACI, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут быть описаны или определены с точки зрения их аффинности связывания с полипептидом TACI. Предпочтительная аффинность связывания включает аффинность связывания с константой диссоциации или K_D , меньшей или равной 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M или 10^{-12} M.

Антитела против TACI, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут действовать в качестве агонистов или антагонистов полипептидов TACI. Например, предусмотрены антитела против TACI, которые препятствуют взаимодействиям рецептор/лиганд с полипептидами TACI, либо частично, либо полностью. Также предусмотрены специфичные к рецептору антитела, которые не препятствуют связыванию лиганда, но препятствуют активации рецептора. Активацию рецептора (например, передачу сигнала) можно определять способами, описанными в настоящем описании или, в ином случае, известными в данной области. Например, активацию рецептора можно определять посредством детекции активации факторов транскрипции NF-AT, AP-1 и/или NF- κ B с использованием способов, известных в данной области, и/или фосфорилирования (например, тирозина или серина/треонина) рецептора или его субстрата посредством иммунопреципитации с последующим вестерн-блот анализом.

В конкретном варианте осуществления специфичные к рецептору антитела против TACI, которые препятствуют как связыванию лиганда, так и активации рецептора, а также антитела против TACI, которые распознают комплекс рецептор-лиганд и предпочтительно не распознают не связанный специфично рецептор или не связанный лиганд, можно использовать в способах по этому изобретению. Указанные выше антитела против TACI можно получать с использованием способов, известных в данной области. См., например, публикацию PCT WO 96/40281; патент США № 5811097; Deng et al., Blood 92 (6): 1981-1988 (1998); Chen et al., Cancer Res. 58(16): 3668-3678 (1998); Harrop et al., J. Immunol. 161(4): 1786-1794 (1998); Zhu et al., Cancer Res. 58(15): 3209-3214 (1998); Yoon et al., J. Immunol. 160(7): 3170-3179 (1998); Prat et al., J. Cell. Sci. 111(Pt2): 237-247 (1998); Pitard et al., J. Immunol. Methods 205 (2): 177-190 (1997); Liautard et al., Cytokine 9(4): 233-241 (1997); Carlson et al., J. Biol. Chem. 272 (17): 11295-11301 (1997); Taryman et al., Neuron 14(4): 755-762 (1995); Muller et al., Structure 6 (9): 1153-1167 (1998); Bartunek et al., Cytokine 8(1): 14-20 (1996) (которые включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме).

Е. Рецептор для нейтрокина-альфа, BCMA.

Полипептиды BCMA, такие как полипептиды, описанные ниже, действуют в качестве антагонистов нейтрокина-альфа и/или APRIL и их также можно использовать в способах по настоящему изобретению. BCMA, также известный как TR18, представляет собой белок из 184 аминокислотных остатков (SEQ ID NO: 8) с вычисленной молекулярной массой приблизительно 20,1 кДа. Нуклеотидная последовательность кДНК, которая кодирует BCMA, представлена в SEQ ID NO: 7. Предсказанные аминокислоты от приблизительно 1 до приблизительно 54 составляют внеклеточный домен (SEQ ID NO: 8); аминокислоты от приблизительно 55 до приблизительно 80 составляют трансмембранный домен (SEQ ID NO: 8); и аминокислоты от приблизительно 81 до приблизительно 184 составляют внутриклеточный домен (SEQ ID NO: 8).

Таким образом, в одном варианте осуществления белок BCMA, который можно использовать в способах по настоящему изобретению, представляет собой выделенный полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или альтернативно состоящий из нее, или полипептид, содержащий часть SEQ ID NO: 8, например, такую как внеклеточный домен BCMA (содержащий аминокислоты с 1 по 54 SEQ ID NO: 8) и/или богатый цистеином домен BCMA (содержащий аминокислоты с 8 по 41 SEQ ID NO: 8), или альтернативно состоящий из нее; а также полипептиды, которые по меньшей мере на 80% идентичны, более предпочтительно по меньшей мере на 90 или 95% идентичны, более предпочтительно по меньшей мере на 96, 97, 98, 99 или 100% идентичны полипептидам, описанным выше.

Под полипептидом, имеющим аминокислотную последовательность, по меньшей мере, например, на 95% "идентичную" эталонной аминокислотной последовательности полипептида BCMA, подразумевают, что аминокислотная последовательность полипептида является идентичной эталонной последовательности, за исключением того, что полипептидная последовательность может включать вплоть до пяти изменений аминокислот на каждые 100 аминокислот эталонной аминокислотной последовательности рецептора BCMA. Иными словами, для получения полипептида, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную эталонной аминокислотной последовательности, вплоть до 5% аминокислотных остатков в эталонной последовательности могут быть удалены или заменены другими аминокислотами, или в эталонную последовательность может быть встроено количество аминокислот, составляющее вплоть до 5% от общего количества аминокислотных остатков в эталонной последовательности. Эти изменения контрольной последовательности могут встречаться на N- или C-концевых положениях эталонной аминокислотной последовательности или в любом положении между этими концевыми положениями, встроенные либо отдельно среди остатков в эталонной последовательности, либо в виде одной или нескольких соседних групп в эталонной последовательности.

Полипептидные фрагменты BCMA включают полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность

довательность, содержащуюся в SEQ ID NO: 8, или альтернативно состоящие из нее. Полипептидные фрагменты могут быть "свободными" или находящимися в более крупном полипептиде, в котором фрагмент формирует часть или участок, наиболее предпочтительно в качестве отдельного непрерывного участка. В дополнительных вариантах осуществления полипептидные фрагменты содержат один или несколько доменов ВСМА или альтернативно состоят из них. Предпочтительные полипептидные фрагменты включают компонент, выбранный из группы: (а) полипептид, содержащий внеклеточный домен ВСМА (для которого предсказано, что он состоит из аминокислотных остатков от приблизительно 1 до приблизительно 54 SEQ ID NO: 8) или альтернативно состоящий из него; (б) полипептид, содержащий богатый цистеином домен ВСМА (для которого предсказано, что он состоит из аминокислотных остатков от приблизительно 8 до приблизительно 41 SEQ ID NO: 8) или альтернативно состоящий из него; (с) полипептид, содержащий трансмембранный домен ВСМА (для которого предсказано, что он состоит из аминокислотных остатков от приблизительно 55 до приблизительно 80 SEQ ID NO: 8) или альтернативно состоящий из него; (d) полипептид, содержащий внутриклеточный домен ВСМА (для которого предсказано, что он состоит из аминокислотных остатков от приблизительно 81 до приблизительно 184 SEQ ID NO: 8) или альтернативно состоящий из него; или (е) любое сочетание полипептидов (а)-(d).

Полагают, что внеклеточный богатый цистеином мотив ВСМА является важными для взаимодействия между ВСМА и его лигандами, нейтрокином-альфа и APRIL. Таким образом, в предпочтительных вариантах осуществления полипептидные фрагменты ВСМА, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержат аминокислотные остатки с 8 по 41 SEQ ID NO: 8 или альтернативно состоят из них. Также являются предпочтительными белки, содержащие полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична полипептидным последовательностям одного или нескольких из этих богатых цистеином мотивов, или альтернативно состоящие из них.

Другие фрагменты белка ВСМА, которые можно использовать в способах по этому изобретению, представляют собой фрагменты, характеризующиеся структурными или функциональными признаками ВСМА. Такие фрагменты включают аминокислотные остатки, которые содержат альфа-спираль и образующие альфа-спираль участки ("альфа-участки"), бета-слой и образующие бета-слой участки ("бета-участки"), поворот и образующие поворот участки ("участки поворота"), виток и образующие виток участки ("участки витка"), гидрофильные участки, гидрофобные участки, альфа-амфипатические участки, бета-амфипатические участки, формирующие поверхность участки, и участки с высоким антигенным индексом (т.е. содержащие четыре или более соседних аминокислоты, имеющие антигенный индекс, превышающий или равный 1,5, как определяют посредством программы Jameson-Wolf с использованием параметров по умолчанию) полного (т.е. полноразмерного) ВСМА (SEQ ID NO: 8), как рассмотрено в патентной заявке США № 10/786176. Определенные предпочтительные участки включают, но не ограничиваются ими, альфа-участки, бета-участки, участки поворота и участки витка, предсказанные Garnier-Robson; альфа-участки, бета-участки и участки поворота, предсказанные Chou-Fasman; гидрофильные участки, предсказанные Kyte-Doolittle; гидрофобные участки, предсказанные Hopp-Woods; альфа- и бета-амфипатические участки Eisenberg; формирующие поверхность участки Emini и участки с высоким антигенным индексом Jameson-Wolf, как предсказывают с использованием параметров по умолчанию этой компьютерной программы.

Полипептид ВСМА для применения в способах по этому изобретению можно экспрессировать в модифицированной форме, такой как слитый белок (содержащий полипептид, связанный пептидной связью с гетерологичной белковой последовательностью (другого белка)), и он может включать не только сигналы для секреции, но также дополнительные гетерологичные функциональные участки. Альтернативно, такой слитый белок можно получать способами синтеза белков, например, с использованием устройства для синтеза пептидов. Таким образом, например, участок дополнительных аминокислот, в частности заряженных аминокислот, можно присоединять к N-концу полипептида для повышения стабильности и устойчивости в клетке-хозяине в ходе очистки или в ходе последующей обработки и хранения. Также к полипептиду можно присоединять пептидные группы для упрощения очистки. Такие участки можно удалять перед окончательным получением полипептида. Присоединение пептидных групп к полипептидам для обеспечения секреции и выделения, для повышения стабильности и упрощения очистки, среди прочих, является известным и общепринятым способом в данной области.

Предпочтительный белок для слияния с ВСМА, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит гетерологичный участок из иммуноглобулина, который является пригодным для растворения белков. Например, в EP-A-0464533 (канадский эквивалент 2045869) и WO 00/02 4782 описаны слитые белки, содержащие различные фрагменты константного участка молекул иммуноглобулинов совместно с другим белком человека или его частью. Слитые белки ВСМА и иммуноглобулина описаны, например, в публикациях PCT WO 01/087977, WO 01/60397 и WO 01/24811 и Gross, et al., (2000) Nature 404:995-999, Thompson, et al., (2000) J. Exp. Med. 192:129-135 и Yu, et al., (2000) Nat Immunol. 1:252-256, включенных в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме. Во многих случаях Fc-часть в слитом белке является высокопреимуществом для применения в целях терапии и диагностики и, таким образом, приводит, например, к улучшенным фармакокинетическим свойствам (EP-A 0232262). С

другой стороны, для некоторых способов применения может быть желательной возможность удаления Fc-части после экспрессии, детекции и очистки слитого белка описанным преимущественным способом. Это желательно в случае, когда оказывается, что Fc-часть препятствует применению в целях лечения и диагностики, например, когда слитый белок подлежит применению в качестве антигена для иммунизации. При разработке лекарственных средств, например, белки человека, такие как hIL-5, подвергали слиянию с Fc-участками в целях высокопроизводительных скрининговых анализов для идентификации антагонистов hIL-5. См., D. Bennett et al., *Journal of Molecular Recognition* 8:52-58 (1995) и K. Johanson et al., *The Journal of Biological Chemistry* 270:9459-9471 (1995).

Как поймет специалист в данной области и как рассмотрено выше, полипептиды ВСМА можно подвергать слиянию с последовательностями других полипептидов. Например, полипептиды ВСМА можно подвергать слиянию с константным доменом иммуноглобулинов (IgA, IgE, IgG, IgM) или их частями (CH1, CH2, CH3 или любым их сочетанием и их частями), или альбумином (включая, но не ограничиваясь ими, рекомбинантный альбумин человека или его фрагменты или варианты (см., например, патент США № 5876969, выданный 2 марта 1999 г., патент EP 0413622 и патент США № 5766883, выданный 16 июня 1998 г., включенные в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме)), с получением в результате химерных полипептидов.

Такие слитые белки могут упрощать очистку, могут продлевать срок хранения и могут повышать время полужизни *in vivo*. Это было показано для химерных белков, состоящих из первых двух доменов CD4-полипептида человека и различных доменов константных участков тяжелой или легкой цепи иммуноглобулинов млекопитающих. См., например, EP 394827; Traunecker et al., *Nature*, 331: 84-86 (1988). Повышенная доставка антигена через эпителиальный барьер в иммунную систему была показана для антигенов (например, инсулина), конъюгированных с партнером для связывания FcRn, таким как IgG или Fc-фрагменты (см., например, публикации PCT WO 96/22024 и WO 99/04813). Также было показано, что слитые белки IgG, которые обладают связанной дисульфидными связями димерной структурой вследствие дисульфидных связей IgG-части, являются более эффективными в отношении связывания и нейтрализации других молекул, чем мономерные полипептиды или их фрагменты отдельно. См., например, Fountoulakis et al., *J. Biochem.*, 270:3958-3964 (1995).

Слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержит, по меньшей мере, фрагмент или вариант полипептида ВСМА и, по меньшей мере, фрагмент или вариант сывороточного альбумина человека, которые связаны друг с другом предпочтительно генетическим слиянием (т.е. слитый белок альбумина получают трансляцией нуклеиновой кислоты, в которой полинуклеотид, кодирующий весь ВСМА или его часть, связывают в рамке считывания с полинуклеотидом, кодирующим весь альбумин или его часть) или химической конъюгацией друг с другом. Полипептид ВСМА и белок альбумина, являющиеся частью слитого белка альбумина, могут быть обозначены как "часть", "участок" или "группа" слитого белка альбумина (например, "часть ВСМА" или "часть белка альбумина").

В одном варианте осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит полипептид ВСМА и белок сывороточного альбумина или альтернативно состоит из них. В других вариантах осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит фрагмент ВСМА и белок сывороточного альбумина или альтернативно состоит из них. В других вариантах осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит вариант ВСМА и белок сывороточного альбумина или альтернативно состоит из них. В предпочтительных вариантах осуществления компонент белка сывороточного альбумина в слитом белке альбумина представляет собой зрелую часть сывороточного альбумина.

В следующих вариантах осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит полипептид ВСМА и биологически активный и/или терапевтически активный фрагмент сывороточного альбумина или альтернативно состоит из них. В следующих вариантах осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит полипептид ВСМА и биологически активный и/или терапевтически активный вариант сывороточного альбумина или альтернативно состоит из них. В предпочтительных вариантах осуществления часть ВСМА в слитом белке альбумина представляет собой полноразмерный полипептид ВСМА. В следующем предпочтительном варианте осуществления часть белка ВСМА в слитом белке альбумина представляет собой зрелый растворимый домен полипептида ВСМА.

В следующих вариантах осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит фрагмент или вариант ВСМА и биологически активный и/или терапевтически активный фрагмент или вариант сывороточного альбумина или альтернативно состоит из них. В предпочтительных вариантах осуществления это изобретение относится к слитому белку альбумина, содержащему зрелую часть полипептида ВСМА и зрелую часть сывороточного альбумина.

В следующих вариантах осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит фрагмент или вариант ВСМА и биологически активный и/или терапевтически активный фрагмент или вариант сывороточного альбумина или альтернативно состоит из

них. В предпочтительных вариантах осуществления это изобретение относится к слитому белку альбумина, содержащему зрелую часть полипептида ВСМА и зрелую часть сывороточного альбумина (включая, но не ограничиваясь ими, рекомбинантный сывороточный альбумин человека или его фрагменты или варианты (см., например, патент США № 5876969, выданный 2 марта 1999 г., патент EP 0413622 и патент США № 5766883, выданный 16 июня 1998 г., включенные в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме)), или альтернативно состоящему из них. В предпочтительном варианте осуществления полипептиды ВСМА (включая их фрагменты или варианты) являются слитыми со зрелой формой сывороточного альбумина человека (т.е. аминокислотами 1-585 сывороточного альбумина человека, как показано на фиг. 1 и 2 патента EP 0322094, который включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). В другом предпочтительном варианте осуществления антитела по настоящему изобретению (включая их фрагменты или варианты) являются слитыми с полипептидными фрагментами, содержащими аминокислотные остатки 1-х сывороточного альбумина человека, где х представляет собой целое число от 1 до 585 и фрагмент альбумина обладает активностью сывороточного альбумина человека, или альтернативно состоящими из них. В другом предпочтительном варианте осуществления полипептиды ВСМА (включая их фрагменты или варианты) являются слитыми с полипептидными фрагментами, содержащими аминокислотные остатки 1-z сывороточного альбумина человека, где z представляет собой целое число от 369 до 419, как описано в патенте США 5766883, включенном в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме, или альтернативно состоящими из них. Полипептиды ВСМА (включая их фрагменты или варианты) могут быть слитыми либо с N-, либо с C-концом гетерологичного белка (например, Fc-полипептида иммуноглобулина или полипептида сывороточного альбумина человека).

В предпочтительных вариантах осуществления белок сывороточного альбумина человека, используемый в слитых белках альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит один или оба из следующих наборов точковых мутаций относительно SEQ ID NO: 11: Leu-407 на Ala, Leu-408 на Val, Val-409 на Ala и Arg-410 на Ala или Arg-410 на A, Lys-413 на Gln и Lys-414 на Gln (см., например, международную публикацию WO 95/23857, включенную в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). В более предпочтительных вариантах осуществления слитые белки альбумина, которые можно использовать в способах по этому изобретению, которые содержат один или оба из описанных выше наборов точковых мутаций, обладают повышенной стабильностью/устойчивостью к протеолитическому расщеплению посредством YарЗр дрожжей, что обеспечивает повышенную продукцию рекомбинантных слитых белков альбумина, экспрессируемых в дрожжевых клетках-хозяевах.

Предпочтительно слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит НА в качестве N-концевой части и полипептид ВСМА в качестве C-концевой части. Альтернативно также можно использовать слитый белок альбумина, содержащий НА в качестве C-концевой части и полипептид ВСМА в качестве N-концевой части.

В других вариантах осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, имеет полипептид ВСМА, слитый как с N-концом, так и с C-концом альбумина. В конкретном варианте осуществления полипептиды ВСМА, слитые с N- и C-концами, являются одинаковыми. В другом варианте осуществления полипептиды ВСМА, слитые с N- и C-концами, представляют собой разные полипептиды ВСМА. В другом варианте осуществления полипептид ВСМА является слитым либо с N-, либо с C-концом альбумина, а с другим концом слит гетерологичный полипептид.

Кроме того, слитые белки альбумина, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут включать линкерный пептид между слитыми частями для обеспечения большего физического разделения между группами. Линкерный пептид может состоять из таких аминокислот, чтобы он был более гибким или более жестким.

Как правило, слитые белки альбумина, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут иметь один образованный из НА участок и один участок ВСМА. Однако для получения слитого белка альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, можно использовать несколько участков каждого белка. Аналогично, для получения слитого белка альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, можно использовать более одного белка. Например, белок может быть слитым как с N-, так и с C-концом НА. В такой конфигурации части белка могут представлять собой одинаковые или различные белковые молекулы. Структуру бифункциональных слитых белков альбумина можно представить как X-НА-Y или Y-НА-X.

В конкретном варианте осуществления белок ВСМА или его фрагмент или вариант, который можно использовать в способах по этому изобретению, может быть конъюгирован с цитотоксином (например, цитостатическим или цитотоксическим средством). Цитотоксин или цитотоксическое средство включает любое средство, которое является вредным для клеток. Их примеры включают паклитаксол, цитохалазин В, грамицидин D, бромид этидия, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, татракаин, лидокаин, пропранолол и пуромидин и их аналоги или гомологи.

В другом варианте осуществления белок ВСМА или его фрагмент или вариант, который можно использовать в способах по этому изобретению, может быть конъюгирован с токсином.

Под "токсином" подразумевают одно или несколько соединений, которые связывают и активируют эндогенные цитотоксические эффекторные системы, радиоизотопы, голотоксины, модифицированные токсины, каталитические субъединицы токсинов, или любые молекулы или ферменты, в норме не представленные в клетке или на поверхности клетки, которые при определенных условиях вызывают гибель клетки. Токсины, которые можно использовать, включают, но не ограничиваются ими, радиоизотопы, известные в данной области, соединения, например, такие как антитела (или обладающие фиксацией комплемента их участки), которые связывают врожденную или индуцируемую эндогенную цитотоксическую эффекторную систему, тимидинкиназа, эндонуклеаза, РНКаза, альфа-токсин, рицин, абрин, экзотоксин А *Pseudomonas*, дифтерийный токсин, сапорин, момордин, гелонин, противовирусный белок лаконоса, альфа-сарцин и холерный токсин. "Токсин" также включает цитостатическое или цитоцидное средство, лекарственное средство или ион радиоактивного металла, например альфа-эмиттеры, например, такие как ^{213}Bi , или другие радиоизотопы, например, такие как ^{103}Pd , ^{133}Xe , ^{131}I , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{35}S , ^{90}Y , ^{153}Sm , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn , $^{90}\text{Иттрий}$, $^{117}\text{Олово}$, $^{186}\text{Рений}$, $^{166}\text{Гольмий}$ и $^{188}\text{Рений}$.

Для улучшения или изменения свойств полипептидов ВСМА, которые можно использовать в способах по этому изобретению, можно использовать белковую инженерию. Технологию рекомбинантных ДНК, известную специалистам в данной области, можно использовать для создания новых мутантных белков или "мутеинов", включающих единичные или множественные аминокислотные замены, делеции, вставки, или слитых белков. Такие модифицированные полипептиды могут демонстрировать, например, повышенную активность или увеличенную стабильность. Кроме того, их можно очищать с более высоким выходом и они показывают лучшую растворимость, чем соответствующий природный полипептид, по меньшей мере, в определенных условиях очистки и хранения. В другом варианте осуществления мутантная форма полипептида ВСМА может быть "доминантно негативной". Для этого в целях снижения активности ВСМА можно использовать дефектные полипептиды ВСМА, например, такие как мутантные формы, лишённые всего TNF-консервативного домена или его части.

Нефункциональные полипептиды ВСМА будут собираться с образованием рецептора (например, мультимера), который может обладать способностью к связыванию, но который не способен индуцировать передачу сигнала.

Белки ВСМА, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут быть в форме мономеров или мультимеров (т.е. димеров, тримеров, тетрамеров и более высоких мультимеров). В конкретных вариантах осуществления полипептиды по этому изобретению представляют собой момеры, димеры, тримеры или тетрамеры. В дополнительных вариантах осуществления мультимеры по этому изобретению представляют собой, по меньшей мере, димеры, по меньшей мере, тримеры или, по меньшей мере, тетрамеры. Полагают, что определенные члены белков семейства TNF существуют в тримерной форме (Beutler and Huffel, Science 264:667, 1994; Banner et al., Cell 73:431, 1993). Таким образом, тримерные ВСМА могут обеспечивать преимущественную и повышенную биологическую активность.

В конкретных вариантах осуществления мультимеры могут представлять собой гомомеры или гетеромеры. Как используют в настоящем описании, термин гомомер относится к мультимеру, содержащему только белки ВСМА (включая фрагменты, варианты и слитые белки ВСМА, как описано в настоящем описании). Эти гомомеры могут содержать белки ВСМА, имеющие идентичные или отличающиеся полипептидные последовательности. В конкретном варианте осуществления гомомер представляет собой мультимер, содержащий только белки ВСМА, имеющие идентичную полипептидную последовательность. В другом конкретном варианте осуществления гомомер представляет собой мультимер, содержащий белки ВСМА, имеющие различные полипептидные последовательности.

Как используют в настоящем описании, термин гетеромер относится к мультимеру, содержащему гетерологичные белки (т.е. белки, содержащие только полипептидные последовательности, которые не соответствуют полипептидным последовательностям, кодируемым геном ВСМА) в дополнение к белкам ВСМА. Мультимеры, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут быть образованы в результате гидрофобных, гидрофильных, ионных и/или ковалентных связей и/или они могут быть непрямо связаны, например, посредством образования липосом. Таким образом, в одном варианте осуществления мультимеры, например, такие как гомодимеры, гомотримеры, гетеротримеры или гетеротетрамеры, образуются, когда полипептиды контактируют друг с другом в растворе. В других вариантах осуществления мультимеры образуются посредством ковалентных связей с полипептидами ВСМА и/или между ними. Такие ковалентные связи могут вовлекать один или несколько аминокислотных остатков, находящихся в полипептидной последовательности белка. В одном примере ковалентные связи представляют собой поперечные связи между остатками цистеина, расположенными в полипептидных последовательностях, которые взаимодействуют в нативном (т.е. встречающемся в природе) полипептиде. В другом примере ковалентные связи являются следствием химического или рекомбинантного манипулирования.

Альтернативно, такие ковалентные связи могут вовлекать один или несколько аминокислотных остатков, содержащихся в гетерологичной полипептидной последовательности в слитом белке ВСМА. В

одном примере ковалентные связи представляют собой связи с гетерологичной последовательностью, находящейся в слитом белке (см., например, патент США № 5478925, содержание которого включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). В конкретном примере ковалентные связи представляют собой связи с гетерологичной последовательностью, находящейся в слитом белке ВСМА-Fc (как описано в настоящем описании). В другом конкретном примере ковалентные связи в слитых белках представляют собой связи с гетерологичной полипептидной последовательностью из другого члена семейства лигандов/рецепторов TNF, который способен образовывать ковалентно связанные мультимеры, например, такой как остеопротегерин (см., например, международную публикацию WO 98/49305, содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). В другом варианте осуществления два или более полипептидов ВСМА связаны через синтетические линкеры (например, линкеры из пептидов, углеводов или растворимых полимеров). Их примеры включают пептидные линкеры, описанные в патенте США № 5073627 (включенном в настоящее описание в качестве ссылки). Белки, содержащие несколько полипептидов ВСМА, разделенных пептидными линкерами, можно получать с использованием общепринятой технологии рекомбинантных ДНК.

В конкретном варианте осуществления антитела, которые связываются с полипептидом ВСМА, полипептидным фрагментом, вариантом SEQ ID NO: 8 и/или полипептидным эпитопом ВСМА (как определяют способами иммунологического анализа для оценки специфичного связывания антитело-антиген, хорошо известными в данной области), можно использовать в способах по этому изобретению. Антитела против ВСМА и их фрагменты описаны, например, в публикациях PCT WO 01/087977, WO 01/60397 и WO 02/66516; и Ch' en, et al., (2005) Cell Immunol 236: 78-85. Все из упомянутых выше ссылок включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме. Антитела включают, но не ограничиваются ими, поликлональные, моноклональные, полиспецифичные, человеческие, гуманизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, Fab-фрагменты, F(ab')-фрагменты, фрагменты, продуцируемые экспрессирующей Fab библиотекой, антиидиотипические (anti-Id) антитела (включая, например, anti-Id антитела к антителам против ВСМА), и связывающие эпитоп фрагменты любого из указанных выше. Как используют в настоящем описании, термин "антитело" относится к молекулам иммуноглобулинов и иммунологически активным частям молекул иммуноглобулинов, т.е. к молекулам, которые содержат антигенсвязывающий участок, который иммуноспецифично связывает антиген. Молекулы иммуноглобулинов по этому изобретению могут представлять собой молекулы иммуноглобулинов любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса. В конкретных вариантах осуществления молекулы иммуноглобулинов представляют собой IgG1. В других конкретных вариантах осуществления молекулы иммуноглобулинов представляют собой IgG4.

Связывающие ВСМА фрагменты антител, которые можно использовать в способах по этому изобретению, включают, но не ограничиваются ими, Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd, одноцепочечные Fv(scFv), одноцепочечные антитела, связанные дисульфидной связью Fv(sdFv) и фрагменты, содержащие либо VL-, либо VH-домен. Антигенсвязывающие фрагменты антитела, включая одноцепочечные антитела, могут содержать переменный участок(участки) отдельно или в сочетании со всеми или частью из следующих: шарнирная область, CH1-, CH2- и CH3-домены. Также предусмотрены антигенсвязывающие фрагменты, также содержащие любое сочетание переменного участка(ов) с шарнирной областью, CH1-, CH2- и CH3-доменами. Антитела по происхождению могут быть из любого животного, включая птиц и млекопитающих. Предпочтительно антитела представляют собой антитела человека, мыши (например, мыши и крысы), осла, овцы, кролика, козы, морской свинки, верблюда, лошади или курицы. Как используют в настоящем описании, "человеческие" антитела включают антитела, обладающие аминокислотной последовательностью иммуноглобулина человека, и включают антитела, выделенные из библиотек иммуноглобулинов человека или из животных, трансгенных по одному или нескольким иммуноглобулинам человека и которые не экспрессируют эндогенные иммуноглобулины, как описано, например, в патенте США № 5939598, выданном Kucherlapati et al., содержание которого включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Антитела против ВСМА, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут быть моноспецифичными, биспецифичными, триспецифичными или более полиспецифичными. Полиспецифичные антитела могут быть специфичными к различным эпитопам полипептида ВСМА или они могут быть специфичными как к полипептиду ВСМА, так и к гетерологичному эпитопу, такому как гетерологичный полипептид или материал твердой подложки. См., например, публикации PCT WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, et al., J. Immunol. 147:60-69 (1991); патенты США № 4474893; 4714681; 4925648; 5573920; 5601819; Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-1553 (1992), содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме.

Антитела против ВСМА можно описать или определить с точки зрения их перекрестной реактивности. Антитела, которые не связывают какой-либо другой аналог, ортолог или гомолог полипептида ВСМА, можно использовать в способах по этому изобретению. В конкретных вариантах осуществления антитела против ВСМА перекрестно реагируют с гомологами мыши, крысы и/или кролика для белков ВСМА человека и их соответствующими эпитопами. В конкретном варианте осуществления антитело

против ВСМА, которое можно использовать в способах по этому изобретению, связывается не только с ВСМА, но также оно связывается с TACI и BAFF-R.

Антитела против ВСМА, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут быть описаны или определены с точки зрения их аффинности связывания с полипептидом ВСМА. Предпочтительная аффинность связывания включает аффинность связывания с константой диссоциации или K_D , меньшей или равной 5×10^{-9} М, 10^{-9} М, 5×10^{-10} М, 10^{-10} М, 5×10^{-11} М, 10^{-11} М, 5×10^{-12} М или 10^{-12} М.

Антитела против ВСМА, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут действовать в качестве агонистов или антагонистов полипептидов ВСМА. Например, предусмотрены антитела против ВСМА, которые препятствуют взаимодействиям рецептор/лиганд с полипептидами ВСМА, либо частично, либо полностью. Также предусмотрены специфичные к рецептору антитела, которые не препятствуют связыванию лиганда, но препятствуют активации рецептора. Активацию рецептора (например, передачу сигнала) можно определять способами, описанными в настоящем описании или, в ином случае, известными в данной области. Например, активацию рецептора можно определять посредством детекции активации факторов транскрипции NF-AT, AP-1 и/или NF- κ B с использованием способов, известных в данной области, и/или фосфорилирования (например, тирозина или серина/треонина) рецептора или его субстрата посредством иммунопреципитации с последующим вестерн-блот анализом.

В конкретном варианте осуществления специфичные к рецептору антитела против ВСМА, которые препятствуют как связыванию лиганда, так и активации рецептора, а также антитела против ВСМА, которые распознают комплекс рецептор-лиганд и предпочтительно не распознают не связанный специфично рецептор или не связанный лиганд, можно использовать в способах по этому изобретению. Указанные выше антитела против ВСМА можно получать с использованием способов, известных в данной области. См., например, публикацию PCT WO 96/40281; патент США № 5811097; Deng et al., Blood 92(6):1981-1988 (1998); Chen et al., Cancer Res. 58 (16): 3668-3678 (1998); Harrop et al., J. Immunol. 161(4): 1786-1794 (1998); Zhu et al., Cancer Res. 58(15): 3209-3214 (1998); Yoon et al., J. Immunol. 160 (7): 3170-3179 (1998); Prat et al., J. Cell. Sci. 111(Pt2): 237-247 (1998); Pitard et al., J. Immunol. Methods 205 (2):177-190 (1997); Liautard et al., Cytokine 9(4): 233-241 (1997); Carlson et al., J. Biol. Chem. 272(17): 11295-11301 (1997); Taryman et al., Neuron 14 (4): 755-762 (1995); Muller et al., Structure 6 (9): 1153-1167 (1998); Bartunek et al., Cytokine 8(1): 14-20 (1996) (которые включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме).

Г. Рецептор для нейтрокина-альфа, BAFF-R.

Полипептиды BAFF-R, такие как полипептиды, описанные ниже, действуют в качестве антагонистов нейтрокина-альфа и/или APRIL и их также можно использовать в способах по настоящему изобретению. BAFF-R, также известный как TR21, представляет собой белок из 184 аминокислотных остатков (SEQ ID NO: 10) с вычисленной молекулярной массой приблизительно 18,9 кДа. Нуклеотидная последовательность кДНК, которая кодирует BAFF-R представлена в SEQ ID NO: 9. Предсказанные аминокислоты от приблизительно 1 до приблизительно 81 составляют внеклеточный домен (SEQ ID NO: 10); аминокислоты от приблизительно 82 до приблизительно 101 составляют трансмембранный домен (SEQ ID NO: 10); и аминокислоты от приблизительно 102 до приблизительно 184 составляют внутриклеточный домен (SEQ ID NO: 10).

Таким образом, в одном варианте осуществления белок BAFF-R, который можно использовать в способах по настоящему изобретению, представляет собой выделенный полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или альтернативно состоящий из нее, или полипептид, содержащий часть SEQ ID NO:10, например, такую как внеклеточный домен BAFF-R (содержащий аминокислоты с 1 по 81 SEQ ID NO: 10) и/или богатый цистеином домен BAFF-R (содержащий аминокислоты с 19 по 35 SEQ ID NO: 10) или альтернативно состоящий из них; а также полипептиды, которые по меньшей мере на 80% идентичны, более предпочтительно по меньшей мере на 90 или 95% идентичны, более предпочтительно по меньшей мере на 96, 97, 98, 99 или 100% идентичны полипептидам, описанным выше.

В другом варианте осуществления белок BAFF-R, который можно использовать в способах по настоящему изобретению, представляет собой выделенный полипептид, содержащий аминокислоты с 1 по 70 SEQ ID NO: 10 и/или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26. В SEQ ID NO: 26 представлены аминокислоты 1-70 BAFF-R, где аминокислота 20 (валин) в BAFF-R замещена аспарагином и аминокислота 27 (лейцин) в BAFF-R замещена пролином. В другом варианте осуществления белок BAFF-R, который можно использовать в способах по настоящему изобретению, представляет собой выделенный полипептид, содержащий аминокислоты с 2 по 70 SEQ ID NO: 26. Полипептиды, которые по меньшей мере на 80% идентичны, более предпочтительно по меньшей мере на 90 или 95% идентичны, более предпочтительно по меньшей мере на 96, 97, 98, 99 или 100% идентичны полипептидам, описанным выше, также можно использовать в способах по настоящему изобретению.

Под полипептидом, имеющим аминокислотную последовательность, по меньшей мере, например, на 95% "идентичную" эталонной аминокислотной последовательности полипептида BAFF-R, подразумевают, что аминокислотная последовательность полипептида является идентичной эталонной последова-

тельности, за исключением того, что полипептидная последовательность может включать вплоть до пяти изменений аминокислот на каждые 100 аминокислот эталонной аминокислотной последовательности рецептора BAFF-R. Иными словами, для получения полипептида, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную эталонной аминокислотной последовательности, вплоть до 5% аминокислотных остатков в эталонной последовательности могут быть удалены или заменены другими аминокислотами, или количество аминокислот, составляющее вплоть до 5% от общего количества аминокислотных остатков в эталонной последовательности, может быть встроено в эталонную последовательность. Эти изменения контрольной последовательности могут встречаться на N- или C-концевых положениях эталонной аминокислотной последовательности или в любом положении между этими концевыми положениями, встроенные либо отдельно среди остатков в эталонной последовательности, либо в виде одной или нескольких соседних групп в эталонной последовательности.

Полипептидные фрагменты BAFF-R включают полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность, содержащуюся в SEQ ID NO: 10 или альтернативно состоящие из нее. Полипептидные фрагменты могут быть "свободными" или находящимися в более крупном полипептиде, в котором фрагмент формирует часть или участок, наиболее предпочтительно в качестве отдельного непрерывного участка. В дополнительных вариантах осуществления полипептидные фрагменты содержат один или несколько доменов BAFF-R или альтернативно состоят из них. Предпочтительные полипептидные фрагменты включают член, выбранный из группы: (a) полипептид, содержащий внеклеточный домен BAFF-R (для которого предсказано, что он состоит из аминокислотных остатков от приблизительно 1 до приблизительно 81 SEQ ID NO: 10) или альтернативно состоящий из него; (b) полипептид, содержащий богатый цистеином домен BAFF-R (для которого предсказано, что он состоит из аминокислотных остатков от приблизительно 19 до приблизительно 35 SEQ ID NO: 10) или альтернативно состоящий из него; (c) полипептид, содержащий трансмембранный домен BAFF-R (для которого предсказано, что он состоит из аминокислотных остатков от приблизительно 82 до приблизительно 101 SEQ ID NO: 10) или альтернативно состоящий из него; (d) полипептид, содержащий внутриклеточный домен BAFF-R (для которого предсказано, что он состоит из аминокислотных остатков от приблизительно 102 до приблизительно 184 SEQ ID NO: 10) или альтернативно состоящий из него; или (e) любое сочетание полипептидов (a)-(d).

Полагают, что внеклеточный богатый цистеином мотив BAFF-R является важным для взаимодействия между BAFF-R и его лигандами, нейтрокином-альфа и APRIL. Таким образом, в предпочтительных вариантах осуществления полипептидные фрагменты BAFF-R, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержат аминокислотные остатки с 19 по 35 SEQ ID NO: 10 или альтернативно состоят из них. Также являются предпочтительными белки, содержащие полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична полипептидным последовательностям одного или нескольких из этих богатых цистеином мотивов, или альтернативно состоящие из них.

Другие фрагменты белка BAFF-R, которые можно использовать в способах по этому изобретению, представляют собой фрагменты, характеризующиеся структурными или функциональными признаками BAFF-R. Такие фрагменты включают аминокислотные остатки, которые содержат альфа-спираль и образующие альфа-спираль участки ("альфа-участки"), бета-слой и образующие бета-слой участки ("бета-участки"), поворот и образующие поворот участки ("участки поворота"), виток и образующие виток участки ("участки витка"), гидрофильные участки, гидрофобные участки, альфа-амфипатические участки, бета-амфипатические участки, формирующие поверхность участки и участки с высоким антигенным индексом (т.е. содержащие четыре или более соседних аминокислот, имеющих антигенный индекс, превышающий или равный 1,5, как определяют посредством программы Jameson-Wolf с использованием параметров по умолчанию) полного (т.е. полноразмерного) BAFF-R (SEQ ID NO: 10), как рассмотрено в патенте США № 7112410. Определенные предпочтительные участки включают, но не ограничиваются ими, альфа-участки, бета-участки, участки поворота и участки витка, предсказанные Garnier-Robson; альфа-участки, бета-участки и участки поворота, предсказанные Chou-Fasman; гидрофильные участки, предсказанные Kyte-Doolittle; гидрофобные участки, предсказанные Norpp-Woods; альфа и бета-амфипатические участки Eisenberg; формирующие поверхность участки Emini и участки с высоким антигенным индексом Jameson-Wolf, как предсказывают, с использованием параметров по умолчанию этой компьютерной программы.

Полипептид BAFF-R для применения в способах по этому изобретению можно экспрессировать в модифицированной форме, такой как слитый белок (содержащий полипептид, связанный пептидной связью с гетерологичной белковой последовательностью (другого белка)), и он может включать не только сигналы для секреции, но также дополнительные гетерологичные функциональные участки. Альтернативно, такой слитый белок можно получать способами синтеза белков, например, с использованием устройства для синтеза пептидов. Таким образом, например, участок дополнительных аминокислот, в частности заряженных аминокислот, можно присоединять к N-концу полипептида для повышения стабильности и устойчивости в клетке-хозяине в ходе очистки или в ходе последующей обработки и хранения. Также к полипептиду можно присоединять пептидные группы для упрощения очистки. Такие участки можно удалять перед окончательным получением полипептида. Присоединение пептидных групп к по-

липептидам для обеспечения секреции и выделения, для повышения стабильности и упрощения очистки, среди прочих, является известным и общепринятым способом в данной области.

Предпочтительный белок для слияния с BAFF-R, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит гетерологичный участок из иммуноглобулина, который является пригодным для растворения белков. Например, в EP-A-0464533 (канадский эквивалент 2045869) и WO 00/024782 описаны слитые белки, содержащие различные фрагменты константного участка молекул иммуноглобулинов совместно с другим белком человека или его частью. Слитые белки BAFF-R и иммуноглобулина описаны, например, в Pelletier, et al., (2003) J. Biol. Chem. 278: 33127-33133 и Carter, et al., (2005) Arthritis Rheum 52: 3943-3954, включенных в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме. Во многих случаях Fc-часть в слитом белке является высокопреимущественной для применения в целях терапии и диагностики и, таким образом, приводит, например, к улучшенным фармакокинетическим свойствам (EP-A 0232262). С другой стороны, для некоторых способов применения может быть желательной возможность удаления Fc-части после экспрессии, детекции и очистки слитого белка описанным преимущественным способом. Это желательно в случае, когда оказывается, что Fc-часть препятствует применению в целях лечения и диагностики, например, когда слитый белок подлежит применению в качестве антигена для иммунизации. При разработке лекарственных средств, например, белки человека, такие как hIL-5, подвергали слиянию с Fc-участками в целях высокопроизводительных скрининговых анализов для идентификации антагонистов hIL-5. См., D. Bennett et al., Journal of Molecular Recognition 8:52-58 (1995) и K. Johanson et al., Journal Biological Chemistry 270:9459-9471 (1995). В конкретном варианте осуществления слитый белок BAFF-R-Fc, который можно использовать в способах по этому изобретению, представляет собой BR3-Fc.

Как поймет специалист в данной области и как рассмотрено выше, полипептиды BAFF-R можно подвергать слиянию с последовательностями других полипептидов. Например, полипептиды BAFF-R можно подвергать слиянию с константным доменом иммуноглобулинов (IgA, IgE, IgG, IgM) или их частями (CH1, CH2, CH3 или любым их сочетанием и их частями), или альбумином (включая, но не ограничиваясь ими, рекомбинантный альбумин человека или его фрагменты или варианты (см., например, патент США № 5876969, выданный 2 марта 1999 г., патент EP 0413622 и патент США № 5766883, выданный 16 июня 1998 г., включенные в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме)) с получением в результате химерных полипептидов.

Такие слитые белки могут упрощать очистку, могут продлевать срок хранения и могут повышать время полужизни *in vivo*. Это было показано для химерных белков, состоящих из первых двух доменов CD4-полипептида человека и различных доменов константных участков тяжелой или легкой цепи иммуноглобулинов млекопитающих. См., например, EP 394827; Trauneker et al., Nature, 331: 84-86 (1988). Повышенная доставка антигена через эпителиальный барьер в иммунную систему была показана для антигенов (например, инсулина), конъюгированных с партнером для связывания FcRn, таким как IgG или Fc-фрагменты (см., например, публикации PCT WO 96/22024 и WO 99/04813). Также было показано, что слитые белки IgG, которые обладают связанной дисульфидными связями димерной структурой вследствие дисульфидных связей IgG-части, являются более эффективными в отношении связывания и нейтрализации других молекул, чем мономерные полипептиды или их фрагменты отдельно. См., например, Fountoulakis et al., J. Biochem., 270:3958-3964 (1995).

Одним примером белка BAFF-R-Fc являются аминокислоты 1-70 SEQ ID NO: 10, слитые с Fc-участком молекулы иммуноглобулина IgG1. Необязательно, аминокислота 20 (валин) в BAFF-R замещена аспарагином и аминокислота 27 (лейцин) в BAFF-R замещена пролином. В SEQ ID NO: 26 представлены аминокислоты 1-70 BAFF-R с этими двумя аминокислотными заменами.

Слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержит, по меньшей мере, фрагмент или вариант полипептида BAFF-R и, по меньшей мере, фрагмент или вариант сывороточного альбумина человека, которые связаны друг с другом предпочтительно генетическим слиянием (т.е. слитый белок альбумина получают трансляцией нуклеиновой кислоты, в которой полинуклеотид, кодирующий весь BAFF-R или его часть, связывают в рамке считывания с полинуклеотидом, кодирующим весь альбумин или его часть) или химической конъюгацией друг с другом. Полипептид BAFF-R и белок альбумина, являющиеся частью слитого белка альбумина, могут быть обозначены как "часть", "участок" или "группа" слитого белка альбумина (например, "часть BAFF-R" или "часть белка альбумина").

В одном варианте осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит полипептид BAFF-R и белок сывороточного альбумина, или альтернативно состоит из них. В других вариантах осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит фрагмент BAFF-R и белок сывороточного альбумина, или альтернативно состоит из них. В других вариантах осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит вариант BAFF-R и белок сывороточного альбумина или альтернативно состоит из них. В предпочтительных вариантах осуществления компонент белка сывороточного альбумина в слитом белке альбумина представляет собой зрелую часть сывороточного альбумина или альтернативно состоит из них.

В следующих вариантах осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит полипептид BAFF-R и биологически активный и/или терапевтически активный фрагмент сывороточного альбумина или альтернативно состоит из них. В следующих вариантах осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит полипептид BAFF-R и биологически активный и/или терапевтически активный вариант сывороточного альбумина или альтернативно состоит из них. В предпочтительных вариантах осуществления часть BAFF-R в слитом белке альбумина представляет собой полноразмерный полипептид BAFF-R. В следующем предпочтительном варианте осуществления часть белка BAFF-R в слитом белке альбумина представляет собой зрелый растворимый домен полипептида BAFF-R.

В следующих вариантах осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит фрагмент или вариант BAFF-R и биологически активный и/или терапевтически активный фрагмент или вариант сывороточного альбумина или альтернативно состоит из них. В предпочтительных вариантах осуществления это изобретение относится к слитому белку альбумина, содержащему зрелую часть полипептида BAFF-R и зрелую часть сывороточного альбумина.

В следующих вариантах осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит фрагмент или вариант BAFF-R и биологически активный и/или терапевтически активный фрагмент или вариант сывороточного альбумина или альтернативно состоит из них. В предпочтительных вариантах осуществления это изобретение относится к слитому белку альбумина, содержащему зрелую часть полипептида BAFF-R и зрелую часть сывороточного альбумина (включая, но не ограничиваясь ими, рекомбинантный сывороточный альбумин человека или его фрагменты или варианты (см., например, патент США № 5876969, выданный 2 марта 1999 г., патент EP 0413622 и патент США № 5766883, выданный 16 июня 1998 г., включенные в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме)), или альтернативно состоящему из них. В предпочтительном варианте осуществления полипептиды BAFF-R (включая их фрагменты или варианты) являются слитыми со зрелой формой сывороточного альбумина человека (т.е. аминокислотами 1-585 сывороточного альбумина человека, как показано на фиг. 1 и 2 патента EP 0322094, который включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). В другом предпочтительном варианте осуществления антитела по настоящему изобретению (включая их фрагменты или варианты) являются слитыми с полипептидными фрагментами, содержащими аминокислотные остатки 1-х сывороточного альбумина человека, где x представляет собой целое число от 1 до 585 и фрагмент альбумина обладает активностью сывороточного альбумина человека, или альтернативно состоящими из них. В другом предпочтительном варианте осуществления полипептиды BAFF-R (включая их фрагменты или варианты) являются слитыми с полипептидными фрагментами, содержащими аминокислотные остатки 1-z сывороточного альбумина человека, где z представляет собой целое число от 369 до 419, как описано в патенте США 5766883, включенном в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме, или альтернативно состоящими из них. Полипептиды BAFF-R (включая их фрагменты или варианты) могут быть слитыми либо с N-, либо с C-концом гетерологичного белка (например, Fc-полипептида иммуноглобулина или полипептида сывороточного альбумина человека).

В предпочтительных вариантах осуществления белок сывороточного альбумина человека, используемый в слитых белках альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит один или оба из следующих наборов точковых мутаций относительно SEQ ID NO: 11: Leu-407 на Ala, Leu-408 на Val, Val-409 на Ala и Arg-410 на Ala или Arg-410 на A, Lys-413 на Gln и Lys-414 на Gln (см., например, международную публикацию WO 95/23857, включенную в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). В более предпочтительных вариантах осуществления слитые белки альбумина, которые можно использовать в способах по этому изобретению, которые содержат один или оба из описанных выше наборов точковых мутаций, обладают повышенной стабильностью/устойчивостью к протеолитическому расщеплению посредством YарЗр дрожжей, что обеспечивает повышенную продукцию рекомбинантных слитых белков альбумина, экспрессируемых в дрожжевых клетках-хозяевах.

Предпочтительно слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит НА в качестве N-концевой части и полипептид BAFF-R в качестве C-концевой части. Альтернативно, также можно использовать слитый белок альбумина, содержащий НА в качестве C-концевой части и полипептид BAFF-R в качестве N-концевой части.

В других вариантах осуществления слитый белок альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, имеет полипептид BAFF-R, слитый как с N-концом, так и с C-концом альбумина. В конкретном варианте осуществления полипептиды BAFF-R, слитые с N- и C-концами, являются одинаковыми. В другом варианте осуществления полипептиды BAFF-R, слитые с N- и C-концами, представляют собой разные полипептиды BAFF-R. В другом варианте осуществления полипептид BAFF-R является слитым либо с N-, либо с C-концом альбумина, а с другим концом слит гетерологичный полипептид.

Кроме того, слитые белки альбумина, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут включать линкерный пептид между слитыми частями для обеспечения большего физического разделения между группами. Линкерный пептид может состоять из таких аминокислот, чтобы он был

более гибким или более жестким.

Как правило, слитые белки альбумина, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут иметь один образованный из НА участок и один участок BAFF-R. Однако для получения слитого белка альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, можно использовать несколько участков каждого белка. Аналогично, для получения слитого белка альбумина, который можно использовать в способах по этому изобретению, можно использовать более одного белка. Например, белок может быть слитым как с N-, так и с C-концом НА. В такой конфигурации части белка могут представлять собой одинаковые или различные белковые молекулы. Структуру бифункциональных слитых белков альбумина можно представить как X-НА-Y или Y-НА-X.

В конкретном варианте осуществления белок BAFF-R или его фрагмент или вариант, который можно использовать в способах по этому изобретению, может быть конъюгирован с цитотоксином (например, цитостатическим или цитотоксическим средством). Цитотоксин или цитотоксическое средство включает любое средство, которое является вредным для клеток. Их примеры включают паклитаксол, цитохалазин В, грамицидин D, бромид этидия, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубин, даунорубин, диgidроксиантрацидин, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, татракаин, лидокаин, пропранолол и пуромидин и их аналоги или гомологи.

В другом варианте осуществления белок BAFF-R или его фрагмент или вариант, который можно использовать в способах по этому изобретению, может быть конъюгирован с токсином.

Под "токсином" подразумевают одно или несколько соединений, которые связывают и активируют эндогенные цитотоксические эффекторные системы, радиоизотопы, голотоксины, модифицированные токсины, каталитические субъединицы токсинов или любые молекулы или ферменты, в норме не представленные в клетке или на поверхности клетки, которые при определенных условиях вызывают гибель клетки. Токсины, которые можно использовать, включают, но не ограничиваются ими, радиоизотопы, известные в данной области, соединения, например, такие как антитела (или обладающие фиксацией комплемента их участки), которые связывают врожденную или индуцируемую эндогенную цитотоксическую эффекторную систему, тимидинкиназа, эндонуклеаза, РНКаза, альфа-токсин, рицин, абрин, экзотоксин A *Pseudomonas*, дифтерийный токсин, сапорин, момордин, гелонин, противовирусный белок лакноса, альфа-сарцин и холерный токсин. "Токсин" также включает цитостатическое или цитотоксическое средство, лекарственное средство или ион радиоактивного металла, например альфа-эмиттеры, например, такие как ^{213}Bi , или другие радиоизотопы, например, такие как ^{103}Pd , ^{133}Xe , ^{131}I , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{35}S , ^{90}Y , ^{153}Sm , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn , $^{90}\text{Yttrium}$, $^{117}\text{Olovo}$, $^{186}\text{Рений}$, $^{166}\text{Гольмий}$ и $^{188}\text{Рений}$.

Для улучшения или изменения свойств полипептидов BAFF-R, которые можно использовать в способах по этому изобретению, можно использовать белковую инженерию. Технологию рекомбинантных ДНК, известную специалистам в данной области, можно использовать для создания новых мутантных белков или "мутеинов", включающих единичные или множественные аминокислотные замены, делеции, вставки, или слитых белков. Такие модифицированные полипептиды могут демонстрировать, например, повышенную активность или увеличенную стабильность. Кроме того, их можно очищать с более высоким выходом и они показывают лучшую растворимость, чем соответствующий природный полипептид, по меньшей мере, в определенных условиях очистки и хранения. В другом варианте осуществления мутантная форма полипептида BAFF-R может быть "доминантно негативной". Для этого в целях снижения активности BAFF-R можно использовать дефектные полипептиды BAFF-R, например, такие как мутантные формы, лишенные всего TNF-консервативного домена или его части. Нефункциональные полипептиды BAFF-R будут собираться с образованием рецептора (например, мультимера), который может обладать способностью к связыванию, но который не способен индуцировать передачу сигнала.

Белки BAFF-R, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут быть в форме мономеров или мультимеров (т.е. димеров, тримеров, тетрамеров и более высоких мультимеров). В конкретных вариантах осуществления полипептиды по этому изобретению представляют собой момеры, димеры, тримеры или тетрамеры. В дополнительных вариантах осуществления мультимеры по этому изобретению представляют собой, по меньшей мере, димеры, по меньшей мере, тримеры или, по меньшей мере, тетрамеры. Полагают, что определенные члены белков семейства TNF существуют в тримерной форме (Beutler and Huffel, *Science* 264:667, 1994; Banner et al., *Cell* 73:431, 1993). Таким образом, тримерные BAFF-R могут обеспечивать преимущественную и повышенную биологическую активность.

В конкретных вариантах осуществления мультимеры могут представлять собой гомомеры или гетеромеры. Как используют в настоящем описании, термин гомомер относится к мультимеру, содержащему только белки BAFF-R (включая фрагменты, варианты и слитые белки BAFF-R, как описано в настоящем описании). Эти гомомеры могут содержать белки BAFF-R, имеющие идентичные или отличающиеся полипептидные последовательности. В конкретном варианте осуществления гомомер представляет собой мультимер, содержащий только белки BAFF-R, имеющие идентичную полипептидную последовательность. В другом конкретном варианте осуществления гомомер представляет собой мультимер, содержащий белки BAFF-R, имеющие различные полипептидные последовательности.

Как используют в настоящем описании, термин гетеромер относится к мультимеру, содержащему

гетерологичные белки (т.е. белки, содержащие только полипептидные последовательности, которые не соответствуют полипептидным последовательностям, кодируемым геном BAFF-R) в дополнение к белкам BAFF-R. Мультимеры, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут быть образованы в результате гидрофобных, гидрофильных, ионных и/или ковалентных связей и/или они могут быть непрямо связаны, например, посредством образования липосом. Таким образом, в одном варианте осуществления мультимеры, например, такие как гомодимеры, гомотримеры, гетеротримеры или гетеротетрамеры, образуются, когда полипептиды контактируют друг с другом в растворе. В других вариантах осуществления мультимеры образуются посредством ковалентных связей с полипептидами BAFF-R и/или между ними. Такие ковалентные связи могут вовлекать один или несколько аминокислотных остатков, находящихся в полипептидной последовательности белка. В одном примере ковалентные связи представляют собой поперечные связи между остатками цистеина, расположенными в полипептидных последовательностях, которые взаимодействуют в нативном (т.е. встречающемся в природе) полипептиде. В другом примере ковалентные связи являются следствием химического или рекомбинантного манипулирования.

Альтернативно, такие ковалентные связи могут вовлекать один или несколько аминокислотных остатков, содержащихся в гетерологичной полипептидной последовательности в слитом белке BAFF-R. В одном примере ковалентные связи представляют собой связи с гетерологичной последовательностью, находящейся в слитом белке (см., например, патент США № 5478925, содержание которого включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). В конкретном примере ковалентные связи представляют собой связи с гетерологичной последовательностью, находящейся в слитом белке BAFF-R-Fc (как описано в настоящем описании). В другом конкретном примере ковалентные связи в слитых белках представляют собой связи с гетерологичной полипептидной последовательностью из другого члена семейства лигандов/рецепторов TNF, который способен образовывать ковалентно связанные мультимеры, например, такой как остеопротегерин (см., например, международную публикацию WO 98/49305, содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). В другом варианте осуществления два или более полипептида BAFF-R связаны через синтетические линкеры (например, линкеры из пептидов, углеводов или растворимых полимеров). Их примеры включают пептидные линкеры, описанные в патенте США № 5073627 (включенном в настоящее описание в качестве ссылки). Белки, содержащие несколько полипептидов BAFF-R, разделенных пептидными линкерами, можно получать с использованием общепринятой технологии рекомбинантных ДНК.

В конкретном варианте осуществления антитела, которые связываются с полипептидом BAFF-R, полипептидным фрагментом, вариантом SEQ ID NO: 10 и/или полипептидным эпитопом BAFF-R (как определяют способами иммунологического анализа для оценки специфичного связывания антитело-антиген, хорошо известными в данной области), можно использовать в способах по этому изобретению. Антитела против BAFF-R и их фрагменты описаны, например, в Lee, et al., (2006) Synthetic anti-BR3 antibodies that mimic BAFF binding and target both human and murine B-cells, *Blood* (Blood First Edition Paper, prepublished online July 13, 2006) Vol. 0, No. 2006, pp. 2006-3011, Ch'en, et al., (2005) *Cell Immunol.* 236:78-85, Nakamura, et al., (2005) *Virchows Arch* 447: 53-60 и Carter, et al., (2005) *Arthritis Rheum* 52:3943-3954. Все из упомянутых выше ссылок включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме. Антитела включают, но не ограничиваются ими, поликлональные, моноклональные, полиспецифичные, человеческие, гуманизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, Fab-фрагменты, F(ab')-фрагменты, фрагменты, продуцируемые экспрессирующей Fab-библиотекой, антиидиотипические (anti-Id) антитела (включая, например, anti-Id антитела к антителам против BAFF-R) и связывающие эпитоп фрагменты любого из указанных выше. Как используют в настоящем описании, термин "антитело" относится к молекулам иммуноглобулинов и иммунологически активным частям молекул иммуноглобулинов, т.е. к молекулам, которые содержат антигенсвязывающий участок, который иммуноспецифично связывает антиген. Молекулы иммуноглобулинов по этому изобретению могут представлять собой молекулы иммуноглобулинов любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса. В конкретных вариантах осуществления молекулы иммуноглобулинов представляют собой IgG1. В других конкретных вариантах осуществления молекулы иммуноглобулинов представляют собой IgG4.

Связывающие BAFF-R фрагменты антител, которые можно использовать в способах по этому изобретению, включают, но не ограничиваются ими, Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечные антитела, связанные дисульфидной связью Fv (sdFv), и фрагменты, содержащие либо VL-, либо VH-домен. Антигенсвязывающие фрагменты антитела, включая одноцепочечные антитела, могут содержать вариабельный участок(участки) отдельно или в сочетании со всеми или частью из следующих: шарнирная область, CH1-, CH2- и CH3-домены. Также предусмотрены антигенсвязывающие фрагменты, также содержащие любое сочетание вариабельного участка(ов) с шарнирной областью, CH1-, CH2- и CH3-доменами. Антитела по происхождению могут быть из любого животного, включая птиц и млекопитающих. Предпочтительно антитела представляют собой антитела человека, мыши (например, мыши и крысы), осла, овцы, кролика, козы, морской свинки, верблюда, лошади или курицы. Как используют в настоящем описании, "человеческие" антитела включают антитела, обладающие аминокислотной после-

довательностью иммуноглобулина человека, и включают антитела, выделенные из библиотек иммуноглобулинов человека или из животных, трансгенных по одному или нескольким иммуноглобулинам человека и которые не экспрессируют эндогенные иммуноглобулины, как описано, например, в патенте США № 5939598, выданном Kucherlapati et al., содержание которого включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Антитела против BAFF-R, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут быть моноспецифичными, биспецифичными, триспецифичными или более полиспецифичными. Полиспецифичные антитела могут быть специфичными к различным эпитопам полипептида BAFF-R или они могут быть специфичными как к полипептиду BAFF-R, так и к гетерологичному эпитопу, такому как гетерологичный полипептид или материал твердой подложки. См., например, публикации PCT WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, et al., J. Immunol. 147:60-69 (1991); патенты США №№ 4474893; 4714681; 4925648; 5573920; 5601819; Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-1553 (1992), содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме.

Антитела против BAFF-R можно описать или определить с точки зрения их перекрестной реактивности. Антитела, которые не связывают какой-либо другой аналог, ортолог или гомолог полипептида BAFF-R, можно использовать в способах по этому изобретению. В конкретных вариантах осуществления антитела против BAFF-R перекрестно реагируют с гомологами мыши, крысы и/или кролика для белков BAFF-R человека и их соответствующими эпитопами. В конкретном варианте осуществления антитело против BAFF-R, которое можно использовать в способах по этому изобретению, связывается не только с BAFF-R, но также оно связывается с TACI и BCMA.

Антитела против BAFF-R, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут быть описаны или определены с точки зрения их аффинности связывания с полипептидом BAFF-R. Предпочтительная аффинность связывания включает аффинность связывания с константой диссоциации или K_D , меньшей или равной 5×10^{-9} М, 10^{-9} М, 5×10^{-10} М, 10^{-10} М, 5×10^{-11} М, 10^{-11} М, 5×10^{-12} М или 10^{-12} М.

Антитела против BAFF-R, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут действовать в качестве агонистов или антагонистов полипептидов BAFF-R. Например, предусмотрены антитела против BAFF-R, которые препятствуют взаимодействиям рецептор/лиганд с полипептидами BAFF-R, либо частично, либо полностью. Также предусмотрены специфичные к рецептору антитела, которые не препятствуют связыванию лиганда, но препятствуют активации рецептора. Активацию рецептора (например, передачу сигнала) можно определять способами, описанными в настоящем описании или, в ином случае, известными в данной области. Например, активацию рецептора можно определять посредством детекции активации факторов транскрипции NF-AT, AP-1 и/или NF-κB с использованием способов, известных в данной области, и/или фосфорилирования (например, тирозина или серина/треонина) рецептора или его субстрата посредством иммунопреципитации с последующим вестерн-блот анализом.

В конкретном варианте осуществления специфичные к рецептору антитела против BAFF-R, которые препятствуют как связыванию лиганда, так и активации рецептора, а также антитела против BAFF-R, которые распознают комплекс рецептор-лиганд и предпочтительно не распознают не связанный специфично рецептор или не связанный лиганд, можно использовать в способах по этому изобретению. Указанные выше антитела против BAFF-R можно получать с использованием способов, известных в данной области. См., например, публикацию PCT WO 96/40281; патент США № 5811097; Deng et al., Blood 92 (6): 1981-1988 (1998); Chen et al., Cancer Res. 58 (16): 3668-3678 (1998); Harrop et al., J. Immunol. 161(4): 1786-1794 (1998); Zhu et al., Cancer Res. 58 (15): 3209-3214 (1998); Yoon et al., J. Immunol. 160(7): 3170-3179 (1998); Prat et al., J. Cell. Sci. 111(Pt2): 237-247 (1998); Pitard et al., J. Immunol. Methods 205(2): 177-190 (1997); Liautard et al., Cytokine 9(4): 233-241 (1997); Carlson et al., J. Biol. Chem. 272 (17): 11295-11301 (1997); Taryman et al., Neuron 14(4): 755-762 (1995); Muller et al., Structure 6(9): 1153-1167 (1998); Bartunek et al., Cytokine 8(1): 14-20 (1996) (которые включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме).

G. Антитела против APRIL.

В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой антитело против APRIL или его антигенсвязывающий фрагмент. Антитела против APRIL и их фрагменты описаны, например, в публикациях PCT WO 01/087977, WO 99/12965, WO 01/60397, и WO 02/094192; патенте США № 6506882; публикации патента США № 2003/0166864, поданной 11 октября 2002 г.; и Ch'en, et al., (2005) Cell Immunol. 236: 78-85; и описаны более подробно ниже. Все упомянутые выше ссылки включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме.

В конкретном варианте осуществления антитела, которые связываются с полипептидом APRIL, полипептидным фрагментом, или вариантом SEQ ID NO:4; и/или эпитопом APRIL (как определяют способами иммунологического анализа для оценки специфичного связывания антитело-антиген, хорошо известными в данной области) можно использовать в способах по этому изобретению. В конкретном варианте осуществления антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут связывать полипептиды APRIL, слитые с другими полипептидными последовательностями. Например, полипептиды APRIL могут быть слитыми с константным доменом иммуноглобулинов (IgA, IgE, IgG,

IgM), или его частями (CH1, CH2, CH3 или любым их сочетанием и их частями), или альбумином (включая, но не ограничиваясь ими, рекомбинантный человеческий альбумин или его фрагменты или варианты (см., например, патент США № 5876969, выданный 2 марта 1999 г., патент EP 0413622 и патент США № 5766883, выданный 16 июня 1998 г., включенные в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме)) с получением в результате химерных полипептидов. Такие слитые белки могут упрощать очистку, могут продлевать срок хранения и могут повышать время полужизни *in vivo*. Это было показано для химерных белков, состоящих из первых двух доменов CD4-полипептида человека и различных доменов константных участков тяжелой или легкой цепей иммуноглобулинов млекопитающих. См., например, EP 394827; Traunecker et al., *Nature*, 331:84-86 (1988). Повышенная доставка антигена через эпителиальный барьер к иммунной системе была показана для антигенов (например, инсулина), конъюгированных с партнером для связывания FcRn, таким как IgG или Fc-фрагменты (см., например, публикации PCT WO 96/22024 и WO 99/04813). Также было выявлено, что слитые белки IgG, которые обладают связанной дисульфидными связями димерной структурой, вследствие дисульфидных связей IgG-части, являются более эффективными в отношении связывания и нейтрализации других молекул, чем мономерные полипептиды или их фрагменты отдельно. См., например, Fountoulakis et al., *J. Biochem.*, 270:3958-3964 (1995).

В конкретных вариантах осуществления антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, связывают гомомерные, особенно гомотримерные, полипептиды APRIL. В других конкретных вариантах осуществления антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, связывают гетеромерные, особенно гетеротримерные, полипептиды APRIL, такие как гетеротример, содержащий два полипептида APRIL и один полипептид нейтрокина-альфа, или гетеротример, содержащий один полипептид APRIL и два полипептида нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, связывают гомомерные, особенно гомотримерные, полипептиды APRIL, где отдельные белковые компоненты мультимеров состоят из зрелой формы APRIL (например, аминокислотных остатков 105-250 SEQ ID NO: 4). В других конкретных вариантах осуществления антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, связывают гетеромерные, особенно гетеротримерные, полипептиды APRIL, такие как гетеротример, содержащий два полипептида APRIL и один полипептид нейтрокина-альфа, или гетеротример, содержащий один полипептид APRIL и два полипептида нейтрокина-альфа, и где отдельные белковые компоненты гетеромера APRIL содержат либо зрелую внеклеточную растворимую часть APRIL (например, аминокислотные остатки 105-250 SEQ ID NO: 4), либо зрелую внеклеточную растворимую часть нейтрокина-альфа (например, аминокислотные остатки 134-285 SEQ ID NO: 2) или альтернативно состоят из них.

В конкретных вариантах осуществления антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, связывают конформационные эпитопы мономерного белка APRIL. В конкретных вариантах осуществления антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, связывают конформационные эпитопы мультимерного, особенно тримерного, белка APRIL. В других вариантах осуществления антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, связывают конформационные эпитопы, которые возникают вследствие соседнего расположения APRIL и гетерологичного полипептида, как может происходить, когда APRIL формирует гетеротримеры (например, с полипептидами нейтрокина-альфа) или в слитых белках между APRIL и гетерологичным полипептидом.

Антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, включают, но не ограничиваются ими, поликлональные, моноклональные, полиспецифичные, человеческие, гуманизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, Fab-фрагменты, F(ab')-фрагменты, фрагменты, продуцируемые экспрессирующей Fab-библиотекой, антиидиотипические (anti-Id) антитела (включая, например, anti-id антитела к антителам против APRIL), и связывающие эпитоп фрагменты любого из указанных выше. Как используют в настоящем описании, термин "антитело" относится к молекулам иммуноглобулинов и иммунологически активным частям молекул иммуноглобулинов, т.е. к молекулам, которые содержат антигенсвязывающий участок, который иммуноспецифично связывает антиген. Молекулы иммуноглобулинов по этому изобретению могут представлять собой молекулы иммуноглобулинов любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса. В предпочтительных вариантах осуществления иммуноглобулин представляет собой иммуноглобулин изотипа IgG1 или IgG4. Иммуноглобулины могут обладать как тяжелой, так и легкой цепью. Набор тяжелых цепей IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY может образовывать пару с формами легкой цепи каппа или ламбда.

В конкретном варианте осуществления антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, представляют собой связывающие APRIL фрагменты антитела и включают, но не ограничиваются ими, Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечные антитела, связанные дисульфидной связью Fv (sdFv), и фрагменты, содержащие либо VL-, либо VH-домен. Связывающие APRIL фрагменты антитела, включая одноцепочечные антитела, могут содержать переменный участок(участки) отдельно или в сочетании со всеми или частью из следующих: шарнирная область, CH1-, CH2- и CH3-домены. В конкретном варианте осуществления связывающие нейтрокин-альфа фрагменты,

которые можно использовать в способах по этому изобретению, содержат любое сочетание варибельного участка(ов) с шарнирной областью, СН1-, СН2- и СН3-доменами. Антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут быть животного происхождения, включая птиц и млекопитающих. Предпочтительно антитела представляют собой антитела человека, мыши (например, мыши и крысы), ослы, овцы, кролика, козы, морской свинки, верблюда, лошади или курицы. Как используют в настоящем описании, "человеческие" антитела включают антитела, обладающие аминокислотной последовательностью иммуноглобулина человека, и включают антитела, выделенные из библиотек иммуноглобулинов человека или из животных, трансгенных по одному или нескольким иммуноглобулинам человека и которые не экспрессируют эндогенные иммуноглобулины, как описано, например, в патенте США № 5939598, выданном Kucherlapati et al., содержание которого включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Антитела против APRIL, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут быть моноспецифичными, биспецифичными, триспецифичными или более полиспецифичными. Полиспецифичные антитела могут быть специфичными к различным эпитопам полипептида APRIL или они могут быть специфичными как к полипептиду APRIL, так и к гетерологичному эпитопу, такому как гетерологичный полипептид или материал твердой подложки. См., например, публикации PCT WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, et al., J. Immunol. 147:60-69 (1991); патенты США № 4474893; 4714681; 4925648; 5573920; 5601819; Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-1553 (1992).

Антитела против APRIL можно описать или определить с точки зрения их перекрестной реактивности. Антитела, которые не связывают какой-либо другой аналог, ортолог или гомолог полипептида APRIL, можно использовать в способах по этому изобретению. В конкретном варианте осуществления антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, перекрестно реагируют с нейтрокином-альфа. В конкретных вариантах осуществления антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, перекрестно реагируют с гомологами мыши, крысы и/или кролика для белков человека и их соответствующими эпитопами.

Антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут быть описаны или определены с точки зрения их аффинности связывания с полипептидом APRIL. В конкретных вариантах осуществления антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, связывают полипептиды APRIL, или их фрагменты или варианты, с константой диссоциации или K_D , меньшей или равной 5×10^{-9} М, 10^{-9} М, 5×10^{-10} М, 10^{-10} М, 5×10^{-11} М, 10^{-11} М, 5×10^{-12} М или 10^{-12} М. В конкретном варианте осуществления антитела, которые можно использовать в способах по этому изобретению, связывают полипептиды APRIL с константой диссоциации или K_D , находящейся в любом одном из диапазонов, который находится между каждым из отдельных приведенных показателей.

Например, предусмотрены антитела против APRIL, которые препятствуют взаимодействиям рецептора/лиганда с полипептидами нейтрокина-альфа либо частично, либо полностью. Также предусмотрены специфичные к APRIL антитела, которые не препятствуют связыванию лиганда, но препятствуют активации рецептора. Активацию рецептора (например, передачу сигнала) можно определять способами, описанными в настоящем описании или, в ином случае, известными в данной области. Например, активацию рецептора можно определять посредством детекции активации факторов транскрипции NF-AT, AP-1 и/или NF-карпаВ с использованием способов, известных в данной области, и/или фосфорилирования (например, тирозина или серина/треонина) рецептора или его субстрата посредством иммунопреципитации с последующим вестерн-блот анализом.

В конкретном варианте осуществления специфичные к APRIL антитела, которые препятствуют как связыванию лиганда, так и активации рецептора, а также антитела, которые распознают комплекс рецептор-лиганд и предпочтительно не распознают не связанный специфично рецептор или не связанный лиганд, можно использовать в способах по этому изобретению. В конкретном варианте осуществления нейтрализующие антитела, которые связывают лиганд и препятствуют связыванию лиганда с рецептором, а также антитела, которые связывают лиганд, препятствуя посредством этого активации рецептора, но не препятствуют связыванию лиганда с рецептором, можно использовать в способах по этому изобретению. Указанные выше антитела против APRIL можно получать с использованием способов, известных в данной области. См., например, публикацию PCT WO 96/40281; патент США № 5811097; Deng et al., Blood 92(6): 1981-1988 (1998); Chen et al., Cancer Res. 58(16): 3668-3678 (1998); Harrop et al., J. Immunol. 161(4): 1786-1794 (1998); Zhu et al., Cancer Res. 58 (15): 3209-3214 (1998); Yoon et al., J. Immunol. 160 (7): 3170-3179 (1998); Prat et al., J. Cell. Sci. 111(Pt2): 237-247 (1998); Pitard et al., J. Immunol. Methods 205(2): 177-190 (1997); Liautard et al., Cytokine 9(4):233-241 (1997); Carlson et al., J. Biol. Chem. 272(17): 11295-11301 (1997); Taryman et al., Neuron 14(4): 755-762 (1995); Muller et al., Structure 6(9): 1153-1167 (1998); Bartunek et al., Cytokine 8(1): 14-20 (1996) (все из которых включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме).

Н. Связывающие APRIL полипептиды.

В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой связывающий APRIL пептид или полипептид. Связывающие APRIL пептиды или полипептиды описаны, например, в международных публикациях патентов номер WO 01/87977, WO 01/87979 и публикациях па-

тентов США № US 2002081296 и US 2002086018, все из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме. Связывающие APRIL пептиды, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению, включают короткие полипептиды, идентифицированные из случайных пептидных последовательностей, воспроизводимых посредством слияния с белками оболочки нитевидного фага. Для описания технологии фагового дисплея пептидных библиотек, см., например, Scott et al. (1990), Science 249: 386; Devlin et al. (1990), Science 249: 404; патент США № 5223409, выданный 29 июня 1993 г.; патент США № 5733731, выданный 31 марта 1998 г.; патент США № 5498530, выданный 12 марта 1996 г.; патент США № 5432018, выданный 11 июля 1995 г.; патент США № 5338665, выданный 16 августа 1994 г.; патент США № 5922545, выданный 13 июля 1999 г.; WO 96/40987, опубликованную 19 декабря 1996 г.; и WO 98/15833, опубликованную 16 апреля 1998 г. (все из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме). Фаг, экспрессирующий пептиды, выделяют последовательными раундами аффинной очистки против иммобилизованного пептида-мишени APRIL с последующим повторным размножением. Кандидатов с наивысшим связыванием с APRIL можно секвенировать с целью определения структуры каждого связывающего пептида. Затем такой идентифицированный связывающий APRIL пептид можно присоединять к "носителю" с дальнейшим получением связывающего APRIL пептида для применения в способах настоящего эксперимента. Термин "носитель" относится к молекуле, которая предотвращает деградацию и/или повышает время полужизни, снижает токсичность, снижает иммуногенность или повышает биологическую активность связывающего APRIL пептида. Иллюстративные носители включают Fc-домен и его варианты ("пептидное антитело", которое является предпочтительным); линейный полимер (например, полиэтиленгликоль (PEG), включая PEG массой 5, 20 и 30 кДа, полилизин, декстран и т.д.); полимер с разветвленной цепью (см., например, патент США № 4289872, выданный Denckenwalter et al. 15 сентября 1981 г.; 5229490, выданный Там 20 июля 1993 г.; WO 93/21259, Frechet et al., опубликованную 28 октября 1993 г.); липид; группу холестерина (такую как стероид); углевод или олигосахарид (например, декстран); любой природный или синтетический белок, полипептид или пептид, который связывается с рецептором "спасения"; альбумин, включая, но не ограничиваясь ими, рекомбинантный альбумин человека или его фрагменты или варианты (см., например, патент США № 5876969, выданный 2 марта 1999 г., патент EP 0413622, и патент США № 5766883, выданный 16 июня 1998 г., включенные в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме); и домен "лейциновой молнии", и другие такие белки и фрагменты белков. Для связывающих APRIL полипептидов, которые можно использовать в способах по этому изобретению, необходимо наличие по меньшей мере одного носителя, присоединенного к пептиду через N-конец, C-конец или боковую цепь одного из аминокислотных остатков. Также можно использовать несколько носителей; например Fc на каждом конце или Fc на одном конце и группу PEG на другом конце или боковой цепи. Для связывающих APRIL пептидов предпочтительным носителем является Fc-домен. Fc-домен может быть слитым с N- или C-концами пептидов или как с N-, так и с C-концами. Слияние с N-концом является предпочтительным.

Как указано выше, Fc-варианты являются пригодными носителями для связывающих APRIL пептидов, которые можно использовать в способах по этому изобретению. Нативный Fc можно значительно модифицировать с образованием Fc-варианта при условии сохранения связывания с рецептором "спасения"; см., например, WO 97/34631 и WO 96/32478. В таких Fc-вариантах можно удалять один или несколько участков нативного Fc, которые обеспечивают структурные признаки или функциональную активность, не требующуюся для связывающих APRIL пептидов, которые можно использовать в способах по этому изобретению. Эти участки можно удалять, например, замещением или делецией остатков, встраиванием остатков в участок или укорочением на фрагменты, содержащие участок. Встроенные или замещенные остатки также могут представлять собой измененные аминокислоты, такие как пептидомиметики или D-аминокислоты. Fc-варианты могут быть желательными по многим причинам, некоторые из которых описаны ниже. Иллюстративные Fc-варианты включают молекулы и последовательности, в которых:

1) удалены участки, вовлеченные в образование дисульфидных связей. Такое удаление может препятствовать реакции с другими содержащими цистеин белками, имеющимися в клетке-хозяине, используемой для продукции молекул по этому изобретению. Для этой цели можно укорачивать содержащий цистеин фрагмент на N-конце или можно удалять остатки цистеина или заменять их другими аминокислотами (например, аланином, серилом). Даже когда остатки цистеина удалены, одноцепочечные Fc-домены могут по-прежнему образовывать димерный Fc-домен, который связан нековалентно;

2) нативный Fc модифицирован в целях его большей совместимости с выбранной клеткой-хозяином. Например, можно удалять последовательность PA вблизи N-конца типичного нативного Fc, которую может распознавать гидролизующий фермент в *E. coli*, такой как пролиноминопептидаза. Также можно добавлять N-концевой остаток метионина, особенно когда молекула экспрессируется рекомбинантно в бактериальной клетке, такой как *E. coli*;

3) участок с N-конца нативного Fc удален для предотвращения N-концевой гетерогенности при экспрессии в выбранной клетке-хозяине. Для этой цели можно удалять любые из первых 20 аминокислотных остатков на N-конце;

4) удалены один или несколько участков гликозилирования. Остатки, которые обычно гликозилируются (например, аспарагин), могут обеспечивать цитолитический ответ. Такие остатки можно удалять или заменять другими негликозилированными остатками (например, аланином);

5) удалены участки, вовлеченные во взаимодействие с комплементом, такие как участок связывания C1q. Например, можно удалять или заменять последовательность ЕКК IgG1 человека. Привлечение комплемента может не быть преимущественным для молекул, которые можно использовать в способах по этому изобретению, и, таким образом, его можно избегать с помощью такого варианта Fc;

6) удалены участки, которые нарушают связывание с Fc-рецепторами, отличными от рецептора "спасения". Нативный Fc может обладать участками для взаимодействия с определенными лейкоцитами, которые не являются необходимыми для слитых молекул связывающего нейтрокин-альфа пептида, которые можно использовать в способах по этому изобретению, и, таким образом, их можно удалять;

7) удален участок ADCC. Участки ADCC известны в данной области; см., например, Molec. Immunol. 29 (5): 633-9 (1992) в отношении участков ADCC в IgG1. Эти участки также не являются необходимыми для слитых молекул, которые можно использовать в способах по этому изобретению, и, таким образом, их можно удалять;

8) когда источником нативного Fc является нечеловеческое антитело, нативный Fc можно гуманизировать. Как правило, для гуманизации нативного Fc выбранные остатки в нечеловеческом нативном Fc заменяют остатками, которые в норме встречаются в нативном человеческом Fc. Способы гуманизации антитела хорошо известны в данной области.

Альтернативным носителем для связывающих APRIL пептидов, которые можно использовать в способах по этому изобретению, может быть белок, полипептид, пептид, антитело, фрагмент антитела или низкомолекулярная молекула (например, соединение пептидомиметика), способная связываться с рецептором "спасения". Например, в качестве носителя можно использовать полипептид, как описано в патенте США № 5739277. Также пептиды можно выбирать посредством фагового дисплея или скрининга РНК-пептид в отношении связывания с рецептором "спасения". Такие связывающие рецептор "спасения" соединения также включены в значение термина "носитель" и их можно использовать для связывающих APRIL пептидов, которые можно использовать в способах по этому изобретению. Такие носители следует выбирать для повышения времени полужизни (например, избегая последовательностей, распознаваемых протеазами) и снижения иммуногенности (например, отдавая предпочтение неиммуногенным последовательностям, как обнаружено при гуманизации антитела).

Как указано выше, также в связывающих APRIL пептидах, которые можно использовать в способах по этому изобретению, можно использовать полимерные носители. В настоящее время доступны различные способы присоединения химических групп, пригодных в качестве носителей, см., например, международную публикацию по договору о патентной кооперации (РСТ) WO 96/11953, включенной в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. В этой публикации РСТ описано, помимо прочего, селективное присоединение растворимых в воде полимеров к N-концу белков.

В конкретном варианте осуществления предпочтительным полимерным носителем является полиэтиленгликоль (PEG). Группа PEG может обладать любой пригодной молекулярной массой и она может быть линейной или разветвленной. Средняя молекулярная масса PEG предпочтительно будет варьировать от приблизительно 2 до приблизительно 100 кДа, более предпочтительно от приблизительно 5 до приблизительно 50 кДа, наиболее предпочтительно от приблизительно 5 до приблизительно 10 кДа. Группы PEG, главным образом, будут присоединять к связывающим APRIL пептидам, которые можно использовать в способах по этому изобретению посредством ацилирования или восстановительного алкилирования через реакционноспособную группу на группе PEG (например, альдегидную, amino, тиольную или сложноэфирную группу) реакционноспособной группы соединения по настоящему изобретению (например, альдегидной, amino или сложноэфирной группы).

Пригодная стратегия для пегилирования синтетических пептидов состоит из объединения через образование конъюгирующей связи в растворе пептида и группы PEG, каждый из которых обладает определенной функциональной группой, которая является взаимно реакционноспособной в отношении другой. Пептиды можно легко получать общепринятым твердофазным синтезом. Пептиды "предварительно активируют" пригодной функциональной группой в конкретном участке. Предшественников очищают и полностью охарактеризовывают перед реакцией с группой PEG. Лигирование пептида с PEG, как правило, происходит в водной фазе, и его мониторинг можно легко проводить посредством обращенно-фазовой аналитической ВЭЖХ. Пегилированные пептиды можно легко очищать препаративной ВЭЖХ и охарактеризовывать аналитической ВЭЖХ, анализом аминокислот и лазерной десорбционной масс-спектрометрией.

Полисахаридные полимеры представляют собой другой тип растворимого в воде полимера, который можно использовать для связывающих APRIL пептидов, которые можно использовать в способах по этому изобретению. Декстраны представляют собой полисахаридные полимеры, состоящие из отдельных субъединиц глюкозы, главным образом, связанных α 1-6-связями. Сам декстран доступен во многих диапазонах молекулярной массы и широко доступен с молекулярной массой от приблизительно 1 до приблизительно 70 кДа. Декстран является растворимым в воде полимером, пригодным для применения в

связывающих APRIL пептидах, которые можно использовать в способах по этому изобретению, в качестве отдельного носителя или в сочетании с другим носителем (например, Fc). См., например, WO 96/11953 и WO 96/05309. Описано применение декстрана, конъюгированного с терапевтическими или диагностическими иммуноглобулинами; см., например, публикацию европейского патента № 0315456, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Декстран массой от приблизительно 1 до приблизительно 20 кДа является предпочтительным, когда декстран используют в качестве носителя в соответствии с настоящим изобретением.

В конкретном варианте осуществления связывающие APRIL пептиды, которые можно использовать в способах по этому изобретению, необязательно включают "линкер". В случае его наличия, его химическая структура не является важной, поскольку он служит, главным образом, в качестве спейсера. Линкер предпочтительно состоит из аминокислот, связанных друг с другом пептидными связями. Таким образом, в предпочтительных вариантах осуществления линкер состоит из от 1 до 30 аминокислот, связанных пептидными связями, где аминокислоты выбраны из 20 встречающихся в природе аминокислот. Некоторые из этих аминокислот могут быть гликозилированными, как хорошо понятно специалисту в данной области. В более предпочтительном варианте осуществления от 1 до 20 аминокислот выбирают из глицина, аланина, пролина, аспарагина, глутамина и лизина. Более предпочтительно линкер состоит из большинства аминокислот, которые не являются пространственно затрудненными, таких как глицин и аланин. Таким образом, предпочтительными линкерами являются полиглицины (в частности (Gly)₄, (Gly)₅), поли(Gly-Ala) и полиаланины. Предпочтительными линкерами являются аминокислотные линкеры, содержащие более 5 аминокислот, с пригодными линкерами, имеющими вплоть до приблизительно 500 аминокислот, выбранных из глицина, аланина, пролина, аспарагина, глутамина, лизина, треонина, серина или аспартата. Линкеры приблизительно из от 20 до 50 аминокислот являются наиболее предпочтительными.

Непептидные линкеры также пригодны для связывающих APRIL пептидов, которые можно использовать в способах по этому изобретению. Например, можно использовать алкильные линкеры, такие как -NH-(CH₂)_n-C(O)-, где n=2-20. Эти алкильные линкеры можно далее замещать любыми пространственно незатрудненными группами, такими как низший алкил (например, C₁-C₆), низший ацил, галоген (например, Cl, Br), CN, NH₂, фенил и т.д.

I. Антисмысловые молекулы и siRNA.

В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой антисмысловую РНК, каталитическую РНК (рибозим) или короткую интерферирующую РНК (siRNA), которая нацелена на нейтрокин-альфа, APRIL или рецепторы для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA и BAFF-R). В конкретном варианте осуществления антисмысловые молекулы, направленные против нейтрокина-альфа, APRIL, TACI, BCMA или BAFF-R, можно использовать в способах по этому изобретению. Технологию антисмысловых молекул можно использовать для контроля экспрессии гена через антисмысловую ДНК или РНК или через образование тройной спирали. Способы антисмысловых молекул описаны, например, в Okano, J. Neurochem. 56: 560 (1991); "Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988). Образование тройной спирали описано, например, в Lee et al., Nucleic Acids Research 6: 3073 (1979); Cooney et al., Science 241: 456 (1988) и Dervan et al., Science 251: 1360 (1991). Способы основаны на связывании полинуклеотида с комплементарной ДНК или РНК. Например, 5'-кодирующую часть полинуклеотида, который кодирует внеклеточный домен полипептида по настоящему изобретению, можно использовать для разработки антисмыслового олигонуклеотида РНК длиной приблизительно от 10 до 40 пар оснований. Олигонуклеотид ДНК разрабатывают, чтобы он был комплементарен участку гена, вовлеченному в транскрипцию, препятствуя посредством этого транскрипции и продукции нейтрокина-альфа, APRIL, TACI, BCMA или BAFF-R. Антисмысловой олигонуклеотид РНК гибридизуется с мРНК *in vivo* и блокирует трансляцию молекулы мРНК в полипептид нейтрокин-альфа, APRIL, TACI, BCMA или BAFF-R. Олигонуклеотиды, описанные выше, также можно доставлять к клеткам, чтобы антисмысловая РНК или ДНК могла экспрессироваться *in vivo* для ингибирования продукции нейтрокина-альфа, APRIL, TACI, BCMA или BAFF-R.

В одном варианте осуществления антисмысловая нуклеиновая кислота для нейтрокина-альфа, APRIL, TACI, BCMA или BAFF-R, которую можно использовать в способах по этому изобретению, продуцируется внутриклеточно посредством транскрипции с экзогенной последовательности. Например, вектор или его часть транскрибируют с получением антисмысловой нуклеиновой кислоты (РНК), которую можно использовать в способах по этому изобретению. Такой вектор может содержать последовательность, кодирующую антисмысловую нуклеиновую кислоту для нейтрокина-альфа, APRIL, TACI, BCMA или BAFF-R. Такой вектор может оставаться эписомальным или он может встраиваться в хромосому при условии, что он может транскрибироваться с продукцией требуемой антисмысловой РНК. Такие векторы можно конструировать способами технологии рекомбинантных ДНК, стандартными в данной области. Векторы могут представлять собой плазмидные, вирусные или другие векторы, известные в данной области, используемые для репликации и экспрессии в клетках позвоночных. Экспрессия последовательности, кодирующей нейтрокин-альфа, APRIL, TACI, BCMA или BAFF-R или их фрагменты, может происходить посредством любого промотора, о котором известно в данной области, что он рабо-

тает в клетках позвоночных, предпочтительно человека. Такие промоторы могут быть индуцибельными или конститутивными. Такие промоторы включают, но не ограничиваются ими, ранний промоторный участок SV40 (Bernoist and Chambon, *Nature* 29: 304-310 (1981), промотор, находящийся на 3'-длинном концевом повторе вируса саркомы Payca (Yamamoto et al., *Cell* 22:787-797 (1980), промотор тимидина вируса герпеса (Wagner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 1441-1445 (1981), регуляторные последовательности гена металлотионеина (Brinster, et al., *Nature* 296: 39-42 (1982)) и т.д.

Антисмысловые нуклеиновые кислоты, которые можно использовать в способах по этому изобретению, содержат последовательность, комплементарную по меньшей мере части РНК-транскрипта гена нейтрокина-альфа, APRIL, TACI, BCMA или BAFF-R. Однако абсолютная комплементарность, хотя и является предпочтительной, не является необходимой. Последовательность, "комплементарная по меньшей мере части РНК", упоминаемая в настоящем описании, означает последовательность, обладающую достаточной комплементарностью для возможности гибридизации с РНК, образуя стабильный дуплекс; таким образом, в случае двухцепочечных антисмысловых нуклеиновых кислот для нейтрокина-альфа, APRIL, TACI, BCMA или BAFF-R можно тестировать одну цепь дуплекса ДНК или можно анализировать образование триплекса. Способность к гибридизации будет зависеть как от степени комплементарности, так и от длины антисмысловой нуклеиновой кислоты. Как правило, чем больше гибридизующаяся нуклеиновая кислота, тем больше она может содержать ошибок спаривания основания с РНК нейтрокина-альфа, APRIL, TACI, BCMA или BAFF-R и, тем не менее, образовывать стабильный дуплекс (или триплекс в зависимости от обстоятельств). Специалист в данной области может определить допустимую степень несоответствия спаривания оснований с использованием стандартных способов определения температуры плавления гибридизационного комплекса.

Олигонуклеотиды, комплементарные 5'-концу транскрипта, например 5'-нетранслируемой последовательности вплоть до иницирующего кодона AUG и включая его, должны действовать наиболее эффективно в отношении ингибирования трансляции. Однако было показано, что последовательности, комплементарные 3'-нетранслируемым последовательностям мРНК, также являются эффективными в отношении ингибирования трансляции мРНК. См., главным образом, Wagner, R., 1994, *Nature* 372: 333-335. Таким образом, в случае подхода антисмысловых молекул для ингибирования трансляции эндогенной мРНК нейтрокина-альфа, APRIL, TACI, BCMA или BAFF-R можно использовать олигонуклеотиды, комплементарные либо 5'-, либо 3'-нетранслируемым некодирующим участкам нейтрокина-альфа (SEQ ID NO: 1), APRE, (SEQ ID NO: 3), TACI (SEQ ID NO: 5), BCMA (SEQ ID NO: 7) или BAFF-R (SEQ ID NO: 9). Олигонуклеотиды, комплементарные 5'-нетранслируемой области мРНК, должны включать последовательность, комплементарную иницирующему кодону AUG. Антисмысловые олигонуклеотиды, комплементарные кодирующим участкам мРНК, являются менее эффективными ингибиторами трансляции, но их можно использовать в соответствии со способами по этому изобретению. Независимо от конструирования для гибридизации с 5'-, 3'-участка или кодирующего участка мРНК нейтрокина-альфа, APRIL, TACI, BCMA или BAFF-R, антисмысловые нуклеиновые кислоты должны обладать длиной по меньшей мере шесть нуклеотидов, и они предпочтительно представляют собой олигонуклеотиды с длиной, варьирующей от 6 до приблизительно 50 нуклеотидов. В конкретных аспектах олигонуклеотид представляет собой по меньшей мере 10 нуклеотидов, по меньшей мере 17 нуклеотидов, по меньшей мере 25 нуклеотидов или по меньшей мере 50 нуклеотидов.

Полинуклеотиды, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут представлять собой ДНК или РНК или химерные смеси или их производные или модифицированные варианты, одноцепочечные или двухцепочечные. Олигонуклеотид может быть модифицирован в группе основания, в группе сахара или в фосфатном остове, например, для повышения стабильности молекулы, гибридизации и т.д. Олигонуклеотид может включать другие присоединенные группы, такие как пептиды (например, для нацеливания на рецепторы клетки-хозяина *in vivo*) или средства, упрощающие транспорт через клеточную мембрану (см., например, Letsinger et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 6553-6556; Lemaitre et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 648-652 (1987); публикацию PCT № WO 88/09810, опубликованную 15 декабря 1988 г.) или гематоэнцефалический барьер (см., например, публикацию PCT WO 89/10134, опубликованную 25 апреля 1988 г.), активируемые гибридизацией расщепляющие агенты (см., например, Krol et al., *BioTechniques* 6:958-976 (1988)) или интеркалирующие агенты (см., например, Zon, *Pharm. Res.* 5: 539-549 (1988)). Для этой цели олигонуклеотид можно конъюгировать с другой молекулой, например пептидом, активируемым гибридизацией поперечно-сшивающим агентом, транспортирующим агентом, активируемым гибридизацией расщепляющим агентом и т.д.

Антисмысловой олигонуклеотид, который можно использовать в способах по этому изобретению, может содержать по меньшей мере одну модифицированную группу основания, которая выбрана из группы, включающей, но не ограничивающейся ими, 5-фторурацил, 5-бром урацил, 5-хлорурацил, 5-иодурацил, гипоксантин, ксантин, 4-ацетилцитозин, 5-(карбоксигидроксиметил)урацил, 5-карбоксиметиламинометил-2-тиоурidin, 5-карбоксиметиламинометилурацил, дигидроурацил, бета-D-галактозилквеозин, инозин, N6-изопентениладенин, 1-метилгуанин, 1-метилюридин, 2,2-диметилгуанин, 2-метиладенин, 2-метилгуанин, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, N6-аденин, 7-метилгуанин, 5-метиламинометилурацил, 5-метоксиаминометил-2-тиоурацил, бета-D-маннозилквеозин, 5-метоксикар-

боксиметилурацил, 5-метоксиурацил, 2-метилтио-N6-изопентениладенин, урацил-5-оксиуксусную кислоту (v), вибутоксозин, псевдоурацил, квеозин, 2-тиоцитозин, 5-метил-2-тиоурацил, 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 5-метилурацил, метиловый сложный эфир урацил-5-оксиуксусной кислоты, урацил-5-оксиуксусную кислоту (v), 5-метил-2-тиоурацил, 3-(3-амино-3-N-2-карбоксипропил)урацил (аср3)w и 2,6-диаминопурин.

Антисмысловой олигонуклеотид, который можно использовать в способах по этому изобретению, также может содержать по меньшей мере одну модифицированную группу сахара, выбранную из группы, включающей, но не ограничивающейся ими, арабинозу, 2-фторарабинозу, ксилулозу и гексозу.

В другом варианте осуществления антисмысловой олигонуклеотид, который можно использовать в способах по этому изобретению, содержит по меньшей мере один модифицированный фосфатный остов, выбранный из группы, включающей, но не ограничивающейся ими, фосфоротиоат, фосфородитиоат, фосфорамидотиоат, фосфорамидат, фосфордиамидат, метилфосфонат, алкилфосфотриэфир и формула или их аналог.

В другом варианте осуществления антисмысловой олигонуклеотид, который можно использовать в способах по этому изобретению, представляет собой альфа-аномерный олигонуклеотид. Альфа-аномерный олигонуклеотид образует специфичные двухцепочечные гибриды с комплементарной РНК, в которых в противоположность обычным бета-элементам цепи параллельны друг другу (Gautier et al., Nucl. Acids Res. 15: 6625-6641 (1987)). Олигонуклеотид представляет собой 2-О-метилрибонуклеотид (Inoue et al., Nucl. Acids Res. 15: 6131-6148 (1987)), или химерный РНК-ДНК-аналог (Inoue et al., FEBS Lett. 215: 327-330 (1997)).

Полинуклеотиды, которые можно использовать в способах по этому изобретению, можно синтезировать стандартными способами, известными в данной области, например с использованием автоматизированного устройства для синтеза ДНК (такого как коммерчески доступного от Biosearch, Applied Biosystems, и т.д.). В качестве примеров фосфоротиоатные олигонуклеотиды можно синтезировать способом Stein et al. (Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988)), метилфосфонатные олигонуклеотиды можно получать с использованием полимерных подложек из стекла с контролируемым размером пор (Sarin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 7448-7451 (1988)) и т.д.

Несмотря на то что можно использовать антисмысловые нуклеотиды, комплементарные последовательности кодирующего участка нейтрокина-альфа, APRIL, TACI, BCMA или BAFF-R, последовательности, комплементарные транскрибируемому нетранслируемому участку, являются наиболее предпочтительными для применения в способах по этому изобретению.

В конкретном варианте осуществления антагонисты нейтрокина-альфа, которые можно использовать в способах по этому изобретению, также включают каталитическую РНК, или рибозим (см., например, международную публикацию PCT WO 90/11364, опубликованную 4 октября 1990 г.; Sarver et al., Science 247: 1222-1225 (1990)), направленный против нейтрокина-альфа, APRIL, TACI, BCMA или BAFF-R. Несмотря на то что для разрушения мРНК нейтрокина-альфа, APRIL, TACI, BCMA или BAFF-R можно использовать рибозимы, которые расщепляют мРНК в последовательностях сайт-специфичного распознавания, применение рибозимов типа "головки молотка" является предпочтительным для применения в способах по этому изобретению. Рибозимы типа "головки молотка" расщепляют мРНК в участках, определяемых фланкирующими участками, которые образуют пары комплементарных оснований с мРНК-мишенью. Единственным необходимым условием является, чтобы мРНК-мишень обладала следующей последовательностью из двух оснований: 5'-UG-3'. Конструирование и получение рибозимов типа "головки молотка" хорошо известно в данной области и описано более подробно в Haseloff and Gerlach, Nature 334:585-591 (1988). В нуклеотидной последовательности нейтрокина-альфа, APRIL, TACI, BCMA или BAFF-R существует множество потенциальных участков расщепления для рибозима типа "головки молотка". Предпочтительно рибозим конструируют таким образом, чтобы участок распознавания для расщепления был расположен вблизи 5'-конца мРНК нейтрокина-альфа, APRIL, TACI, BCMA или BAFF-R; т.е. для повышения эффективности и минимизации внутриклеточного накопления нефункциональных мРНК-транскриптов.

Как и в подходе антисмысловых молекул, рибозимы, которые можно использовать в способах по этому изобретению, могут состоять из модифицированных олигонуклеотидов (например, для повышенной стабильности, нацеливания и т.д.), и они должны быть доставлены к клеткам, которые экспрессируют нейтрокин-альфа, APRIL, TACI, BCMA или BAFF-R in vivo. Конструкции ДНК, кодирующие рибозим, можно вносить в клетку таким же образом, как описано выше для внесения антисмысловой кодирующей ДНК. Предпочтительный способ доставки включает применение конструкции ДНК, "кодирующей" рибозим под контролем сильного конститутивного промотора, например, такого как промотор pol III или pol II, так что трансфицированные клетки будут продуцировать достаточные количества рибозима для разрушения эндогенных транскриптов нейтрокина-альфа, APRIL, TACI, BCMA или BAFF-R и ингибирования трансляции. Поскольку рибозимы в отличие от антисмысловых молекул являются каталитическими, для эффективности необходима более низкая внутриклеточная концентрация.

В конкретном варианте осуществления в способах по этому изобретению можно использовать короткую интерферирующую РНК, направленную против нейтрокина-альфа, APRIL, TACI, BCMA или

BAFF-R. Технологию siRNA можно использовать для контроля экспрессии гена посредством индукции в клетках РНК-индуцируемого комплекса сайленсинга (RISC). Способы siRNA описаны, например, в Hamilton A.J. and Baulcombe D.C. *Science*. 1999 Oct 29; 286 (5441): 950-2; Elbashir S.M., et al. *Nature*. 2001 May 24; 411(6836): 494-8 и Hanon, Gregory J. and Rossi, John J. *Nature* 431, 371-378 (2004). Способы основаны на введении в клетку короткой двухцепочечной РНК (как правило, из 20-25 нуклеотидов). Двухцепочечная РНК расплетается и цепи разделяются. Затем отдельная цепь РНК встраивается в RISC. Затем RISC осуществляет специфичное в отношении последовательности расщепление РНК, что приводит к подавлению трансляции. Например, кодирующий участок полинуклеотида, который кодирует полипептид нейтрокина-альфа, APRIL, TACI, BCMA или BAFF-R, можно использовать для конструирования олигонуклеотида siRNA длиной приблизительно от 20 до 25 нуклеотидов. Олигонуклеотид ДНК конструируют с соответствующим фрагментом из 20-25 нуклеотидов спейсером приблизительно из 9 нуклеотидов и обратной комплементарной последовательностью для выбранного нуклеотидного фрагмента. Можно ожидать, что РНК-транскрипт, продуцируемый с этой конструкции, будет самостоятельно собираться в шпильчатую петлю. Доставка РНК шпильчатой петли в клетку приводит к процессингу РНКазой, Dicer, с образованием короткой двухцепочечной siRNA. Встраивание цепи этой siRNA в эффекторный комплекс RISC приводит к расщеплению мРНК, на которую нацелена siRNA в целях ингибирования продукции нейтрокина-альфа, APRIL, TACI, BCMA или BAFF-R.

В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота siRNA для нейтрокина-альфа, APRIL, TACI, BCMA или BAFF-R, которую можно использовать в способах по этому изобретению, продуцируется внутриклеточно посредством транскрипции с экзогенной последовательности. Например, вектор или его часть транскрибируется, продуцируя siRNA, которую можно использовать в способах по этому изобретению. Такой вектор может содержать последовательность, кодирующую нуклеиновую кислоту siRNA для нейтрокина-альфа, APRIL, TACI, BCMA или BAFF-R. Такие векторы можно конструировать способами технологии рекомбинантных ДНК, стандартными в данной области. Векторы могут представлять собой плазмидные, вирусные или другие векторы, известные в данной области, используемые для репликации и экспрессии в клетках позвоночных. Транскрипцию последовательности, кодирующей siRNA для нейтрокина-альфа, APRIL, TACI, BCMA или BAFF-R, как правило, проводят с использованием промотора РНК-полимеразы III (например, U6 или H1), который, как правило, направляет транскрипцию малых ядерных РНК (snRNA).

Модуляторы В-клеток

В дополнение к рецепторам для нейтрокина-альфа и APRIL В-лимфоциты экспрессируют множество молекул клеточной поверхности, которые функционируют, информируя В-клетки о внеклеточном микроокружении, и действуют в качестве трансмембранных сигналов, положительно и отрицательно регулирующих функцию и выживание В-клеток. Среди этих рецепторов CD19, CD20 и CD22 были идентифицированы в качестве перспективных мишеней для терапевтического вмешательства.

CD20 представляет собой интегральный мембранный белок, который действует в комплексе в качестве кальциевого канала. Ингибиторы кальциевого канала CD20 нарушают гомеостаз Ca^{2+} и прогрессию клеточного цикла. В конкретном варианте осуществления в способах по настоящему изобретению можно использовать антитело против CD20. В предпочтительном варианте осуществления антитело против CD20, которое можно использовать в способах по этому изобретению, представляет собой Rituxan® (ритуксимаб). В другом предпочтительном варианте осуществления антитело против CD20, которое можно использовать в способах по этому изобретению, представляет собой TRU-015. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело против CD20, которое можно использовать в способах по этому изобретению, представляет собой окрелизумаб (PRO70769). В другом предпочтительном варианте осуществления антитело против CD20, которое можно использовать в способах по этому изобретению, представляет собой IMMU-106. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело против CD20, которое можно использовать в способах по этому изобретению, представляет собой HuMax-CD20.

CD22 является членом семейства siglec связывающих сialовую кислоту белков, встречающихся в различных клетках, включая В-лимфоциты. Взаимодействие CD22 со множеством цис- и трансуглеводных лигандов приводит к регуляции различных аспектов развития, пролиферации и активации В-клеток. В конкретном варианте осуществления антитело против CD22 можно использовать в способах по настоящему изобретению. В предпочтительном варианте осуществления антитело против CD22, которое можно использовать в способах по этому изобретению, представляет собой эпратузумаб.

Другие иммуномодулирующие средства

В конкретном варианте осуществления способы по настоящему изобретению можно применять с одним или несколькими из следующих лекарственных средств: CellCept (микофенолата мофетил; MMF), Orenicia® (абатацепт; CTLA4-Ig), Riguent™ (абетимус натрий; LJP 394), Prestara™ (прасерон), Edratide (TV-4710), Actemra® (тоцилизумаб; атлизумаб), VX-702, TRX 1, IPP-201101, ABR-215757, агонист сфингозин-1-фосфата-1 (S1P1), HuMax-Inflam™ (MDX 018), MEDI-545 (MDX-1103/1333), RhuDex®, дезоксиспергуалин, ENBREL™ (этанерцепт), антитело против TNF, антитело против интерферона-альфа.

Группы пациентов

Как описано в настоящем описании, данные клинического испытания, в котором пациентов с волчанкой лечили антителом, которое нейтрализует белок нейтрокина-альфа, показали значительное смягчение симптомов, обусловленных волчанкой у пациентов, обладающих титром ANA 1:80 или выше, и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл (пример 1). Удивительно, статистически значимые улучшения клинических результатов, определяющих активность заболевания (такие как снижение показателя SELENA SLEDAI, объясненного более подробно ниже), были получены только для группы пациентов, в противоположность полной совокупности пациентов, вовлеченных в клиническое испытание. Таким образом, настоящее изобретение относится к идентификации подгрупп пациентов, которые обладают большей вероятностью ответа на лечение иммуномодулирующим средством, таким как антагонист нейтрокина-альфа.

Кроме того, как описано в настоящем описании, системная красная волчанка (SLE) представляет собой крайне гетерогенное заболевание, которое трудно точно диагностировать вследствие широкой природы симптомов, которыми может обладать пациент, и того факта, что многие симптомы, обусловленные волчанкой, также наблюдают при ряде других аутоиммунных заболеваний. Таким образом, один вариант осуществления настоящего изобретения относится к способу лечения пациентов, которые обладают титром ANA 1:80 или выше и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл, в плазме или сыворотке их крови, включающему введение терапевтически эффективного количества антагониста нейтрокина-альфа или другого иммуномодулирующего средства, известного в данной области и/или описанного в настоящем описании, независимо от диагноза заболевания. Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к способу лечения пациентов, которые обладают титром ANA 1:80 или выше и/или уровнем антител дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл, в плазме или сыворотке их крови, включающему введение терапевтически эффективного количества антагониста нейтрокина-альфа или другого иммуномодулирующего средства, известного в данной области и/или описанного в настоящем описании, независимо от диагноза заболевания, и далее включающему проведение определения, что пациенты обладают титром ANA 1:80 или выше и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл, в плазме или сыворотке их крови, перед введением иммуномодулирующего средства.

В следующих вариантах осуществления пациенты, которые обладают титром ANA 1:80 или выше и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл, в плазме или сыворотке их крови, имеют аутоиммунное заболевание, которое представляет собой не SLE. В следующих вариантах осуществления пациенты, которые обладают титром ANA 1:80 или выше и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл, в плазме или сыворотке их крови, имеют ревматоидный артрит. В следующих вариантах осуществления пациенты, которые обладают титром ANA 1:80 или выше и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл, в плазме или сыворотке их крови, имеют синдром Шегрена. В следующих вариантах осуществления пациенты, которые обладают титром ANA 1:80 или выше и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл, в плазме или сыворотке их крови, имеют склеродермию. В следующих вариантах осуществления пациенты, которые обладают титром ANA 1:80 или выше и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл, в плазме или сыворотке их крови, имеют полимиозит-дерматомиозит. В следующих вариантах осуществления пациенты, которые обладают титром ANA 1:80 или выше и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл, в плазме или сыворотке их крови, имеют синдром Фелти. В следующих вариантах осуществления пациенты, которые обладают титром ANA 1:80 или выше, и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл, в плазме или сыворотке их крови, имеют смешанное заболевание соединительной ткани. В следующих вариантах осуществления пациенты, которые обладают титром ANA 1:80 или выше и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл, в плазме или сыворотке их крови, имеют синдром Рейно. В следующих вариантах осуществления пациенты, которые обладают титром ANA 1:80 или выше и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл, в плазме или сыворотке их крови, имеют ювенильный хронический артрит.

Более того, следует отметить, что в обоих клинических испытаниях 2 фазы с использованием антитела, которое нейтрализует белок нейтрокина-альфа, для лечения пациентов с системной красной волчанкой и ревматоидного артрита (см. примеры 1 и 3), было выявлено, что пациенты с положительным по аутоантителам заболеванием на исходном уровне обладали большей вероятностью ответа на лечение. Как описано в настоящем описании, у пациентов со SLE, которые обладают титром ANA 1:80 или выше и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 МЕ/мл, на исходном уровне, был показан более выраженный ответ, в целом, чем у пациентов с SLE, у которых титр ANA составлял менее 1:80 и уровень антитела против дцДНК составлял менее 30 МЕ/мл. Аналогично, при ревматоидном артрите было выявлено, что у пациентов, которые были положительными по ревматоидному фактору [RF] или антителам против циклического цитруллинированного пептида [CCP] на исходном уровне, был показан более выраженный ответ, в целом, чем у пациентов с ревматоидным артритом, которые не были положительными по ревматоидному фактору [RF] или антителам против циклического цитруллиниро-

ванного пептида [ССР] на исходном уровне.

Таким образом, в другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ лечения пациента, который является положительным по ревматоидному фактору [RF] и/или антителам против циклического цитруллинированного пептида [ССР] на исходном уровне, включающий введение терапевтически эффективного количества антагониста нейтрокина-альфа или другого иммуномодулирующего средства, известного в данной области и/или описанного в настоящем описании, независимо от диагноза заболевания. Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к способу лечения пациента, который является положительным по ревматоидному фактору [RF] и/или антителам против циклического цитруллинированного пептида [ССР] на исходном уровне, включающему введение терапевтически эффективного количества антагониста нейтрокина-альфа или другого иммуномодулирующего средства, известного в данной области и/или описанного в настоящем описании, независимо от диагноза заболевания, и далее включающему проведение определения, что пациент является положительным по ревматоидному фактору [RF] и/или антителам против циклического цитруллинированного пептида [ССР] на исходном уровне, перед введением иммуномодулирующего средства. В конкретных вариантах осуществления пациента считают положительным по ревматоидному фактору, если он обладает уровнем ревматоидного фактора ≥ 12 МЕ/мл в его/ее плазме крови и/или сыворотке. В конкретных вариантах осуществления пациента считают положительным по антителу против ССР, если он обладает уровнем антитела против ССР ≥ 10 единиц в его/ее плазме крови и/или сыворотке.

В следующем аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ лечения пациента, который является положительным по аутоантителам на исходном уровне, включающий введение терапевтически эффективного количества антагониста нейтрокина-альфа или другого иммуномодулирующего средства, известного в данной области и/или описанного в настоящем описании, независимо от диагноза заболевания. Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к способу лечения пациента, который является положительным по аутоантителам на исходном уровне, включающему введение терапевтически эффективного количества антагониста нейтрокина-альфа или другого иммуномодулирующего средства, известного в данной области и/или описанного в настоящем описании, независимо от диагноза заболевания, и далее включающему проведение определения, что пациент является положительным по аутоантителу на исходном уровне, перед введением иммуномодулирующего средства.

Получение иммуномодулирующих средств

Способы получения и/или выделения иммуномодулирующих средств, которые можно использовать в настоящем изобретении, известны специалистам в соответствующих областях. Ниже кратко рассмотрены способы, доступные для получения иммуномодулирующих средств с белковой структурой (например, антител против нейтрокина-альфа, связывающих нейтрокин-альфа пептидов и полипептидов, рецепторных белков для нейтрокина-альфа, а также фрагментов и вариантов вышеупомянутых полипептидов).

В одном варианте осуществления полинуклеотид, кодирующий иммуномодулирующий белок, встраивают в вектор (например, вектор для клонирования или экспрессирующий вектор). Вектор может представлять собой, например, фаговый, плазмидный, вирусный или ретровирусный вектор. Ретровирусные векторы могут быть компетентными по репликации или дефектными по репликации. В последнем случае размножение вируса, главным образом, будет происходить только в комплементирующих клетках-хозяевах. Полинуклеотиды, кодирующие иммуномодулирующий белок, можно связывать с вектором, содержащим селективный маркер, для размножения в хозяине. Введение конструкции вектора в клетку-хозяин можно проводить известными в данной области способами, которые включают, но не ограничиваются ими, трансфекцию посредством фосфата кальция, опосредуемую DEAE-декстраном трансфекцию, опосредуемую катионными липидами трансфекцию, электропорацию, трансдукцию, инфекцию или другие способы. Такие способы описаны во многих стандартных практикумах, таких как Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology* (1986).

Главным образом, рекомбинантные экспрессирующие векторы будут включать ориджины репликации и селективные маркеры, допускающие трансформацию клетки-хозяина, например ген устойчивости к ампициллину *E. coli* и ген *TRP1 S. cerevisiae*, и промотор, источником которого является высокоэкспрессируемый ген для направления транскрипции расположенной ниже структурной последовательности. Источником таких промоторов могут быть опероны, кодирующие гликолитические ферменты, такие как 3-фосфоглицераткиназа (PGK), α -фактор, кислая фосфатаза, или белки теплового шока среди прочих. Гетерологичную структурную последовательность встраивают в рамке считывания с последовательностями инициации и терминации трансляции и предпочтительно лидерной последовательностью, способной направлять секрецию транслируемого белка в периплазматическое пространство или внеклеточную среду. Необязательно, гетерологичная последовательность может кодировать слитый белок, включающий N-концевой пептид для идентификации, обеспечивающий требуемые свойства, например стабилизацию или упрощенную очистку экспрессируемого рекомбинантного продукта.

В одном варианте осуществления полинуклеотид, кодирующий иммуномодулирующий белок, функционально связан с пригодным гетерологичным регуляторным элементом (например, промотором или энхансером), таким как промотор фага лямбда PL, промоторы *lac*, *trp*, *phoA* и *tac* *E. coli*, ранний и

поздний промоторы SV40 и промоторы ретровирусных LTR в качестве нескольких примеров. Другие пригодные промоторы будут известны квалифицированному специалисту.

Как указано, экспрессирующие векторы предпочтительно будут включать по меньшей мере один селективный маркер. Такие маркеры включают дигидрофолатредуктазу, G418 или ген устойчивости к неомицину для культуры эукариотических клеток и гены устойчивости к тетрациклину, канамицину или ампициллину для культивирования в *E. coli* и других бактериях. Репрезентативные примеры пригодных хозяев включают, но не ограничиваются ими, бактериальные клетки, такие как клетки *E. coli*, *Streptomyces* и *Salmonella typhimurium*; клетки грибов, такие как клетки дрожжей (например, *Saccharomyces cerevisiae* или *Pichia pastoris* (регистрационный номер ATCC 201178)); клетки насекомых, такие как клетки *Drosophila S2* и *Spodoptera Sf9*; клетки животных, такие как клетки CHO, COS, 293 и меланомы Bowes; и клетки растений. Пригодные культуральные среды и условия культивирования описанных выше клеточных хозяев известны в данной области.

Клетка-хозяин может быть клеткой высших эукариот, такой как клетка млекопитающего (например, полученная от человека клетка), или клеткой низших эукариот, такой как клетка дрожжей, или клетка-хозяин может представлять собой прокариотическую клетку, такую как бактериальная клетка. Можно выбирать клетку-хозяин, которая модулирует экспрессию последовательностей встроенных генов или осуществляет модификацию или процессинг продукта гена конкретным требуемым образом. Экспрессия с определенных промоторов может повышаться в присутствии определенных индукторов; таким образом, можно контролировать экспрессию полученного способами генетической инженерии полипептида. Более того, различные клетки-хозяева обладают свойствами и определенными механизмами для трансляционного и посттрансляционного процессинга и модификации (например, фосфорилирования, расщепления) белков. Можно выбирать клеточные линии, пригодные для обеспечения требуемых модификаций и процессинга чужеродного экспрессируемого белка. Выбор пригодных векторов и промоторов для экспрессии в клетке-хозяине является хорошо известным процессом, и требуемые способы конструирования экспрессирующего вектора, введения вектора в хозяина и экспрессии в хозяине являются общепринятыми способами в данной области.

Пригодные экспрессирующие векторы для применения в бактериях конструируют встраиванием структурной последовательности ДНК, кодирующей требуемый белок, совместно с пригодными сигналами инициации и терминации трансляции в правильной рамке считывания с функциональным промотором. Вектор будет содержать один или несколько фенотипических селективных маркеров и ориджин репликации для обеспечения поддержания вектора и, если желательно, для обеспечения амплификации в хозяине. Пригодные для трансформации прокариотические хозяева включают *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, и различные виды родов *Pseudomonas*, *Streptomyces* и *Staphylococcus*, хотя в качестве предпочтительных для выбора хозяев также можно использовать других хозяев. В качестве репрезентативного, но не ограничивающего примера, пригодные экспрессирующие векторы для применения в бактериях могут содержать селективный маркер и бактериальный ориджин репликации, полученный из коммерчески доступных плазмид, содержащих генетические элементы хорошо известного вектора для клонирования pBR322 (ATCC 37017). Такие коммерческие векторы включают, например, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) и GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA). Эти "основные" фрагменты pBR322 объединяют с пригодным промотором и структурной последовательностью, подлежащей экспрессии. Среди векторов, предпочтительных для применения в бактериях, находятся pHE4-5 (регистрационный номер ATCC 209311 и его варианты), pQE70, pQE60 и pQE-9, доступные от QIAGEN, Inc., выше; векторы pBS, векторы Phagescript, векторы Bluescript, pNH8A, pNH116a, pNH18A, pNH46A, доступные от Stratagene; и ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5, доступные от Pharmacia. Предпочтительные экспрессирующие векторы для применения в дрожжевых системах включают, но не ограничиваются ими, pYES2, pYD1, pTEF1/Zeo, pYES2/GS, pPICZ, pGAPZ, pGAPZalpha, pPIC9, pPIC3.5, pHIL-D2, pHIL-S1, pPIC3.5K, pPIC9K и PAO815 (все из которых доступны от Invitrogen, Carlsbad, CA). Среди предпочтительных эукариотических векторов находятся pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 и pSG, доступные от Stratagene; и pSVK3, pBPV, pMSG и pSVL (доступные от Pharmacia). Другие пригодные векторы будут легко понятны квалифицированному специалисту.

После трансформации пригодного штамма-хозяина и выращивания штамма-хозяина до пригодной клеточной плотности выбранный промотор индуцируют пригодными способами (например, сменой температуры или химической индукцией) и клетки культивируют в течение дополнительного периода времени. Как правило, клетки собирают центрифугированием, разрушают физическими или химическими способами и полученный неочищенный экстракт сохраняют для дальнейшей очистки.

Микробные клетки, используемые для экспрессии белков, можно разрушать любым пригодным способом, включая циклы замораживания и оттаивания, обработку ультразвуковым излучением, механическое разрушение или применение средств для лизиса клеток, такие способы хорошо известны специалистам в данной области.

В одном варианте осуществления для экспрессии белка нейтрокина-альфа в эукариотической системе используют дрожжи *Pichia pastoris*. *Pichia pastoris* представляет собой митотрофные дрожжи, которые могут метаболизировать метанол в качестве их единственного источника углерода. Основной ста-

дией каскада метаболизма метанола является окисление метанола до формальдегида с использованием O_2 . Эту реакцию катализирует фермент алкогольоксидаза. В целях метаболизма метанола в качестве их единственного источника углерода, *Pichia pastoris* должны продуцировать высокие уровни алкогольоксидазы, частично, вследствие относительно низкой аффинности алкогольоксидазы в отношении O_2 . Таким образом, в среде для роста, зависящей от метанола в качестве основного источника углерода, промоторный участок одного или двух генов алкогольоксидазы (AOX1) является высокоактивным. В присутствии метанола алкогольоксидаза, продуцируемая с гена AOX1, составляет вплоть до приблизительно 30% общего растворимого белка в *Pichia pastoris*. См. Ellis, S.B., et al., Mol. Cell. Biol. 5:1111-21 (1985); Koutz, P.J., et al., Yeast 5: 167-77 (1989); Tschopp, J.F., et al., Nucl. Acids Res. 15: 3859-76 (1987). Таким образом, в *Pichia*, растущих в присутствии метанола, гетерологичная кодирующая последовательность, например, с регуляцией транскрипции посредством всей или части регуляторной последовательности AOX1, экспрессируется на исключительно высоких уровнях.

В одном примере для экспрессии ДНК, кодирующей слитый с альбумином белок по этому изобретению, как указано в настоящем описании, в дрожжевой системе *Pichia*, используют плазмидный вектор pPIC9K, по существу, как описано в "Pichia Protocols: Methods in Molecular Biology", D.R. Higgins и J. Cregg, eds. The Humana Press, Totowa, NJ, 1998. Этот экспрессирующий вектор обеспечивает экспрессию и секрецию полипептида по этому изобретению с помощью сильного промотора AOX1, связанного с секреторным сигнальным пептидом (т.е. лидерной последовательностью) щелочной фосфатазы (PHO) *Pichia pastoris*, расположенным выше множественного сайта клонирования.

Вместо pPIC9K можно использовать многие другие дрожжевые векторы, такие как pYES2, pYD1, pTEF1/Zeo, pYES2/GS, pPICZ, pGAPZ, pGAPZalpha, pPIC9, pPIC3.5, pHIL-D2, pHIL-S1, pPIC3.5K и PAO815, как поймет специалист в данной области, при условии, что представленная экспрессирующая конструкция обладает правильно расположенными сигналами для транскрипции, трансляции, секреции (если желательно) и т.п., включая AUG в рамке считывания, при необходимости.

В одном варианте осуществления экспрессию гетерологичной кодирующей последовательности на высоком уровне можно осуществлять посредством клонирования гетерологичного полинуклеотида по этому изобретению в экспрессирующий вектор, например, такой как pGAPZ или pGAPZalpha, и выращивания дрожжевой культуры в отсутствие метанола.

Транскрипцию ДНК, кодирующей иммуномодулирующие белки, высшими эукариотами повышают встраиванием в вектор энхансерной последовательности. Энхансеры представляют собой цис-регуляторные элементы ДНК, как правило, приблизительно из от 10 до 300 п.о., которые действуют на промотор, усиливая его транскрипцию. Их примеры включают энхансер SV40 на поздней стороне ориджина репликации с 100 по 270 п.о., энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер вируса полиоми на поздней стороне ориджина репликации и аденовирусные энхансеры.

Также для экспрессии рекомбинантного белка можно использовать различные системы культур клеток млекопитающих. Примеры экспрессирующих систем млекопитающих включают линии COS-7 фибробластов почки обезьяны, описанные Gluzman (Cell 23:175 (1981)), и другие клеточные линии, способные экспрессировать совместимый вектор, например клеточные линии C127, 3T3, CHO, HeLa и BHK. Экспрессирующие векторы млекопитающих будут содержать ориджин репликации, пригодный промотор и энхансер, а также любые необходимые участки связывания рибосом, участок полиаденилирования, донорные и акцепторные участки сплайсинга, последовательности терминации транскрипции и 5'-фланкирующие нетранскрибируемые последовательности. Последовательности ДНК, образованные из участков сплайсинга SV40, и участки полиаденилирования можно использовать для обеспечения требуемых нетранскрибируемых генетических элементов.

В конкретном варианте осуществления используют конструкции, сконструированные для экспрессии части иммуномодулирующего белка, такие как внеклеточные домены рецепторов для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA и BAFF-R). Для конструирования полинуклеотидных праймеров в целях получения такой экспрессирующей конструкции специалист в данной области может использовать полинуклеотидные и полипептидные последовательности, представленные в качестве SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8 соответственно или SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10 соответственно.

Для экспрессии полинуклеотидов, кодирующих иммуномодулирующий белок, используют клетку-хозяина. Такие клетки-хозяева включают первичные, вторичные и иммортализованные клетки-хозяева, источником которых являются позвоночные, в частности млекопитающие. В некоторых случаях клетки-хозяева будут получать с удалением или заменой эндогенного генетического материала (например, кодирующей нейтрокин-альфа последовательности) и/или с включением генетического материала (например, гетерологичных полинуклеотидных последовательностей). В некоторых случаях клетку-хозяин модифицируют для обеспечения и/или изменения экспрессии эндогенного полинуклеотида, кодирующего иммуномодулирующий белок. Например, способы, известные в данной области, можно использовать для функциональной ассоциации гетерологичных контрольных участков (например, промотора и/или энхансера) и эндогенных полинуклеотидных последовательностей посредством гомологичной рекомбинации (см., например, патент США № 5641670, выданный 24 июня 1997 г.; международную публикацию WO

96/29411, опубликованную 26 сентября 1996 г.; международную публикацию WO 94/12650, опубликованную 4 августа 1994 г.; Koller et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989) и Zijlstra et al., Nature 342:435-438 (1989), описания которых включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме).

Для получения иммуномодулирующего белка клетки-хозяева, описанные в настоящем описании, можно использовать общепринятым способом. Альтернативно, также для получения иммуномодулирующего полипептида можно использовать бесклеточные системы трансляции с применением РНК, образованных из конструкций ДНК по настоящему изобретению.

Рамку считывания AUG, при необходимости, можно экспрессировать или синтезировать в модифицированной форме, такой как слитый белок (содержащий полипептид, связанный через пептидную связь с гетерологичной белковой последовательностью (другого белка)), и он может включать не только сигналы секреции, но также дополнительные гетерологичные функциональные участки. Такой слитый белок можно получать лигированием полинуклеотидов, кодирующих иммуномодулирующий белок, и требуемой последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей требуемую аминокислотную последовательность, друг с другом, способами, известными в данной области, в правильной рамке считывания, и экспрессией слитого белкового продукта способами, известными в данной области. Альтернативно такой слитый белок можно получать способами синтеза белков, например, с использованием устройства для синтеза пептидов. Таким образом, например, к N-концу полипептида можно добавлять участок из дополнительных аминокислот, в частности заряженных аминокислот, в целях повышения стабильности и устойчивости в клетке-хозяине в ходе очистки или в ходе последующей обработки и хранения. Также к полипептиду можно добавлять пептидные группы для упрощения очистки. Такие участки можно удалять перед окончательным получением полипептида.

Присоединение пептидных групп к полипептидам для обеспечения секреции и выделения, для повышения стабильности и упрощения очистки, среди прочих, является известным и общепринятым способом в данной области.

В одном варианте осуществления полинуклеотид, кодирующий иммуномодулирующий белок, может быть слитым с сигнальными последовательностями, которые будут определять локализацию иммуномодулирующего белка в конкретных компартментах прокариотической или эукариотической клетки и/или направлять секрецию иммуномодулирующего белка из прокариотической или эукариотической клетки. Например, в *E. coli* может быть желательным направление экспрессии белка в периплазматическое пространство. Примеры сигнальных последовательностей или белков (или их фрагментов), с которыми могут быть слиты полипептиды по этому изобретению в целях направления экспрессии полипептида в периплазматическое пространство бактерий, включают, но не ограничиваются ими, сигнальную последовательность *relB*, сигнальную последовательность связывающего мальтозу белка (MBP), MBP, сигнальную последовательность *ompA*, сигнальную последовательность В-субъединицы переплазматического термолabileного энтеротоксина *E. coli* и сигнальную последовательность щелочной фосфатазы. Для конструирования слитых белков, которые определяют локализацию белка, коммерчески доступно несколько векторов, таких как серии векторов pMAL (в частности, серия pMAL-p), доступные от New England Biolabs. В конкретном варианте осуществления полинуклеотиды, кодирующие иммуномодулирующий белок, могут быть слитыми с сигнальной последовательностью пектагилазы *relB* в целях повышения эффективности экспрессии в грамотрицательных бактериях и очистки таких полипептидов. См., патенты США №№ 5576195 и 5846818, содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Примеры сигнальных пептидов, которые могут быть слитыми с иммуномодулирующим белком в целях направления его секреции в клетках млекопитающих, включают, но не ограничиваются ими, сигнальную последовательность MPIF-1 (аминокислоты 1-21, регистрационный номер GenBank AAB51134), сигнальную последовательность станниокальцина (MLQNSAVLLLLVISASA, SEQ ID NO: 27) и консенсусную сигнальную последовательность (MPTWAWWLFLVLLALWAPARG, SEQ ID NO: 28). Пригодной сигнальной последовательностью, которую можно использовать совместно с бакуловирусными экспрессирующими системами, является сигнальная последовательность gp67 (аминокислоты 1-19, регистрационный номер GenBank AAA72759).

Предпочтительный слитый белок содержит гетерологичный участок из иммуноглобулина, который является пригодным для стабилизации и очистки белков. Например, в EP-A-0464533 (канадский эквивалент 2045869) описаны слитые белки, содержащие различные фрагменты константного участка молекул иммуноглобулинов, совместно с другим белком человека или его частью. Во многих случаях Fc-часть в слитом белке является особенно преимущественной для применения в целях лечения и, таким образом, приводит, например, к улучшенным фармакокинетическим свойствам (EP-A-0232262). С другой стороны, для некоторых способов применения может быть желательной возможность удаления Fc-части после экспрессии, детекции и очистки слитого белка описанным преимущественным способом. Это желательно в случае, когда оказывается, что Fc-часть препятствует применению в целях лечения и диагностики, например, когда слитый белок подлежит применению в качестве антигена для иммунизации. При разработке лекарственных средств, например, белки человека, такие как hIL-5, подвергали слиянию с Fc-

участками в целях высокопроизводительных скрининговых анализов для идентификации антагонистов hIL-5. См. D. Bennett et al., J. Molecular Recognition 8:52-58 (1995) и K. Johanson et al., J. Biol. Chem. 270: 9459-9471 (1995).

Иммуномодулирующие белки, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению, включают природные очищенные продукты, продукты процессов химического синтеза и продукты, полученные рекомбинантными способами, из прокариотического или эукариотического хозяина, включая, например, бактериальные, дрожжевые клетки, клетки высших растений, клетки насекомых и клетки млекопитающих. В зависимости от хозяина, используемого для процесса рекомбинантной продукции, иммуномодулирующие белки могут быть гликозилированными или они могут быть негликозилированными. Кроме того, иммуномодулирующие белки также могут включать начальный модифицированный остаток метионина, в некоторых случаях являющийся следствием опосредуемых хозяином процессов.

Иммуномодулирующие белки, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению, можно химически синтезировать с использованием способов, известных в данной области (например, см. Creighton, 1983, *Proteins: Structures and Molecular Principles*, W.H. Freeman & Co., N.Y., и Hunkapiller, M., et al., 1984, *Nature* 310:105-111). Например, пептид, соответствующий фрагменту иммуномодулирующего белка, можно синтезировать с использованием устройства для синтеза пептидов. Более того, если желательно, в полипептидную последовательность, кодирующую иммуномодулирующий белок, можно встраивать неклассические аминокислоты или химические аналоги аминокислот в качестве замены или вставки. Неклассические аминокислоты, главным образом, включают, но не ограничиваются ими, D-изомеры обычных аминокислот, 2,4-диаминомасляную кислоту, α-аминоизомасляную кислоту, 4-аминомасляную кислоту, Abu, 2-аминомасляную кислоту, g-Abu, e-Ahx, 6-аминогексановую кислоту, Aib, 2-аминоизомасляную кислоту, 3-аминопропионовую кислоту, орнитин, норлейцин, норвалин, гидроксипролин, саркозин, цитруллин, гомоцитруллин, цистеиновую кислоту, трет-бутилглицин, трет-бутилаланин, фенилглицин, циклогексилаланин, b-аланин, фтор-аминокислоты, разработанные аминокислоты, такие как b-метиламинокислоты, Ca-метиламинокислоты, Na-метиламинокислоты и аналоги аминокислот. Более того, аминокислота может представлять собой D (правовращающую) или L (левовращающую) аминокислоту.

Иммуномодулирующие белки, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению, можно дифференциально модифицировать в ходе трансляции или после нее, например, посредством гликозилирования, ацетилирования, фосфорилирования, амидации, образования производных с известными защитными/блокирующими группами, протеолитического расщепления, связывания с молекулой антитела или другим клеточным лигандом и т.д. Любую из многочисленных химических модификаций можно проводить известными способами, включая, но не ограничиваясь ими, специфичное химическое расщепление бромидом цианогена, трипсином, хомотрипсином, папаином, протеазой V8, NaBH₄, ацетилирование, форматирование, окисление, восстановление, метаболический синтез в присутствии туникамицина и т.д.

Дополнительные посттрансляционные модификации (например, N-связанные или O-связанные углеводные цепи, процессинг N-конца или C-конца), включают, например, присоединение химических групп к аминокислотному остову, химические модификации N-связанных или O-связанных углеводных цепей и вставку или делецию N-концевого остатка метионина в результате экспрессии в прокариотической клетке-хозяине. Полипептиды также можно модифицировать поддающейся детекции меткой, такой как ферментная, флуоресцентная, радиоизотопная или аффинная метка, для обеспечения детекции и выделения белка.

Примеры пригодных ферментов включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу, глюкозооксидазу или ацетилхолинэстеразу; примеры пригодных комплексов простетических групп включают стрептавидин/биотин и авидин/биотин; примеры пригодных флуоресцентных материалов включают биотин, умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат, родамин, дихлор-триазиниламинфлуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин; пример люминесцентного материала включает люминол; примеры биолюминесцентных материалов включают люциферазу, люциферин и экворин; и примеры пригодного радиоактивного материала включают ион радиоактивного металла, например альфа-эмиттеры, например, такие как ²¹³Bi, или другие радиоизотопы, например, такие как иод (¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²¹I), углерод (¹⁴C), сера (³⁵S), тритий (³H), индий (^{115m}In, ^{113m}In, ¹¹²In, ¹¹¹In), и технеций (^{99m}Tc), таллий (²⁰¹Tl), галлий (⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), палладий (¹⁰³Pd), молибден (⁹⁹Mo), ксенон (¹³³Xe), фтор (¹⁸F), ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵⁹Gd, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁴²Pr, ¹⁰⁵Rh, ⁹⁷Ru, ⁶⁸Ge, ⁵⁷Co, ⁶⁵Zn, ⁸⁵Sr, ³²P, ¹⁵³Gd, ¹⁶⁹Yb, ⁵¹Cr, ⁵⁴Mn, ⁷⁵Se, ¹¹³Sn и ¹¹⁷Олово.

В конкретных вариантах осуществления иммуномодулирующие белки, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению, могут быть мечеными европием. Например, иммуномодулирующие белки (например, антагонисты нейтрокина-альфа) можно метить европием с использованием набора для мечения Eu DELFIA (каталожный # 1244-302, Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA) в соответствии с инструкциями изготовителя.

В конкретных вариантах осуществления иммуномодулирующие белки, например, связаны с макроциклическими хелатирующими агентами, пригодными для конъюгации с полипептидами ионов радиоак-

тивных металлов, включая, но не ограничиваясь ими, ^{111}In , ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{166}Ho и ^{153}Sm . В предпочтительном варианте осуществления ион радиоактивного металла, ассоциированный с макроциклическими хелатирующими агентами, представляет собой ^{111}In . В другом предпочтительном варианте осуществления ион радиоактивного металла, ассоциированный с макроциклическим хелатирующим агентом, представляет собой ^{90}Y . В конкретных вариантах осуществления макроциклический хелатирующий агент представляет собой 1,4,7,10-тетраазаацетоксидоктодекан- $\text{N,N',N'',N'''}-\text{тетрауксусную}$ кислоту (DOTA). В других конкретных вариантах осуществления DOTA связана с иммуномодулирующим белком через ликерную молекулу. Примеры линкерных молекул, пригодных для конъюгации DOTA с полипептидом, широко известны в данной области, см., например, DeNardo et al., Clin Cancer Res. 4 (10): 2483-90, 1998; Peterson et al., Bioconjug. Chem. 10(4): 553-7, 1999 и Zimmerman et al., Nucl. Med. Biol. 26 (8): 943-50, 1999, которые включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме. Кроме того, патенты США №№ 5652361 и 5756065, в которых описаны хелатирующие агенты, которые можно конъюгировать с антителами, и способы их получения и применения, включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме. Хотя внимание в патентах США №№ 5652361 и 5756065 сосредоточено на конъюгации хелатирующих агентов с антителами, специалист в данной области может легко адаптировать описанный в них способ в целях конъюгации хелатирующих агентов с другими полипептидами.

В одном варианте осуществления иммуномодулирующий белок, который можно использовать в способах по настоящему изобретению, может быть меченым биотином.

Химически модифицированные производные иммуномодулирующих белков, которые могут обеспечить дополнительные преимущества, такие как повышенная растворимость, стабильность и время циркуляции *in vivo* или *in vitro* полипептида или сниженная иммуногенность (см. патент США № 4179337), также можно использовать в способах по настоящему изобретению. Химические группы для образования производных можно выбирать из растворимых в воде полимеров, таких как полиэтиленгликоль, сополимеры этиленгликоль/пропиленгликоль, карбоксиметилцеллюлоза, декстран, поливиниловый спирт и т.п. Полипептиды можно модифицировать в случайных положениях в молекуле или в определенных положениях в молекуле, и они могут включать одну, две, три или более присоединенных химических групп.

Полимер может обладать любой молекулярной массой, и он может быть разветвленным или прямым. В случае полиэтиленгликоля предпочтительная молекулярная масса составляет между приблизительно 1 и приблизительно 100 кДа (термин "приблизительно" указывает на то, что в препаратах полиэтиленгликоля некоторые молекулы будут обладать большей или меньшей массой по сравнению с указанной молекулярной массой) для простоты обработки и изготовления. Можно использовать другие размеры в зависимости от требуемого терапевтического профиля (например, длительности требуемого замедленного высвобождения, эффектов, при их наличии, на биологическую активность, простоты обработки, степени выраженности или отсутствия антигенности и других известных эффектов полиэтиленгликоля на терапевтический белок или аналог). Например, полиэтиленгликоль может обладать средней молекулярной массой приблизительно 200, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500, 10000, 10500, 11000, 11500, 12000, 12500, 13000, 13500, 14000, 14500, 15000, 15500, 16000, 16500, 17000, 17500, 18000, 18500, 19000, 19500, 20000, 25000, 30000, 35000, 40000, 50000, 55000, 60000, 65000, 70000, 75000, 80000, 85000, 90000, 95000 или 100000 кДа.

Как указано выше, полиэтиленгликоль может иметь разветвленную структуру. Разветвленные полиэтиленгликоли описаны, например, в патенте США № 5643575; Morpurgo et al., Appl. Biochem. Biotechnol. 56: 59-72 (1996); Vorobjev et al., Nucleosides Nucleotides 18: 2745-2750 (1999) и Caliceti et al., Bioconjug. Chem. 10: 638-646 (1999), описания всех из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок.

Молекулы полиэтиленгликоля (или других химических групп) следует присоединять к белку, учитывая эффекты на функциональные или антигенные домены белка. Существует множество способов присоединения, доступных специалистам в данной области, например, в EP 0401384, включенном в настоящее описание в качестве ссылки (присоединение PEG к G-CSF), см. также Malik et al., Exp. Hematol. 20: 1028-1035 (1992) (где описано пегилирование GM-CSF с использованием трезилхлорида). Например, полиэтиленгликоль можно ковалентно присоединять через аминокислотные остатки посредством реакционноспособной группы, такой как свободная аминогруппа или карбоксильная группа. Реакционноспособные группы представляют собой группы, с которыми может связываться активированная молекула полиэтиленгликоля. Аминокислотные остатки, имеющие свободную аминогруппу, могут включать, например, остатки лизина и остатки N-концевых аминокислот; остатки, имеющие свободную карбоксильную группу, могут включать остатки аспарагиновой кислоты, остатки глутаминовой кислоты и C-концевой аминокислотный остаток. Также для присоединения молекул полиэтиленгликоля в качестве реакционноспособных групп можно использовать сульфгидрильные группы. Предпочтительным для терапевтических целей является присоединение аминогруппы, такое как присоединение к N-концу или группе лизина.

Как указано выше, полиэтиленгликоль можно присоединять к белкам через связь с любым из мно-

жества аминокислотных остатков. Например, полиэтиленгликоль можно связывать с белками через ковалентные связи с остатками лизина, гистидина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты или цистеина. Для присоединения полиэтиленгликоля к определенным аминокислотным остаткам (например, лизина, гистидина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты или цистеина) белка или к аминокислотным остаткам более чем одного типа (например, лизина, гистидина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, цистеина и их сочетаний) в белке можно использовать одну или несколько реакционноспособных химических групп.

Конкретно, могут быть желательными белки, химически модифицированные на N-конце. С использованием полиэтиленгликоля в качестве примера можно выбирать из множества молекул полиэтиленгликоля (по молекулярной массе, ветвлению и т.д.), соотношений молекул полиэтиленгликоля и молекул белка (или пептида) в реакционной смеси, типов реакций пегилирования, подлежащих проведению, и способов получения выбранного пегилированного с N-конца белка. Способ получения пегилированного с N-конца препарата (т.е. отделения этой группы от других монопегилированных групп, если необходимо) может представлять собой способ очистки пегилированного с N-конца материала из совокупности молекул пегилированных белков. N-концевую модификацию определенных химически модифицированных белков можно проводить посредством восстановительного алкилирования, в котором используется различная реакционная способность различных типов первичных аминогрупп (лизина относительно N-концевой аминогруппы), доступных для образования производного конкретного белка. В пригодных условиях реакции достигают, по существу, селективного образования производного белка на N-конце посредством содержащего карбонильную группу полимера.

Как указано выше, пегилирование белков по этому изобретению можно проводить множеством способов. Например, полиэтиленгликоль можно присоединять к белку либо прямо, либо посредством промежуточного линкера. Безлинкерные системы для присоединения полиэтиленгликоля к белкам описаны в Delgado et al., Crit. Rev. Thera. Drug Carrier Sys. 9:249-304 (1992); Francis et al., Intern. J. of Hematol. 68:1-18 (1998); патенте США № 4002531; патенте США № 5349052; WO 95/06058 и WO 98/32466, описания которых включены в настоящее описание в качестве ссылок.

В одной системе для присоединения полиэтиленгликоля непосредственно к аминокислотным остаткам белков без промежуточного линкера используется трезилированный MPEG, который получают модификацией монометоксиполиэтиленгликоля (MPEG) с использованием трезилхлорида ($\text{ClSO}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$). При реакции белка с трезилированным MPEG полиэтиленгликоль непосредственно присоединяется к аминогруппам белка. Таким образом, это изобретение относится к конъюгатам белок-полиэтиленгликоль, получаемым реакцией белков по этому изобретению с молекулой полиэтиленгликоля, имеющей 2,2,2-трифторэтансульфонильную группу.

Также полиэтиленгликоль можно присоединять к белкам с использованием множества различных промежуточных линкеров. Например, в патенте США № 5612460, полное описание которого включено в настоящее описание в качестве ссылки, описаны уретановые линкеры для присоединения полиэтиленгликоля к белкам. Конъюгаты белок-полиэтиленгликоль, где полиэтиленгликоль присоединен к белку через линкер, также можно получать реакцией белков с соединениями, такими как MPEG-сукцинимидилсукцинат, MPEG, активированный 1,1'-карбонилдидиимидазолом, MPEG-2,4,5-трихлорфенилкарбонат, MPEG-п-нитрофенилкарбонат и различные MPEG-сукцинатные производные. Множество дополнительных производных полиэтиленгликоля и реакционных химических групп для присоединения полиэтиленгликоля к белкам описано в WO 98/32466, полное описание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки. Пегилированные белковые продукты, получаемые с использованием реакционных химических групп, указанных в настоящем описании, включены в объем этого изобретения.

Количество групп полиэтиленгликоля, присоединяемых к каждому белку по этому изобретению (т.е. степень замещения), также может варьировать. Например, пегилированные белки по этому изобретению могут быть связаны, в среднем, с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 20 молекулами полиэтиленгликоля или более. Аналогично, средняя степень замещения находится в диапазонах, таких как 1-3, 2-4, 3-5, 4-6, 5-7, 6-8, 7-9, 8-10, 9-11, 10-12, 11-13, 12-14, 13-15, 14-16, 15-17, 16-18, 17-19 или 18-20 групп полиэтиленгликоля на молекулу белка. Способы определения степени замещения рассмотрены, например, в Delgado et al., Crit. Rev. Thera. Drug Carrier Sys. 9: 249-304 (1992).

Иммуномодулирующие белки, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению, можно выделять и очищать известными способами, которые включают, но не ограничиваются ими, осаждение сульфатом аммония или этанолом, экстракцию кислотой, анионообменную или катионообменную хроматографию, хроматографию с фосфоцеллюлозой, хроматографию гидрофобного взаимодействия, аффинную хроматографию, хроматографию с гидроксилатапитом и хроматографию с лектином. Наиболее предпочтительно для очистки используют высокоэффективную жидкостную хроматографию ("ВЭЖХ").

Составы и введение

Это изобретение относится к способам лечения, ингибирования и профилактики посредством введения субъекту эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей иммуномодули-

рующее средство, такое как антагонист нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок TACI-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок BAFF-R-Fc. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой пептидное антитело против нейтрокина-альфа. В конкретном варианте осуществления антагонист нейтрокина-альфа представляет собой фрагмент или вариант белка нейтрокина-альфа, который функционирует в качестве доминантно-негативной формы. В предпочтительном варианте осуществления иммуномодулирующее средство является, по существу, очищенным (например, по существу, не содержащим веществ, которые ограничивают его эффект или вызывают нежелательные побочные эффекты). Субъект предпочтительно представляет собой животное, включая, но не ограничиваясь ими, таких животных, как коровы, свиньи, лошади, куры, кошки, собаки и т.д., и предпочтительно он представляет собой млекопитающее и наиболее предпочтительно человека.

Иммуномодулирующее средство будут изготавливать и дозировать способом, согласующимся с надлежащей медицинской практикой, с учетом клинического состояния отдельного пациента (особенно побочных эффектов лечения иммуномодулирующим средством отдельно), области доставки композиции, содержащей иммуномодулирующее средство, способа введения, схемы введения и других факторов, известных специалистам. Для целей настоящего описания "терапевтически эффективное количество" иммуномодулирующего средства, таким образом, определяют с учетом таких факторов.

Известны различные системы для доставки и их можно использовать для введения фармацевтической композиции, содержащей иммуномодулирующее средство, например инкапсулирование в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать соединение, опосредуемый рецептором эндоцитоз (см., например, Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)), конструирование нуклеиновой кислоты в качестве части ретровирусного или другого вектора и т.д. Способы введения включают, но не ограничиваются ими, внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный способы. Фармацевтическую композицию, содержащую иммуномодулирующее средство, можно вводить любым удобным способом, например посредством инфузии или болюсной инъекции, посредством всасывания через эпителиальные или слизистые выстилки (например, слизистую оболочку полости рта, ректальную или кишечную слизистую оболочку и т.д.) и их можно вводить совместно с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или местным. Кроме того, может быть желательным введение фармацевтической композиции, содержащей иммуномодулирующее средство, в центральную нервную систему любым пригодным способом, включая внутрижелудочковую и интратекальную инъекцию; внутрижелудочковую инъекцию можно упрощать внутрижелудочковым катетером, например, присоединенным к резервуару, такому как резервуар Омайя. Также можно применять легочное введение, например, посредством применения ингалятора или распылителя и состава со средством для распыления.

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим составам лекарственных средств (например, иммуномодулирующих средств, известных в данной области и/или описанных в настоящем описании). В частности, настоящее изобретение относится к фармацевтическим составам лекарственных средств, которые обладают белковой структурой (например, белки и антитела). Фармацевтический состав по этому изобретению содержит фармацевтически приемлемые эксципиенты. Как правило, фармацевтический состав по этому изобретению изготавливают таким образом, чтобы лекарственное средство сохраняло его физическую, химическую и биологическую активность. Фармацевтический состав по этому изобретению можно хранить при пригодных температурах. Например, фармацевтический состав по этому изобретению можно хранить при 2-8°C, при -40°C или при -80°C. В конкретном варианте осуществления пригодный состав представляет собой состав, в котором наблюдают агрегацию лекарственного средства, составляющую менее чем приблизительно 1% в течение 2 лет, в котором наблюдают окисление лекарственного средства, составляющее менее чем приблизительно 1% в течение 2 лет и/или в котором наблюдают дезамидацию лекарственного средства, составляющую менее чем приблизительно 4% в течение 2 лет. Количество лекарственного средства, представленного в фармацевтическом составе по этому изобретению, определяют, например, учитывая требуемые объемы доз и способ(ы) введения. В одном варианте осуществления этого изобретения концентрация лекарственного средства в фармацевтическом составе по этому изобретению составляет приблизительно 1-160 мг/мл, приблизительно 10-155 мг/мл, приблизительно 20-150 мг/мл, приблизительно 30-145 мг/мл, приблизительно 40-140 мг/мл, приблизительно 50-135 мг/мл, приблизительно 60-130 мг/мл, приблизительно 70-125 мг/мл, приблизительно 80-120 мг/мл, приблизительно 90-115 мг/мл, приблизительно 95-110 мг/мл, приблизительно 100-105 мг/мл или приблизительно 100 мг/мл. Также подразумевают, что к этому изобретению относятся промежуточные диапазоны указанных выше концентраций, например приблизительно 11-154 мг/мл. Например, подразумевают включение диапазонов значений, в которых используется сочетание любого из перечисленных выше значений в качестве верхнего и/или нижнего пределов. В этом контексте "приблизительно" включает конкретные приведенные диапазоны и диапазоны, которые превышают или являются ниже верхнего и/или нижнего пределов диапазона на несколько

(5, 4, 3, 2, или 1) мг/мл.

Водные фармацевтические составы по этому изобретению содержат рН-буферный раствор. В одном варианте осуществления этого изобретения буфер, используемый в фармацевтических составах по этому изобретению, обладает значением рН, варьирующим от приблизительно 5 до приблизительно 7. В предпочтительном варианте осуществления буфер, используемый в фармацевтических составах по этому изобретению, обладает значением рН, варьирующим от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,5. В другом предпочтительном варианте осуществления буфер, используемый в фармацевтических составах по этому изобретению, обладает значением рН, варьирующим от приблизительно 5,8 до приблизительно 6,2. В другом предпочтительном варианте осуществления буфер, используемый в фармацевтических составах по этому изобретению, обладает значением рН приблизительно 6,0. Также подразумевают, что к этому изобретению относятся промежуточные диапазоны указанных выше значений рН. Например, подразумевают включение диапазонов значений, в которых используется сочетание любого из перечисленных выше значений в качестве верхнего и/или нижнего пределов. В этом контексте "приблизительно" включает конкретные приведенные диапазоны и диапазоны, которые превышают или являются ниже верхнего и/или нижнего пределов диапазона на 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 или 0,1 единиц рН. Примеры буферов, которые будут удерживать значения рН в предпочтительных диапазонах, включают ацетатный (например, натрий-ацетатный), сукцинатный (такой как натрий-сукцинатный), глюконатный, гистидиновый, цитратный, Tris, фосфатный, глицилглициновый и другие буферы органических кислот. Дополнительные иллюстративные буферы представляют собой буферы, которые являются фармацевтически приемлемыми и которые можно получать из пригодных кислот, оснований и их солей, таких как определены ниже.

Фармацевтически приемлемые кислоты включают неорганические и органические кислоты, которые являются нетоксичными в концентрациях и способах, посредством которых их изготавливают. Например, пригодные неорганические кислоты включают хлористо-водородную, перхлорную, бромисто-водородную, иодисто-водородную, азотную, серную, сульфоновую, сульфиновую, сульфанильную, фосфорную, карбоновую и т.д. Пригодные органические кислоты включают прямые и разветвленные алкильные, ароматические, циклические, циклоалифатические, ариалифатические, гетероциклические, насыщенные, ненасыщенные, моно-, ди- и трикарбоновые кислоты, включая, например, муравьиную, уксусную, 2-гидроксиуксусную, трифторуксусную, фенилуксусную, триметилуксусную, трет-бутилуксусную, аминоксусную, пропионовую, 2-гидроксипропионовую, 2-оксипропионовую, пропандионовую, циклопентанпропионовую, циклопентанпропионовую, 3-фенилпропионовую, бутановую, бутандионовую, бензойную, 3-(4-гидроксibenzoил)бензойную, 2-ацетоксибензойную, аскорбиновую, коричневую, лаурилсерную, стеариновую, муконовую, миндальную, янтарную, эмбоновую, фумаровую, яблочную, малеиновую, гидроксималеиновую, малоновую, молочную, лимонную, виннокаменную, гликолевую, гликоновую, глюконовую, пировиноградную, глиоксиловую, щавелевую, мезиловую, янтарную, салициловую, фталевую, пальмовую, пальмеивую, тиоциановую, метансульфоновую, этансульфоновую, 1,2-этандисульфоновую, 2-гидроксиэтансульфоновую, бензолсульфоновую, 4-хлорбензолсульфоновую, нафталин-2-сульфоновую, п-толуолсульфоновую, камфоросульфоновую, 4-метилбикло[2.2.2]-окт-2-ен-1-карбоновую, глюкогоптоновую, 4,4'-метиленис-3-(гидрокси-2-ен-1-карбоновую кислоту), гидроксинафтольную и т.д.

Фармацевтически приемлемые основания включают неорганические и органические основания, которые являются нетоксичными в концентрациях и способах, посредством которых их изготавливают. Например, пригодные основания включают основания, образованные металлами, такими как литий, натрий, калий, магний, кальций, аммоний, железо, цинк, медь, марганец, алюминий, N-метилглюкамин, морфолин, пиперидин, и органическими нетоксичными основаниями, включая первичные, вторичные и третичные амины, замещенные амины, циклические амины и основные ионообменные смолы [например, $N(R')_4^+$ (где R' независимо представляет собой H или C_{1-4} алкил, например аммоний, Tris)], например, изопропиламин, триметиламин, диэтиламин, триэтиламин, трипропиламин, этаноламин, 2-диэтиламиноэтанол, триметамин, дициклогексиламин, лизин, аргинин, гистидин, кофеин, прокаин, гидрабамин, холин, бетаин, этилендиамин, глюкозамин, метилглюкамин, теобромин, пурины, пиперазин, пиперидин, N-этилпиперидин, полиаминовые смолы и т.д. Особенно предпочтительными органическими нетоксичными основаниями являются изопропиламин, диэтиламин, этаноламин, триметамин, дициклогексиламин, холин и кофеин.

Дополнительные фармацевтически приемлемые кислоты и основания, применимые с настоящим изобретением, включают кислоты и основания, которые образованы из аминокислот, например гистидина, глицина, фенилаланина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, лизина и аспарагина.

Фармацевтически приемлемые буферы включают буферы, образованные как из кислотных, так и основных аддитивных солей указанных выше кислот и оснований. В одном варианте осуществления этого изобретения буфер фармацевтического состава по этому изобретению представляет собой сукцинатный, гистидиновый, цитратный и/или фосфатный буфер. В предпочтительном варианте осуществления буфер фармацевтического состава по этому изобретению представляет собой гистидиновый буфер. В другом предпочтительном варианте осуществления буфер фармацевтического состава по этому изобретению представляет собой цитратный буфер.

В другом варианте осуществления этого изобретения концентрация буфера в фармацевтическом составе по этому изобретению составляет приблизительно 5-50 мМ, приблизительно 5-20 мМ, приблизительно 5-15 мМ или приблизительно 10 мМ. Также подразумевают, что к этому изобретению относятся промежуточные диапазоны указанных выше концентраций, например приблизительно 6-48 мМ. Например, подразумевают включение диапазонов значений, в которых используется сочетание любого из перечисленных выше значений в качестве верхнего и/или нижнего пределов. В этом контексте "приблизительно" включает конкретные приведенные диапазоны и диапазоны, которые превышают или являются ниже верхнего и/или нижнего пределов диапазона на несколько (5, 4, 3, 2, или 1) мМ.

Также в фармацевтический состав по этому изобретению можно добавлять поверхностно-активное вещество. Иллюстративные поверхностно-активные вещества включают неионные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбаты (например, полисорбаты 20 или 80) или полуксамеры (например, полуксамер 188). Другие фармацевтически приемлемые поверхностно-активные вещества хорошо известны в данной области и также предусмотрены. В конкретном варианте осуществления поверхностно-активное вещество добавляют в количестве, достаточном для снижения агрегации лекарственного средства (такой как агрегация, происходящая при встряхивании или транспортировке), с целью минимизации образования твердых частиц в фармацевтическом составе по этому изобретению, и/или в целях снижения неспецифичной адсорбции лекарственного средства. В предпочтительном варианте осуществления фармацевтический состав по этому изобретению включает поверхностно-активное вещество, которое представляет собой полисорбат.

В одном варианте осуществления фармацевтический состав по этому изобретению содержит поверхностно-активное вещество полисорбат 20. В одном предпочтительном варианте осуществления фармацевтический состав по этому изобретению содержит между по меньшей мере 0,007% и приблизительно 0,07% полисорбата 20. В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтический состав по этому изобретению содержит между приблизительно 0,01% и приблизительно 0,05% полисорбата 20. В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтический состав по этому изобретению содержит между приблизительно 0,01% и приблизительно 0,03% полисорбата 20. В другом предпочтительном варианте осуществления в фармацевтическом составе по этому изобретению находится приблизительно 0,01% полисорбат 20. В этом контексте "приблизительно" включает конкретные приведенные диапазоны и диапазоны, которые превышают или являются ниже верхнего и/или нижнего пределов диапазона на 0,01, 0,009, 0,008, 0,007, 0,006 или 0,005%, при условии, что процентное содержание полисорбата 20 составляет не ниже 0,007%.

В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтический состав по этому изобретению содержит поверхностно-активное вещество полисорбат 80. В одном предпочтительном варианте осуществления фармацевтический состав по этому изобретению содержит между приблизительно 0,0015 и приблизительно 0,07% полисорбата 80. В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтический состав по этому изобретению содержит между приблизительно 0,003 и приблизительно 0,05% полисорбата 80. В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтический состав по этому изобретению содержит между приблизительно 0,005 и приблизительно 0,03% полисорбата 80. В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтический состав по этому изобретению содержит между приблизительно 0,01 и приблизительно 0,03% полисорбата 80. В другом предпочтительном варианте осуществления в фармацевтическом составе по этому изобретению находится приблизительно 0,01% полисорбата 80. В этом контексте "приблизительно" включает конкретные приведенные диапазоны и диапазоны, которые превышают или являются ниже верхнего и/или нижнего пределов диапазона на 0,01, 0,009, 0,008, 0,007, 0,006 или 0,005% при условии, что процентное содержание полисорбата 20 составляет не ниже чем 0,0015%.

В фармацевтический состав по этому изобретению можно добавлять модифицирующее тоничность средство. Пригодные модифицирующие тоничность средства включают соли и аминокислоты. Соли, которые являются фармацевтически приемлемыми и пригодны для фармацевтических составов по этому изобретению, включают хлорид натрия, сукцинат натрия, сульфат натрия, хлорид калия, хлорид магния, сульфат магния и хлорид кальция. Предпочтительные соли для применения в фармацевтических составах по этому изобретению представляют собой NaCl и MgCl₂. NaCl может повышать стабильность лекарственного средства посредством защиты средства от дезамидации и агрегации. В одном предпочтительном варианте осуществления фармацевтический состав по этому изобретению содержит NaCl. В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтический состав по этому изобретению содержит между приблизительно 150 и приблизительно 500 мМ NaCl. В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтический состав по этому изобретению содержит приблизительно 150 мМ NaCl. В этом контексте "приблизительно" включает конкретные приведенные диапазоны и диапазоны, которые превышают или являются ниже верхнего и/или нижнего пределов диапазона на 1, 2, 3, 4, 5, 10, 25 или 50 мМ. В предпочтительном варианте осуществления фармацевтические составы по этому изобретению являются изотоничными. Под "изотоничным" подразумевают, что фармацевтический состав по этому изобретению обладает, по существу, таким же осмотическим давлением, как и кровь человека. Изотонические составы будут, главным образом, обладать осмотическим давлением от приблизительно

250 до приблизительно 350 мОсм, предпочтительно от приблизительно 290 до приблизительно 310 мОсм. В этом контексте "приблизительно" включает конкретные приведенные диапазоны и диапазоны, которые превышают или являются ниже верхнего и/или нижнего пределов диапазона на несколько (5, 4, 3, 2 или 1) мОсм. Изотоничность можно определять с использованием, например, парофазного осмометра или осмометра по принципу замораживания.

В одном варианте осуществления фармацевтический состав по этому изобретению содержит указанные выше средства (т.е. лекарственное средство, буфер, поверхностно-активное вещество и модифицирующее тоничность средство) и, по существу, не содержит одного или нескольких консервантов, таких как бензиловый спирт, фенол, м-крезол, хлорбутанол и бензэтоний Cl. В другом варианте осуществления в фармацевтический состав по этому изобретению может быть включен консервант, особенно, где состав представляет собой состав для многократного дозирования. В фармацевтический состав по этому изобретению могут быть включены один или несколько других фармацевтически приемлемых носителей, эксципиентов или стабилизаторов, таких как вещества, описанные в Remington's Pharmaceuticals Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980), при условии, что они не оказывают значительного неблагоприятного действия на требуемые характеристики состава. Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в применяемых дозировках и концентрациях и включают дополнительные буферные средства; вспомогательные растворители; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); биологически деградируемые полимеры, такие как полиэфиры; консерванты; криопротекторы; лиопротекторы; наполнители и т.п. Примеры пригодных криопротекторов включают полиолы, полиэтиленгликоль (PEG), бычий сывороточный альбумин (BSA), глутаминовую кислоту, другие аминокислоты и т.п. Дополнительный пригодный криопротектор включает сахара и спирты сахаров, такие как сахароза, манноза, трегалоза, глюкоза, сорбит и маннит и т.п. Пригодные лиопротекторы могут включать сахара, включая сахарозу, трегалозу, лактозу и мальтозу и т.п. Пригодные наполнители включают маннит, глицин и сорбит и т.п.

В конкретном варианте осуществления фармацевтический состав по этому изобретению не содержит криопротектора. В следующем варианте осуществления фармацевтический состав по этому изобретению не содержит сахарозы.

ЭДТА, которую обычно используют для стабилизации состава белка, также можно включать в фармацевтический состав по этому изобретению. ЭДТА в качестве хелатирующего агента может ингибировать катализируемое металлом окисление сульфгидрильных групп, таким образом снижая образование связанных дисульфидной связью агрегатов. Предпочтительная концентрация ЭДТА составляет от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,2%.

Фармацевтический состав по этому изобретению также можно комбинировать с одним или несколькими другими лекарственными средствами, если необходимо, при конкретном показании для лечения предпочтительно с лекарственными средствами с дополняющей активностью, которая не оказывает неблагоприятного эффекта на лекарственное средство в фармацевтическом составе по этому изобретению. Предусмотрены сочетания, где дополнительные лекарственные средства изготавливают в качестве смеси с иммуномодулирующими средствами. Кроме того, предусмотрены сочетания, где дополнительные лекарственные средства изготавливают независимо, однако они предназначены для одновременного или частично совпадающего введения с иммуномодулирующим средством. Такие дополнительные лекарственные средства пригодным образом представлены в сочетании в количествах, которые являются эффективными для предполагаемой цели. Дополнительные лекарственные средства, которые можно комбинировать с составом по этому изобретению, описаны в настоящем описании далее.

Настоящее изобретение относится в предпочтительном варианте осуществления к фармацевтическому составу, содержащему 10 мМ гистидиновый буфер, 150 мМ NaCl и 0,01% полисорбат 80, pH 6,0 ($\pm 0,5$) или альтернативно состоящему из них. В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтический состав по этому изобретению содержит антитело в количестве от приблизительно 1 до приблизительно 160 мг/мл, предпочтительно от приблизительно 80 до приблизительно 120 мг/мл, 10 мМ гистидиновый буфер, 150 мМ NaCl и 0,01% полисорбат 80, pH 6,0 ($\pm 0,5$) или альтернативно состоит из них. В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтический состав по этому изобретению содержит антитело в количестве от приблизительно 1 до приблизительно 160 мг/мл, предпочтительно от приблизительно 80 до приблизительно 120 мг/мл, 10 мМ гистидиновый буфер, 150 мМ NaCl и 0,01% полисорбат 80, pH 6,0 ($\pm 0,5$) или альтернативно состоит из них, для внутривенного введения. В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтический состав по этому изобретению содержит антитело в количестве от приблизительно 1 до приблизительно 160 мг/мл, предпочтительно от приблизительно 80 до приблизительно 120 мг/мл, 10 мМ гистидиновый буфер, 150 мМ NaCl и 0,01% полисорбат 80, pH 6,0 ($\pm 0,5$) или альтернативно состоит из них, для подкожного введения. В этом контексте "приблизительно" включает конкретные приведенные диапазоны и диапазоны, которые превышают или являются ниже верхнего и/или нижнего пределов диапазона на несколько (5, 4, 3, 2 или 1) мг/мл.

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтический состав по этому изобретению со-

держит 100 мг/мл антитела, 10 мМ гистидиновый буфер, 150 мМ NaCl и 0,01% полисорбат 80, pH 6,0 ($\pm 0,5$) или альтернативно состоит из них. В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтический состав по этому изобретению содержит 100 мг/мл антитела, 10 мМ гистидиновый буфер, 150 мМ NaCl и 0,01% полисорбат 80, pH 6,0 ($\pm 0,5$) или альтернативно состоит из них, для внутривенного введения. В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтический состав по этому изобретению содержит 100 мг/мл антитела, 10 мМ гистидиновый буфер, 150 мМ NaCl и 0,01% полисорбат 80, pH 6,0 ($\pm 0,5$) или альтернативно состоит из них, для подкожного введения.

Настоящее изобретение относится в предпочтительном варианте осуществления к фармацевтическому составу, содержащему 0,74 мг/мл L-гистидина, 1,1 мг/мл моногидрохлорида L-гистидина, 8,8 мг/мл NaCl и 0,1 мг/мл полисорбата 80, pH 6,0 ($\pm 0,5$) или альтернативно состоящему из них. В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтический состав по этому изобретению содержит антитело в количестве от приблизительно 1 до приблизительно 160 мг/мл, предпочтительно от приблизительно 80 до приблизительно 120 мг/мл, 0,74 мг/мл L-гистидина, 1,1 мг/мл моногидрохлорида L-гистидина, 8,8 мг/мл NaCl и 0,1 мг/мл полисорбата 80, pH 6,0 ($\pm 0,5$) или альтернативно состоит из них. В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтический состав по этому изобретению содержит антитело в количестве от приблизительно 1 до приблизительно 160 мг/мл, предпочтительно от приблизительно 80 до приблизительно 120 мг/мл, 0,74 мг/мл L-гистидина, 1,1 мг/мл моногидрохлорида L-гистидина, 8,8 мг/мл NaCl и 0,1 мг/мл полисорбата 80, pH 6,0 ($\pm 0,5$) или альтернативно состоит из них, для внутривенного введения. В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтический состав по этому изобретению содержит антитело в количестве от приблизительно 1 до приблизительно 160 мг/мл, предпочтительно от приблизительно 80 до приблизительно 120 мг/мл, 0,74 мг/мл L-гистидина, 1,1 мг/мл моногидрохлорида L-гистидина, 8,8 мг/мл NaCl и 0,1 мг/мл полисорбата 80, pH 6,0 ($\pm 0,5$) или альтернативно состоит из них, для подкожного введения. В этом контексте "приблизительно" включает конкретные приведенные диапазоны и диапазоны, которые превышают или являются ниже верхнего и/или нижнего пределов диапазона на несколько (5, 4, 3, 2 или 1) мг/мл.

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтический состав по этому изобретению содержит 100 мг/мл антитела, 0,74 мг/мл L-гистидина, 1,1 мг/мл моногидрохлорида L-гистидина, 8,8 мг/мл NaCl и 0,1 мг/мл полисорбата 80, pH 6,0 ($\pm 0,5$) или альтернативно состоит из них. В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтический состав по этому изобретению содержит 100 мг/мл антитела, 0,74 мг/мл L-гистидина, 1,1 мг/мл моногидрохлорида L-гистидина, 8,8 мг/мл NaCl и 0,1 мг/мл полисорбата 80, pH 6,0 ($\pm 0,5$) или альтернативно состоит из них, для внутривенного введения. В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтический состав по этому изобретению содержит 100 мг/мл антитела, 0,74 мг/мл L-гистидина, 1,1 мг/мл моногидрохлорида L-гистидина, 8,8 мг/мл NaCl и 0,1 мг/мл полисорбата 80, pH 6,0 ($\pm 0,5$) или альтернативно состоит из них, для подкожного введения.

В предпочтительном варианте осуществления антитело в фармацевтическом составе по этому изобретению представляет собой моноклональные антитело. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело в фармацевтическом составе по этому изобретению представляет собой антитело IgG. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело в фармацевтическом составе по этому изобретению представляет собой антитело IgG1. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело в фармацевтическом составе по этому изобретению представляет собой антитело IgG1/ λ . В другом предпочтительном варианте осуществления антитело в фармацевтическом составе по этому изобретению представляет собой антитело человека или гуманизированное антитело.

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтический состав по этому изобретению является стабильным в течение по меньшей мере 6 месяцев при 2-8°C. В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтический состав по этому изобретению является стабильным в течение по меньшей мере 9 месяцев при 2-8°C. В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтический состав по этому изобретению является стабильным в течение по меньшей мере 1 года при 2-8°C. В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтический состав по этому изобретению является стабильным в течение по меньшей мере 1,5 лет при 2-8°C. В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтический состав по этому изобретению является стабильным в течение по меньшей мере 2 лет при 2-8°C. В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтический состав по этому изобретению является стабильным в течение по меньшей мере 3 лет при 2-8°C. В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтический состав по этому изобретению является стабильным в течение по меньшей мере 4 лет при 2-8°C. В другом предпочтительном варианте осуществления фармацевтический состав по этому изобретению является стабильным в течение по меньшей мере 5 лет при 2-8°C.

В предпочтительном варианте осуществления антитело в фармацевтическом составе по этому изобретению может обладать значительной стабильностью на протяжении повторяющихся циклов замораживания-оттаивания и после такой обработки может оставаться стабильным после его размораживания. Как правило, состав, подлежащий замораживанию, замораживают быстро, например замораживают в жидком азоте. Размораживание может происходить в диапазоне температур, например, от приблизительно

но 0 до приблизительно 25°C, который представляет собой медленное размораживание; или от приблизительно 26 до 40°C, который представляет собой быстрое размораживание. В этом контексте "приблизительно" включает конкретные приведенные диапазоны и диапазоны, которые превышают или являются ниже верхнего и/или нижнего пределов диапазона на несколько (5, 4, 3, 2 или 1) °C. Примером быстрого размораживания является размораживание фармацевтического состава по этому изобретению на водяной бане при 37°C. В предпочтительном варианте осуществления антитело в фармацевтическом составе по этому изобретению является стабильным в течение по меньшей мере одного цикла замораживания-размораживания. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело в фармацевтическом составе по этому изобретению является стабильным в течение по меньшей мере двух циклов замораживания-размораживания. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело в фармацевтическом составе по этому изобретению является стабильным в течение по меньшей мере трех циклов замораживания-размораживания. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело в фармацевтическом составе по этому изобретению является стабильным в течение по меньшей мере четырех циклов замораживания-размораживания. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело в фармацевтическом составе по этому изобретению является стабильным в течение по меньшей мере пяти циклов замораживания-размораживания. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело в фармацевтическом составе по этому изобретению является стабильным в течение по меньшей мере десяти циклов замораживания-размораживания.

Может быть желательным определение оптимального режима замораживания-размораживания фармацевтического состава по этому изобретению для сохранения стабильности, или может быть желательной идентификация фармацевтического состава по этому изобретению, который обеспечивает наибольшую стабильность антитела, которое будет подвергаться конкретному циклу замораживания-размораживания. Таким образом, в варианте осуществления этого изобретения оценивают этот параметр. Например, стабильность фармацевтического состава по этому изобретению можно анализировать во множестве условий замораживания-размораживания, таких как быстрое замораживание, медленное замораживание, быстрое размораживание, медленное размораживание в различных сочетаниях для определения способа, который приводит к наименьшему количеству продуктов деградации (например, который приводит к наибольшей стабильности).

Исследование концентрации показало, что антитело IgG1/λ может обладать концентрацией вплоть до по меньшей мере 160 мг/мл в фармацевтическом составе по этому изобретению, содержащем 10 мМ гистидиновый буфер, 150 мМ NaCl и 0,01% полисорбат 80, pH 6,0, без неблагоприятных эффектов на чистоту (как определяют посредством SEC-HPLC) и агрегацию (твердых частиц не наблюдали) (данные не представлены). Кроме того, с увеличением концентрации наблюдали повышение вязкости. По мере повышения вязкости повышается вероятность трудности введения. Исследования показали, что образцы с вязкостью менее 7,75 сП можно легко инъецировать через иглу 30G 1/2 дюйма менее чем за 10 с. Как показано в табл. X, даже при концентрации антитела IgG1/λ 160 мг/мл вязкость фармацевтического состава составляет менее 7,75 сП, и, таким образом, он все еще легко инъецируется через шприц.

Таблица X

Вязкость в зависимости от концентрации антитела IgG1/λ

Концентрация, мг/мл	Вязкость, сП
0,0	0,93
18,9	0,97
35,5	1,13
65,7	1,48
79,2	1,80
89,4	1,96
104,0	2,38
113,2	2,68
122,2	3,15
128,0	3,43
136,5	3,89
144,1	4,58
161,7	6,74

Составы, подлежащие применению для введения *in vivo*, наиболее предпочтительно являются стерильными. Стерильности легко добиваются фильтрованием через стерильные фильтрационные мембраны до или после изготовления состава.

В предпочтительном варианте осуществления антитело по этому изобретению изготавливают в 10 мМ цитрате натрия, 1,9% глицине, 0,5% сахарозе, 0,01% полисорбате 80, pH 6,5 ($\pm 0,3$). В другом предпочтительном варианте осуществления антитело по этому изобретению изготавливают в 10-мМ цитрате натрия, 1,9% глицине, 0,5% сахарозе, 0,01% полисорбате 80, pH 6,5 ($\pm 0,3$), для внутривенного введения.

В предпочтительном варианте осуществления антитело по этому изобретению изготавливают в 10-мМ цитрате натрия, 8% сахарозе, 0,04% (мас./об.) полисорбате 80 (pH 6,5) ($\pm 0,3$). В другом предпочтительном варианте осуществления антитело по этому изобретению изготавливают в 10-мМ цитрате натрия, 8% сахарозе, 0,04% (мас./об.) полисорбате 80 (pH 6,5), для внутривенного введения. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело по этому изобретению изготавливают в 10-мМ цитрате натрия, 8% сахарозе, 0,04% (мас./об.) полисорбате 80 (pH 6,5), для подкожного введения.

Как правило, составы получают контактированием антагониста нейтрокина-альфа или другого иммуномодулирующего средства, известного в данной области и/или описанного в настоящем описании, в гомогенной и однородной смеси с жидкими носителями или высокодисперсными твердыми носителями или и с теми, и с другими. Затем, если необходимо, продукт преобразуют в требуемый состав. Предпочтительно носитель представляет собой парентеральный носитель, более предпочтительно раствор, который является изотоничным с кровью реципиента. Примеры таких носителей включают воду, физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Также здесь являются пригодными неводные носители, такие как жирные масла и этилолеат, а также липосомы.

Приемлемо, чтобы носитель содержал небольшие количества добавок, таких как вещества, которые повышают изотоничность и химическую стабильность. Такие материалы являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях, и включают буферы, такие как фосфатный, цитратный, сукцинатный буферы, уксусная кислота и другие органические кислоты или их соли; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота; низкомолекулярные (менее чем приблизительно десять остатков) полипептиды, например полиаргинин или трипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота или аргинин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая целлюлозу или ее производные, глюкозу, маннозу, сахарозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; спирты сахаров, такие как маннит или сорбит; противоионы, такие как натрий; консерванты, такие как крезол, фенол, хлорбутанол, бензиловый спирт и парабены и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбаты, полосамеры или PEG.

Композиции, содержащие иммуномодулирующие полипептиды, как правило, изготавливают в таких носителях в концентрации приблизительно от 0,001 до 100 мг/мл или от 0,1 до 100 мг/мл, предпочтительно 1-10 мг/мл или 1-10 мг/мл, при значениях pH приблизительно от 3 до 10 или от 3 до 8, более предпочтительно 5-8, наиболее предпочтительно 6-7. Будет понятно, что применение некоторых из указанных выше эксципиентов, носителей или стабилизаторов приведет к образованию солей полипептидов.

Композиции, подлежащие применению для терапевтического введения, наиболее предпочтительно являются стерильными. Стерильности легко добиваются фильтрованием через стерильные фильтрационные мембраны (например, 0,2-микронные мембраны). Терапевтические композиции, как правило, помещают в контейнер, имеющий стерильное входное отверстие, например в пакет для внутривенного раствора или флакон, имеющий пробку, проницаемую для иглы для подкожной инъекции.

Фармацевтические композиции, содержащие иммуномодулирующие средства, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению, в обычном случае будут хранить в контейнерах для однократной или многократных доз, например герметично запаянных ампулах или флаконах, в качестве водного раствора или в форме лиофилизированного состава для разбавления. В качестве примера лиофилизированного состава 10-мл флаконы заполняют 5 мл стерильно фильтрованным 1% (мас./об.) водным раствором полипептида нейтрокина-альфа и полученную смесь лиофилизируют. Раствор для инфузии получают разбавлением лиофилизированного полипептида нейтрокина-альфа с использованием бактериостатической воды для инъекции.

Альтернативно, фармацевтические композиции, содержащие иммуномодулирующие средства, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению, хранят в контейнерах для однократной дозы в лиофилизированной форме. Выбранный состав для инфузии разбавляют с использованием стерильного носителя для инъекции.

В конкретных вариантах осуществления иммуномодулирующие средства, которые можно использовать в настоящем изобретении, представляют собой меченые радиоактивной меткой полипептиды, такие как меченая радиоактивной меткой форма нейтрокина-альфа или антитела против CD20. Такие фармацевтические композиции, содержащие меченые радиоактивной меткой молекулы, также могут содержать радиопротекторы и заменители плазмы, такие как аскорбат натрия, Gentran-40 и глицерин. В кон-

кретных вариантах осуществления композиции, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержат иодированные формы полипептидов нейтрокина-альфа или их фрагменты или варианты, которые изготавливают в 10,0 мМ цитрате натрия, 140,0 мМ хлориде натрия, 8,7 мМ HEPES, 4% (мас./об.) аскорбате натрия, 3,3% (мас./об.) Gentran-40. В конкретных вариантах осуществления композиции, которую можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержит по меньшей мере 1 мг/мл иодированной формы аминокислотных остатков 134-285 в SEQ ID NO: 2, 10,0 мМ цитрат натрия, 140,0 мМ хлорид натрия, 8,7 мМ HEPES, 4% (мас./об.) аскорбат натрия, 3,3% (мас./об.) Gentran-40. В конкретных вариантах осуществления композиции, которую можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержит по меньшей мере 2 мг/мл иодированной формы аминокислотных остатков 134-285 в SEQ ID NO: 2, 10,0 мМ цитрат натрия, 140,0 мМ хлорид натрия, 8,7 мМ HEPES, 4% (мас./об.) аскорбат натрия, 3,3% (мас./об.) Gentran-40. В конкретных вариантах осуществления композиции, которую можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержит по меньшей мере 3 мг/мл иодированной формы аминокислотных остатков 134-285 в SEQ ID NO: 2, 10,0 мМ цитрат натрия, 140,0 мМ хлорид натрия, 8,7 мМ HEPES, 4% (мас./об.) аскорбат натрия, 3,3% (мас./об.) Gentran-40. В конкретных вариантах осуществления композиции, которую можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержит по меньшей мере 4 мг/мл иодированной формы аминокислотных остатков 134-285 в SEQ ID NO: 2, 10,0 мМ цитрат натрия, 140,0 мМ хлорид натрия, 8,7 мМ HEPES, 4% (мас./об.) аскорбат натрия, 3,3% (мас./об.) Gentran-40. В конкретных вариантах осуществления композиции, которую можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержит по меньшей мере 4,6 мг/мл иодированной формы аминокислотных остатков 134-285 в SEQ ID NO: 2, 10,0 мМ цитрат натрия, 140,0 мМ хлорид натрия, 8,7 мМ HEPES, 4% (мас./об.) аскорбат натрия, 3,3% (мас./об.) Gentran-40.

В конкретных вариантах осуществления композиции, которую можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержит приблизительно между 0,1 и 20 мг/мл иодированной формы аминокислотных остатков 134-285 в SEQ ID NO: 2, 10,0 мМ цитрат натрия, 140,0 мМ хлорид натрия, 8,7 мМ HEPES, 4% (мас./об.) аскорбат натрия, 3,3% (мас./об.) Gentran-40. В конкретных вариантах осуществления композиции, которую можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержит приблизительно между 1 и 10 мг/мл иодированной формы аминокислотных остатков 134-285 в SEQ ID NO: 2, 10,0 мМ цитрат натрия, 140,0 мМ хлорид натрия, 8,7 мМ HEPES, 4% (мас./об.) аскорбат натрия, 3,3% (мас./об.) Gentran-40. В конкретных вариантах осуществления композиции, которую можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержит приблизительно между 2 и 8 мг/мл иодированной формы аминокислотных остатков 134-285 в SEQ ID NO: 2, 10,0 мМ цитрат натрия, 140,0 мМ хлорид натрия, 8,7 мМ HEPES, 4% (мас./об.) аскорбат натрия, 3,3% (мас./об.) Gentran-40. В конкретных вариантах осуществления композиции, которую можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержит приблизительно между 3 и 6 мг/мл иодированной формы аминокислотных остатков 134-285 в SEQ ID NO: 2, 10,0 мМ цитрат натрия, 140,0 мМ хлорид натрия, 8,7 мМ HEPES, 4% (мас./об.) аскорбат натрия, 3,3% (мас./об.) Gentran-40.

В предпочтительных вариантах осуществления композиции, которую можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержит антитело против нейтрокина-альфа. В других вариантах осуществления композиции, которую можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержит антитело, которое специфично связывает нейтрокин-альфа. В других вариантах осуществления композиции, которую можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержит антагонистическое антитело против нейтрокина-альфа. В других вариантах осуществления композиции, которую можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержит антитело, которое специфично связывает нейтрокин-альфа и нейтрализует биологическую активность нейтрокина-альфа. В других вариантах осуществления композиции, которую можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержит антитело против нейтрокина-альфа, которое связывает рекомбинантный белок нейтрокина-альфа, очищенный из клеточной культуры, где указанный рекомбинантный белок нейтрокина-альфа кодируется полинуклеотидом, кодирующим по меньшей мере аминокислоты с 134 по 285 в SEQ ID NO: 2. В других вариантах осуществления композиции, которую можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержит антитело, которое специфично связывает нейтрокин-альфа, где указанное антитело связывает рекомбинантный белок нейтрокина-альфа, очищенный из клеточной культуры, где указанный рекомбинантный белок нейтрокина-альфа кодируется полинуклеотидом, кодирующим, по меньшей мере, аминокислоты с 134 по 285 SEQ ID NO: 2.

Фармацевтические композиции, содержащие иммуномодулирующие средства, можно вводить перорально, ректально, парентерально, подкожно, интрацестерально, интравагинально, внутривентриально, местно (посредством порошков, мазей, капель или трансдермального пластыря), буккально или в качестве перорального или назального аэрозоля (например, посредством ингаляции пара или порошка).

Как используют в настоящем описании, термин "парентеральный" относится к способам введения, которые включают внутривенную, внутримышечную, внутривентриальную, интратестеральную, подкожную и внутрисуставную инъекцию и инфузию.

В предпочтительном варианте осуществления композиции, содержащие иммуномодулирующие средства, вводят подкожно.

В другом предпочтительном варианте осуществления композиции, содержащие иммуномодулирующие средства, вводят внутривенно.

Композиции, содержащие иммуномодулирующие средства, также можно вводить посредством систем для замедленного высвобождения. Пригодные примеры композиций для замедленного высвобождения включают пригодные полимерные материалы (например, такие как полупроницаемые полимерные матрицы в форме имеющих определенную форму изделий, например, пленок или микрокапсул), пригодные гидрофобные материалы (например, в качестве эмульсии в приемлемом масле) или ионообменные смолы и мало растворимые производные (например, такие как малорастворимая соль).

Матрицы для замедленного высвобождения включают полилактиды (патент США № 3773919, EP 58481), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата (Sidman, U. et al., *Biopolymers* 22:547-556 (1983)), поли(2-гидроксиэтилметакрилат) (R. Langer et al., *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277 (1981) и R. Langer, *Chem. Tech.* 12:98-105 (1982)), этиленвинилацетат (R. Langer et al., *Id.*) или поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту (EP 133988).

В конкретном варианте осуществления композиции, содержащие иммуномодулирующие средства, изготавливают в биологически деградируемой полимерной системе для доставки лекарственного средства, например, как описано в патентах США №№ 4938763; 5278201; 5278202; 5324519; 5340849 и 5487897 и в международных публикациях WO 01/35929, WO 00/24374 и WO 00/06117, которые включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме. В конкретных вариантах осуществления композиции, содержащие иммуномодулирующие средства, изготавливают с использованием биологически деградируемой системы ATRIGEL® от Atrix Laboratories, Inc. (Fort Collins, Colorado). В других конкретных вариантах осуществления композиции, содержащие иммуномодулирующие средства, изготавливают с использованием системы для замедленного высвобождения ProLease®, доступной от Alkermes, Inc. (Cambridge, MA).

Примеры биологически деградируемых полимеров, которые можно использовать в фармацевтических составах, включают, но не ограничиваются ими, полилактиды, полигликолиды, поликапролактоны, полиангидриды, полиамиды, полиуретаны, полиэфирамиды, полиортоэфиры, полидиоксаноны, полиацетали, поликетали, поликарбонаты, полиортокарбонаты, полифосфазены, полигидроксibuтираты, полигидроксивалераты, полиалкиленоксалаты, полиалкиленсукцинаты, полияблочную кислоту, полиаминокислоты, полиметилвиниловый эфир, полималеиновый ангидрид, поливинилпирролидон, полиэтиленгликоль, полигидроксицеллюлозу, хитин, хитозан и сополимеры, терполимеры или сочетания или смеси указанных выше материалов. Предпочтительными полимерами являются полимеры, которые обладают более низкой степенью кристаллизации и являются более гидрофобными. Эти полимеры и сополимеры являются более растворимыми в биологически совместимых растворителях, чем кристаллические в высокой степени полимеры, такие как полигликолид и хитин, которые также обладают высоким уровнем образования водородных связей. Предпочтительными материалами с требуемыми параметрами растворимости являются полилактиды, поликапролактоны и их сополимеры с гликолидом, в которых имеется большее количество аморфных участков в целях повышения растворимости. В конкретных предпочтительных вариантах осуществления биологически деградируемые полимеры, которые можно использовать для изготовления композиций, содержащих иммуномодулирующие средства, представляют собой сополимеры лактида и гликолидов. Свойства полимеров, такие как молекулярная масса, гидрофобность и соотношение лактид/гликолид, можно модифицировать в целях получения требуемого профиля высвобождения лекарственного средства (см., например, Ravivarapu et al., *Journal of Pharmaceutical Sciences* 89:732-741 (2000), которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме).

Также предпочтительно, чтобы растворитель для биологически деградируемого полимера был нетоксичным, растворимым в воде и иным образом биологически совместимым. Примеры таких растворителей включают, но не ограничиваются ими, N-метил-2-пирролидон, 2-пирролидон, C2-C6-алканола, C1-C15-спирты, диолы, триолы и тетраолы, такие как этанол, глицерин, пропиленгликоль, бутанол; C3-C15-алкилкетоны, такие как ацетон, диэтилкетон и метилэтилкетон; C3-C15-сложные эфиры, такие как метилацетат, этилацетат, этиллактат; алкилкетоны, такие как метилэтилкетон, C1-C15-амиды, такие как диметилформамид, диметилацетамид и капролактан; C3-C20-простые эфиры, такие как тетрагидрофуран или солкеталь; tween, триацетин, пропиленкарбонат, децилметилсульфоксид, диметилсульфоксид, олеиновую кислоту, 1-додецилазациклопентан-2-он. Другими предпочтительными растворителями являются бензиловый спирт, бензилбензоат, дипропиленгликоль, трибутирин, этилолеат, глицерин, гликофура, изопропилмиристат, изопропилпальмитат, олеиновая кислота, полиэтиленгликоль, пропиленкарбонат и триэтилцитрат. Наиболее предпочтительными растворителями являются N-метил-2-пирролидон, 2-пирролидон, диметилсульфоксид, триацетин и пропиленкарбонат, вследствие их способности к сольватации и их совместимости.

Кроме того, составы и композиции, содержащие иммуномодулирующие средства и биологически деградируемый полимер, также могут включать средства, модифицирующие скорость высвобождения, и/или образующие поры средства. Примеры средств, модифицирующих скорость высвобождения, включают, но не ограничиваются ими, жирные кислоты, триглицериды, другие средства, такие как гидрофоб-

ные соединения, органические растворители, пластификаторы и гидрофильные соединения. Пригодные средства, модифицирующие скорость высвобождения, включают, например, сложные эфиры моно-, ди- и трикарбоновых кислот, такие как 2-этоксиэтилацетат, метилацетат, этилацетат, диэтилфталат, диметилфталат, дибутилфталат, диметиладипат, диметилсукцинат, диметилоксалат, диметилцитрат, триэтилцитрат, ацетилтрибутилцитрат, ацетилтриэтилцитрат, глицеринтриацетат, ди(н-бутил)себацат и т.п.; полигидроксиспирты, такие как пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, глицерин, сорбит и т.п.; жирные кислоты; триэфиры глицерина, такие как триглицериды, эпоксицированное соевое масло и другие эпоксицированные растительные масла; стерин, такие как холестерин; спирты, такие как C₆-C₁₂-алканола, 2-этоксиэтанол и т.п. Средство, модифицирующее скорость высвобождения, можно использовать отдельно или в сочетании с другими такими средствами. Пригодные сочетания средств, модифицирующих скорость высвобождения, включают, но не ограничиваются ими, глицерин/пропиленгликоль, сорбит/глицерин, этиленоксид/пропиленоксид, бутиленгликоль/адипиновую кислоту и т.п. Предпочтительные средства, модифицирующие скорость высвобождения, включают, но не ограничиваются ими, диметилцитрат, триэтилцитрат, этилгептаноат, глицерин и гексаноидол. Пригодные образующие поры средства, которые можно использовать в композиции полимера, включают, но не ограничиваются ими, сахара, такие как сахароза и декстроза, соли, такие как хлорид натрия и карбонат натрия, полимеры, такие как гидроксипропилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, полиэтиленгликоль и поливинилпирролидон. Твердые кристаллы, которые будут обеспечивать требуемый размер пор, такие как соль или сахар, являются предпочтительными.

В конкретных вариантах осуществления композиции, содержащие иммуномодулирующие средства, изготавливают с использованием системы BEMA™ BioErodible Mucoadhesive System, системы MCA™ MucoCutaneous Absorption System, системы SMP™ Solvent MicroParticle System, или системы BCP™ Bio-Compatible Polymer System от Atrix Laboratories, Inc. (Fort Collins, Colorado).

Композиции для замедленного высвобождения также включают заключенные в липосомы композиции (см., главным образом, Langer, Science 249:1527-1533 (1990); Treat et al., в Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 317-327 и 353-365 (1989)). Липосомы можно получать способами, по существу, известными: DE 3218121; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82:3688-3692 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77:4030-4034 (1980); EP 52322; EP 36676; EP 88046; EP 143949; EP 142641; японская патентная заявка 83-118008; патенты США №№ 4485045 и 4544545 и EP 102324. Как правило, липосомы представляют собой небольшие липосомы (приблизительно 200-800 Ангстрем) однослойного типа, в которых содержание липидов составляет более чем приблизительно 30 мол.% холестерина, где выбранное соотношение корректируют для оптимальной иммуномодулирующей терапии.

В другом варианте осуществления композиции для замедленного высвобождения включают кристаллические составы, известные в данной области.

В другом дополнительном варианте осуществления композиции, содержащие иммуномодулирующее средство, доставляют посредством дозатора (см. Langer, выше; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald et al., Surgery 88:507 (1980); Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)).

Другие системы с контролируемым высвобождением описаны в обзоре Langer (Science 249:1527-1533 (1990)).

Для парентерального введения в одном варианте осуществления иммуномодулирующее средство изготавливают, главным образом, посредством смешивания его в требуемой степени чистоты в единичную дозированную инъекруемую форму (раствор, суспензию или эмульсию) с фармацевтически приемлемым носителем, т.е. носителем, который является нетоксичным для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и является совместимым с другими ингредиентами состава. Например, когда активный ингредиент представляет собой иммуномодулирующий белок, состав предпочтительно не включает окислителей и других соединений, о которых известно, что они оказывают неблагоприятное действие на полипептиды.

В конкретном варианте осуществления может быть желательным введение фармацевтических соединений или композиций местно в область, нуждающуюся в лечении; это введение можно проводить, например, и не ограничиваясь этим, посредством местной инфузии в ходе хирургической операции, местного применения, например, вместе с перевязкой раны после хирургической операции, посредством инъекции, посредством катетера, посредством суппозитория или посредством имплантата, где указанный имплантат представляет собой пористый, непористый или гелеобразный материал, включая мембраны, такие как мембраны на основе сиаластика или волокна. Предпочтительно при введении белка, включая антитело по этому изобретению, необходимо обращать внимание на то, чтобы применять материалы, на которые белок не адсорбируется.

В другом варианте осуществления иммуномодуляторное средство можно доставлять в пузырьке (vesicle), в частности липосомой (см. Langer, Science 249:1527-1533 (1990); Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infection Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327; see generally *ibid.*).

В другом варианте осуществления иммуномодулирующее средство можно доставлять в системе с контролируемым высвобождением. В одном варианте осуществления можно применять дозатор (см. Langer, выше; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald et al., Surgery 88:507 (1980); Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)). В другом варианте осуществления можно применять полимерные материалы (см. Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61 (1983); см. также Levy et al., Science 228:190 (1985); During et al., Ann. Neurol. 25:351 (1989); Howard et al., J. Neurosurg. 71:105 (1989)). В другом варианте осуществления систему с контролируемым высвобождением можно помещать вблизи терапевтической мишени, например головного мозга, что, таким образом, требует только части системной дозы (см., например, Goodson, в Medical Applications of Controlled Release, выше, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

Другие системы с контролируемым высвобождением описаны в обзоре Langer (Science 249:1527-1533 (1990)).

В конкретном варианте осуществления, где соединение по этому изобретению представляет собой нуклеиновую кислоту, кодирующую белок, нуклеиновую кислоту можно вводить *in vivo* для обеспечения экспрессии кодируемого ею белка, посредством конструирования ее в качестве части пригодного экспрессирующего нуклеиновую кислоту вектора и введения его, так чтобы он оказался внутриклеточным, например, посредством применения ретровирусного вектора (см. патент США № 4980286), или посредством прямой инъекции, или посредством применения бомбардировки микрочастицами (например, генной пушки; Biolistic, Dupont), или покрытием липидами или рецепторами клеточной поверхности или трансфицирующими средствами, или посредством введения его в связанном состоянии с гомеобокс-подобным пептидом, о котором известно, что он проникает в ядро (см., например, Joliet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868 (1991)) и т.д. Альтернативно нуклеиновую кислоту можно вводить внутриклеточно и встраивать в ДНК клетки-хозяина для экспрессии посредством гомологичной рекомбинации.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям. Такие композиции содержат терапевтически эффективное количество соединения и фармацевтически приемлемый носитель. В конкретном варианте осуществления термин "фармацевтически приемлемый" означает одобренный органом регулирования федерального правительства или правительства штата или приведенный в фармакопее США или другой широко известной фармакопее для применения у животных и более конкретно у человека. Термин "носитель" относится к разбавителю, адьюванту, эксципиенту или средству для доставки, с которым вводят лекарственное вещество. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая масла нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Когда фармацевтическую композицию вводят внутривенно, вода является предпочтительным носителем. Также в качестве жидких носителей можно использовать растворы физиологического раствора и водные растворы декстрозы и глицерина, в частности, для инъектируемых растворов. Пригодные фармацевтические эксципиенты включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, известняк, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое снятое молоко, глицерин, пропилен, глицоль, воду, этанол и т.п. Композиция, если желательна, также может содержать небольшие количества смачивающих средств, или эмульгаторов, или pH-буферных средств. Эти композиции могут быть в форме растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов с замедленным высвобождением и т.п. Композицию можно изготавливать в форме суппозитория с традиционными связующими веществами и носителями, такими как триглицериды. Пероральный состав может включать стандартные носители, такие как маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния и т.д. фармацевтической степени очистки. Примеры пригодных фармацевтических носителей описаны в "Remington's Pharmaceutical Sciences", E.W. Martin. Такие композиции будут содержать терапевтически эффективное количество соединения предпочтительно в очищенной форме совместно с количеством носителя, пригодным для обеспечения надлежащего введения пациенту. Состав должен соответствовать способу введения.

В предпочтительном варианте осуществления композицию изготавливают в соответствии с общепринятыми способами в качестве фармацевтической композиции, адаптированной для внутривенного введения человеку. Как правило, композиции для внутривенного введения представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. Если необходимо, композиция также может включать растворитель и местный анестетик, такой как лидокаин, для смягчения боли в области инъекции. Как правило, ингредиенты доставляют либо отдельно, либо в смеси друг с другом в единичной дозированной форме, например, в форме сухого лиофилизированного порошка или не содержащего воды концентрата в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или саше с указанием количества активного вещества. Когда композиция подлежит введению инфузией, ее можно помещать в бутылку для инфузии, содержащую стерильную воду или физиологический раствор фармацевтической степени очистки. Когда композицию вводят посредством инъекции, может быть предоставлена ампула со стерильной водой для инъекции или физиологическим раствором, чтобы можно было смешивать ингредиенты перед введением.

Иммуномодулирующие средства можно изготавливать в качестве нейтральных или солевых форм. Фармацевтически приемлемые соли включают соли, образованные с анионами, такие как соли, образованные хлористо-водородной, фосфорной, уксусной, щавелевой, виннокаменной кислотами и т.д., и соли, образованные с катионами, такие как соли, образованные гидроксидом натрия, калия, аммония, кальция, железа, изопропиламин, триэтиламин, 2-этиламиноэтанола, гистидином, прокаинам и т.д.

Количество иммуномодулирующего средства, которое будет эффективным в способах по этому изобретению, как описано в настоящем описании, можно определять стандартными клиническими способами. Кроме того, для упрощения определения оптимальных диапазонов доз необязательно можно использовать анализы *in vitro*. Точная доза, подлежащая применению в составе, также будет зависеть от способа введения и тяжести заболевания или нарушения, и она должна быть определена в соответствии с суждением врача и обстоятельствами для каждого пациента. Эффективные дозы могут быть экстраполированы из кривых доза-эффект, полученных с помощью систем для тестирования *in vitro* или в моделях на животных.

Для антител вводимая пациенту дозировка, как правило, составляет от 0,1 до 100 мг/кг массы тела пациента. Предпочтительно вводимая пациенту дозировка составляет между 0,1 и 20 мг/кг массы тела пациента, более предпочтительно от 1 до 10 мг/кг массы тела пациента. В предпочтительных вариантах осуществления пациенту вводят дозу 1, 4, 10 или 20 мг/кг внутривенно. Как правило, антитела человека обладают более длительным периодом полужизни в организме человека, чем антитела из других видов, вследствие иммунного ответа на чужеродные полипептиды. Таким образом, часто являются возможными более низкие дозировки антител человека и менее частое введение. Кроме того, дозировку и частоту введения антител по этому изобретению можно снижать повышением всасывания и проникновения в ткани (например, в головной мозг) антител посредством модификаций, например, таких как липидация.

В качестве общего предложения общее фармацевтически эффективное количество полипептида, вводимого парентерально на дозу, будет находиться в диапазоне приблизительно от 1 мкг/кг/сутки до 10 мг/кг/сутки на массу тела пациента, хотя, как указано выше, оно будет подвергаться рассмотрению терапевтом. Более предпочтительно эта доза составляет по меньшей мере 0,01 мг/кг/сутки и наиболее предпочтительно для человека между приблизительно 0,01 и 1 мг/кг/сутки.

В другом варианте осуществления полипептид вводят человеку в дозе между 0,0001 и 0,045 мг/кг/сутки, предпочтительно в дозе между 0,0045 и 0,045 мг/кг/сутки и более предпочтительно в дозе приблизительно 45 мкг/кг/сутки у человека и в дозе приблизительно 3 мг/кг/сутки у мышей.

При постоянном введении полипептид, как правило, вводят со скоростью дозирования от приблизительно 1 до приблизительно 50 мкг/кг/ч либо посредством 1-4 инъекций в сутки, либо посредством непрерывных подкожных инфузий, например, с использованием мини-дозатора. Также можно использовать раствор в пакете для внутривенной инфузии.

Длительность введения, требуемого для выявления изменений, и интервал после введения для проявления ответа, варьирует в зависимости от требуемого эффекта.

Композиции, содержащие иммуномодулирующие средства, можно вводить в качестве непрерывной инфузий, многократных отдельных инъекций в сутки (например, три или более раз в сутки или два раза в сутки), однократной инъекции в сутки или в качестве отдельных инъекций, проводимых с перерывами (например, два раза в сутки, один раз в сутки, раз в двое суток, два раза в неделю, раз в неделю, раз в две недели, раз в месяц, раз в два месяца и раз в три месяца). При постоянном введении полипептид, как правило, вводят со скоростью дозирования от приблизительно 0,001-10 до приблизительно 50 мкг/кг/ч, либо посредством 1-4 инъекций в сутки, либо посредством непрерывных подкожных инфузий, например, с использованием мини-дозатора.

Эффективные дозировки композиций, содержащих иммуномодулирующие средства, подлежащие введению, можно определять способами, хорошо известными специалистам в данной области, в которых рассматривают такие параметры, как биологическое время полужизни, биодоступность и токсичность.

Такое определение находится в пределах квалификации специалистов в данной области, особенно с учетом подробного описания, представленного в настоящем описании.

Биологическое воздействие на организм иммуномодулирующего средства может играть важную роль в определении терапевтически и/или фармакологически эффективной схемы дозирования. Варианты дозирования, такие как повторное введение относительно низкой дозы иммуномодулирующего средства в течение относительно длительного периода времени, могут оказывать эффект, который терапевтически и/или фармакологически отличается от эффекта, достигаемого при повторных введениях относительно высокой дозы иммуномодулирующего средства в течение относительно короткого периода времени.

С использованием эквивалентных коэффициентов пересчета дозировок относительно площади поверхности, предоставленных Freireich, E.J., et al. (Cancer Chemotherapy Reports 50(4): 219-44 (1966)), специалист в данной области способен пригодным образом преобразовать данные, полученные при применении иммуномодулирующего средства в данной экспериментальной системе, в точный показатель фармацевтически эффективного количества иммуномодулирующего средства, подлежащего введению на дозу, в другой экспериментальной системе. Экспериментальные данные, полученные при введении им-

муномодулирующего средства мышам, например, можно преобразовывать посредством коэффициентов пересчета, предоставленных Freireich, et al., в точные показатели фармацевтически эффективных доз нейтрокина-альфа у крысы, обезьяны, собаки и человека. Представленная ниже таблица пересчета (табл. III) представляет собой обобщенные данные, представленные Freireich, et al. В табл. III приведены приблизительные коэффициенты пересчета доз, выраженные в единицах мг/кг для одного вида в дозу для эквивалентной площади поверхности, выраженную в качестве мг/кг для другого вида, представленного в таблице.

Таблица III

Коэффициенты пересчета доз для эквивалентной площади поверхности

	К				
	Мышь	Крыса	Обезьяна	Собака	Человек
ОТ	(20 г)	(150 г)	(3,5 кг)	(8 кг)	(60 кг)
Мышь	1	1/2	1/4	1/6	1/12
Крыса	2	1	1/2	1/4	1/7
Обезьяна	4	2	1	3/5	1/3
Собака	6	4	5/3	1	1/2
Человек	12	7	3	2	1

Таким образом, например, с использованием коэффициентов пересчета, представленных в табл. III, доза 50 мг/кг у мыши преобразуется в соответствующую дозу 12,5 мг/кг у обезьяны, поскольку $(50 \text{ мг/кг}) \times (1/4) = 12,5 \text{ мг/кг}$. В качестве дополнительного примера дозы 0,02, 0,08, 0,8, 2 и 8 мг/кг у мыши приравниваются к эффективным дозам 1,667, 6,67, 66,7, 166,7 мкг/кг и 0,667 мг/кг соответственно у человека.

В определенных вариантах осуществления предусмотрено введение меченных радиоактивной меткой форм нейтрокина-альфа или антитела против нейтрокина-альфа. Радиометрическая дозировка, подлежащая применению, может значительно варьировать. Композицию меченного радиоактивной меткой нейтрокина-альфа или антитела против нейтрокина-альфа можно вводить в дозе от приблизительно 0,1 до приблизительно 100 мКи на 70 кг массы тела. В другом варианте осуществления композицию меченного радиоактивной меткой нейтрокина-альфа или антитела против нейтрокина-альфа можно вводить в дозе от приблизительно 0,1 до приблизительно 50 мКи на 70 кг массы тела. В другом варианте осуществления композицию меченного радиоактивной меткой нейтрокина-альфа или антитела против нейтрокина-альфа можно вводить в дозе приблизительно 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мКи на 70 кг массы тела.

Композицию меченного радиоактивной меткой нейтрокина-альфа или антитела против нейтрокина-альфа можно вводить в дозе от приблизительно 0,1 до приблизительно 10 мКи/кг массы тела. В другом варианте осуществления композицию меченного радиоактивной меткой нейтрокина-альфа или антитела против нейтрокина-альфа можно вводить в дозе от приблизительно 0,25 до приблизительно 5 мКи/кг массы тела. В конкретных вариантах осуществления композицию меченного радиоактивной меткой нейтрокина-альфа или антитела против нейтрокина-альфа можно вводить в дозе приблизительно 0,35, 0,70, 1,35, 1,70, 2,0, 2,5 или 3,0 мКи/кг.

Композицию меченного радиоактивной меткой нейтрокина-альфа или антитела против нейтрокина-альфа можно вводить в дозе от приблизительно 1 до приблизительно 50 мКи/м². В другом варианте осуществления композицию меченного радиоактивной меткой нейтрокина-альфа или антитела против нейтрокина-альфа можно вводить в дозе от приблизительно 10 до приблизительно 30 мКи/м². В конкретных вариантах осуществления композицию меченного радиоактивной меткой нейтрокина-альфа или антитела против нейтрокина-альфа можно вводить в дозе приблизительно 10, 15, 20, 25 или 30 мКи/м².

Общая концентрация белка нейтрокина-альфа, белка нейтрокина-альфа SV, антитела против нейтрокина-альфа и/или антитела против нейтрокина-альфа SV в композиции меченного радиоактивной меткой нейтрокина-альфа или антитела против нейтрокина-альфа также может варьировать, например, от приблизительно 1 мкг/кг до приблизительно 1 мг/кг. В конкретных вариантах осуществления общая концентрация белка нейтрокина-альфа, белка нейтрокина-альфа SV, антитела против нейтрокина-альфа и/или антитела против нейтрокина-альфа SV в композиции меченного радиоактивной меткой нейтрокина-альфа или антитела против нейтрокина-альфа может составлять приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 мкг/кг.

Например, известно, что лимфомы являются радиочувствительными опухолями. Для иммунодиагностической визуализации можно использовать мечение индикаторным изотопом с помощью комплекса, как правило, 1-20 мг белка нейтрокина-альфа метят посредством приблизительно от 1 до 60 мКи радиоизотопа. Доза в некоторой степени может зависеть от используемого для визуализации изотопа; количества на верхней границе диапазона, предпочтительно от 40 до 60 мКи, можно использовать в случае

^{99m}Tc ; количества на нижней границе диапазона, предпочтительно 1-20 мКи, можно использовать в случае ^{111}In . Для целей визуализации субъекту можно вводить от приблизительно 1 до приблизительно 30 мг комплекса нейтрокина-альфа. Для радиоиммунотерапевтических целей комплекс нейтрокина-альфа вводят субъекту в достаточном количестве, чтобы полная введенная в организм доза составляла вплоть до приблизительно 1100 сГр, но предпочтительно была меньшей или равной 500 сГр. Общее количество белка нейтрокина-альфа, вводимого субъекту, включая белок нейтрокина-альфа, конъюгат нейтрокина-альфа и комплекс нейтрокина-альфа, может варьировать от 1,0 мкг/кг до 1,0 мг/кг массы тела пациента. В другом варианте осуществления общее количество белка нейтрокина-альфа, вводимого субъекту, может варьировать от 20 до 100 мкг/кг массы тела пациента.

Количество радиоактивности, которое будет обеспечивать приблизительно 500 сГр всему организму человека, оценивают как приблизительно 825 мКи ^{131}I . Количества радиоактивности, подлежащие введению, зависят, частично, от выбранного изотопа. В случае терапии ^{90}Y пригодными считают количества радиоактивности от приблизительно 1 до приблизительно 200 мКи, с предпочтительными количествами, составляющими от 1 до 150 мКи, и наиболее предпочтительными количествами, составляющими от 1 до 100 мКи (например, 60 мКи). Предпочтительные способы оценки доз в тканях, исходя из введенной радиоактивности, представляют собой проведение визуализации или другой фармакокинетической схемы с индикаторной дозой, чтобы получить показатели для предварительной дозиметрии. При определении пригодной дозировки радиофармацевтического средства для введения индивиду необходимо учитывать количество радиации, которое получают отдельные органы по сравнению с максимальной толерантностью таких органов. Такая информация известна специалистам в данной области, например, см. Emami et al., *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 21:109-22 (1991) и Meredith, *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 17:83-99 (2002), обе из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме.

Протокол "высокой дозы", например, в диапазоне от 200 до 600 сГр (или выше) для всего организма может требовать обеспечения протокола замещения костного мозга, поскольку костный мозг представляет собой ткань, которая ограничивает дозировку облучения вследствие токсичности.

В конкретных вариантах осуществления пациенту проводят многократные введения композиции (например, антитела, которое специфично связывает нейтрокин-альфа или другое иммуномодулирующее средство, известное в данной области и/или описанное в настоящем описании). Один тип многократных введений относится к курсу. Один курс может включать, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более введений. Для любого одного введения доза может быть фиксированной или переменной, для обеспечения первоначальной ударной дозы лекарственного средства и/или для учета отличий массы, площади поверхности тела, активности заболевания, ответа на заболевание, переносимости лекарственного средства, времени восстановления, параметров РК и/или фармакологического ответа(ов) у конкретных пациентов.

Время между любыми двумя введениями в данном курсе может быть фиксированным или переменным для обеспечения соответствия отличиям активности заболевания, ответа заболевания, переносимости лекарственного средства, времени восстановления, параметров РК и/или фармакологического ответа(ов) у конкретных пациентов. В конкретных вариантах осуществления пациенту вводят первоначальную ударную дозу, которая в два раза превышает количество, вводимое при последующих введениях. В других вариантах осуществления период времени между любыми двумя введениями может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 суток (1 неделю) или более. В конкретных вариантах осуществления период времени между любыми двумя введениями может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель или более. Пациентам также можно проводить многократные курсы лечения. Если требуется более одного курса, время между любыми двумя курсами лечения может быть фиксированным или переменным для обеспечения соответствия отличиям активности заболевания, ответа заболевания, переносимости лекарственного средства, времени восстановления, параметров РК и/или фармакологического ответа(ов) у конкретных пациентов. В конкретных вариантах осуществления период между любыми двумя курсами может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6 недель или более. В конкретных вариантах осуществления период времени между любыми двумя курсами может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 месяцев или более. В конкретных вариантах осуществления период времени между любыми двумя курсами может составлять 1, 2, 3, 4, 5 лет или более. В конкретных вариантах осуществления пациенту проводят первоначальное болюсное введение с последующим одним или несколькими курсовыми лечениями.

В одном варианте осуществления первоначальное болюсное введение включает дозу, превышающую или равную 2 мг/кг антитела-антагониста нейтрокина-альфа, вводимого пациенту внутривенно. В одном варианте осуществления первоначальное болюсное введение включает дозу, превышающую или равную 5 мг/кг антитела-антагониста нейтрокина-альфа, вводимого пациенту внутривенно. В предпочтительных вариантах осуществления первоначальное болюсное введение включает дозу, превышающую или равную 10 мг/кг антитела-антагониста нейтрокина-альфа, вводимого пациенту внутривенно. В других вариантах осуществления первоначальное болюсное введение включает дозу, превышающую или равную 15 мг/кг антитела-антагониста нейтрокина-альфа, вводимого пациенту внутривенно. В одном варианте осуществления первоначальное болюсное введение включает дозу, превышающую или равную

20 мг/кг антитела-антагониста нейтрокина-альфа, вводимого пациенту внутривенно.

В других конкретных вариантах осуществления первоначальный болюс содержит антитело против CD20.

В других конкретных вариантах осуществления первоначальный болюс содержит средство, содержащее В-клетки.

Это изобретение также относится к фармацевтической упаковке или набору, содержащему один или несколько контейнеров, заполненных одним или несколькими ингредиентами фармацевтических композиций. Необязательно, к такому контейнеру(ам) может быть присоединено указание в форме, предписываемой государственным органом, регулирующим изготовление, применение и продажу фармацевтических средств или биологических продуктов, где указание отражает одобрение органом изготовления, применения или продажи для введения человеку.

Иммуномодулирующее средство можно вводить отдельно или в сочетании с другими лекарственными средствами, включая, но не ограничиваясь ими, одно или несколько дополнительных иммуномодулирующих средств, химиотерапевтических средств, антибиотиков, противовирусных средств, стероидных и нестероидных противовоспалительных средств, общепринятых иммунотерапевтических средств и цитокинов. Сочетания можно вводить либо совместно, например, в качестве смеси, отдельно, но одновременно, или параллельно; или последовательно. В такое введение включены случаи, когда комбинированные средства вводят совместно в качестве терапевтической смеси, а также процессы, когда комбинированные средства вводят отдельно, но одновременно, например, через отдельные внутривенные катетеры, одному и тому же индивиду. Введение "в сочетании" далее включает отдельное введение одного из соединений или средств, которое вводят сначала, после которого вводят второе средство.

В предыдущих абзацах описано, что иммуномодулирующее средство можно вводить в сочетании с другим соединением. В определенных случаях дополнительное соединение само также представляет собой иммуномодулирующее средство.

Подразумевается, что описание в этих абзацах предполагает, что конкретно предусмотрена возможность введения двух или более различных иммуномодулирующих средств в сочетании друг с другом совместно со способами по настоящему изобретению. Например, конкретно предусмотрено, что антитело против нейтрокина-альфа можно использовать вместе с антителом против CD20 совместно со способами по настоящему изобретению.

Традиционные неспецифичные иммунодепрессивные средства, которые можно вводить в сочетании с иммуномодулирующим средством, включают, но не ограничиваются ими, стероиды, циклоспорин, аналоги циклоспорина, циклофосфамид, внутривенный циклофосфамид, метилпреднизолон, преднизолон, азатиоприн, FK-506, 15-дезоксипергуалин и другие иммунодепрессивные средства, которые действуют посредством супрессии функции отвечающих Т-клеток. Другие иммунодепрессивные средства, которые можно вводить в сочетании с иммуномодулирующим средством, включают, но не ограничиваются ими, преднизолон, метотрексат, талидомид, метоксален, рапамицин, лефлуномид, мизорибин (BREDININ™), бреквинар, дезоксиспергуалин и азаспирин (SKF 105685).

В конкретных вариантах осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с иммунодепрессантом. Препараты иммунодепрессантов, которые можно вводить с иммуномодулирующим средством, включают, но не ограничиваются ими, ORTHOCLONE OKT® 3-(муромонаб-CD3), SANDIMUNE™, NEORAL™, SANGDYA™ (циклоспорин), PROGRAF® (FK506, такролимус), CELLCEPT® (микофенолата мотефил, активным метаболитом которого является микофеноловая кислота), IMURAN™ (азатиоприн), глюкокортикостероиды, адренокортикальные стероиды, такие как DELTASONE™ (преднизон) и HYDELTRASOL™ (преднизолон), FOLEX™ и MEXATE™ (метотрексат), OXSORALEN-ULTRA™ (метоксален) и RAPAMUNE™ (сиролимус). В конкретном варианте осуществления иммунодепрессанты можно применять для профилактики отторжения трансплантата органа или костного мозга.

В другом варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с терапией стероидами. Стероиды, которые можно вводить в сочетании с иммуномодулирующим средством, включают, но не ограничиваются ими, пероральные кортикостероиды, преднизон и метилпреднизолон (например, внутривенный метилпреднизолон). В конкретном варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с преднизолоном. В следующем конкретном варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с преднизолоном и иммунодепрессивным средством. Иммунодепрессивные средства, которые можно вводить с иммуномодулирующим средством и преднизолоном, представляют собой средства, описанные в настоящем описании, и они включают, но не ограничиваются ими, азатиоприн, циклофосфамид и внутривенный циклофосфамид. В другом конкретном варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с метилпреднизолоном. В следующем конкретном варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с метилпреднизолоном и иммунодепрессивным средством.

Иммунодепрессивные средства, которые можно вводить с иммуномодулирующим средством и метилпреднизолоном, представляют собой средства, описанные в настоящем описании, и они включают, но не ограничиваются ими, азатиоприн, циклофосфамид и внутривенный циклофосфамид.

рин, бендазак, бензидамин, буколом, дифенпирамид, дитазол, эморфазон, гвайазулен, набуметон, нимезулид, орготеин, оксацепрол, паранилин, перизоксал, пифоксим, проквазон, проксалол и тенидап.

В конкретных вариантах осуществления иммуномодулирующее средство вводят отдельно или в сочетании с антителом против CD4. В одном варианте осуществления совместное введение иммуномодулирующего средства с антителом против CD4 предусмотрено для лечения ревматоидного артрита. В одном варианте осуществления совместное введение иммуномодулирующего средства с антителом против CD4 предусмотрено для лечения системной красной волчанки.

В конкретных вариантах осуществления иммуномодулирующее средство вводят отдельно или в сочетании с антителом против IL-15. В одном варианте осуществления совместное введение иммуномодулирующего средства с антителом против IL-15 предусмотрено для лечения ревматоидного артрита. В одном варианте осуществления совместное введение иммуномодулирующего средства с антителом против IL-15 предусмотрено для лечения системной красной волчанки.

В конкретных вариантах осуществления иммуномодулирующее средство вводят отдельно или в сочетании с CTLA4-Ig и LEA29Y. В одном варианте осуществления совместное введение иммуномодулирующего средства с CTLA4-Ig и LEA29Y предусмотрено для лечения ревматоидного артрита. В одном варианте осуществления совместное введение иммуномодулирующего средства с CTLA4-Ig и LEA29Y предусмотрено для лечения системной красной волчанки.

В конкретных вариантах осуществления иммуномодулирующее средство вводят отдельно или в сочетании с антителом против рецептора для IL-6. В одном варианте осуществления совместное введение иммуномодулирующего средства с антителом против рецептора для IL-6 предусмотрено для лечения ревматоидного артрита. В одном варианте осуществления совместное введение иммуномодулирующего средства с антителом против рецептора для IL-6 предусмотрено для лечения системной красной волчанки.

В конкретных вариантах осуществления иммуномодулирующее средство вводят отдельно или в сочетании с антителом против C5 (компонента комплемента). В одном варианте осуществления совместное введение иммуномодулирующего средства с антителом против C5 предусмотрено для лечения ревматоидного артрита. В одном варианте осуществления совместное введение иммуномодулирующего средства с антителом против C5 предусмотрено для лечения системной красной волчанки.

В конкретных вариантах осуществления иммуномодулирующее средство вводят отдельно или в сочетании с ингибиторами каскада комплемента. Ингибиторы каскада комплемента включают, но не ограничиваются ими, антитела против пропердина (Gliatech); TP-10, рекомбинантный растворимый рецептор для комплемента I типа (AVANT Immunotheragenetics Inc.); пекселизмаб, ингибитор комплемента C5 (Alexion Pharmaceuticals Inc.); и 5G1.1, моноклональное антитело, которое препятствует расщеплению компонента комплемента C5 на его провоспалительные компоненты. В одном варианте осуществления совместное введение иммуномодулирующего средства с ингибиторами каскада комплемента предусмотрено для лечения воспаления, ревматоидного артрита и/или системной красной волчанки.

В другом варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с химиотерапевтическим средством. Химиотерапевтические средства, которые можно вводить с иммуномодулирующим средством, включают, но не ограничиваются ими, производные антибиотиков (например, доксорубин, блеомицин, даунорубин и дактиномицин); антиэстрогены (например, тамоксифен); антиметаболиты (например, фторурацил, 5-FU, метотрексат, флоксуридин, интерферон альфа-2b, глутаминовую кислоту, пликамицин, меркаптопурин и 6-тиогуанин); цитотоксические средства (например, кармустин, BCNU, ломустин, CCNU, цитозин арабинозид, циклофосфамид, эстрамустин, гидроксимочевину, прокарбазин, митомицин, бисульфат, цисплатин и винкристина сульфат); гормоны (например, медроксипрогестерон, эстрамустина фосфат натрия, этинилэстрадиол, эстрадиол, магестрола ацетат, метилтестостерон, диэтилстилбестрола дифосфат, хлортрианизен и тестолактон); производные азотистого иприта (например, мефален, хлорамбуцил, мехлорэтамин (азотистый иприт) и тиотепу); стероиды и сочетания (например, бетаметазона натрия фосфат); и другие (например, дикарбазин, аспарагиназу, митотан, винкристина сульфат, винбластин сульфат и этопозид).

В конкретном варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с CHOP (циклофосфамид, доксорубин, винкрестин и преднизон) или сочетанием одного или нескольких компонентов CHOP. В одном варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с антителами против CD20, моноклональными антителами против CD20 человека. В другом варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с антителами против CD20 и CHOP, или с антителами против CD20 и любым сочетанием одного или нескольких компонентов CHOP, в частности циклофосфамидом и/или преднизоном. В конкретном варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с ритуксимабом. В следующем варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят с ритуксимабом и CHOP, или ритуксимабом и любым сочетанием одного или нескольких компонентов CHOP, в частности циклофосфамидом и/или преднизоном. В конкретном варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с тозигумомабом (антителом против CD20 от Coulter Pharmaceuticals, San Francisco, CA). В следующем варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят с тозигумомабом и CHOP или тозигумомабом и любым со-

четанием одного или нескольких компонентов СНОР, в частности циклофосфамидом и/или преднизоном. Тозитумомаб необязательно может быть связан с ^{131}I . Антитела против CD20 необязательно могут быть связаны с радиоизотопами, токсинами или цитотоксическими пролекарствами.

В другом конкретном варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с ZevalinTM. В следующем варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят с ZevalinTM и СНОР или ZevalinTM и любым сочетанием одного или нескольких компонентов СНОР, в частности циклофосфамидом и/или преднизоном. ZevalinTM может быть связан с одним или несколькими радиоизотопами. Особенно предпочтительными изотопами являются ^{90}Y и ^{111}In .

В дополнительных вариантах осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с ритуксимабом (RituxaneTM) и/или ибритутوماбом тиуксетаном (ZevalinTM, например, либо (In-111) ибритутوماбом тиуксетаном, либо (Y-90) ибритутوماбом тиуксетаном). В конкретном варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с ритуксимабом и/или ибритутوماбом тиуксетаном для лечения неходжжкинской лимфомы.

В конкретных вариантах осуществления иммуномодулирующее средство вводят в качестве длительного лечения, которое дополняется введением антитела против CD20 после обострения заболевания, например после обострения волчанки.

В дополнительных вариантах осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с иматинибом мезилатом (Gleevec[®] метансульфонатом 4-[(4-метил-1-пиперазинил)метил]-N-[4-метил-3-[[4-(3-пиридинил)-2-пиримидинил]амино]фенил]бензамида).

В дополнительных вариантах осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с бортезомибом (VelcadeTM [(1R)-3-метил-1-[[[(2S)-1-оксо-3-фенил-2-[(пиразинилкарбонил)амино]пропил]амино]бутил]бороновой кислотой).

В дополнительных вариантах осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с алектузумабом (Campath[®]).

В дополнительных вариантах осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с флударабином фосфатом (Fludara[®] 9H-пурин-6-амин, 2-фтор-9-(5-O-фосфоно-β-D-арабинофуранозил) (2-фтор-ara-AMP)).

Иммуномодулирующее средство можно вводить в сочетании с одним или несколькими лекарственными средствами, пригодными для лечения множественной миеломы, включая, но не ограничиваясь ими, алкилирующие средства, антрациклины, кармустин (DTI-015, BCNU, BiCNU, Gliadel Wafer[®]), циклофосфамид (Cytosan[®], Neosar[®], CTX), дексаметазон (Decadron[®]), доксорубин (Adriamycin[®], Doxil[®], Rubex[®]), мелфалан (L-PAM, Alkeran[®], иприт фенилаланина), преднизон, талидомид и винкристин (Oncovorin[®], Onco TCS[®], VCR, Leurocristine[®]).

Предпочтительные сочетания лекарственных средств, пригодные для лечения множественной миеломы, которые можно вводить в сочетании с иммуномодулирующим средством, включают, но не ограничиваются ими, циклофосфамид + преднизон, мелфалан + преднизон (MP), винкристин + Adriamycin[®] + дексаметазон (VAD), винкристин + кармустин + мелфалан + циклофосфамид + преднизон (VBMCP; протокол M2), и винкристин + мелфалан + циклофосфамид + преднизон, чередующиеся с винкристин + кармустин + доксорубин + преднизон (VMCP/VBAP).

Иммуномодулирующее средство можно вводить в сочетании с одним или несколькими лекарственными средствами, пригодными для лечения неходжжкинской лимфомы, включая, но не ограничиваясь ими, 2-хлордезоксиаденозин, амифостин (Ethyol[®], Ethiofos[®], WR-272), бексаротен (Targretin[®], Targretin gel[®], Targretin oral[®], LGD 1069), блеомицин (Blenoxane[®]), бисульфат (Busulfex[®], Myleran[®]), карбоплатин (Paraplatin[®], CBDCA), кармустин (DTI-015, BCNU, BiCNU, Gliadel Wafer[®]), хлорамбуцил (Leukeran[®]), цисплатин (Platinol[®], CDDP), кладрибин (2-CdA, Leustatin[®]), циклофосфамид (Cytosan[®], Neosar[®], CTX), цитарабин (Cytosar-U[®], ara-C, цитозин арабинозид, DepoCyt[®]), дакарбазин (DTIC), даунорубин (дауномицин, DaunoXome[®], Daunorubicin[®], Cerubidine[®]), денилейкин дифтитокс (Ontak[®]), дексаметазон (Decadron[®]), долазетрона мезилат (Anzemet[®]), доксорубин (Adriamycin[®], Doxil[®], Rubex[®]), эритропоэтин (EPO[®], Epogen[®], Procrit[®]), этопозид фосфат (Etopophos[®]), этопозид (VP-16, Vepesid[®]), флударабин (Fludara[®], FAMP), гранизетрон (Kytril[®]), гидрокортизон, идарубин (Idamycin[®], DMDR, IDA), ифосфамид (IFEX[®]), интерферон альфа (Alfaferon[®], Alpha-IF[®]), интерферон альфа 2a (Intron A[®]), мехлорэтамин (азотистый иприт, HN₂, Mustargen[®]), мелфалан (L-PAM, Alkeran[®], иприт фенилаланина), Methotrexate[®] (MTX, Mexate[®], Folex[®]), метилпреднизолон (Solumedrol[®]), митоксантрон (Novantrone[®], DHAD), ондансетрон (Zofran[®]), пентостатин (Nipent[®], 2-дезоксикоформин), перфосфамид (4-гидропероксициклофосфамид, 4-HC), преднизон, прокарбазин (Matulane[®]), Rituximab[®] (Rituxane[®], MAb против CD20), тиоптепу (триэтилентиофосфорамид, Thioplex[®]), топотекан (Hycamtin[®], SK&F-104864, NSC-609699, Evotopin[®]), винбластин (Velban[®], VLB), винкристин (Oncovin[®], Onco TCS[®], VCR, Leurocristine[®]) и виндесин (Eldisine[®], Fildesin[®]).

Предпочтительные сочетания лекарственных средств, пригодные для лечения неходжжкинской лимфомы, которые можно вводить в сочетании с иммуномодулирующим средством, включают, но не

ограничиваются ими, Adriamycin® + бленоксан + винбластин + дакарбазин (ABVD), антиидиотипическая терапия (BsAb) + интерферон альфа, антиидиотипическая терапия (BsAb) + хлорамбуцил, антиидиотипическая терапия (BsAb) + интерлейкин-2, BCNU (кармустин) + этопозид + Ara-C (цитарабин) + мелфален (BEAM), блеомицин + этопозид + адриамицин + циклофосфамид + винкристин + прокарбазин + преднизон (BEACOPP), бриостатин + винкристин, циклофосфамид + BCNU (кармустин) + VP-16 (этопозид) (CBV), циклофосфамид + винкристин + преднизон (CVP), циклофосфамид + Adriamycin® (гидроксилдауномицин) + винкристин (онковорин) + преднизон (CHOP), циклофосфамид + Novantrone® (митоксантрон) + винкристин (онковорин) + преднизон (CNOP), циклофосфамид + доксорубицин + тенипозид + преднизон, циклофосфамид + Adriamycin® (гидроксилдауномицин) + винкристин (онковорин) + преднизон + ритуксимаб (CHOP + ритуксимаб), циклофосфамид + доксорубицин + тенипозид + преднизон + интерферон альфа, цитарабин + блеомицин + винкристин + метотрексат (CytaBOM), дексаметазон + цитарабин + цисплатин (DHAP), дексаметазон + ифосфамид + цисплатин + этопозид (DICE), доксорубицин + винбластин + мехлорэтамин + винкристин + блеомицин + этопозид + преднизон (Stanford V), этопозид + винбластин + адриамицин (EVA), этопозид + метилпреднизон + цитарабин + цисплатин (ESHAP), этопозид + преднизон + ифосфамид + цисплатин (EPIC), флударабин, митоксантрон + дексаметазон (FMD), флударабин, дексаметазон, цитарабин (ara-C), + цисплатин (Platinol®) (FluDAp), ифосфамид + цисплатин + этопозид (ICE), мехлорэтамин + Oncovin® (винкристин) + прокарбазин + преднизон (MOPP), Mesna + ифосфамид + идарубицин + этопозид (MIZE), метотрексат с восстановлением лейковорином + блеомицин + адриамицин + циклофосфамид + онковорин + дексаметазон (m-BACOD), преднизон + метотрексат + адриамицин + циклофосфамид + этопозид (ProMACE), тиотепа + бисульфат + циклофосфамид, тиотепа + бисульфат + мелфалан, топотекан + паклитаксел и винкристин (Oncovin®) + Adriamycin® + дексаметазон (VAD).

Следующие примеры лекарственных средств, пригодных для лечения неходжкинской лимфомы, которые можно вводить в сочетании с иммуномодулирующим средством, включают, но не ограничиваются ими, A007 (4-4'-дигидроксibenзофенон-2,4-динитрофенилгидразон), AG-2034 (AG-2024, AG-2032, GARFT (ингибитор [глицинамидрибонуклеозидтрансформилазы]), альдеслейкин (IL-2, Proleukin®), алемтузумаб (Campath®), алитретиноин (Panretin®, LGN-1057), альтретамин (Hexalen®, гексаметилмеламин, Hexastat®), аминокамптотетин (9-AC, 9-аминокамптотетин, NSC 603071), MAb против CD19/CD3 (scFv против CD19/CD3, MAb против NHL), антиидиотипическую терапию (BsAb), арабинозилгуанин (Ara-G, GW506U78), триоксид мышьяка (Trisenox®, ATO), B43-генистеин (конъюгат Ат против CD19/генистеин), конъюгаты антитела B7, бетатин (Beta-LT), антагонисты BLYS, бриостатин-1 (Briostatin®, BMY-45618, NSC-339555), CHML (цитотрофные гетерогенные молекулярные липиды), клофарабин (хлор-фтор-араА), даклизумаб (Zenepax®), депсипептид (FR901228, FK228), доластатин-10 (DOLA-10, NSC-376128), эприрубицин (Ellence®, EPI, 4'-эпидоксорубицин), эпратузумаб (Lymphocide®, гуманизированное антитело против CD22, HAT), лиганд Fly3/flk2 (Mobista®), G3139 (Genasense®, GentaAnticodex®, антисмысловая молекула для Bcl-2), HulD10 (MAb против HLA-DR, SMART 1D10), HumaLYM (MAb против CD20), ибри-туломаба тиуксетан (Zevalin®), интерферон-гамма (гамма-интерферон, Gamma 100®, Gamma-IF), ирино-текан (Camptosar®, CPT-11, Topotecin®, CaptoCPT-1), ISIS-2053, ISIS-3521 (антисмысловая молекула для PKC-альфа), иммунотоксин Lmb-2 (рекомбинантный иммунотоксин против CD25, anti-Tac(Fv)-PE38), Leuvestin® (цитотектин + ген IL-2, генная терапия IL-2), Lym-1 (131-LLYM-1), вакцину против лимфомы (Genitope), неларабин (соединение 506, U78), соединения Neugene (Oncomyc-NG®, Resten-NG®, антисмысловая молекула для myc), NovoMAb-G2 scFv (NovoMAb-G2 IgM), O6-бензилгуанин (BG, Procept®), оксалиплатин (Eloxatine®, Eloxatin®), паклитаксел (Paxene®, Taxol®), паклитаксел-DHA (Taxoprexin®), пел-дезин (BCX-34, ингибитор PNP), ребеккамицин и аналоги ребеккамицина, SCH-66336, собузоксан (MST-16, Perazolin®), SU5416 (Semaxanib®, ингибитор VEGF), TER-286, талидомид, TNP-470 (AGM-1470), то-зитумомаб (Bexxar®), валсподар (PSC 833), ваксид (ДНК-вакцина против В-клеточной лимфомы), вино-релбин (Navelbine®), WF10 (регулятор макрофагов) и XR-9576 (XR-9351, ингибитор Р-гликопротеина/MDR).

Иммуномодулирующее средство можно вводить в сочетании с одним или несколькими лекарственными средствами, пригодными для лечения острого лимфоцитарного лейкоза, включая, но не ограничиваясь ими, амсакрин, карбоплатин (Paraplatin®, CBDCA), кармустин (DTI-015, BCNU, BiCNU, Glyadel Wafer®), холекалиферол, циклофосфамид (Citoxan®, Neosar®, CTX), цитарабин (Cytosar-U®, ara-C, цитозина арабинозид, DepoCyt®), даунорубицин (дауномицин, DaunoXome®, Daunorubicin®, Cerubidine®), дексаметазон (Decadron®), доксорубицин (Adriamycin®, Doxil®, Rubex®), этопозид (VP-16, Vepesid®), Filgrastam® (Neupogen®, G-CSF, Leukine®), флударабин (Fludara®, FAMP), идарубицин (Idamycin®, DMDR, IDA), ифосфамид (IFEX®), иматиниба мезилат (STI-571, Imatinib®, Glivec®, Gleevec®, ингибитор тирозинкиназы Abl), интерферон-гамма (гамма-интерферон, Gamma 100®, Gamma-IF), L-аспарагиназа (Elspar®, Crastinin®, Asparaginase medac®, Kidrolase®), меркаптопурин (6-меркаптопурин, 6-MP), Methotrexate® (MTX, Mexate®, Folex®), митоксантрон (Novantrone®, DHAD), Pegaspargase® (Oncospar®), пред-

низон, ретиноевую кислоту, тенипозид (VM-26, Vumon[®]), тиогуанин (6-тиогуанин, 6-TG), топотекан (Hycamtin[®], SK&F-104864, NSC-609699, Evotopin[®]), третиноин (Retin-A[®], Atragen[®], ATRA, Vesanoid[®]) и винкристин (Oncovirin[®], Onco TCS[®], VCR, Leurocristine[®]).

Следующие примеры лекарственных средств, пригодных для лечения острого лимфоцитарного лейкоза, которые можно вводить в сочетании с иммуномодулирующим средством, включают, но не ограничиваются ими, аминокамптотецин (9-AC, 9-аминокамптотецин, NSC 603071), аминокпертин, аннамицин (AR-522, аннамицин LF, Aronex[®]), арабинозилгуанин (Ara-G, GW506U78, Nelzarabine[®]), триоксид мышьяка (Trisenox[®], ATO, Atrivex[®]), B43-генистеин (конъюгат Ат против CD19/генистеин), B43-PAP (конъюгат Ат против CD19/противовирусный белок лаконоса), кордицепин, CS-682, децитабин (5-аза-2'-дезоксидитидин), доластатин-10 (DOLA-10, NSC-376128), G3139 (Genasense[®], GentaAnticode[®], антисмысловая молекула Bcl-2), ирофульвен (MGI-114, ивофульван, аналог ацилфулвена), MS-209, фенилбутират, хинин, TNP-470 (AGM-1470, фумагиллин), триметрексат (Neutrexin[®]), троксацитабин (BCH-204, BCH-4556, Troxatyl[®]), UCN-01 (7-гидроксистауропорин), WHI-P131 и вакцину WT1.

Предпочтительные сочетания лекарственных средств, пригодные для лечения острого лимфоцитарного лейкоза, которые можно вводить в сочетании с иммуномодулирующим средством, включают, но не ограничиваются ими, карбоплатин + митоксантрон, кармустин + циклофосфамид + этопозид, цитарабин + даунорубин, цитарабин + доксорубин, цитарабин + идарубин, цитарабин + интерферон-гамма, цитарабин + аспарагиназа, цитарабин + митоксантрон, цитарабин + флударабин и митоксантрон, этопозид + цитарабин, этопозид + ифосфамид, этопозид + митоксантрон, ифосфамид + этопозид + митоксантрон, ифосфамид + тенипозид, метотрексат + меркаптопурин, метотрексат + меркаптопурин + винкристин + преднизон, фенилбутират + цитарабин, фенилбутират + этопозид, фенилбутират + топотекан, фенилбутират + третиноин, хинин + доксорубин, хинин + митоксантрон + цитарабин, тиогуанин + цитарабин + амсакрин, тиогуанин + этопозид + идарубин, тиогуанин + ретиноевая кислота + холекальциферол, винкристин + преднизон, винкристин + преднизон и L-аспарагиназа, винкристин + дексаметазон/преднизон + аспарагиназа + даунорубин/доксорубин, винкристин + дексаметазон/преднизон + аспарагиназа + даунорубин/доксорубин + филграстим, винкристин + дексаметазон/преднизон + аспарагиназа + даунорубин/доксорубин + циклофосфамид + метотрексат и винкристин + дексаметазон/преднизон + аспарагиназа + даунорубин/доксорубин + циклофосфамид + метотрексат + филграстим.

Иммуномодулирующее средство можно вводить в сочетании с одним или несколькими лекарственными средствами, пригодными для лечения хронического лимфоцитарного лейкоза, включая, но не ограничиваясь ими, хлорамбуцил (Leukeran[®]), кладрибин (2-CdA, Leustatin[®]), циклофосфамид (Cytosan[®], Neosar[®], CTX), цитарабин (Cytosar-U[®], ara-C, цитозина арабинозид, DepoCyt[®], цитарабина оксфосфат, ara-CMP), доксорубин (Adriamycin[®], Doxil[®], Rubex[®]), флударабин (Fludara[®], FAMP), пентостатин (Nipent[®], 2-дезоксикоформин), преднизон и винкристин (Oncovirin[®], Onco TCS[®], VCR, Leurocristine[®]).

Следующие примеры лекарственных средств, пригодных для лечения хронического лимфоцитарного лейкоза, которые можно вводить в сочетании с иммуномодулирующим средством, включают, но не ограничиваются ими, алемтузумаб (Campath[®]), аминокамптотецин (9-AC, 9-аминокамптотецин, NSC 603071), аминокпертин, аннамицин (AR-522, аннамицин LF, Aronex[®]), арабинозилгуанин (Ara-G, GW506U78, Nelzarabine[®], соединение 506U78), триоксид мышьяка (Trisenox[®], ATO, Atrivex[®]), бриостатин-1 (Briostatine[®], BMY-45618, NSC-339555), CS-682, доластатин-10 (DOLA-10, NSC-376128), филграстим (Neupogen[®], G-CSF, Leukine), флавопиридол (NSC-649890, HMR-1275), G3139 (Genasense[®], GentaAnticode[®], антисмысловая молекула Bcl-2), ирофульвен (MGI-114, ивофульван, аналог ацилфулвена), MS-209, фенилбутират, Rituximab[®] (Rituxan[®], MAb против CD20), талидомид, теофиллин, TNP-470 (AGM-1470, фумагиллин), UCN-01 (7-гидроксистауропорин) и WHI-P131.

Предпочтительные сочетания лекарственных средств, пригодные для лечения хронического лимфоцитарного лейкоза, которые можно вводить в сочетании с иммуномодулирующим средством, включают, но не ограничиваются ими, флударабин + преднизон и циклофосфамид + доксорубин + винкристин + преднизон (CHOP).

В дополнительном варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с цитокинами. Цитокины, которые можно вводить с иммуномодулирующим средством, включают, но не ограничиваются ими, GM-CSF, G-CSF, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL10, IL12, IL13, IL15, anti-CD40, CD40L, IFN-альфа, IFN-бета, IFN-гамма, TNF-альфа и TNF-бета. В другом варианте осуществления иммуномодулирующее средство можно вводить с любым интерлейкином, включая, но не ограничиваясь ими, IL-1альфа, IL-1бета, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20 и IL-21 и IL-22. В предпочтительных вариантах осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с IL4 и IL10. Авторами настоящего изобретения было выявлено, что как IL4, так и IL10 повышает опосредуемую нейтрокином-альфа пролиферацию В-клеток.

Авторами настоящего изобретения было выявлено, что *in vitro* каждый из IFN-гамма и IL-10 повышает экспрессию нейтрокина-альфа на клеточной поверхности моноцитов и макрофагов (макрофаги по-

лучали культивированием первичных моноцитов с 20 нг/мл М-CSF в течение 12-15 суток), в то время как обработка IL-4 снижала экспрессию нейтрокина-альфа на клеточной поверхности моноцитов и макрофагов. IL-4, вводимый с IL-10, приводил к полному ингибированию индуцируемой посредством IL-10 экспрессии на клеточной поверхности нейтрокина-альфа. IL-4, вводимый с IFN-гамма, приводил к повышенной экспрессии на клеточной поверхности нейтрокина-альфа. Обработка макрофагов посредством IFN-гамма и IL-10 приводила к 3-кратному повышению высвобождения растворимого (активного) нейтрокина-альфа в культуральную среду, по сравнению с необработанными макрофагами.

В дополнительном варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят с хемокином. В другом варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят с хемокином бета-8, хемокином бета-1 и/или воспалительным белком макрофагов-4. В предпочтительном варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят с хемокином бета-8.

В дополнительном варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с антагонистом IL-4. Антагонисты IL-4, которые можно вводить с иммуномодулирующим средством, включают, но не ограничиваются ими, полипептиды растворимого рецептора для IL-4, мультимерные формы полипептидов растворимого рецептора для IL-4; антитела против рецептора для IL-4, которые связывают рецептор для IL-4 без передачи биологического сигнала, вызываемого IL-4, антителами против IL-4, которые блокируют связывание IL-4 с одним или несколькими рецепторами IL-4, и мутеины IL-4, которые связывают рецепторы для IL-4, но не передают биологический сигнал, вызываемый IL-4. Предпочтительно антитела, используемые в соответствии с этим способом, представляют собой моноклональные антитела (включая фрагменты антител, например, такие как фрагменты, описанные в настоящем описании).

В дополнительном варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с гемопэзическими факторами роста. Гемопэзические факторы роста, которые можно вводить с иммуномодулирующим средством, включают, но не ограничиваются ими, LEUKINE™ (SARGRAMOSTIM™) и NEUPOGEN™ (FILGRASTIM™).

В дополнительном варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с факторами роста фибробластов. Факторы роста фибробластов, которые можно вводить с иммуномодулирующим средством, включают, но не ограничиваются ими, FGF-1, FGF-2, FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, FGF-7, FGF-8, FGF-9, FGF-10, FGF-11, FGF-12, FGF-13, FGF-14 и FGF-15.

В дополнительном варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с антигипертензивным средством.

Антигипертензивные средства, которые можно вводить с иммуномодулирующим средством, включают, но не ограничиваются ими, средства, блокирующие кальциевые каналы, такие как нифедипин (ADALAT™, PROCARDIA™); периферические вазодилататоры, такие как гидралазин (APRESOLINE™); бета-адренергические блокирующие средства, такие как пропранолол (INDERAL™); альфа/бета-адренергические блокаторы, такие как лабетолол (NORMODYNE™, TRANDATE™); средства, которые ингибируют продукцию ангиотензина II, такие как каптоприл (CAPOTEN™), средства, которые прямо ингибируют активность ангиотензина II, такие как лозартан (COZAAR™); и тиазидные диуретики, такие как гидрохлортиазид (HYDRODIURIL™, ESIDREX™).

Иммуномодулирующие средства можно вводить отдельно или в сочетании с другими адъювантами. Адъюванты, которые можно вводить с иммуномодулирующим средством, включают, но не ограничиваются ими, квасцы, квасцы плюс дезоксихолат (ImmunoAg), MTP-PE (Biocine Corp.), QS21 (Genentech, Inc.), BCG и MPL. В конкретном варианте осуществления иммуномодулирующие средства вводят в сочетании с квасцами. В другом конкретном варианте осуществления иммуномодулирующие средства вводят в сочетании с QS-21. Следующие адъюванты, которые можно вводить с иммуномодулирующими средствами, включают, но не ограничиваются ими, монофосфориллипидный иммуномодулятор, AdjuVax 100a, QS-21, QS-18, CRL1005, соли алюминия, MF-59 и адъюванты виросомной технологии. Вакцины, которые можно вводить с иммуномодулирующим средством, включают, но не ограничиваются ими, вакцины направленные на защиту против MMR (корь, свинка, краснуха), полиомиелита, ветрянки, столбняка/дифтерии, гепатита А, гепатита В, Haemophilus influenzae В, коклюша, пневмонии, гриппа, болезни Лайма, ротавируса, холеры, желтой лихорадки, японского энцефалита, полиомиелита, бешенства, брюшного тифа и коклюша и/или PNEUMOVAX-23™. В другом конкретном варианте осуществления иммуномодулирующее средство применяют в сочетании с PNEUMOVAX-23™.

В одном варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с другим членом семейства TNF. TNF, TNF-связанные или TNF-подобные молекулы, которые можно вводить с иммуномодулирующим средством, включают, но не ограничиваются ими, растворимые формы TNF-альфа, лимфотоксин-альфа (LT-альфа, также известный как TNF-бета), LT-бета (находящийся в гетеротримерном комплексе LT-альфа2-бета), OPGL, FasL, CD27L, CD30L, CD40L, 4-1BBL, DcR3, OX40L, TNF-гамма (международная публикация WO 96/14328), TRAIL/AIM-I (международная публикация WO 97/33899), LIGHT/AIM-II (международная публикация WO 97/34911), APRIL (J. Exp. Med. 188(6):1185-1190), эндокин-альфа (международная публикация WO 98/07880), FASTR/TR6 (международная публика-

ция WO 98/30694), остеопротегрин (OPG), и нейтрокин-альфа (международная публикация WO 98/18921, OX40 и фактор роста нервов (NGF), и растворимые формы Fas, CD30, CD27, CD40 и 4-IBB, TR2 (международная публикация WO 96/34095), DR3 (международная публикация WO 97/33904), TRAIL-R1/DR4 (международная публикация WO 98/32856), TRAIL-R3, TR5 (международная публикация WO 98/30693), TR6 (международная публикация WO 98/30694), TRAIL-R2/TR7 (международная публикация WO 98/41629), TRANK, TR9 (международная публикация WO 98/56892), TRAIL-R4/TR10 (международная публикация WO 98/54202), 312C2 (международная публикация WO 98/06842) и TR12.

В другом варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с одним или несколькими рецепторами для нейтрокина-альфа (например, TACI, BCMA и BAFF-R). В предпочтительных вариантах осуществления рецептор для нейтрокина-альфа является растворимым. В других предпочтительных вариантах осуществления рецептор для нейтрокина-альфа является слитым с Fc-участком молекулы иммуноглобулина, таким как Fc-участок молекулы IgG1. Например, аминокислотные остатки 1-154 TACI (регистрационный номер GenBank AAC51790), аминокислоты 1-48 BCMA (регистрационный номер GenBank NP_001183 или аминокислоты с 1 по 81 BAFF-R (регистрационный номер GenBank NP_443177) могут быть слитыми с Fc-участком IgG-молекулы, и их можно использовать в сочетании с другим иммуномодулирующим средством, известным в данной области и/или описанным в настоящем описании. В другом варианте осуществления белок BAFF-R-Fc, который можно вводить в сочетании с иммуномодулирующим средством, представляет собой аминокислоты 1-70 SEQ ID NO: 10, слитые с Fc-участком молекулы иммуноглобулина IgG1. Необязательно, аминокислота 20 (валин) в BAFF-R замещена аспарагином и аминокислота 27 (лейцин) в BAFF-R замещена пролином.

В предпочтительном варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с антителами против CD40L и/или антителами против CD40.

В дополнительном варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят отдельно или в сочетании с антиангиогенным средством(ами). Антиангиогенные средства, которые можно вводить с иммуномодулирующим средством, включают, но не ограничиваются ими, ангиостатин (Entremed, Rockville, MD), тропонин-1 (Boston Life Sciences, Boston, MA), антиинвазивный фактор, ретиноевую кислоту и ее производные, паклитаксел (Taxol), сурамин, тканевой ингибитор металлопротеиназы-1, тканевой ингибитор металлопротеиназы-2, VEGF, ингибитор активатора плазминогена-1, ингибитор активатора плазминогена-2 и различные формы легких переходных металлов "d-группы".

Легкие переходные металлы "d-группы" включают, например, формы ванадия, молибдена, вольфрама, титана, ниобия и тантала. Такие формы переходных металлов могут образовывать комплексы металлов. Пригодные комплексы вышеупомянутых форм переходных металлов включают оксокомплексы переходных металлов.

Репрезентативные примеры комплексов ванадия включают оксокомплексы ванадия, такие как ванадатные и ванадилные комплексы. Пригодные ванадатные комплексы включают метаванадатные и ортованадатные комплексы, например, такие как метаванадат аммония, метаванадат натрия и ортованадат натрия. Пригодные ванадилные комплексы включают, например, ванадилацетилацетонат и ванадилсульфат, включая гидраты ванадилсульфата, такие как моно- и тригидраты ванадилсульфата.

Репрезентативные примеры комплексов вольфрама и молибдена также включают оксокомплексы. Пригодные оксокомплексы вольфрама включают комплексы вольфрамата и оксида вольфрама. Пригодные комплексы вольфрамата включают вольфраMAT аммония, вольфраMAT кальция, вольфраMAT натрия дигидрат и вольфрамную кислоту. Пригодные оксиды вольфрама включают оксид вольфрама(IV) и оксид вольфрама(VI). Пригодные оксокомплексы молибдена включают комплексы молибдата, оксида молибдена и молибденильные комплексы. Пригодные комплексы молибдата включают молибдат аммония и его гидраты, молибдат натрия и его гидраты и молибдат калия и его гидраты. Пригодные оксиды молибдена включают оксид молибдена(VI), оксид молибдена(VI) и молибденовую кислоту. Пригодные молибденильные комплексы включают, например, молибденилацетилацетонат. Другие пригодные комплексы вольфрама и молибдена включают гидроксопроизводные, образованные, например, из глицерина, виннокаменной кислоты и сахаров.

Также в контексте настоящего изобретения можно применять широкое множество других антиангиогенных факторов. Их репрезентативные примеры включают, но не ограничиваются ими, тромбоцитарный фактор 4; сульфат протамина; сульфатные производные хитина (получаемые из панциря краба-стригуна), (Murata et al., Cancer Res. 51:22-26, (1991)); комплекс сульфатного полисахарида и пептидогликана (SP-PG) (функция этого соединения может усиливаться при наличии стероидов, таких как эстроген и тамоксифен цитрат); стауроспорин; модуляторы матриксного метаболизма, включая, например, аналоги пролина, цисгидроксипролин, d,L-3,4-дегидропролин, тиапролин, альфа,альфа-дипиридил, аминопропионитрилфумарат; 4-пропил-5-(4-пиридинил)-2(3H)-оксазолон; метотрексат; митоксантрон; гепарин; интерфероны; сывороточный 2-макроглобулин; ChIMP-3 (Pavloff et al., J. Bio. Chem. 267:17321-17326, (1992)); химостатин (Tomkinson et al., Biochem J. 286:475-480, (1992)); циклодекстрина тетрадекасульфат; эпонемидин; камптотецин; фумагиллин (Ingber et al., Nature 348:555-557, (1990)); золота натрия тиомалат ("GST"; Matsubara and Ziff, J. Clin. Invest. 79:1440-1446, (1987)); сывороточную антикоагулянтную; альфа2-антиплазмин (Holmes et al., J. Biol. Chem. 262 (4):1659-1664, (1987)); бисантрон (National Can-

cer Institute); лобензарит динатрий (динатрий N-(2)-карбоксифенил-4-хлорантронильная кислота или "CCA"; (Takeuchi et al., Agents Actions 36:312-316, (1992)); и ингибиторы металлопротеиназы, такие как BB94.

Дополнительные антиангиогенные факторы, которые также можно применять в контексте настоящего изобретения, включают талидомид (Celgene, Warren, NJ); ангиостатический стероид; AGM-1470 (H. Brem and J. Folkman J. Pediatr. Surg. 28:445-51 (1993)); антагонист интегрин альфа v бета 3 (C. Storgard et al., J. Clin. Invest. 103:47-54 (1999)); карбоксиаминоимидазол; карбоксиамидотриазол (CAI) (National Cancer Institute, Bethesda, MD); конбретастатин A-4 (CA4P) (OXiGENE, Boston, MA); скваламин (Magainin Pharmaceuticals, Plymouth Meeting, PA); TNP-470 (Tap Pharmaceuticals, Deerfield, IL); ZD-0101 Astra-Zeneca (London, UK); APRA (CT2584); бенефин, биростатин-1 (SC339555); CGP-41251 (PKC 412); CM101; дексразоксан (ICRF187); DMXAA; эндостатин; флавопридиол; генестеин; GTE; ImmTher; прессу (ZD1839); октреотид (соматостатин); панретин; пенацилламин; фотопойнт; PI-88; приномастат (AG-3340) пурлитин; сурадисту (FCE26644); тамоксифен (Nolvadex); тазаротен; тетраиомолибдат; кселоду (капецитабин) и 5-фторурацил.

Антиангиогенные средства, которые можно вводить в сочетании с иммуномодулирующим средством, могут действовать через множество механизмов, включая, но не ограничиваясь ими, ингибирование протеолиза внеклеточного матрикса, блокирование функции молекул адгезии эндотелиальная клетка-внеклеточный матрикс, антагонизм функции индукторов ангиогенеза, таких как факторы роста, и ингибирование рецепторов для интегринов, экспрессирующихся на пролиферирующих эндотелиальных клетках. Примеры антиангиогенных ингибиторов, которые препятствуют протеолизу внеклеточного матрикса и которые можно вводить в сочетании с иммуномодулирующим средством, включают, но не ограничиваются ими, AG-3340 (Agouron, La Jolla, CA), BAY-12-9566 (Bayer, West Haven, CT), BMS-275291 (Bristol Myers Squibb, Princeton, NJ), CGS-27032A (Novartis, East Hanover, NJ), маримастат (British Biotech, Oxford, UK) и метастат (Aeterna, St-Foy, Quebec). Примеры антиангиогенных ингибиторов, которые действуют посредством блокирования функции молекул адгезии эндотелиальная клетка-внеклеточный матрикс и которые можно вводить в сочетании с иммуномодулирующим средством, включают, но не ограничиваются ими, EMD-121974 (Merck KgaA Darmstadt, Germany) и витаксин (Ixsys, La Jolla, CA/Medimmune, Gaithersburg, MD). Примеры антиангиогенных средств, которые действуют посредством прямого антагонизма или ингибирования индукторов ангиогенеза и которые можно вводить в сочетании с иммуномодулирующим средством, включают, но не ограничиваются ими, ангиозим (Ribozyme, Boulder, CO), антитело против VEGF (Genentech, S. San Francisco, CA), PTK-787/ZK-225846 (Novartis, Basel, Switzerland), SU-101 (Sugen, S. San Francisco, CA), SU-5416 (Sugen/Pharmacia Upjohn, Bridgewater, NJ) и SU-6668 (Sugen). Другие антиангиогенные средства действуют посредством непрямого ингибирования ангиогенеза. Примеры не прямых ингибиторов ангиогенеза, которые можно вводить в сочетании с композициями по этому изобретению, включают, но не ограничиваются ими, IM-862 (Cytran, Kirkland, WA), интерферон-альфа, IL-12 (Roche, Nutley, NJ), и пентосан полисульфат (Georgetown University, Washington, DC).

В конкретных вариантах осуществления предусмотрено применение иммуномодулирующего средства в сочетании с антиангиогенными средствами для лечения, профилактики и/или смягчения аутоиммунного заболевания, например, такого как аутоиммунное заболевание, описанное в настоящем описании.

В конкретном варианте осуществления предусмотрено применение иммуномодулирующего средства в сочетании с антиангиогенными средствами для лечения, профилактики и/или смягчения артрита. В более конкретном варианте осуществления предусмотрено применение иммуномодулирующего средства по этому изобретению в сочетании с антиангиогенными средствами для лечения, профилактики и/или смягчения ревматоидного артрита.

В другом варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с антикоагулянтом. Антикоагулянты, которые можно вводить с иммуномодулирующим средством, включают, но не ограничиваются ими, гепарин, варфарин и аспирин. В конкретном варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с гепарином и/или варфарином. В другом конкретном варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с варфарином. В другом конкретном варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с варфарином и аспирином. В другом конкретном варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с гепарином. В другом конкретном варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с гепарином и аспирином.

В другом варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании со средством, которое подавляет продукцию антител против кардиолипина. В конкретных вариантах осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании со средством, которое блокирует и/или снижает способность антител против кардиолипина связывать фосфолипидсвязывающий белок плазмы бета-2-гликопротеин I (b2GPI).

В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с антиретровирусными средствами, нуклеозидными ингибиторами обратной транскриптазы, нуклеозид-

ными ингибиторами обратной транскриптазы и/или ингибиторами протеазы. Нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, которые можно вводить в сочетании с иммуномодулирующим средством, включают, но не ограничиваются ими, RETROVIR™ (зидовудин/AZT), VIDEX™ (диданозин/ddI), HIVID™ (зальцитабин/ddC), ZERIT™ (ставудин/d4T), EPIVIR™ (ламивудин/3TC) и COMBIVIR™ (зидовудин/ламивудин).

Ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, которые можно вводить в сочетании с иммуномодулирующим средством, включают, но не ограничиваются ими, VIRAMUNE™ (невирапин), RESCRIPTOR™ (делавирдин) и SUSTIVA™ (эфавиренц). Ингибиторы протеазы, которые можно вводить в сочетании с иммуномодулирующим средством, включают, но не ограничиваются ими, CRIVAN™ (индинавир), NORVIR™ (ритонавир), INVIRASE™ (саквинавир) и VIRACEPT™ (нелфинавир).

В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с антиретровирусными средствами, нуклеозидными/нуклеотидными ингибиторами обратной транскриптазы (NRTI), ненуклеозидными ингибиторами обратной транскриптазы (NNRTI) и/или ингибиторами протеазы (PI). NRTI, которые можно вводить в сочетании с иммуномодулирующим средством, включают, но не ограничиваются ими, RETROVIR™ (зидовудин/AZT), VIDEX™ (диданозин/ddI), HIVID™ (зальцитабин/ddC), ZERIT™ (ставудин/d4T), EPIVIR™ (ламивудин/3TC) и COMBIVIR™ (зидовудин/ламивудин). NNRTI, которые можно вводить в сочетании с иммуномодулирующим средством, включают, но не ограничиваются ими, VIRAMUNE™ (невирапин), RESCRIPTOR™ (делавирдин) и SUSTIVA™ (эфавиренц). Ингибиторы протеазы, которые можно вводить в сочетании с иммуномодулирующим средством, включают, но не ограничиваются ими, CRIVAN™ (индинавир), NORVIR™ (ритонавир), INVIRASE™ (саквинавир) и VIRACEPT™ (нелфинавир).

Дополнительные NRTI включают LODENOSINE™ (F-ddA; NRTI с устойчивым к кислотам аденозином; Triangle/Abbott); COVIRACIL™ (эмтрицитабин/FTC; структурно сходный с ламивудином (3TC), но с от 3 до 10 раз большей активностью *in vitro*; Triangle/Abbott); dOTC (BCH-10652, также структурно сходный с ламивудином, но сохраняет активность против значительной части устойчивых к ламивудину изолятов; Biochem Pharma); адефовир (не получивший одобрения FDA для терапии против HIV; Gilead Sciences); PREVEON® (адефовир дипивоксил, активное пролекарство адефовира; его активной формой является PMEA-pp); TENOFOVIR™ (бис-РОС PMPA, пролекарство PMPA; Gilead); DAPD/DXG (активный метаболит DAPD; Triangle/Abbott); D-D4FC (сходный с 3TC, с активностью против AZT/3TC-устойчивого вируса); GW420867X (Glaxo Wellcome); ZIAGEN™ (абакавир/159U89; Glaxo Wellcome Inc.); CS-87 (3'-азидо-2',3'-дидезоксиуридин; WO 99/66936) и пролекарственные формы β-L-FD4C и β-L-FddC с 3-ацил-2-тиоэтилом (SATE) (WO 98/17281).

Дополнительные NNRTI включают COACTINON™ (эмивирин/МКС-442, сильнодействующий NNRTI класса HEPT; Triangle/Abbott); CAPRAVIRINE™ (AG-1549/S-1153, NNRTI следующего поколения с активностью против вирусов, содержащих мутацию K103N; Agouron); PNU-142721 (обладает активностью, от 20 до 50 раз превышающей активность его предшественника делавирдина, и является активным против мутантных форм K103N; Pharmacia & Upjohn); DPC-961 и DPC-963 (производные эфавиренца второго поколения, разработанные для активности против вирусов с мутацией K103N; DuPont); GW-420867X (обладает активностью, в 25 раз превышающей активность HBY097, и является активным против мутантных форм K103N; Glaxo Wellcome); CALANOLIDE A (встречающееся в природе средство из каучукового дерева; активен против вирусов, содержащих любую или обе из мутаций Y181C и K103N); и прополис (WO 99/49830).

Дополнительные ингибиторы протеазы включают LOPINAVIR™ (ABT378/r; Abbott Laboratories); BMS-232632 (азапептид; Bristol-Myers Squibb); TIPRANAVIR™ (PNU-140690, непептидный дигидропирион; Pharmacia & Upjohn); PD-178390 (непептидный дигидропирион; Parke-Davis); BMS 232632 (азапептид; Bristol-Myers Squibb); L-756,423 (аналог индинавира; Merck); DMP-450 (циклическое соединение мочевины; Avid & DuPont); AG-1776 (пептидомиметик с активностью *in vitro* против устойчивых к ингибиторам протеазы вирусов; Agouron); VX-175/GW-433908 (фосфатное пролекарство ампренавира; Vertex & Glaxo Wellcome); CGP61755 (Ciba) и AGENERASE™ (ампренавир; Glaxo Wellcome Inc.).

Дополнительные антиретровирусные средства включают ингибиторы слияния/grp41-связывающие средства. Ингибиторы слияния/grp41-связывающие средства включают T-20 (пептид из остатков 643-678 эктодомена трансмембранного белка grp41 HIV, который связывается с grp41 в его покоящемся состоянии и предотвращает трансформацию в состояние слияния; Trimeris) и T-1249 (ингибитор слияния второго поколения; Trimeris).

Дополнительные антиретровирусные средства включают ингибиторы слияния/антагонисты рецепторов для хемокинов.

Ингибиторы слияния/антагонисты рецепторов для хемокинов включают антагонисты CXCR4, такие как AMD 3100 (бициклам), SDF-1 и его аналоги и ALX40-4C (катионный пептид), T22 (18-аминокислотный пептид; Trimeris) и аналоги T22 T134 и T140; антагонисты CCR5, такие как RANTES (9-68), AOP-RANTES, NNY-RANTES и TAK-779; и антагонисты CCR5/CXCR4, такие как NSC 651016 (ана-

лог дистамицина). Также к ним относятся антагонисты CCR2B, CCR3 и CCR6. Также слияние могут ингибировать агонисты рецепторов для хемокинов, такие как RANTES, SDF-1, MIP-1 α , MIP-1 β и т.д.

Дополнительные антиретровирусные средства включают ингибиторы интегразы. Ингибиторы интегразы включают дикофеилхиновые (DFQA) кислоты; L-цикорную кислоту (дикофеилвиннокаменную (DCTA) кислоту); хинализарин (QLC) и сходные антрахиноны; ZINTEVIR™ (AR 177, олигонуклеотид, который, возможно, действует на клеточной поверхности, а не является истинным ингибитором интегразы; Arondex); и нафтолы, такие как описаны в WO 98/50347.

Дополнительные антиретровирусные средства включают подобные гидроксимочевине соединения, такие как BCX-34 (ингибитор фосфорилазы пуриновых нуклеозидов; Biocryst); ингибиторы рибонуклеотидредуктазы, такие как DIDOX™ (Molecules for Health); ингибиторы инозинмонофосфатдегидрогеназы (IMPDH), такие как VX-497 (Vertex); и микофеновые кислоты, такие как CellCept (микофенолят мофетил; Roche).

Дополнительные антиретровирусные средства включают ингибиторы вирусной интегразы, ингибиторы ядерной транслокации вирусного генома, такие как арилен-бис(метилкетон)соединения; ингибиторы проникновения HIV, такие как AOP-RANTES, NNY-RANTES, слитый белок RANTES-IgG, растворимые комплексы RANTES и гликозаминогликанов (GAG), и AMD-3100; ингибиторы нуклеокапсидных цинковых пальцев, такие как соединения дитиана; мишени Tat и Rev HIV; и фармакологические усилители, такие как ABT-378.

Другие антиретровирусные лекарственные средства включают цитокины и лимфокины, такие как MIP-1 α , MIP-1 β , SDF-1 α , IL-2, PROLEUKIN™ (альдеслейкин/L2-7001; Chiron), IL-4, IL-8, IL-10, IL-12 и IL-13; интерфероны, такие как IFN- α 2a, антагонисты TNF, NF κ B, GM-CSF, M-CSF и IL-10; средства, которые модулируют активацию иммунной системы, такие как циклоспорин и преднизон; вакцины, такие как Remune™ (HIV Immunogen), APL 400-003 (Apollon), рекомбинантный gp120 и его фрагменты, двухвалентный (B/E) рекомбинантный оболочечный гликопротеин, rgp120CM235, MN rgp120, SF-2 rgp120, комплекс gp120/растворимый CD4, белок дельта JR-FL, разветвленный синтетический пептид, образованный из прерывающегося домена C3/C4 gp120, компетентные в отношении слияния иммуногены, и вакцины на основе Gag, Pol, Nef и Tat; генно-терапевтические средства, такие как генетические супрессорные элементы (GSE; WO 98/54366) и интракины (генетически модифицированные CC-хемокины, нацеленные на ER для блокирования поверхностной экспрессии вновь синтезированного CCR5 (Yang et al., PNAS 94:11567-72 (1997); Chen et al., Nat. Med. 3:1110-16 (1997))); антитела, такие как антитело против CXCR4 12G5, антитела против CCR5 2D7, 5C7, PA8, PA9, PA10, PAH, PA12 и PA14, антитела против CD4 Q4120 и RPA-T4, антитело против CCR3 7B11, антитела против gp120 17b, 48d, 447-52D, 257-D, 268-D и 50.1, антитела против Tat, антитела против TNF- α и моноклональное антитело 33A; агонисты и антагонисты рецептора для арилуглеводородов (AH), такие как TCDD, 3,3',4,4',5-пентахлорбифенил, 3,3',4,4'-тетрахлорбифенил, и α -нафтофлаван (WO 98/30213); и антиоксиданты, такие как этиловый эфир γ -L-глутамил-L-цистеина (γ -GCE; WO 99/56764).

В других вариантах осуществления иммуномодулирующее средство можно вводить в сочетании со средствами против оппортунистической инфекции. Средства против оппортунистических инфекций, которые можно вводить в сочетании с иммуномодулирующим средством, включают, но не ограничиваются ими, TRIMETHOPRIM-SULFAMETHOXAZOLE™, DAPSONE™, PENTAMIDINE™, ATOVAQUONE™, ISONIAZID™, RIFAMPIN™, PYRAZINAMIDE™, ETHAMBUTOL™, RIFABUTIN™, CLARITHROMYCIN™, AZITHROMYCIN™, GANCICLOVIR™, FOSCARNET™, CIDOFOVIR™, FLUCONAZOLE™, ITRACONAZOLE™, KETOCONAZOLE™, ACYCLOVIR™, FAMCICLOVIR™, PYRIMETHAMINE™, LEUCOVORIN™, NEUPOGEN™ (филграстим/G-CSF) и LEUKINE™ (сарграмостим/GM-CSF). В конкретном варианте осуществления иммуномодулирующее средство применяют в сочетании с TRIMETHOPRIM-SULFAMETHOXAZOLE™, DAPSONE™, PENTAMIDINE™ и/или ATOVAQUONE™ для профилактического лечения, предотвращения и/или диагностики оппортунистической инфекции пневмонии *Pneumocystis carinii*. В другом конкретном варианте осуществления иммуномодулирующее средство применяют в любом сочетании с ISONIAZID™, RIFAMPIN™, PYRAZINAMIDE™ и/или ETHAMBUTOL™ для профилактического лечения, предотвращения и/или диагностики оппортунистической комплексной инфекции *Mycobacterium avium*. В другом конкретном варианте осуществления иммуномодулирующее средство применяют в любом сочетании с RIFABUTIN™, CLARITHROMYCIN™ и/или AZITHROMYCIN™ для профилактического лечения, предотвращения и/или диагностики оппортунистической инфекции *Mycobacterium tuberculosis*. В другом конкретном варианте осуществления иммуномодулирующее средство применяют в любом сочетании с GANCICLOVIR™, FOSCARNET™ и/или CIDOFOVIR™ для профилактического лечения, предотвращения и/или диагностики оппортунистической цитомегаловирусной инфекции. В другом конкретном варианте осуществления иммуномодулирующее средство применяют в любом сочетании с FLUCONAZOLE™, ITRACONAZOLE™ и/или KETOCONAZOLE™ для профилактического лечения, предотвращения и/или диагностики оппортунистической грибковой инфекции. В другом конкретном варианте осуществления

иммуномодулирующее средство применяют в любом сочетании с ACYCLOVIR™ и/или FAMCICOLVIR™ для профилактического лечения, предотвращения и/или диагностики оппортунистической инфекции вирусом простого герпеса I типа и/или II типа. В другом конкретном варианте осуществления иммуномодулирующее средство применяют в любом сочетании с PYRIMETHAMINE™ и/или LEUCOVORIN™ для профилактического лечения, предотвращения и/или диагностики оппортунистической инфекции *Toxoplasma gondii*. В другом конкретном варианте осуществления иммуномодулирующее средство применяют в любом сочетании с LEUCOVORIN™ и/или NEUPOGEN™ для профилактического лечения, предотвращения и/или диагностики оппортунистической бактериальной инфекции.

В следующем варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с противовирусным средством. Противовирусные средства, которые можно вводить с иммуномодулирующим средством, включают, но не ограничиваются ими, ацикловир, рибавирин, амантадин и ремантадин.

В следующем варианте осуществления иммуномодулирующее средство вводят в сочетании с антибиотиками. Антибиотики, которые можно вводить с иммуномодулирующим средством, включают, но не ограничиваются ими, амоксициллин, аминогликозиды, бета-лактамы (гликопептиды), бета-лактамазы, клиндамицин, хлорамфеникол, цефалоспорины, цiproфлоксацин, эритромицин, фторхинолоны, макролиды, метронидазол, пенициллины, хинолоны, рифампин, стрептомицин, сульфонамид, тетрациклины, триметоприм, триметоприм-сульфаметоксазол и ванкомицин.

Кроме того, иммуномодулирующее средство можно вводить отдельно или в сочетании с другими терапевтическими схемами, включая, но не ограничиваясь ими, лучевую терапию. Такую комбинированную терапию можно проводить последовательно или одновременно.

Наборы

Это изобретение также относится к фармацевтической упаковке или набору, содержащему один или несколько контейнеров, заполненных одним или несколькими ингредиентами фармацевтических композиций. Необязательно, к такому контейнеру(ам) может быть присоединено указание в форме, предписываемой государственным органом, регулирующим изготовление, применение и продажу фармацевтических средств или биологических продуктов, где указание отражает одобрение органом изготовления, применения или продажи для введения человеку. Кроме того, полипептиды по настоящему изобретению можно использовать совместно с другими терапевтическими соединениями. В конкретном варианте осуществления набор содержит указание в форме, предписываемой государственным органом, регулирующим изготовление, применение и продажу фармацевтических средств или биологических продуктов, где указание отражает одобрение органом изготовления, применения или продажи для введения человеку, у пациентов, которые обладают титром ANA, превышающим или равным 1:80 и/или уровнем антител против дцДНК, превышающим или равным 30 ME в его/ее плазме или сыворотке крови.

Примеры

После описания, главным образом, этого изобретения, описание будет более легко понятным с учетом следующих примеров, которые представлены в качестве иллюстрации и не предназначены для ограничения.

Пример 1. Обобщенные результаты клинического испытания с целью тестирования применения антитела (белимумаба), которое нейтрализует белок нейтрокина-альфа, для лечения системной красной волчанки (SLE).

В проспективном, рандомизированном, двойном слепом, плацебо-контролируемом испытании тестировали белимумаб, антитело, которое нейтрализует белок нейтрокина-альфа, в дополнение к стандартной терапии SLE. Дозирование проводили 449 субъектам с SLE по критериям ACR (Tan et al., *Arthritis Rheum.* 25:1271-7, (1982) и Hochberg et al., *Arthritis Rheum.* 40:1725, (1997)), с поддающимися определению аутоантителами в анамнезе и показателем SELENA SLEDAI ≥ 4 при скрининге.

Исследуемое средство (1, 4, 10 мг/кг белимумаба) или плацебо вводили внутривенно на 0, 14, 28 сутки, а затем каждые 2 сутки в течение 52 недель. Субъектам, которые завершили 52-недельный период лечения, предлагали продолжить исследование в течение 24-недельного продленного срока. Белимумаб изготавливали в 10 mM цитрате натрия, 1,9% глицине, 0,5% сахарозе, 0,01% (мас./об.) полисорбате 80, pH 6,5 ($\pm 0,3$).

Субъекты, получавшие плацебо, получали состав (10 mM цитрат натрия, 1,9% глицин, 0,5% сахароза, 0,01% (мас./об.) полисорбат 80, pH 6,5 ($\pm 0,3$)) без белимумаба. Эффективность оценивали каждые 1-2 месяца посредством SELENA SLEDAI (SS), индекса обострений SLE, общей оценки терапевтом (PGA). Показатели активности заболевания BILAG и SF-36 также регулярно оценивали. Предварительно определенные первичные результаты эффективности представляли собой процентное снижение показателя SS на 24 неделе и период до обострения более 52 недель, как определяют посредством индекса обострений SLE. Биологические маркеры включали ANA, антитело против дцДНК (Ат), C3/C4, изотипы Ig и FACS периферических В-клеток. В-клетки анализировали каждые 1-2 месяца посредством 4-цветного FACS (CD19, CD20, CD27, CD69, CD38, CD138 и CD45). Уровни сывороточного аутоантитела, включая Ат против дцДНК, изотипы Ig, уровни общего белка и альбумина определяли во время тех же посещений. Критерий хи-квадрат коэффициента вероятности, тест Вилкоксона или t-тест использовали для ана-

лиза изменений биологических маркеров.

Средний возраст субъектов в этом исследовании составлял 42; средняя длительность SLE у этих субъектов составляла 8,8 лет. Исходный уровень активности заболевания у этих субъектов был относительно высоким, при этом приблизительно 67% субъектов имели показатель SS, составляющий 8 баллов или более (средний показатель SS 9,6). 93% субъектов, вовлеченных в это исследование, составляли женщины. 70% субъектов были европеоидами; 24% субъектов были афроамериканцами; 3% субъектов были азиатами и 18% субъектов были латиноамериканцами (перекрывание категорий). 98% субъектов обладали положительными показателями ANA в анамнезе и 71,5% субъектов были ANA+ при включении в исследование (титр ANA $\geq 1:80$ и/или Ат против дцДНК ≥ 30 МЕ/мл при скрининге/сутки 0). 50% субъектов обладали титром антител против дцДНК ≥ 30 МЕ/мл при включении в исследование. Большинство распространенных сопутствующих лекарственных средств от SLE, используемых на исходном уровне, включали следующие средства: стероиды (приблизительно 70% субъектов), аминоксиприны (например, антималярийные средства) (70%), ингибиторы COX-2 (28%), ингибиторы COX-1 (26%), азатиоприн (20%), метотрексат (16%) и микофенолата мофетил (16%). Тридцать четыре процента и 42% субъектов, получавших активное средство и плацебо, соответственно, получали клинически существенные дозы системных кортикостероидов (определяемые как доза преднизона или эквивалента преднизона $\geq 7,5$ мг/сутки) на исходном уровне. Не было значимых отличий исходных характеристик или показателей завершения в группах исследования (81% завершение).

Первичные результаты эффективности не достигли статистической значимости, однако показатель SS был значительно снижен на 29% на 52 неделе у субъектов ANA+ ($p=0,0435$, см. фиг. 1). Обострения SLE снижались у субъектов, получавших белимумаб, в ходе 24-52 недель с использованием исходного уровня на 24 неделе (логарифмический показатель $p=0,036$). Хотя не было выявлено значимых отличий в составных числовых показателях BILAG (составной показатель BILAG, вычисленный преобразованием показателей систем органов в числовые показатели следующим образом: A=9, B=3, C=1, D=0, E=0), у субъектов ANA+, анализ показателей для 8 отдельных органных доменов показал меньшее возрастание показателей в двух органных доменах (скелетных мышц, $p<0,008$; неврологическом, $p<0,038$) и направление в сторону меньшего возрастания показателей в трех органных доменах (сердечно-сосудистом и дыхательном, $p=0,060$; общем, $p<0,15$; почечном, $p<0,15$) у субъектов, которых лечили белимумабом, на 52 неделе. Показатель PGA улучшался с 16 недели ($p=0,016$) до 52 недели ($p<0,002$, все активные соединения против плацебо). Улучшения происходили, несмотря на повышение преднизона в группе плацебо относительно группы, которую лечили белимумабом (повышение до $>7,5$ мг/сутки ~15% против ~7%). У субъектов ANA+ наблюдалось значительное снижение частоты увеличения дозы преднизона, от низкой дозы $\leq 7,5$ мг/сутки до высокой дозы $>7,5$ мг/сутки, уже на 8 неделе ($p<0,05$ в течение 8-12 недель и в течение 32-40 недель). Не было эффекта дозы в отношении эффективности, подтверждая, что все дозы являются в равной степени активными. Не было выявлено клинически значимых ухудшений безопасности, включая неблагоприятные эффекты (АЕ), тяжесть АЕ, инфекции или лабораторную токсичность во всех группах белимумаба относительно группы плацебо. Меньшее количество субъектов, которых лечили белимумабом, обладало плевритом (3,3% против 8%, $p<0,05$), в то время как большее количество имело крапивницу (4% против 0%, $p<0,05$). Инфузионные реакции были редкими, только с 1 зарегистрированным тяжелым случаем. Иммуногенность в отношении белимумаба наблюдали у 1 субъекта (1 мг/кг).

Как показано в табл. IX, анализ субъектов ANA+ на 52 неделе показал, что лечение белимумабом привело к значительной стабилизации заболевания относительно плацебо, как определяют по индексу BILAG (3 ряд) и по PGA (4 ряд). Кроме того, также в испытании анализировали показатели ответа среди групп лечения с использованием комбинированного конечного показателя ответа (1 ряд), который сочетает показатель общей активности заболевания, как определяют по показателю SS, с показателем общего состояния пациента, как оценивают посредством индекса активности заболевания PGA, и показателем заболевания в конкретных системах органов, как определяют по шкале BILAG. Пациентов оценивали как отвечающих на лечение по комбинированному конечному показателю, если они обладали сниженным показателем SELENA SLEDAI ≥ 4 балла, не имели ухудшения их показателя PGA, определяемого как повышение показателя PGA на $<0,3$ балла и не имели ухудшения в какой-либо конкретной системе органов, определяемого как отсутствие нового показателя органных доменов BILAG A или 2 новых показателей органных доменов BILAG B. Анализ субъектов ANA+ с использованием описанного выше составного конечного показателя показал значительный ответ на белимумаб ($p=0,0058$).

Кроме того, у субъектов ANA+ были выявлены значительные улучшения PGA и показателей физического компонента SF-36 (SF-36 PCS) в начале лечения. Среднее процентное изменение по сравнению с исходным уровнем PGA показало значительное улучшение ($p<0,05$) уже на 4 неделе у субъектов ANA+, которых лечили белимумабом, по сравнению с субъектами ANA+, которых лечили плацебо. Показатели для среднего процентного изменения показателя PGA через 8 недель, 16 недель, 48 недель и 52 недели также показали значительное улучшение у субъектов ANA+, которых лечили белимумабом, по сравнению с субъектами ANA+, которых лечили плацебо ($p<0,05$ на 8, 16 и 48 неделях; $p<0,01$ на 52 неделе). Средний показатель PCS SF-36 также показал значительное улучшение качества жизни у субъектов

ANA+, которых лечили белимумабом, по сравнению с субъектами ANA+, которых лечили плацебо, на 12, 24, 48 и 52 неделях ($p < 0,05$ в каждый момент времени).

В ходе исследования у субъектов, которых лечили белимумабом, наблюдали значительные снижения количеств В-клеток (выраженные в качестве среднего процентного изменения по сравнению с исходным уровнем), включая CD19+ В-клетки ($p < 0,01$ для каждого измерения, проведенного в течение 8-52 недель), активированные В-клетки (CD20+/CD69+; $p < 0,01$ для каждого измерения, проведенного в течение 8-52 недель), наивные В-клетки (CD20+/CD27-; $p < 0,01$ для каждого измерения, проведенного в течение 8-52 недель), и плазматикоидные В-клетки (CD20+/CD138+; $p < 0,01$ для каждого измерения, проведенного в течение 16-52 недель). Измерения количеств В-клеток на 24 неделе показало, что белимумаб (во всех случаях лечения вместе) значительно снижал В-клетки через 24 недели по сравнению с субъектами, которых лечили плацебо. На 24 неделе было выявлено значительное снижение количества клеток (выраженное в качестве среднего процентного отклонения от исходного уровня; $p < 0,0001$) для CD19+ В-клеток, наивных В-клеток (CD20 + /CD27-), активированных В-клеток (CD20+/CD69+) и плазматикоидных В-клеток (CD20+/CD138+). Белимумаб (во всех случаях лечения вместе) значительно снижал количество В-клеток на 52 неделе (средние значения). На 52 неделе среднее процентное отклонение CD20+ В-клеток составляло 54%* для всех групп лечения вместе со значительным снижением, наблюдаемым уже на 8 неделе ($p < 0,0001$). На 52 неделе среднее процентное отклонение для плазматикоидных В-клеток (CD20+/CD138+) составляло 62%* для всех групп лечения вместе. Кроме того, среднее процентное отклонение для активированных В-клеток (CD20+/CD69+ В-клетки) составляло 70%* на 52 неделе (* - во всех случаях $p < 0,002$). На 52 неделе количество CD19+ В-клеток и наивных В-клеток (CD20+/CD27-) было значительно сниженным, в то время как популяции клеток памяти сохранялись. Напротив, количество плазматических клеток (CD20-/CD138+) возрастало на 72,5% по сравнению с исходным уровнем (2,7%) у субъектов, которых лечили белимумабом, относительно 30,6% у субъектов, которых лечили плацебо/стандартным способом лечения ($p = 0,02$), на 52 неделе. Кроме того, белимумаб индуцировал снижение количеств В-клеток, длившееся до 76 недели. На 76 неделе среднее процентное отклонение для CD20+ В-клеток составляло 61% для всех групп лечения вместе. На 76 неделе среднее процентное отклонение для плазматикоидных В-клеток (CD20+/CD138+) составляло 60% для всех групп лечения вместе. Кроме того, среднее процентное отклонение для активированных В-клеток (CD20+/CD69+ В-клетки) на 76 неделе составляло 84% для всех групп лечения вместе. Среди субъектов, которые имели титр антител против дцДНК ≥ 30 МЕ/мл при включении в исследование, было выявлено значительное снижение титра антител против дцДНК (выраженное в качестве среднего процентного отклонения от исходного уровня) уже на 4 неделе у субъектов, которых лечили белимумабом, по сравнению с субъектами, которых лечили плацебо ($p < 0,01$ для каждого измерения, проведенного в течение 4-12 недель; $p < 0,03$ для каждого измерения, проведенного в течение 16-24 недель, и $p < 0,01$ для каждого измерения, проведенного в течение 32-52 недель). Белимумаб снижал Ат против дцДНК на 52 неделе на 30% ($p < 0,002$, у положительных на исходном уровне) относительно 9% в группе плацебо. Этот эффект был длительным, поскольку измерение на 76 неделе показало 28% снижение Ат против дцДНК. Значительное индуцированное белимумабом снижение сывороточных уровней IgG, IgA, IgE и IgM (выраженное в качестве среднего процентного отклонения от исходного уровня) было выявлено уже на 8 неделе ($p < 0,0001$) у субъектов, которых лечили белимумабом, по сравнению с контролями, которых лечили плацебо. На 52 неделе сывороточные уровни IgG, IgA, IgE и IgM были снижены (10, 14, 34 и 29% соответственно). Снижение длилось до 76 недели (12, 15, 35 и 34% соответственно). Более того, для субъектов с повышенными уровнями изотипов Ig на исходном уровне, у 41% (52/128, $p = 0,0014$) субъектов, получавших белимумаб, произошло возвращение к нормальным уровням изотипов Ig, в то время как они нормализовались только у 16% (7/45) контрольных субъектов. Было выявлено значительное повышение уровней C4-комплемента (выраженное в качестве среднего процентного отклонения от исходного уровня) для каждого измерения, проведенного в течение 4-52 недель среди пациентов с низким уровнем C4-комплемента на исходном уровне, в группе лечения белимумабом ($p \leq 0,01$). На 52 неделе C4 был повышен на 33% ($p = 0,0126$, низкий исходный C4) в группе лечения белимумабом. Снова эффект белимумаба был замедленным с повышением C4 до 46% на 76 неделе в группе лечения белимумабом. На 52 неделе 14,5% (24/165) субъекты anti-дцДНК+, получавшие белимумаб, становились отрицательными по сравнению с 3,5% (2/58) в случае плацебо ($p = 0,012$). На 76 неделе 3 дополнительных субъекта anti-дцДНК+, получавших белимумаб, стали отрицательными.

Белимумаб был хорошо переносимым и показал значительную биологическую активность. Белимумаб улучшал показатели PGA, снижал количества В-клеток, повышал C4, снижал антитела против дцДНК и снижал/нормализовал уровни изотипов Ig. Белимумаб замедлял начало обострения через 6 месяцев. У субъектов, положительных по ANA в начале исследования, показатель SS значительно улучшался на 52 неделе. В заключение, комбинированный конечный показатель ответа показал значительный ответ на лечение белимумабом у субъектов ANA+ (см. табл. IX).

Таблица IX

Показатель ответа у субъектов ANA+ на 52 неделе

	Плацебо	1 мг/кг	4 мг/кг	10 мг/кг	Все дозы активного средства	Значение Р*
	N=86	N=78	N=79	N=78	N=235	
1. Уровень ответа (%) у субъектов со снижением SELENA SLEDAI ≥ 4 и без ухудшения индекса BILAG (нет нового показателя органного домена BILAG A или 2 новых показателей органного домена BILAG B) и без ухудшения PGA (повышение $<0,3$ баллов)	25 (29,1%)	38 (48,7%)	34 (43,0%)	36 (46,2%)	108 (46,0%)	0,0058
2. % субъектов со снижением SELENA SLEDAI ≥ 4	34 (39,5%)	41 (52,6%)	38 (48,1%)	37 (47,4%)	116 (49,4%)	0,1169
3. % субъектов без ухудшения индекса BILAG (нет нового показателя органного домена BILAG A или 2 новых показателей органного домена BILAG B)	70 (81,4%)	69 (88,5%)	75 (94,9%)	71 (91,0%)	215 (91,5%)	0,0152
4. % субъектов без ухудшения PGA (повышение $<0,3$ баллов от исходного уровня)	66 (76,7%)	70 (89,7%)	70 (88,6%)	72 (92,3%)	212 (90,2%)	0,0027

*значение Р, исходя из теста коэффициента вероятности для парного сравнения между всеми объединенными активными дозами против плацебо

Пример 2. Оценка протеинурии по SELENA SLEDAI.

Часто системная красная волчанка обуславливает нарушение функционирования почек. Специалист в данной области может знать множество стандартных показателей, которые можно использовать для оценки функции почек, например прогрессирование в заболевание почек конечной стадии, длительное удвоение уровня сывороточного креатинина, клиренса креатинина, клиренса иоталамата, концентрации белка в отдельном образце мочи и концентрации белка в 24-часовом образце мочи.

Изменения протеинурии, вычисленные в 24-часовых образцах мочи, представляют собой одну из категорий, оцениваемых в SELENA SLEDAI. Измерения протеинурии можно проводить любым способом, известным в данной области. В конкретном варианте осуществления получают отдельный образец мочи и определяют количество белка и/или клиренс креатинина, см., например, Lemann, et al., Clin Chem., 33: 297-9, 1987 и Schwab, et al., Arch Intern Med., May; 147 (5): 943-4, 1987. В конкретном варианте осуществления мочу собирают в течение 24 ч и определяют количество белка и/или клиренс креатинина. В конкретном варианте осуществления получают отдельный образец мочи, определяют соотношение количества белка к величине клиренса креатинина и это соотношение используют для оценки количества белка в 24-часовом образце мочи, см., например, Ruggenti, et al., BMJ. 316(7130): 504-9, 1998. Таким образом, в этом примере 24-часовой образец мочи может относиться либо к количеству грамм белка в моче, исходя из 24-часового образца мочи, либо к оценке количества грамм белка в 24-часовом образце мочи. Оценка количества грамм белка в 24-часовом образце мочи может быть основана, например, на соотношении количества белка в отдельном образце мочи к величине клиренса креатинина в отдельном

образце мочи.

В стандартной системе оценки SELENA SLEDAI пациенту, который обладает вновь появившейся протеинурией или последним повышением протеинурии, которое приводит к показателю протеинурии в текущем 24-часовом образце мочи, который по меньшей мере на 0,5 г выше, чем показатель протеинурии, определенный в непосредственно предшествующем 24-часовом образце мочи, будет приписан показатель 4 за протеинурию по опубликованной шкале SELENA SLEDAI, см., например, Bombardier, et al., *Arthritis Rheum.* Jun; 35 (6): 630-40, 1992. Таким образом, в стандартной системе оценки SELENA SLEDAI субъект, которому приписано 4 балла на исходном уровне за протеинурию, будет обладать улучшением SELENA SLEDAI при последующем посещении, при условии, что протеинурия не продолжает возрастать на $>0,5$ г в 24-часовом образце мочи (т.е. у пациента вычитут 4 балла из его общего показателя, даже с учетом стабильной протеинурии или повышения $\leq 0,5$ г/24).

Модификация правил оценки протеинурии SELENA SLEDAI описана ниже. Как и в стандартной системе оценки SELENA SLEDAI, пациенту, который обладает вновь появившейся протеинурией или последним повышением протеинурии, которое приводит к показателю протеинурии в текущем 24-часовом образце мочи, который по меньшей мере на 0,5 г выше, чем показатель протеинурии, определенный в непосредственно предшествующем 24-часовом образце мочи, будет приписан показатель 4 за протеинурию. Кроме того, если показатель протеинурии пациента не улучшился (т.е. не произошло снижения протеинурии в текущем 24-часовом образце по меньшей мере на 0,5 г по сравнению с протеинурией, определенной в непосредственно предшествующем 24-часовом образце мочи) пациенту будут продолжать приписывать 4 балла за протеинурию. Однако если показатель протеинурии у пациентов улучшился (т.е. произошло снижение протеинурии в текущем 24-часовом образце мочи по меньшей мере на 0,5 г по сравнению с показателем протеинурии, определенным в непосредственно предшествующем 24-часовом образце мочи), пациенту будет приписано 0 баллов за протеинурию.

В конкретном варианте осуществления предшествующие определения протеинурии проводили в 24-часовом образце мочи, который был получен за ≤ 26 недель до текущего определения.

Пример 3. Обобщенные результаты клинического испытания в целях тестирования применения антитела (белимумаб), которое нейтрализует белок нейтрокина-альфа, для лечения ревматоидного артрита (RA).

Многоцентровое, рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое исследование 2 фазы проводили у субъектов с RA. Субъектов случайным образом разделяли на 4 группы лечения (плацебо, 1, 4 и 10 мг/кг). Белимумаб или плацебо вводили в дозах 1, 4 и 10 мг/кг на 0, 14 и 28 сутки и каждые 28 суток после этого в течение 24 недель, с последующим необязательным 24-недельным периодом продления. Белимумаб составляли в 10 мМ цитрате натрия, 1,9% глицине, 0,5% сахарозе, 0,01% (мас./об.) полисорбате 80, pH 6,5 ($\pm 0,3$). Субъекты, получавшие дозу плацебо, получали состав (10 мМ цитрат натрия, 1,9% глицин, 0,5% сахароза, 0,01% (мас./об.) полисорбат 80, pH 6,5 ($\pm 0,3$)) без белимумаба. Всего в исследовании участвовали 283 субъекта. Белимумаб вводили 214 субъектам в дозировках 1, 4 или 10 мг/кг в ходе 24-недельной фазы лечения в исследовании. Шестьдесят девять субъектов получали плацебо.

Статистически наилучший ответ ACR20 был достигнут в группе лечения 1 мг/кг ($p=0,0097$), а также во всех группах лечения активным средством вместе ($p=0,0213$). ACR20 представляет собой индекс, разработанный Американским колледжем ревматологии (ACR) для оценки ответа у пациента на лечение от ревматоидного артрита. Ответ ACR20 определяют как по меньшей мере 20% снижение количества чувствительных суставов и количества увеличенных суставов, в дополнение к улучшению по меньшей мере 20% трех из пяти других показателей симптомов или проявлений заболевания (т.е. оценки пациентом боли, общей оценки пациентом, общей оценки врачом, собственной оценки пациентом нетрудоспособности, реактантов острой фазы [СОЭ или CRP]). Более того, результат для группы лечения 1 мг/кг оставался статистически значимым при поправке на множественные сравнения с использованием закрытого способа Бонферрони ($p<0,0166$). Как и у субъектов с SLE, белимумаб был ассоциирован с улучшенными ответами ACR20 у субъектов с положительным по аутоантителу заболеванием (ревматоидный фактор [RF] или антитело против циклического цитруллинированного пептида [CCP]), а также у субъектов, положительных по С-реактивному протеину (CRP) на исходном уровне. Наблюдали биологическую активность, включающую статистически значимые снижения количеств CD20+ В-клеток, наивных В-клеток, активированных В-клеток и RF; количество клеток памяти повышалось в течение первого месяца лечения и медленно снижалось при продолжении лечения. Белимумаб был хорошо переносим во всех дозах. Зависимость доза-ответ не была выявлена в этом исследовании ни в отношении эффективности, ни безопасности, ни эффектов на биомаркеры. Продолжение лечения в продленном периоде исследования было хорошо переносимым. Ответ ACR20 был повышен приблизительно на 40% на 48 неделе. Эффекты на биомаркеры были повышены или сохранялись при продолжении лечения, в то время как количество клеток памяти продолжало снижаться к исходным уровням. Сывороточные концентрации в этом исследовании находились в ожидаемом диапазоне, исходя из данных 1 фазы, и сопутствующее лечение (т.е. метотрексат, лефлуномид или гидроксихлороквин) не оказывало значительного эффекта на действие белимумаба.

Пример 4. Нейтрокин-альфа увеличивает длительность жизни В-клеток через два независимых каскада передачи сигнала.

Нейтрокин-альфа, также называемый BLyS (стимулятором В-лимфоцитов), BAFF, TALL-1, THANK, TNFSF13B и ZTNF4, необходим для выживания покоящихся периферических В-лимфоцитов (Rolink, A. G., and Melchers, F. (2002), *Curr Opin Immunol* 14, 266-275). Важность нейтрокина-альфа для гомеостаза наивных В-клеток наилучшим образом показана с помощью открытия, что дефицитные по нейтрокину-альфа мыши, полученные направленной делецией гена или введением растворимых рецепторов-ловушек, обладают значительным дефицитом В-клеток маргинальной зоны и фолликулов, основных популяций зрелых периферических В-клеток (Gross, J.A., et al. (2001) *Immunity* 15, 289-302; Schieffmann, B., et al. (2001). *Science* 293, 2111-2114). Напротив, эктопическая экспрессия нейтрокина-альфа с трансгена значительно увеличивает количество В-клеток фолликулов и маргинальной периферической зоны без влияния на Т-клетки, В1-клетки, ранние (T1) переходные периферические В-клетки или развивающиеся В-клетки в костном мозге (Mackay, F., et al. (2003). *Annu Rev Immunol* 21, 231-264). Нейтрокин-альфа также необходим для поддержания множества В-клеточных опухолей, и нарушенная регуляция стимуляции нейтрокина-альфа спасает аутореактивные В-клетки от удаления, обеспечивая посредством этого продукцию аутоантител (Kalled, S.L. (2005), *Immunol Rev* 204, 43-54). Таким образом, нейтрокин-альфа обладает критической ролью в гомеостазе как нормальных, так и патогенных В-клеток. В этом примере подробно описаны результаты экспериментов, проведенных для понимания механизма, посредством которого нейтрокин-альфа обеспечивает выживание В-клеток.

Экспериментальные способы

Мыши: мышей Pim-1^{+/+}2^{+/+}, Pim-1^{-/-}2^{+/+}, Pim-1^{+/+}2^{-/-} и Pim-1^{-/-}2^{-/-} получали из исходных мышей Pim-1^{+/+}2^{+/+} от Paul Rothman Columbia University, New York, NY. Мыши C57BL/6 (B6) были из The Jackson Laboratory, Bar Harbor ME или от National Cancer Institute Production Program, NCI-Fredrick, Fredrick MD. Животных скрещивали и содержали в Univ. of Pennsylvania, Harvard Medical School или Univ. of Massachusetts Medical School в соответствии с руководствами Institutional Animal Care and Use Committee.

Очистка В-клеток: В-клетки селезенки получали посредством обработки спленоцитов anti-thy 1.2 и комплементом, с последующей очисткой покоящихся В-клеток с использованием пошагового градиента перколла и сбором клеток в 60-70% поверхности раздела. В некоторых экспериментах CD23⁺ В-клетки получали положительной селекцией и магнитным разделением суспензий спленоцитов с использованием биотинилированного антитела против CD23 (BD Biosciences-Pharmingen, San Diego CA) и покрытых стрептавидином микрогранул (Miltenyi Biotec, Auburn CA). CD23⁺ В-клетки не отбирали по размеру на перколле, поскольку активация в окружающей среде *in vivo* приводит к потере CD23. В-клетки, полученные с помощью антитела и перколла, на >90% представляли собой B220⁺, в то время как CD23⁺ В-клетки были на >95% чистыми.

Клеточные культуры: очищенные В-клетки или CD23⁺ В-клетки культивировали в RPMI-1640, дополненной 2-меркаптоэтанолом, MEM-заменяемыми аминокислотами, глутамином, пенициллином и стрептомицином (полная среда, CM). Для анализа выживания В-клеток и других анализов использовали рекомбинантный нейтрокин-альфа человека, изготовленный в Human Genome Sciences, Rockville MD, в концентрации 50-100 нг/мл. Меченый FLAG нейтрокин-альфа человека был от Dr. Randolph Noelle, Dartmouth Medical School. Нейтрокин-альфа мыши приобретали от Alexis Biochemicals, San Diego CA и интерферон альфа человека (IFN α) от PBL Biomedical, Piscataway, NJ. Рапамицин использовали в конечной концентрации 50 нМ, добавляемый в культуры из исходного раствора в метаноле. Контрольные В-клетки в экспериментах с использованием рапамицина обрабатывали метанолом в качестве контроля в виде носителя. Для анализов кинетики В-клетки получали и охлаждали в течение ночи при 4°C. 5-6 \times 10⁶ очищенных В-клеток на образец помещали в 24-луночные планшеты, покрытые 5 мкг/мл моноклонального антитела против FLAG M2 (Sigma), промывали, блокировали посредством 1% BSA в PBS, с последующим добавлением меченого посредством FLAG нейтрокина-альфа человека в количестве 2 мкг/лунка за час до промывания и добавления клеток. Нестимулированные контрольные В-клетки представляли собой клетки, помещенные в лунки, обработанные только антителом против FLAG. В-клетки также активировали инкубацией с IgM против антител мыши (5 мкг/мл), антителом против CD40 (0,5 мкг/мл) или 100 нг/мл рекомбинантного нейтрокина-альфа человека, добавленных в буфер для анализа кинетики (сбалансированный солевой раствор Хэнкса плюс 2% BSA).

Антитела и вестерн-блоттинг: антитела мыши против Pim 2 (1D12), Pim 1 (19F7), антитела козы против актина (1-19), антитела против Ig мыши, антитела против Ig кролика и антитела против Ig козы, связанные с HRP, получали от Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA. Антитела кролика против Akt фосфосерина 473, киназы фосфотреонина 389 p70 S6, FKHR/FKRHL1 фосфотреонина 24/32, phosphoGSK3 α /p, GSK, p70S6K, FKHR и Akt приобретали от Cell Signaling, Beverly MA. Антитело кролика против Mcl-1 мыши приобретали от Rockland, Wilmington MA. Лизаты цельных клеток получали промыванием В-клеток ледяным PBS и лизисом в RIPA (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% дезоксихолат натрия, 0,1% SDS, 50 mM Tris pH 8,0), дополненной ингибиторами протеаз (минитаб, Roche, Indianapolis IN) и коктейлем ингибиторов фосфатаз I и II (Sigma). 10-50 мкг белка разделяли в 4-12% бис-трис-

полиакриламидных гелях NuPage (Invitrogen, Carlsbad CA) и переносили на нитроцеллюлозу. Блоты блокировали 3% BSA (Sigma, не содержащем IgG), 0,2% Tween-20 в PBS и инкубировали с первичным анти-телом в том же буфере в течение ночи при 4°C. Блоты промывали PBS-0,2% Tween-20, инкубировали с вторичным антителом, конъюгированным с HRP и проявляли с использованием ECLplus (Amersham Bioscience, Piscataway NJ). Блоты извлекали для повторного исследования посредством инкубации в течение 20 мин при 65°C в PBS, дополненном 1% SDS и 100 мкМ β -меркаптоэтанолом. Затем блоты промывали и блокировали, как указано выше.

Анализ выживания: В-клетки в количестве 5×10^6 /мл культивировали в 24-луночных чашках для культивирования тканей в СМ при 37°C. В-клетки дополняли 50-100 нг/мл γ hу-нейтрокина-альфа, 50 нМ рапамицином, 200 Е IFN α человека или сочетанием этих реагентов. В-клетки предварительно обрабатывали 50 нМ рапамицином или носителем за 1 ч до культивирования с тестируемыми добавками, через 48 ч культивирования добавляли свежий рапамицин. Мониторинг выживания проводили раз в сутки посредством подсчета жизнеспособных клеток с использованием исключения трипанового синего, при этом каждое определение проводили в трех экземплярах.

Результаты.

Исследование механизма, посредством которого нейтрокин-альфа обеспечивает выживание В-клеток, показало, что нейтрокин-альфа активирует каскад Akt/mTOR в В-клетках. Очищенные В-клетки стимулировали в течение 0, 5, 20, 60 или 120 мин посредством 100 нг/мл рекомбинантного нейтрокина-альфа человека или мыши или антителом против Ig (положительный контроль) при 37°C в предварительно обработанной газом среде. Лизаты получали из охлажденных льдом образцов и анализировали посредством вестерн-блоттинга. Такая стимуляция первичных В-клеток рекомбинантным нейтрокином-альфа приводит к активации каскада Akt, как определяют по повышенному фосфорилированию 473 остатка серина и 308 остатка треонина Akt. Дополнительные эксперименты, в которых очищенные В-клетки стимулировали посредством связанного с планшетом FLAG-меченого нейтрокина-альфа, растворимого нейтрокина-альфа (100 нг/мл) или 0,5 мкг/мл антитела против CD40 (положительный контроль), показали, что Akt сам по себе был активирован, как выявляют по фосфорилированию субстратов Akt, GSK3 и факторов транскрипции forkhead FOXO1 и FOXO3a. mTOR представляет собой основной эффектор Akt, участвующий в последующей передаче сигнала. После стимуляции нейтрокина-альфа активация mTOR в первичных В-клетках также была показана по фосфорилированию субстратов mTOR, киназы p70 S6 и ингибитора трансляции 4E-BP1. Характер фосфорилирования исследовали посредством вестерн-блоттинга.

Рапамицин представляет собой эффективный ингибитор mTOR и эффективный супрессор пролиферации и дифференцировки В-клеток. Небольшие покоящиеся В-клетки от нормальных доноров культивировали в течение 4 суток с 100 нг/мл γ hу-нейтрокина-альфа, носителя или 50 нМ рапамицина, или без них, которые использовали для предварительной обработки В-клеток перед культивированием, добавляемыми непосредственно в культуры в начале и повторно добавляемые каждые 2 суток. Жизнеспособные клетки определяли на 4 сутки. Кокультивирование общих В-клеток или CD23+ В-клеток с нейтрокином-альфа и рапамицином не препятствовало опосредуемому нейтрокином-альфа повышению выживания, как определяют по количеству жизнеспособных клеток, представленных в культуре через 4 суток. Этот результат подтверждает, что в обработанных нейтрокином-альфа В-клетках может быть активным другой каскад выживания.

Pim представляют собой семейство из трех серий/треонин-киназ, которое может обеспечить защиту от устойчивого к рапамицину апоптоза, индуцируемого в кроветворных клетках множеством активаторов (Fox, C.J., et al. (2003), Genes Dev 17, 1841-1854 и Fox, C.J., et al. (2005), J. Exp. Med. 201, 259-266). Посредством вестерн-блоттинга было показано, что после 2 суток обработки 100 нг/мл γ hу-нейтрокина-альфа в первичных В-клетках происходила активация экспрессии Pim1 и Pim2.

Для тестирования вовлечения Pim1 и 2 в опосредуемое нейтрокином-альфа выживание В-клеток, CD23+ В-клетки из доноров дикого типа или гетерозигот Pim1^{+/-}2^{+/-}, двойных дефицитных Pim1^{-/-}2^{-/-} или дефицитных Pim2 (Pim1^{+/-}2^{-/-}) доноров культивировали в СМ в течение 4 суток с носителем, 100 нг/мл γ hу-нейтрокина-альфа и с 50 нМ рапамицином или без него. Жизнеспособность определяли каждые сутки по исключению трипанового синего. Интересно, В-клетки из мышей с двойным дефицитом по Pim1 и Pim2 (В-клетки Pim1^{-/-}2^{-/-}) не проявляли повышенного выживания при воздействии нейтрокина-альфа. Этот результат можно объяснить тем, что mTOR и Pim 1 и 2 действуют в различных каскадах передачи сигнала, каждый из которых опосредует обеспечение нейтрокином-альфа выживания. Для проверки теории о вовлечении двух отдельных каскадов тестировали эффект рапамицина на опосредуемое нейтрокином-альфа выживание В-клеток Pim1^{-/-}2^{-/-}. Добавление рапамицина препятствовало способности нейтрокина-альфа повышать выживание В-клеток в В-клетках Pim1^{-/-}2^{-/-}. Дальнейшее исследование показало, что В-клетки Pim1^{+/-}2^{-/-}, дефицитные только по функции Pim2, были так же чувствительны к рапамицину, как и В-клетки Pim1^{-/-}2^{-/-}, что указывает на то, что Pim1 не является необходимым для эффектов нейтрокина-альфа на выживание В-клеток. Взятые вместе, эти данные показывают, что существует два независимых каскада, которые действуют, опосредуя обеспечиваемое нейтрокином-альфа выживание, и что

любой каскад отдельно является достаточным для этой активности нейтрокина-альфа.

Дальнейшие эксперименты показали, что экспрессия Mcl-1, члена семейства Bcl-2, который участвует в обеспечении гомеостаза периферических В- и Т-клеток, необходима для эффективного усиления выживания В-клеток (защиты против индукции апоптоза) (данные не представлены).

Таким образом, композицию, содержащую ингибитор каскада akt/mTOR (например, рапамицин) и ингибитор каскада Pim2 можно использовать для имитации эффектов, индуцируемых антагонистом нейтрокина-альфа. Таким образом, композицию, содержащую ингибитор каскада Akt/mTOR (например, рапамицин) и ингибитор каскада Pim2, можно применять в качестве антагониста нейтрокина-альфа для ингибирования выживания В-клеток или для лечения одного или нескольких заболеваний или нарушений, описанных в настоящем описании. Например, композицию, содержащую ингибитор каскада Akt/mTOR (например, рапамицин) и ингибитор каскада Pim2, можно применять для снижения длительности жизни В-клеток. Кроме того, композицию, содержащую ингибитор каскада Akt/mTOR (например, рапамицин) и ингибитор каскада Pim2, можно применять для лечения аутоиммунного заболевания. В конкретных вариантах осуществления композицию, содержащую ингибитор каскада Akt/mTOR (например, рапамицин) и ингибитор каскада Pim2, можно применять для лечения опосредуемых В-клетками аутоиммунных заболеваний. В других конкретных вариантах осуществления композицию, содержащую ингибитор каскада Akt/mTOR (например, рапамицин) и ингибитор каскада Pim2, можно применять для лечения аутоиммунных заболеваний, в которых преобладают аутоантитела. В конкретных вариантах осуществления композицию, содержащую ингибитор каскада Akt/mTOR (например, рапамицин) и ингибитор каскада Pim2, можно применять для лечения ревматоидного артрита, системной красной волчанки, рассеянного склероза, миастении, синдрома Шегрена, диабета типа 1, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, синдрома Гийена-Барре, тиреоидита Хашимото или болезни Грэйвса.

Кроме того, композицию, содержащую ингибитор Mcl-1, можно применять для имитации эффектов, индуцируемых антагонистом нейтрокина-альфа. Таким образом, композицию, содержащую ингибитор Mcl-1, можно применять в качестве антагониста нейтрокина-альфа для ингибирования выживания В-клеток или для лечения одного или нескольких заболеваний или нарушений, описанных в настоящем описании. Например, композицию, содержащую ингибитор Mcl-1, можно применять для снижения продолжительности жизни В-клеток. Кроме того, композицию, содержащую ингибитор Mcl-1, можно применять для лечения аутоиммунного заболевания. В конкретных вариантах осуществления композицию, содержащую ингибитор Mcl-1, можно применять для лечения опосредуемых В-клетками аутоиммунных заболеваний. В других конкретных вариантах осуществления композицию, содержащую ингибитор Mcl-1, можно применять для лечения аутоиммунных заболеваний, в которых преобладают аутоантитела. В конкретных вариантах осуществления композицию, содержащую ингибитор Mcl-1, можно применять для лечения ревматоидного артрита, системной красной волчанки, рассеянного склероза, миастении, синдрома Шегрена, диабета типа 1, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, синдрома Гийена-Барре, тиреоидита Хашимото или болезни Грэйвса.

Пример 5. Охарактеризация составов антител.

Анализ 1 мг/мл антитела IgG1/λ, изготовленного в 10 mM гистидиновом и 10 mM цитратном буферах, посредством дифференциальной сканирующей калориметрии использовали для оценки термической стабильности антитела в каждом составе. Конкретное антитело, используемое в этом исследовании, представляло собой антитело IgG1/λ, которое является специфичным к нейтрокину-альфа и способно нейтрализовать активность нейтрокина-альфа. Анализ показал, что температура плавления была наивысшей для обоих буферов в диапазоне pH 6,0-7,5 и более высокая температура плавления, как правило, указывает на более высокую термическую стабильность. Температура плавления цитратного буфера была на ~2°C выше, чем для гистидинового буфера в этом диапазоне pH, подтверждая, что цитратный буфер может обеспечить более стабильный состав антитела. Однако термическая обратимость антитела была выше в гистидиновом буфере, чем в цитратном буфере. Это подтверждает, что антитело обладает большей биофизической стабильностью в гистидине, чем в цитрате, несмотря на более низкую температуру плавления. Это было подтверждено исследованиями стабильности составов антитела, в которых было выявлено, что 10 mM гистидин приводит к меньшей агрегации, чем 10 mM цитрат, при хранении при 2-8°C в течение 18 месяцев. В ходе исследования стабильности буферную емкость двух буферов анализировали многократными измерениями pH. В дополнение к обеспечению большей биофизической стабильности для антитела, гистидин, по-видимому, обеспечивает большую буферную емкость при pH 6,0-6,5, чем цитрат в диапазоне pH 6,5-7,0. В исследовании стабильности в течение 18 месяцев в составах гистидина сохранялись стабильные значения pH с течением времени при всех тестируемых температурах (2-8, 25 и 40°C). Напротив, цитратные составы обладали более широкой изменчивостью при более высоких температурах (данные не представлены).

Пример 6. Исследование долговременной стабильности состава антитела.

Для определения срока хранения состава антитела проводили исследование долговременной стабильности 100 мг/мл антитела в 10 mM гистидине, 150 mM NaCl, 0,01% (мас./об.) полисорбате 80, pH 6,0. Конкретное антитело, используемое в этом исследовании, представляло собой антитело IgG1/λ, которое

является специфичным к нейтрокину-альфа и способно нейтрализовывать активность нейтрокина-альфа. Аликвоты, объемом 2 мл, хранили в 5-мл стеклянных флаконах в вертикальном положении в течение 24 месяцев при -80, 2-8, 25 и 40°C. Образцы хранили при -80°C в качестве контроля, при 2-8°C для определения срока хранения, и в условиях ускорения (25 и 40°C) для мониторинга любых возможных каскадов деградации, которые могут возникнуть. Периодически в течение 24 месяцев образцы анализировали различными способами анализа, включая визуальное исследование, определение pH, концентрации, SDS-PAGE, SEC-HPLC, ионообменную ВЭЖХ (IE-HPLC), биологический анализ, капиллярное изоэлектрическое фокусирование (cIEF), пептидное картирование, RP-HPLC и ISOQUANT®.

Анализ образцов, хранящихся в течение 24 месяцев при 2-8 и -80°C посредством SEC-HPLC, EE-HPLC и RP-HPLC был визуально сравнимым во всех трех способах, только с небольшими наблюдаемыми отличиями. В образце при 2-8°C снижалась чистота при SEC-HPLC с приблизительной скоростью 0,03% в месяц, и снижались ранние элюируемые пики IE-HPLC (главным образом, вследствие дезамидации) с приблизительно скоростью 0,14% в месяц (данные не представлены). В образце при 2-8°C были показаны только небольшие изменения агрегации (<1%), дезамидация (~4%) и окисление (1%) антитела через 24 месяца хранения. Однако при всех анализах образцов, хранящихся в условиях ускорения, наблюдали значительную деградацию. Деградация, выявленная посредством SEC-HPLC, в условиях ускорения включала как агрегацию, так и фрагментацию. Анализы IE-HPLC показали, что хранение в условиях ускорения приводит к повышению ранних элюируемых пиков. Дезамидация и фрагментация были выявлены пептидным картированием при 25°C; дезамидация, окисление, фрагментация и преобразование аспартата в изоаспартат были выявлены при 40°C. Таким образом, антитело в концентрации 100 мг/мл IgG1/λ в фармацевтическом составе по этому изобретению является стабильным при 2-8°C в течение по меньшей мере 24 месяцев хранения.

Пример 7. Анализ *in vitro* в целях тестирования ингибирования взаимодействия нейтрокин-альфа - рецептор для нейтрокина-альфа.

Ниже описан анализ, который можно использовать для тестирования действия соединения в качестве антагониста нейтрокина-альфа. Конкретно, в этом анализе определяют способность соединения ингибировать связывание растворимого нейтрокина-альфа с его собственным рецептором на клетках IM9.

Получение биотинилированного нейтрокина-альфа.

100 мкг либо человеческого, либо мышинного нейтрокина-альфа подвергают диализу в течение ночи при 4°C против 50 мМ бикарбоната натрия (гидрокарбоната натрия) pH 8,5 с использованием кассеты slide-a-lyzer (Pierce). На следующие сутки NHS-биотин (Pierce) растворяют в DMSO до 13,3 мг/мл. Затем его добавляют к нейтрокину-альфа в молярном соотношении биотин:нейтрокин-альфа 20:1, смешивают и инкубируют на льду в течение 2 ч. Затем биотинилированный нейтрокин-альфа подвергают обратному диализу в стерильный PBS (Sigma) с использованием кассеты slide-a-lyzer в течение ночи при 4°C. Биологическую активность биотинилированного нейтрокина-альфа подтверждают с использованием анализа ингибирования связывания рецептора (см. ниже).

Поддержание клеток IM9.

Клетки IM9 представляют собой клеточную линию В-лимфоцитов человека, которая экспрессирует рецепторы для нейтрокина-альфа. Клетки IM9 можно поддерживать в RPMI-1640, дополненной 4 мМ L-глутамином, 10% FCS, 10 Е пенициллина, 100 г/мл стрептомицина (все реагенты от Sigma). Клетки размораживают из замороженного исходного образца и их можно использовать в анализах после 5 суток в культуре, когда они достигают плотности $4-8 \times 10^5$ /мл.

Анализ ингибирования связывания рецептора.

На 96-луночные планшеты с плоским дном (Costar) наносят 100 мкл на лунку поли-L-лизина (Sigma) в разведении 1:10 в PBS в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем планшеты дважды промывают водой, позволяют высохнуть на воздухе и помещают на 4°C в течение ночи. Затем в каждую лунку добавляют 100 мкл клеток IM9 (в количестве 10^6 /мл в культуральной среде RPMI-1640). Затем планшеты центрифугируют при 3200 об/мин в течение 5 мин для осаждения клеток. Среду осторожно аспирируют и в каждую лунку добавляют 200 мкл MPBS (PBS, содержащая 3% блокирующий раствор Marvel). Затем обеспечивают блокирование в планшетах в течение 1 ч при комнатной температуре.

В отдельном 96-луночном планшете в каждую лунку добавляют 10 мкл биотинилированного нейтрокина-альфа (в концентрации 162,5 нг/мл) в MPBS до конечной концентрации 25 нг/мл. В каждую лунку добавляют 55 мкл каждого тестируемого соединения. Конечный объем в каждой лунке составляет 65 мкл. Предпочтительно тестируемое соединение также разбавляют в MPBS. Затем планшеты инкубируют при комнатной температуре в течение 30 мин.

Покрытые IM9 планшеты промывают два раза в PBS, высушивают постукиванием и сразу добавляют 50 мкл смеси фаг/биотинилированный нейтрокин-альфа и инкубируют при комнатной температуре в течение 1 ч. Планшеты промывают три раза в PBST и три раза в PBS, высушивают постукиванием и в каждую лунку добавляют 50 мкл стрептавидина-Delfia (Wallac) в разведении 1:1000 в буфере для анализа изготовителя. Затем планшеты инкубируют при комнатной температуре в течение 1 ч и промывают шесть раз в растворе для промывания Delfia (Wallac). После высушивания планшетов постукиванием

добавляют 100 мкл на лунку усиливающего раствора Delfia (Wallac). Планшеты осторожно постукивают для обеспечения образования мицелл, инкубируют при комнатной температуре в течение 10 мин и определяют показания флуоресценции на рабочей станции Wallac 1420 при 6520 нМ.

Пригодные для включения в этот анализ контроли включают только образец бионейтрокин-альфа для демонстрации того, что в этом анализе происходит максимальное связывание биотинилированного нейтрокина-альфа с его рецептором и чтобы показать фоновый сигнал в этом анализе, образец не содержит бионейтрокина-альфа. Дополнительным пригодным контролем является специфичное не к нейтрокину-альфа или "не имеющее отношения к нейтрокину-альфа" соединение - соединение, структурно сходное с тестируемым соединением, но предположительно не взаимодействующее ни с нейтрокином-альфа, ни с одним из рецепторов для нейтрокина-альфа. Если тестируемое соединение представляло собой антитело против нейтрокина-альфа изотипа IgG1, пригодный "не имеющий отношения к нейтрокину-альфа" контроль может представлять собой другое антитело IgG1, которое не является специфичным к нейтрокину-альфа или одному из его рецепторов.

Пример 8. Анализ пролиферации В-клеток человека для скрининга молекул антагонистов нейтрокина-альфа *in vitro*.

Один биологический анализ для оценки эффектов предполагаемого антагониста нейтрокина-альфа проводят в трех экземплярах в 96-луночных планшетах посредством смешивания равных объемов нейтрокина-альфа, отвечающих клеток и предполагаемого антагониста, каждый из которых получен в качестве 3X исходного реагента.

В-лимфоциты очищают из миндалевидной железы человека посредством MACS (истощение, направленное против CD3), промывают и ресуспендируют в полной среде (CM) (RPMI 1640 с 10% FBS, содержащей 100 Е/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 4 мМ глутамин, 5×10^{-5} М бета-меркаптоэтанол) в концентрации 3×10^6 клеток/мл. К клеткам добавляют *Staphylococcus aureus*, Cowan I (SAC, CalBiochem) в 3X концентрации (3X=разведение 1:33,333 исходного образца).

В то же время получают восемь серийных разведений (3-кратных) потенциального антагониста в CM, так что разбавленные антагонисты находятся в 3X конечных концентрациях, подлежащих тестированию в анализах. Например, антитела обычно тестируют, начиная с конечной концентрации 10 мкг/мл и снижаясь до приблизительно 1,5 нг/мл.

Человеческий г-нейтрокин-альфа получают в CM в 3X концентрации (3X=300, 30 и 3 нг/мл) в CM. Потенциальные антагонисты обычно тестируют при нескольких концентрациях нейтрокина-альфа для избежания ложноотрицательных результатов вследствие неожиданно низкой аффинности или концентрации антагониста.

Затем 50 мкл разбавленного антагониста и 50 мкл разбавленного нейтрокина-альфа добавляют в лунки, содержащие 50 мкл клеточной смеси.

Затем клетки инкубируют в течение 72 ч (37°C, 5% CO₂) в полностью увлажненной камере. Через 72 ч клетки дополняют 0,5 мКи/лунка ³H-тимидина (6,7 Ки/ммоль) и инкубируют в течение дополнительных 24 ч. Сбор с планшетов проводят с использованием устройства для сбора Tomtec Cell Harvester и фильтров, подсчитываемых на сцинтилляционном счетчике TopCount (Packard).

Пригодные контроли для включения в этот анализ включают образец, в который не был включен антагонист, для того, чтобы показать максимальное включение ³H-тимидина в этом анализе, и образец, который не содержит нейтрокина-альфа, чтобы показать фоновый сигнал в этом анализе. Дополнительным пригодным контролем является специфичное не к нейтрокину-альфа или "не имеющее отношение к нейтрокину-альфа" тестируемое соединение - соединение, структурно сходное с тестируемым соединением, но предположительно не взаимодействующее ни с нейтрокином-альфа, ни с одним из рецепторов для нейтрокина-альфа. Например, если тестируемое соединение представляло собой антитело против нейтрокина-альфа изотипа IgG1, пригодный "не имеющий отношения к нейтрокину-альфа" контроль может представлять собой другое антитело IgG1, которое не является специфичным к нейтрокину-альфа или одному из его рецепторов.

Специалист в данной области будет знаком с модификациями, которые можно проводить в этом анализе, например, в порядке стадий или в используемых реагентах. В качестве конкретного примера, вместо SAC первичному воздействию антитела против IgM можно подвергать В-клетки. Специалист в данной области также знаком с другими анализами, которые можно использовать для тестирования способности соединения действовать в качестве антагониста нейтрокина-альфа.

Пример 9. Анализ пролиферации В-клеток мыши для скрининга молекул антагонистов нейтрокина-альфа *in vitro*.

Для определения того, ингибирует ли потенциальный антагонист нейтрокина-альфа опосредуемую нейтрокином-альфа пролиферацию В-клеток, можно проводить анализ пролиферации спленоцитов мыши. В кратком изложении, спленоциты мыши выделяют, промывая селезенку с использованием иглы 25g и 10 мл полной среды (RPMI 1640 в 10% FBS, содержащая 100 Е/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 4 мМ глутамин, 5×10^{-5} М β-меркаптоэтанол). Клетки пропускают через 100-микронный нейлоновый фильтр для удаления клеточных комков. Затем суспензию клеток центрифугируют в фиколле при

400×g в течение 25 мин при комнатной температуре (одна 15-мл коническая пробирка/селезенка; 3 мл фиколла, 10 мл клеточной суспензии/селезенка; фиколл 1083 от Sigma). Выделенные клетки промывают 3 раза в полной среде и подсчитывают. Затем выделенные клетки разбавляют до концентрации 3×10^6 /мл в полной среде, содержащей 3X концентрацию SAC (3X=разведение 1:33,333 исходного образца; исходный образец представляет собой 10% суспензию *Staph. aureus* (штамм Cowan I), доступную от Calbiochem).

Для каждого антитела 50 мкл разведений антитела в концентрациях 30, 3,0 и 0,3 мкг/мл добавляют аликвотами в отдельные лунки 96-луночного планшета в тройном экземпляре. Среда, не содержащую антитела (и изотипические контроли человека (приобретенные коммерчески), если необходимо), используют в качестве отрицательных контролей.

Белок нейтрокина-альфа разбавляют в полной среде до концентраций 300, 90 и 30 нг/мл. Затем 50 мкл каждого из разведений нейтрокина-альфа добавляют к серии разведений антитела в планшетах. Затем планшеты, содержащие разведения антитела и нейтрокина-альфа, инкубируют в течение 30 мин при 37°C, 5% CO₂, после чего во все лунки добавляют 50 мкл клеточной суспензии спленоцитов, содержащей SAC. Затем планшеты инкубируют в течение 72 ч (37°C, 5% CO₂).

Через 72 ч в каждую лунку добавляют 50 мкл полной среды, содержащей 0,5 мКи 3Н-тимидина (6,7 Ки/мМ; Amersham) и клетки инкубируют в течение дополнительных 20-24 ч при (37°C, 5% CO₂). После инкубации клетки собирают с использованием устройства для сбора клеток Tomtec Cell Harvester и фильтров, подсчитываемых в сцинтилляционном счетчике TopCount (Packard).

Специалист в данной области будет знаком с модификациями, которые можно проводить в этом анализе, например, в порядке стадий или в используемых реагентах. В качестве конкретного примера вместо SAC первичному воздействию антитела против IgM можно подвергать В-клетки. Специалист в данной области также знаком с другими анализами, которые можно использовать для тестирования способности соединения действовать в качестве антагониста нейтрокина-альфа.

Будет понятно, что это изобретение можно применять на практике иным образом, чем конкретно описано в представленном выше описании и примерах. Возможно множество модификаций и вариантов настоящего изобретения, с учетом указанных выше указаний и, таким образом, они находятся в объеме прилагаемой формулы изобретения.

Полное описание всех публикаций (включая патенты, патентные заявки, статьи в журналах, практикумы, книги или другие документы), цитированные в настоящем описании, включены в настоящее описание в качестве ссылок.

Кроме того, список последовательностей, представленный как в компьютерной, так и в бумажной формах, включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Кроме того, полное описание (включая описание, список последовательностей и чертежи) каждой из следующих условных и безусловных патентных заявок США и международных патентных заявок, включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме: условные заявки США № 60/725625, поданная 13 октября 2005 г.; 60/735967, поданная 14 ноября 2005 г.; 60/776664, поданная 27 февраля 2006 г.; 60/781387, поданная 13 марта 2006 г.; 60/787557, поданная 31 марта 2006 г.; 60/797360, поданная 4 мая 2006 г.; 60/814870, поданная 20 июня 2006 г.; 60/815558, поданная 22 июня 2006 г.; 60/815827, поданная 23 июня 2006 г.; 60/834150, поданная 31 июля 2006 г.; 60/725626, поданная 13 октября 2005 г.; 60/735988, поданная 14 ноября 2005 г.; 60/776665, поданная 27 февраля 2006 г.; 60/797351, поданная 4 мая 2006 г.; 60/814869, поданная 20 июня 2006 г.; 60/815559, поданная 22 июня 2006 г.; 60/834152, поданная 31 июля 2006 г.; 60/725627, поданная 13 октября 2005 г.; 60/735964, поданная 14 ноября 2005 г.; 60/776658, поданная 27 февраля 2006 г.; 60/725629, поданная 13 октября 2005 г.; 60/735963, поданная 14 ноября 2005 г.; 60/776660, поданная 27 февраля 2006 г.; 60/725628, поданная 13 октября 2005 г.; 60/735987, поданная 14 ноября 2005 г.; 60/776659, поданная 27 февраля 2006 г.; 60/543261, поданная 11 февраля 2004 г.; 60/580387, поданная 18 июня 2004 г.; 60/617191, поданная 12 октября 2004 г.; 60/368548, поданная 1 апреля 2002 г.; 60/336726, поданная 7 декабря 2001 г.; 60/331478, поданная 16 ноября 2001 г.; 60/330835, поданная 31 октября 2001 г.; 60/329747, поданная 18 октября 2001 г.; 60/329508, поданная 17 октября 2001 г.; 60/225628, поданная 15 августа 2000 г.; 60/227008, поданная 23 августа 2000 г.; 60/234338, поданная 22 сентября 2000 г.; 60/240806, поданная 17 октября 2000 г.; 60/250020, поданная 30 ноября 2000 г.; 60/276248, поданная 6 марта 2001 г.; 60/293499, поданная 25 мая 2001 г.; 60/296122, поданная 7 июня 2001 г.; 60/304809, поданная 13 июля 2001 г.; 60/122388, поданная 2 марта 1999 г.; 60/124097, поданная 12 марта 1999 г.; 60/126599, поданная 26 марта 2000 г.; 60/127598, поданная 2 апреля 1999 г.; 60/130412, поданная 16 апреля 1999 г.; 60/130696, поданная 23 апреля 1999 г.; 60/131278, поданная 27 апреля 1999 г.; 60/131673, поданная 29 апреля 1999 г.; 60/136784, поданная 28 мая 1999 г.; 60/142659, поданная 6 июля 1999 г.; 60/145824, поданная 27 июля 1999 г.; 60/167239, поданная 24 ноября 1999 г.; 60/168624, поданная 3 декабря 1999 г.; 60/171108, поданная 16 декабря 1999 г.; 60/171626, поданная 23 декабря 1999 г.; 60/176015, поданная 14 января 2000 г.; и 60/036100, поданная 14 января 1997 г.; безусловные заявки США с серийными номерами 11/054539, поданная 10 февраля 2005 г.; 10/739042, поданная 19 декабря 2003 г.; 10/735865, поданная 16 декабря 2003 г.; 10/270487, поданная 16 октября 2002 г.; 09/929493, по-

данная 14 августа 2001 г., 09/588947, поданная 8 июня 2000 г., 09/589285, поданная 8 июня 2000 г., 09/589286, поданная 8 июня 2000 г., 09/589287, поданная 8 июня 2000 г., 09/589288, поданная 8 июня 2000 г., 09/507968, поданная 22 февраля 2000 г., 09/255794, поданная 23 февраля 1999 г., и 09/005874, поданная 12 января 1998 г.; и международные патентные заявки с серийными номерами PCT/US 01/25549, поданная 15 августа 2001 г., PCT/US 00/04336, поданная 22 февраля 2000 г., и PCT/US 96/17957, поданная 25 октября 1996 г.

Список последовательностей

- <110> Human Genome Sciences, Inc.
- <120> СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЦЕЛЯХ ЛЕЧЕНИЯ
ПАЦИЕНТОВ С ПОЛОЖИТЕЛЬНЫМ ПО АУТОАНТИТЕЛАМ ЗАБОЛЕВАНИЕМ
- <130> PF620PCT
- <140> PCT/US06/38756
- <141> 2006-10-13
- <150> 60/725,625
- <151> 2005-10-13
- <150> 60/725,626
- <151> 2005-10-13
- <150> 60/725,627
- <151> 2005-10-13
- <150> 60/725,628
- <151> 2005-10-13
- <150> 60/725,629
- <151> 2005-10-13
- <150> 60/735,987
- <151> 2005-11-14
- <150> 60/735,963
- <151> 2005-11-14
- <150> 60/735,964
- <151> 2005-11-14
- <150> 60/735,967
- <151> 2005-11-14
- <150> 60/735,988
- <151> 2005-11-14
- <150> 60/776,664
- <151> 2006-02-27
- <150> 60/776,665
- <151> 2006-02-27
- <150> 60/776,658
- <151> 2006-02-27
- <150> 60/776,659
- <151> 2006-02-27
- <150> 60/776,660
- <151> 2006-02-27
- <150> 60/781,387
- <151> 2006-03-13
- <150> 60/787,557
- <151> 2006-03-31

```

<150> 60/797,351
<151> 2006-05-04

<150> 60/797,360
<151> 2006-05-04

<150> 60/814,869
<151> 2006-06-20

<150> 60/814,870
<151> 2006-06-20

<150> 60/815,558
<151> 2006-06-22

<150> 60/815,559
<151> 2006-06-22

<150> 60/815,827
<151> 2006-06-23

<150> 60/834,150
<151> 2006-07-31

<150> 60/834,152
<151> 2006-07-31

<160> 28

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 1100
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (147)..(1001)

<400> 1
aaattcagga taactctctt gaggggtgag ccaagccctg ccatgtagtg cagcaggac      60
atcaacaaac acagataaca ggaaatgata cattccctgt ggtoacttat tctaaaggcc      120
ccaaccttca aagttcaagt agtgat atg gat gac tcc aca gaa agg gag cag      173
                               Met Asp Asp Ser Thr Glu Arg Glu Gln
                               1           5
tca cgc ctt act tct tgc ctt aag aaa aga gaa gaa atg aaa ctg aag      221
Ser Arg Leu Thr Ser Cys Leu Lys Lys Arg Glu Glu Met Lys Leu Lys
10           15           20           25
gag tgt gtt tcc atc ctc cca cgg aag gaa agc ccc tct gtc cga tcc      269
Glu Cys Val Ser Ile Leu Pro Arg Lys Glu Ser Pro Ser Val Arg Ser
30           35           40
tcc aaa gac gga aag ctg ctg gct gca acc ttg ctg ctg gca ctg ctg      317
Ser Lys Asp Gly Lys Leu Leu Ala Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu
45           50           55
tct tgc tgc ctc acg gtg gtg tct ttc tac cag gtg gcc gcc ctg caa      365
Ser Cys Cys Leu Thr Val Val Ser Phe Tyr Gln Val Ala Ala Leu Gln
60           65           70
ggg gac ctg gcc agc ctc cgg gca gag ctg cag ggc cac cac gcg gag      413
Gly Asp Leu Ala Ser Leu Arg Ala Glu Leu Gln Gly His His Ala Glu
75           80           85

```



```

aag ctg cca gca gga gca gga gcc ccc aag gcc ggc ctg gag gaa gct 461
Lys Leu Pro Ala Gly Ala Gly Ala Pro Lys Ala Gly Leu Glu Glu Ala
90 95 100 105
cca gct gtc acc gcg gga ctg aaa atc ttt gaa cca cca gct cca gga 509
Pro Ala Val Thr Ala Gly Leu Lys Ile Phe Glu Pro Pro Ala Pro Gly
110 115 120
gaa ggc aac tcc agt cag aac agc aga aat aag cgt gcc gtt cag ggt 557
Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asn Ser Arg Asn Lys Arg Ala Val Gln Gly
125 130 135
cca gaa gaa aca gtc act caa gac tgc ttg caa ctg att gca gac agt 605
Pro Glu Glu Thr Val Thr Gln Asp Cys Leu Gln Leu Ile Ala Asp Ser
140 145 150
gaa aca cca act ata caa aaa gga tct tac aca ttt gtt cca tgg ctt 653
Glu Thr Pro Thr Ile Gln Lys Gly Ser Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu
155 160 165
ctc agc ttt aaa agg gga agt gcc cta gaa gaa aaa gag aat aaa ata 701
Leu Ser Phe Lys Arg Gly Ser Ala Leu Glu Glu Lys Glu Asn Lys Ile
170 175 180 185
ttg gtc aaa gaa act ggt tac ttt ttt ata tat ggt cag gtt tta tat 749
Leu Val Lys Glu Thr Gly Tyr Phe Phe Ile Tyr Gly Gln Val Leu Tyr
190 195 200
act gat aag acc tac gcc atg gga cat cta att cag agg aag aag gtc 797
Thr Asp Lys Thr Tyr Ala Met Gly His Leu Ile Gln Arg Lys Lys Val
205 210 215
cat gtc ttt ggg gat gaa ttg agt ctg gtg act ttg ttt cga tgt att 845
His Val Phe Gly Asp Glu Leu Ser Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile
220 225 230
caa aat atg cct gaa aca cta ccc aat aat tcc tgc tat tca gct ggc 893
Gln Asn Met Pro Glu Thr Leu Pro Asn Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly
235 240 245
att gca aaa ctg gaa gaa gga gat gaa ctc caa ctt gca ata cca aga 941
Ile Ala Lys Leu Glu Glu Gly Asp Glu Leu Gln Leu Ala Ile Pro Arg
250 255 260 265
gaa aat gca caa ata tca ctg gat gga gat gtc aca ttt ttt ggt gca 989
Glu Asn Ala Gln Ile Ser Leu Asp Gly Asp Val Thr Phe Phe Gly Ala
270 275 280
ttg aaa ctg ctg tgacctactt acaccatgtc tctagctatt ttctccctt 1041
Leu Lys Leu Leu
285
tctctgtacc tctaagaaga aagaatctaa ctgaaaatac caaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1100

```

<210> 2
 <211> 285
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Asp Asp Ser Thr Glu Arg Glu Gln Ser Arg Leu Thr Ser Cys Leu
 1 5 10 15
 Lys Lys Arg Glu Glu Met Lys Leu Lys Glu Cys Val Ser Ile Leu Pro
 20 25 30
 Arg Lys Glu Ser Pro Ser Val Arg Ser Ser Lys Asp Gly Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ala Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Cys Leu Thr Val Val
 50 55 60
 Ser Phe Tyr Gln Val Ala Ala Leu Gln Gly Asp Leu Ala Ser Leu Arg
 65 70 75 80
 Ala Glu Leu Gln Gly His His Ala Glu Lys Leu Pro Ala Gly Ala Gly
 85 90 95
 Ala Pro Lys Ala Gly Leu Glu Glu Ala Pro Ala Val Thr Ala Gly Leu
 100 105 110
 Lys Ile Phe Glu Pro Pro Ala Pro Gly Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asn
 115 120 125

```

Ser Arg Asn Lys Arg Ala Val Gln Gly Pro Glu Glu Thr Val Thr Gln
130      135      140
Asp Cys Leu Gln Leu Ile Ala Asp Ser Glu Thr Pro Thr Ile Gln Lys
145      150      155      160
Gly Ser Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Ser
165      170      175
Ala Leu Glu Glu Lys Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Glu Thr Gly Tyr
180      185      190
Phe Phe Ile Tyr Gly Gln Val Leu Tyr Thr Asp Lys Thr Tyr Ala Met
195      200      205
Gly His Leu Ile Gln Arg Lys Lys Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu
210      215      220
Ser Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Glu Thr Leu
225      230      235      240
Pro Asn Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala Lys Leu Glu Glu Gly
245      250      255
Asp Glu Leu Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Leu
260      265      270
Asp Gly Asp Val Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys Leu Leu
275      280      285

```

<210> 3
 <211> 1717
 <212> DHK
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (282)..(1034)

```

<400> 3
acctctgtcc ttagagggga ctggaaccta attctcctga gcctgagggg ggggtggagg 60
tctcaagaca acgctgtccc cagcaggag tgccaggagc actaacagta cccttagatt 120
gctttcctcc tccctccttt tttattttca agttcctttt tatttctcct tgcgtaacaa 180
ccttcttccc ttctgcacca ctgcccgtag ccttaccgcg gccgccacct ccttgctaca 240
ccactcttga aaccacagct gttggcaggg tccccagct c atg cca gcc tca tct 296
Met Pro Ala Ser Ser
1 5
cct ttc ttg cta gcc ccc aaa ggg cct cca ggc aac atg ggg ggc cca 344
Pro Phe Leu Leu Ala Pro Lys Gly Pro Pro Gly Asn Met Gly Gly Pro
10 15 20
gtc aga gag ccg gca ctc tca gtt gcc ctc tgg ttg agt tgg ggg gca 392
Val Arg Glu Pro Ala Leu Ser Val Ala Leu Trp Leu Ser Trp Gly Ala
25 30 35
gct ctg ggg gcc gtg gct tgt gcc atg gct ctg ctg acc caa caa aca 440
Ala Leu Gly Ala Val Ala Cys Ala Met Ala Leu Leu Thr Gln Gln Thr
40 45 50
gag ctg cag agc ctc agg aga gag gtg agc cgg ctg cag agg aca gga 488
Glu Leu Gln Ser Leu Arg Arg Glu Val Ser Arg Leu Gln Arg Thr Gly
55 60 65
ggc ccc tcc cag aat ggg gaa ggg tat ccc tgg cag agt ctc ccg gag 536
Gly Pro Ser Gln Asn Gly Glu Gly Tyr Pro Trp Gln Ser Leu Pro Glu
70 75 80 85
cag agt tcc gat gcc ctg gaa gcc tgg gag aat ggg gag aga tcc ccg 584
Gln Ser Ser Asp Ala Leu Glu Ala Trp Glu Asn Gly Glu Arg Ser Arg
90 95 100
aaa agg aga gca gtg ctc acc caa aaa cag aag aag cag cac tct gtc 632
Lys Arg Arg Ala Val Leu Thr Gln Lys Gln Lys Lys Gln His Ser Val
105 110 115
ctg cac ctg gtt ccc att aac gcc acc tcc aag gat gac tcc gat gtg 680
Leu His Leu Val Pro Ile Asn Ala Thr Ser Lys Asp Asp Ser Asp Val
120 125 130

```

```

aca gag gtg atg tgg caa cca gct ctt agg cgt ggg aga ggc cta cag      728
Thr Glu Val Met Trp Gln Pro Ala Leu Arg Arg Gly Arg Gly Leu Gln
135                      140                      145
gcc caa gga tat ggt gtc cga atc cag gat gct gga gtt tat ctg ctg      776
Ala Gln Gly Tyr Gly Val Arg Ile Gln Asp Ala Gly Val Tyr Leu Leu
150                      155                      160                      165
tat agc cag gtc ctg ttt caa gac gtg act ttc acc atg ggt cag gtg      824
Tyr Ser Gln Val Leu Phe Gln Asp Val Thr Phe Thr Met Gly Gln Val
170                      175                      180
gtg tct cga gaa ggc caa gga agg cag gag act cta ttc cga tgt ata      872
Val Ser Arg Glu Gly Gln Gly Arg Gln Glu Thr Leu Phe Arg Cys Ile
185                      190                      195
aga agt atg ccc tcc cac ccg gac cgg gcc tac aac agc tgc tat agc      920
Arg Ser Met Pro Ser His Pro Asp Arg Ala Tyr Asn Ser Cys Tyr Ser
200                      205                      210
gca ggt gtc ttc cat tta cac caa ggg gat att ctg agt gtc ata att      968
Ala Gly Val Phe His Leu His Gln Gly Asp Ile Leu Ser Val Ile Ile
215                      220                      225
ccc cgg gca agg gcg aaa ctt aac ctc tct cca cat gga acc ttc ctg      1016
Pro Arg Ala Arg Ala Lys Leu Asn Leu Ser Pro His Gly Thr Phe Leu
230                      235                      240                      245
ggg ttt gtg aaa ctg tga ttgtgttata aaaagtggct ccagcttgg      1064
Gly Phe Val Lys Leu
250
aagaccaggg tgggtacata ctggagacag ccaagagctg agtatataaa ggagagggaa      1124
tgtgcaggaa cagaggcgctc ttcttggtt ttgctccccg ttctcactt ttcccttttc      1184
attcccaccc cctagacttt gatcttacgg atatcttgct tctgttcccc atggagctcc      1244
gaattcttgc gtgtgtgtag atgaggggagc ggggacgggc gccaggcatt gtccagacct      1304
ggtcggggcc cactggaagc atccagaaca gcaccacat ctagcgcccg ctctagagga      1364
tcctctgagg ggcccaagct tacgcgtgca tgcgacgtca tagctctctc cctatagtga      1424
gtcgtattat aagctagctt gggatctttg tgaaggaaac ttacttctgt ggtgtgacat      1484
aattggacaa actacctaca gagattttaa gctctaaggt aaatataaaa tttttaagtg      1544
tataatgtgt taaactagct gcatatgctt gctgcttgag agtttggtt actgagtatg      1604
attatgaaaa tattatacac aggagctagt gatctatggt ggtttttagat caagccaagg      1664
tcattcaggc ctcagctcaa gctgtcatga tcatatcagc atacaattgt gag      1717

```

<210> 4
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Met Pro Ala Ser Ser Pro Phe Leu Leu Ala Pro Lys Gly Pro Pro Gly
 1 5 10 15
 Asn Met Gly Gly Pro Val Arg Glu Pro Ala Leu Ser Val Ala Leu Trp
 20 25 30
 Leu Ser Trp Gly Ala Ala Leu Gly Ala Val Ala Cys Ala Met Ala Leu
 35 40 45
 Leu Thr Gln Gln Thr Glu Leu Gln Ser Leu Arg Arg Glu Val Ser Arg
 50 55 60
 Leu Gln Arg Thr Gly Gly Pro Ser Gln Asn Gly Glu Gly Tyr Pro Trp
 65 70 75 80
 Gln Ser Leu Pro Glu Gln Ser Ser Asp Ala Leu Glu Ala Trp Glu Asn
 85 90 95
 Gly Glu Arg Ser Arg Lys Arg Arg Ala Val Leu Thr Gln Lys Gln Lys
 100 105 110
 Lys Gln His Ser Val Leu His Leu Val Pro Ile Asn Ala Thr Ser Lys
 115 120 125
 Asp Asp Ser Asp Val Thr Glu Val Met Trp Gln Pro Ala Leu Arg Arg
 130 135 140
 Gly Arg Gly Leu Gln Ala Gln Gly Tyr Gly Val Arg Ile Gln Asp Ala
 145 150 155 160
 Gly Val Tyr Leu Leu Tyr Ser Gln Val Leu Phe Gln Asp Val Thr Phe
 165 170 175

```

Thr Met Gly Gln Val Val Ser Arg Glu Gly Gln Gly Arg Gln Glu Thr
      180      185      190
Leu Phe Arg Cys Ile Arg Ser Met Pro Ser His Pro Asp Arg Ala Tyr
      195      200      205
Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Val Phe His Leu His Gln Gly Asp Ile
      210      215      220
Leu Ser Val Ile Ile Pro Arg Ala Arg Ala Lys Leu Asn Leu Ser Pro
      225      230      235      240
His Gly Thr Phe Leu Gly Phe Val Lys Leu
      245      250

```

<210> 5
 <211> 882
 <212> JHK
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(882)

```

<400> 5
atg agt ggc ctg ggc cgg agc agg cga ggt ggc cgg agc cgt gtg gac      48
Met Ser Gly Leu Gly Arg Ser Arg Arg Gly Gly Arg Ser Arg Val Asp
1      5      10      15
cag gag gag cgc ttt cca cag ggc ctg tgg acg ggg gtg gct atg aga      96
Gln Glu Glu Arg Phe Pro Gln Gly Leu Trp Thr Gly Val Ala Met Arg
      20      25      30
tcc tgc ccc gaa gag cag tac tgg gat cct ctg ctg ggt acc tgc atg      144
Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met
      35      40      45
tcc tgc aaa acc att tgc aac cat cag agc cag cgc acc tgt gca gcc      192
Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala
      50      55      60
ttc tgc agg tca ctc agc tgc cgc aag gag caa ggc aag ttc tat gac      240
Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp
      65      70      75      80
cat ctc ctg agg gac tgc atc agc tgt gcc tcc atc tgt gga cag cac      288
His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His
      85      90      95
cct aag caa tgt gca tac ttc tgt gag aac aag ctc agg agc cca gtg      336
Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Pro Val
      100      105      110
aac ctt cca cca gag ctc agg aga cag cgg agt gga gaa gtt gaa aac      384
Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Arg Gln Arg Ser Gly Glu Val Glu Asn
      115      120      125
aat tca gac aac tcg gga agg tac caa gga ttg gag cac aga ggc tca      432
Asn Ser Asp Asn Ser Gly Arg Tyr Gln Gly Leu Glu His Arg Gly Ser
      130      135      140
gaa gca agt cca gct ctc ccg ggg ctg aag ctg agt gca gat cag gtg      480
Glu Ala Ser Pro Ala Leu Pro Gly Leu Lys Leu Ser Ala Asp Gln Val
      145      150      155      160
gcc ctg gtc tac agc acg ctg ggg ctc tgc ctg tgt gcc gtc ctc tgc      528
Ala Leu Val Tyr Ser Thr Leu Gly Leu Cys Leu Cys Ala Val Leu Cys
      165      170      175
tgc ttc ctg gtg gcg gtg gcc tgc ttc ctc aag aag agg ggg gat ccc      576
Cys Phe Leu Val Ala Val Ala Cys Phe Leu Lys Lys Arg Gly Asp Pro
      180      185      190
tgc tcc tgc cag ccc cgc tca agg ccc cgt caa agt ccg gcc aag tct      624
Cys Ser Cys Gln Pro Arg Ser Arg Pro Arg Gln Ser Pro Ala Lys Ser
      195      200      205
tcc cag gat cac gcg atg gaa gcc ggc agc cct gtg agc aca tcc ccc      672
Ser Gln Asp His Ala Met Glu Ala Gly Ser Pro Val Ser Thr Ser Pro
      210      215      220

```

```

gag cca gtg gag acc tgc agc ttc tgc ttc cct gag tgc agg gcg ccc 720
Glu Pro Val Glu Thr Cys Ser Phe Cys Phe Pro Glu Cys Arg Ala Pro
225                230                235                240
acg cag gag agc gca gtc acg cct ggg acc ccc gac ccc act tgt gct 768
Thr Gln Glu Ser Ala Val Thr Pro Gly Thr Pro Asp Pro Thr Cys Ala
                245                250                255
gga agg tgg ggg tgc cac acc agg acc aca gtc ctg cag cct tgc cca 816
Gly Arg Trp Gly Cys His Thr Arg Thr Thr Val Leu Gln Pro Cys Pro
                260                265                270
cac atc cca gac agt ggc ctt ggc att gtg tgt gtg cct gcc cag gag 864
His Ile Pro Asp Ser Gly Leu Gly Ile Val Cys Val Pro Ala Gln Glu
                275                280                285
ggg ggc cca ggt gca taa 882
Gly Gly Pro Gly Ala
290

```

<210> 6
 <211> 293
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

```

<400> 6
Met Ser Gly Leu Gly Arg Ser Arg Arg Gly Gly Arg Ser Arg Val Asp
1                    5                    10                    15
Gln Glu Glu Arg Phe Pro Gln Gly Leu Trp Thr Gly Val Ala Met Arg
                20                25                30
Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met
35                    40                    45
Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala
50                    55                    60
Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp
65                    70                    75                    80
His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His
85                    90                    95
Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Pro Val
100                105                110
Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Arg Gln Arg Ser Gly Glu Val Glu Asn
115                120                125
Asn Ser Asp Asn Ser Gly Arg Tyr Gln Gly Leu Glu His Arg Gly Ser
130                135                140
Glu Ala Ser Pro Ala Leu Pro Gly Leu Lys Leu Ser Ala Asp Gln Val
145                150                155                160
Ala Leu Val Tyr Ser Thr Leu Gly Leu Cys Leu Cys Ala Val Leu Cys
165                170                175
Cys Phe Leu Val Ala Val Ala Cys Phe Leu Lys Lys Arg Gly Asp Pro
180                185                190
Cys Ser Cys Gln Pro Arg Ser Arg Pro Arg Gln Ser Pro Ala Lys Ser
195                200                205
Ser Gln Asp His Ala Met Glu Ala Gly Ser Pro Val Ser Thr Ser Pro
210                215                220
Glu Pro Val Glu Thr Cys Ser Phe Cys Phe Pro Glu Cys Arg Ala Pro
225                230                235                240
Thr Gln Glu Ser Ala Val Thr Pro Gly Thr Pro Asp Pro Thr Cys Ala
245                250                255
Gly Arg Trp Gly Cys His Thr Arg Thr Thr Val Leu Gln Pro Cys Pro
260                265                270
His Ile Pro Asp Ser Gly Leu Gly Ile Val Cys Val Pro Ala Gln Glu
275                280                285
Gly Gly Pro Gly Ala
290

```

<210> 7
 <211> 834
 <212> DHK

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (67)..(621)

<400> 7

```

ttgtaagata ttacttgtaa ttccaggctg ttctttctgt agctcccttg ttttcttttt 60
gtgatac atg ttg cag atg gct ggg cag tgc tcc caa aat gaa tat ttt 108
      Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe
      1          5          10
gac agt ttg ttg cat gct tgc ata cct tgt caa ctt cga tgt tct tct 156
Asp Ser Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser
15          20          25          30
aat act cct cct cta aca tgt cag cgt tat tgt aat gca agt gtg acc 204
Asn Thr Pro Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr
35          40          45
aat tca gtg aaa gga acg aat gcg att ctc tgg acc tgt ttg gga ctg 252
Asn Ser Val Lys Gly Thr Asn Ala Ile Leu Trp Thr Cys Leu Gly Leu
50          55          60
agc tta ata att tct ttg gca gtt ttc gtg cta atg ttt ttg cta agg 300
Ser Leu Ile Ile Ser Leu Ala Val Phe Val Leu Met Phe Leu Leu Arg
65          70          75
aag ata agc tct gaa cca tta aag gac gag ttt aaa aac aca gga tca 348
Lys Ile Ser Ser Glu Pro Leu Lys Asp Glu Phe Lys Asn Thr Gly Ser
80          85          90
ggg ctc ctg ggc atg gct aac att gac ctg gaa aag agc agg act ggt 396
Gly Leu Leu Gly Met Ala Asn Ile Asp Leu Glu Lys Ser Arg Thr Gly
95          100          105          110
gat gaa att att ctt ccg aga ggc ctc gag tac acg gtg gaa gaa tgc 444
Asp Glu Ile Ile Leu Pro Arg Gly Leu Glu Tyr Thr Val Glu Glu Cys
115          120          125
acc tgt gaa gac tgc atc aag agc aaa ccg aag gtc gac tct gac cat 492
Thr Cys Glu Asp Cys Ile Lys Ser Lys Pro Lys Val Asp Ser Asp His
130          135          140
tgc ttt cca ctc cca gct atg gag gaa ggc gca acc att ctt gtc acc 540
Cys Phe Pro Leu Pro Ala Met Glu Glu Gly Ala Thr Ile Leu Val Thr
145          150          155
acg aaa acg aat gac tat tgc aag agc ctg cca gct gct ttg agt gct 588
Thr Lys Thr Asn Asp Tyr Cys Lys Ser Leu Pro Ala Ala Leu Ser Ala
160          165          170
acg gag ata gag aaa tca att tct gct agg taa ttaaccattt cgactcgagc 641
Thr Glu Ile Glu Lys Ser Ile Ser Ala Arg
175          180
agtgccactt taaaaatctt ttgtcagaat agatgatgtg tcagatctct ttaggatgac 701
tgtatttttc agttgccgat acagcttttt gtctctaac tgtggaaact ctttatgtta 761
gatatatttc tctagggttac tgttgggagc ttaatggtag aaacttcctt ggtttctatg 821
attaaagtct ttt 834

```

<210> 8

<211> 184

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

```

Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser
1          5          10          15
Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr
20          25          30
Pro Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser
35          40          45
Val Lys Gly Thr Asn Ala Ile Leu Trp Thr Cys Leu Gly Leu Ser Leu
50          55          60

```

```

Ile Ile Ser Leu Ala Val Phe Val Leu Met Phe Leu Leu Arg Lys Ile
65          70          75          80
Ser Ser Glu Pro Leu Lys Asp Glu Phe Lys Asn Thr Gly Ser Gly Leu
85          90          95
Leu Gly Met Ala Asn Ile Asp Leu Glu Lys Ser Arg Thr Gly Asp Glu
100         105         110
Ile Ile Leu Pro Arg Gly Leu Glu Tyr Thr Val Glu Glu Cys Thr Cys
115         120         125
Glu Asp Cys Ile Lys Ser Lys Pro Lys Val Asp Ser Asp His Cys Phe
130         135         140
Pro Leu Pro Ala Met Glu Glu Gly Ala Thr Ile Leu Val Thr Thr Lys
145         150         155         160
Thr Asn Asp Tyr Cys Lys Ser Leu Pro Ala Ala Leu Ser Ala Thr Glu
165         170         175
Ile Glu Lys Ser Ile Ser Ala Arg
180

```

<210> 9
 <211> 899
 <212> DHK
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (6)..(560)

```

<400> 9
gcacc atg agg cga ggg ccc cgg agc ctg cgg ggc agg gac gcg cca gcc      50
      Met Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala
      1          5          10          15
ccc acg ccc tgc gtc ccg gcc gag tgc ttc gac ctg ctg gtc cgc cac      98
Pro Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His
      20          25          30
tgc gtg gcc tgc ggg ctc ctg cgc acg cgg cgg cgg aaa ccg gcc ggg      146
Cys Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly
      35          40          45
gcc agc agc cct gcg ccc agg acg gcg ctg cag ccg cag gag tgg gtg      194
Ala Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val
      50          55          60
ggc gcg ggg gcc gcc gag gcg gcg ctg ccc ctg ccc ggg ctg ctc ttt      242
Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala Leu Pro Leu Pro Gly Leu Leu Phe
      65          70          75
ggc gcc ccc gcg ctg ctg gcc ctg gca ctg gtc ctg gcg ctg gtc ctg      290
Gly Ala Pro Ala Leu Leu Gly Leu Ala Leu Val Leu Ala Leu Val Leu
      80          85          90          95
gtg ggt ctg gtg agc tgg agg cgg cga cag cgg cgg ctt cgc gcc gcg      338
Val Gly Leu Val Ser Trp Arg Arg Arg Gln Arg Arg Leu Arg Gly Ala
      100         105         110
tcc tcc gca gag gcc ccc gac gga gac aag gac gcc cca gag ccc ctg      386
Ser Ser Ala Glu Ala Pro Asp Gly Asp Lys Asp Ala Pro Glu Pro Leu
      115         120         125
gac aag gtc atc att ctg tct ccg gga atc tct gat gcc aca gct cct      434
Asp Lys Val Ile Ile Leu Ser Pro Gly Ile Ser Asp Ala Thr Ala Pro
      130         135         140
gcc tgg cct cct cct ggg gaa gac cca gga acc acc cca cct gcc cac      482
Ala Trp Pro Pro Pro Gly Glu Asp Pro Gly Thr Thr Pro Pro Gly His
      145         150         155
agt gtc cct gtg cca gcc aca gag ctg gcc tcc act gaa ctg gtg acc      530
Ser Val Pro Val Pro Ala Thr Glu Leu Gly Ser Thr Glu Leu Val Thr
      160         165         170         175
acc aag acg gcc gcc cct gag caa caa tag cagggagccg gcaggaggtg      580
Thr Lys Thr Ala Gly Pro Glu Gln Gln
      180
gccctctgcc tcctctgga cccccagcca ggggcttgga aatcaaatc agctcttcac      640

```

```

tccagcatgc acatgccctc tttctgggac caggctaacc ctgcagaagc acagacacta 700
cagaccacag cattcagccc ccatggagtt tgggtgtgctt gcctttggct tcagacctca 760
ccatctttga cagcccttga aggtggtagc ccagctcctg ttcctgtgcc ttcaaaaggc 820
tggggcacta tgagtaaaag accgctttta aaatggggaa ggcaccatta agccaaaatg 880
aatctgaaaa aagacaaaa

```

<210> 10
 <211> 184
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 Met Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro
 1 5 10 15
 Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys
 20 25 30
 Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala
 35 40 45
 Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly
 50 55 60
 Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala Leu Pro Leu Pro Gly Leu Leu Phe Gly
 65 70 75 80
 Ala Pro Ala Leu Leu Gly Leu Ala Leu Val Leu Ala Leu Val Leu Val
 85 90 95
 Gly Leu Val Ser Trp Arg Arg Arg Gln Arg Arg Leu Arg Gly Ala Ser
 100 105 110
 Ser Ala Glu Ala Pro Asp Gly Asp Lys Asp Ala Pro Glu Pro Leu Asp
 115 120 125
 Lys Val Ile Ile Leu Ser Pro Gly Ile Ser Asp Ala Thr Ala Pro Ala
 130 135 140
 Trp Pro Pro Pro Gly Glu Asp Pro Gly Thr Thr Pro Pro Gly His Ser
 145 150 155 160
 Val Pro Val Pro Ala Thr Glu Leu Gly Ser Thr Glu Leu Val Thr Thr
 165 170 175
 Lys Thr Ala Gly Pro Glu Gln Gln
 180

<210> 11
 <211> 585
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
 1 5 10 15
 Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
 20 25 30
 Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
 35 40 45
 Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
 50 55 60
 Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
 65 70 75 80
 Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
 85 90 95
 Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
 100 105 110
 Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
 115 120 125
 Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
 130 135 140
 Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
 145 150 155 160
 Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala


```

          165          170          175
Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
      180      185      190
Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu
      195      200      205
Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro
      210      215      220
Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys
      225      230      235      240
Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp
      245      250      255
Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser
      260      265      270
Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His
      275      280      285
Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser
      290      295      300
Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala
      305      310      315      320
Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg
      325      330      335
Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr
      340      345      350
Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu
      355      360      365
Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
      370      375      380
Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
      385      390      395      400
Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
      405      410      415
Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
      420      425      430
Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
      435      440      445
Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
      450      455      460
Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
      465      470      475      480
Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
      485      490      495
Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
      500      505      510
Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
      515      520      525
Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
      530      535      540
Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
      545      550      555      560
Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
      565      570      575
Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
      580      585

```

<210> 12
 <211> 266
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Met Asp Asp Ser Thr Glu Arg Glu Gln Ser Arg Leu Thr Ser Cys Leu
 1 5 10 15
 Lys Lys Arg Glu Glu Met Lys Leu Lys Glu Cys Val Ser Ile Leu Pro
 20 25 30

```

Arg Lys Glu Ser Pro Ser Val Arg Ser Ser Lys Asp Gly Lys Leu Leu
   35           40           45
Ala Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Cys Leu Thr Val Val
   50           55           60
Ser Phe Tyr Gln Val Ala Ala Leu Gln Gly Asp Leu Ala Ser Leu Arg
   65           70           75           80
Ala Glu Leu Gln Gly His His Ala Glu Lys Leu Pro Ala Gly Ala Gly
           85           90           95
Ala Pro Lys Ala Gly Leu Glu Glu Ala Pro Ala Val Thr Ala Gly Leu
           100          105          110
Lys Ile Phe Glu Pro Pro Ala Pro Gly Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asn
           115          120          125
Ser Arg Asn Lys Arg Ala Val Gln Gly Pro Glu Glu Thr Gly Ser Tyr
           130          135          140
Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Ser Ala Leu Glu
   145           150          155          160
Glu Lys Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Glu Thr Gly Tyr Phe Phe Ile
           165          170          175
Tyr Gly Gln Val Leu Tyr Thr Asp Lys Thr Tyr Ala Met Gly His Leu
           180          185          190
Ile Gln Arg Lys Lys Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu Ser Leu Val
           195          200          205
Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Glu Thr Leu Pro Asn Asn
   210           215          220
Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala Lys Leu Glu Glu Gly Asp Glu Leu
   225           230          235          240
Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Leu Asp Gly Asp
           245          250          255
Val Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys Leu Leu
           260          265

```

<210> 13

<211> 249

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> OTHER INFORMATION: I006D08 scFv

<400> 13

```

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
   1           5           10          15
Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Asn Asn Asn
           20           25           30
Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
           35           40           45
Gly Gly Ile Ile Pro Met Phe Gly Thr Ala Lys Tyr Ser Gln Asn Phe
   50           55           60
Gln Gly Arg Val Ala Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Ser
   65           70           75           80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
           85           90           95
Ala Arg Ser Arg Asp Leu Leu Leu Phe Pro His Tyr Gly Met Asp Val
           100          105          110
Trp Gly Arg Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser
           115          120          125
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Phe Ser Ser Glu Leu
           130          135          140
Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Val
   145           150          155          160
Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln
           165          170          175
Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn
           180          185          190

```

015860

```

Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn
      195                200                205
Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp
      210                215                220
Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Trp Val Phe Gly
      225                230                235                240
Gly Gly Thr Glu Leu Thr Val Leu Gly
                        245

```

<210> 14
 <211> 251
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> OTHER INFORMATION: I050B11 scFv

```

<400> 14
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asn His
      20      25      30
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
      35      40      45
Gly Trp Ile Ser Gly His Asp Asp Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
      50      55      60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
      65      70      75      80
Ile Glu Leu Arg Ser Leu Lys Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Arg Pro Phe Tyr Asp Thr Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gln Tyr Phe
      100     105     110
Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
      115     120     125
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Leu Glu Thr
      130     135     140
Thr Leu Thr Gln Ser Pro Asp Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg
      145     150     155     160
Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Arg Gly Trp Val
      165     170     175
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Met Tyr
      180     185     190
Gly Thr Ser Arg Arg Ala Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
      195     200     205
Glu Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu
      210     215     220
Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Thr Ser Pro Arg Thr
      225     230     235     240
Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
      245     250

```

<210> 15
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> OTHER INFORMATION: I050A12 scFv

```

<400> 15
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Asp Thr Phe Ser His Tyr
      20      25      30

```

```

Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
      35              40              45
Gly Gly Ile Ile Pro Thr Phe Asn Ala Val Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
      50              55              60
Gln Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Gly Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
      65              70              75              80
Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85              90              95
Ala Thr Ala Pro Tyr Asp Leu Leu Thr His Tyr Phe His Tyr Phe Asp
      100             105             110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
      115             120             125
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Leu Ser Ser Glu
      130             135             140
Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Thr Leu Gly Gln Thr Val Arg
      145             150             155             160
Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Pro Ser Trp Tyr
      165             170             175
Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Pro Lys Asn
      180             185             190
Ile Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly
      195             200             205
Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala
      210             215             220
Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Ala Ser Ser Gly Asn His Tyr Val Phe
      225             230             235             240
Ala Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
      245             250

```

<210> 16

<211> 251

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> OTHER INFORMATION: I050B11-15 scFv

<400> 16

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asn His
      20      25      30
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
      35      40      45
Gly Trp Ile Ser Gly His Asp Asp Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
      50      55      60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
      65      70      75      80
Ile Glu Leu Arg Ser Leu Lys Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Arg Pro Phe Tyr Asp Thr Leu Thr Ser Tyr Val Phe Gln Val Trp
      100     105     110
Val Ala Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
      115     120     125
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Leu Glu Thr
      130     135     140
Thr Leu Thr Gln Ser Pro Asp Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg
      145     150     155     160
Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Arg Gly Trp Val
      165     170     175
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Met Tyr
      180     185     190
Gly Ala Ser Arg Arg Ala Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
      195     200     205

```

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu
 210 215 220
 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Thr Ser Pro Arg Thr
 225 230 235 240
 Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
 245 250

<210> 17
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> OTHER INFORMATION: I116A01 scFv

<400> 17
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Asn Asn Asn
 20 25 30
 Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Ile Pro Met Phe Gly Thr Ala Lys Tyr Ser Gln Asn Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Ala Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Gly Thr Ala Ser
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Arg Asp Leu Leu Leu Phe Pro His His Ala Leu Ser Pro
 100 105 110
 Trp Gly Arg Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Phe Ser Ser Glu Leu
 130 135 140
 Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Val
 145 150 155 160
 Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln
 165 170 175
 Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn
 180 185 190
 Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn
 195 200 205
 Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp
 210 215 220
 Tyr Tyr Cys Ser Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Trp Val Phe Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Thr Glu Leu Thr Val Leu Gly
 245

<210> 18
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> OTHER INFORMATION: I026C04-K scFv

<400> 18
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Arg Ala Ser Gly Gly Ser Phe Asn Lys His
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

```

Gly Gly Ile Leu Pro Met Tyr Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50          55          60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Leu Thr Asn Thr Val Tyr
 65          70          75          80
Met Asp Leu Ser Arg Leu Arg Tyr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Arg Glu Leu Gly Leu Ser Ile Val Gly Ala Thr Thr Gly Ala Leu
          100          105          110
Asp Met Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
          115          120          125
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Gln Ser Val
          130          135          140
Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln Lys Val Thr
          145          150          155          160
Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser
          165          170          175
Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu
          180          185          190
Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys
          195          200          205
Ser Gly Ala Ser Ala Thr Leu Asp Ile Thr Gly Leu Gln Thr Gly Asp
          210          215          220
Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp His Ser Ser Gln Val Val Phe
          225          230          235          240
Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
          245          250

```

<210> 19
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

```

<400> 19
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1          5          10          15
Ser Val Lys Met Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
          20          25          30
Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
          35          40          45
Gly Tyr Ile Ile Pro Arg Asn Thr Tyr Thr Thr Phe Asn Gln Lys Phe
          50          55          60
Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
          65          70          75          80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Arg His Tyr Gly Gly Gly Tyr Trp Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala
          100          105          110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

<210> 20
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

```

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

```

```

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Tyr
65          70          75          80
Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85          90          95
Asp Asp Pro Met Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100        105        110
Arg

```

<210> 21
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

```

<400> 21
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1          5          10          15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20        25        30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35        40        45
Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50        55        60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65        70        75        80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85        90        95
Arg Gly Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr
100       105       110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115       120

```

<210> 22
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

```

<400> 22
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1          5          10          15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Tyr
20        25        30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35        40        45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50        55        60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ser Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65        70        75        80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg
85        90        95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100       105

```

<210> 23
 <211> 293
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> OTHER INFORMATION: Ингибиторное пептидное антитело против нейтрокина-альфа

```

<400> 23
Met Leu Pro Gly Cys Lys Trp Asp Leu Leu Ile Lys Gln Trp Val Cys
1          5          10          15

```

```

Asp Pro Leu Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Ala
      20      25      30
Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Met Leu Pro Gly Cys Lys Trp
      35      40      45
Asp Leu Leu Ile Lys Gln Trp Val Cys Asp Pro Leu Gly Gly Gly Gly
      50      55      60
Gly Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
      65      70      75      80
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
      85      90      95
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
      100      105      110
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
      115      120      125
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
      130      135      140
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
      145      150      155      160
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
      165      170      175
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
      180      185      190
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
      195      200      205
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
      210      215      220
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
      225      230      235      240
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
      245      250      255
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
      260      265      270
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
      275      280      285
Leu Ser Pro Gly Lys
      290

```

<210> 24

<211> 293

<212> PRT

<213> Искусственный

<220>

<223> OTHER INFORMATION: Ингибиторное пептидное антитело против нейтрокина-альфа

<400> 24

```

Met Phe His Asp Cys Lys Trp Asp Leu Leu Thr Lys Gln Trp Val Cys
1      5      10      15
His Gly Leu Gly Ser Gly Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Ala
      20      25      30
Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr His Met Phe His Asp Cys Lys Trp
      35      40      45
Asp Leu Leu Thr Lys Gln Trp Val Cys His Gly Leu Gly Gly Gly Gly
      50      55      60
Gly Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
      65      70      75      80
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
      85      90      95
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
      100      105      110
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
      115      120      125
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
      130      135      140

```



```

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
145          150          155          160
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
          165          170          175
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
          180          185          190
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
          195          200          205
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
          210          215          220
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
225          230          235          240
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
          245          250          255
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
          260          265          270
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
          275          280          285
Leu Ser Pro Gly Lys
          290

```

<210> 25
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> OTHER INFORMATION: Связывающий нейтрокин-альфа пептид

<400> 25
 Gly Gln Met Gly Trp Arg Trp Asp Pro Leu Thr Lys Met Trp Leu Gly
 1 5 10 15
 Thr Ser

<210> 26
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Искусственный

<220>
 <223> OTHER INFORMATION: Аминокислоты 1-70 BAFF-R (SEQ ID NO:10) с
 аминокислотными заменами V20N и L27P

<400> 26
 Met Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro
 1 5 10 15
 Thr Pro Cys Asn Pro Ala Glu Cys Phe Asp Pro Leu Val Arg His Cys
 20 25 30
 Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala
 35 40 45
 Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly
 50 55 60
 Ala Gly Ala Gly Glu Ala
 65 70

<210> 27
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> СИГНАЛ
 <222> (1)..(17)

```

<400> 27
      Met Leu Gln Asn Ser Ala Val Leu Leu Leu Leu Val Ile Ser Ala Ser
      1                               10                   15
      Ala

<210> 28
<211> 22
<212> PRT
<213> Искусственный

<220>
<223> OTHER INFORMATION: консенсусная сигнальная последовательность

<220>
<221> СИГНАЛ
<222> (1)..(22)

<400> 28
      Met Pro Thr Trp Ala Trp Trp Leu Phe Leu Val Leu Leu Leu Ala Leu
      1                               10                   15
      Trp Ala Pro Ala Arg Gly
                        20

```

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения пациента с аутоиммунным заболеванием, который обладает титром антиядерного антитела (ANA) $\geq 1:80$ или уровнем антител против дцДНК ≥ 30 МЕ/мл в плазме или сыворотке крови, включающий введение терапевтически эффективного количества антагониста нейтрокина-альфа.

2. Способ по п.1, где аутоиммунное заболевание представляет собой системную красную волчанку (SLE).

3. Способ лечения пациента с аутоиммунным заболеванием, который включает:

(a) проведение определения наличия у пациента титра антиядерного антитела (ANA) $\geq 1:80$ или уровня антител против дцДНК ≥ 30 МЕ/мл в плазме или сыворотке крови и

(b) введение после проведения указанного определения терапевтически эффективного количества антагониста нейтрокина-альфа указанному пациенту.

4. Способ по п.1 или 3, где аутоиммунное заболевание представляет собой ревматоидный артрит, синдром Шегрена, склеродермию, полимиозит, дерматомиозит, синдром Фелти, смешанное заболевание соединительной ткани, синдром Рейно или ювенильный хронический артрит.

5. Способ лечения пациента с системной красной волчанкой, включающий:

(a) проведение определения наличия у пациента титра антиядерного антитела (ANA) $\geq 1:80$ или уровня антител против дцДНК ≥ 30 МЕ/мл в плазме или сыворотке крови и

(b) введение терапевтически эффективного количества антагониста нейтрокина-альфа указанному пациенту после проведения указанного определения.

6. Способ по любому из пп.1-5, где антагонист нейтрокина-альфа вводят в сочетании с антителом против CD20.

7. Способ по п.5, где перед введением антагониста нейтрокина-альфа пациент обладает по меньшей мере одной характеристикой, выбранной из группы, состоящей из:

(a) показателя SELENA SLEDAI ≥ 6 ;

(b) сниженного уровня C3-компонента комплемента в плазме или сыворотке крови;

(c) сниженного уровня C4-компонента комплемента в плазме или сыворотке крови;

(d) пациент получает $\geq 7,5$ мг/сутки преднизона и

(e) пациент получает или ранее получал терапию иммунодепрессантами в целях лечения связанных с волчанкой симптомов.

8. Способ снижения частоты введения или количества кортикостероида, вводимого пациенту с системной красной волчанкой, включающий введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества антагониста нейтрокина-альфа.

9. Способ по п.8, где кортикостероид выбран из группы, состоящей из преднизона, преднизолона, гидрокортизона, метилпреднизолона и дексаметазона.

10. Способ по п.8, где кортикостероид представляет собой преднизон.

11. Способ по п.10, где количество преднизона, вводимого пациенту, снижается по меньшей мере на 25% до $\leq 7,5$ мг/сутки.

12. Способ по п.8, где перед введением антагониста нейтрокина-альфа пациент обладает по меньшей мере одной характеристикой, выбранной из группы, состоящей из:

(a) титра ANA $\geq 1:80$;

(b) уровня антител против дцДНК ≥ 30 МЕ/мл в плазме или сыворотке крови;

(c) показателя SELENA SLEDAI ≥ 6 ;

(d) сниженного уровня C3-компонента комплемента в плазме или сыворотке крови;

- (e) сниженного уровня C4-компонента комплемента в плазме или сыворотке крови;
- (f) пациент получает $\geq 7,5$ мг/сутки преднизона и
- (g) пациент получает или ранее получал терапию иммунодепрессантами в целях лечения связанных с волчанкой симптомов.

13. Способ по п.12, где пациент обладает титром ANA $\geq 1:80$.

14. Способ по п.12, где пациент обладает уровнем антител против дцДНК ≥ 30 МЕ/мл в плазме или сыворотке крови.

15. Способ по п.7 или 12, где пациент имеет показатель SELENA SLEDAI, превышающий ≥ 6 , перед введением антагониста нейтрокина-альфа.

16. Способ по п.7 или 12, где пациент имеет концентрацию C3-компонента комплемента менее 90 мг/дл в плазме или сыворотке крови перед введением антагониста нейтрокина-альфа.

17. Способ по п.7 или 12, где пациент имеет концентрацию C4-компонента комплемента менее 16 мг/дл в его/ее плазме или сыворотке крови перед введением антагониста нейтрокина-альфа.

18. Способ по п.7 или 12, где пациент получает $\geq 7,5$ мг/сутки преднизона перед введением антагониста нейтрокина-альфа.

19. Способ по п.7 или 12, где пациент получает или ранее получал терапию иммунодепрессантами в целях лечения связанных с волчанкой симптомов.

20. Способ определения наличия ответа у пациента с волчанкой на лечение, включающий:

(a) определение показателей SELENA SLEDAI, BILAG и PGA у пациента перед проведением лечения;

(b) проведение лечения, где лечение представляет собой введение фармацевтической композиции, содержащей антагонист нейтрокина-альфа; и

(c) определение показателей SELENA SLEDAI, BILAG и PGA у пациента после проведения лечения;

где пациента считают отвечающим на лечение, если показатель SELENA SLEDAI, определенный на стадии (c), на 4 или более баллов ниже, чем показатель SELENA SLEDAI, определенный на стадии (a); показатель индекса BILAG, определенный на стадии (c), не включает новый показатель органного домена BILAG A или 2 новых показателя органного домена BILAG B по сравнению с показателем BILAG, определенным на стадии (a), и показатель PGA, определенный на стадии (c), на $<0,3$ балла выше, чем показатель PGA, определенный на стадии (a).

21. Способ по любому из пп.1-20, где антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок, содержащий связывающий нейтрокин-альфа домен рецептора для нейтрокина-альфа.

22. Способ по п.21, где антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок, содержащий связывающий нейтрокин-альфа домен TACI (SEQ ID NO: 6).

23. Способ по п.21, где антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок, содержащий связывающий нейтрокин-альфа домен BCMA (SEQ ID NO: 8).

24. Способ по п.21, где антагонист нейтрокина-альфа представляет собой белок, содержащий связывающий нейтрокин-альфа домен BAFF-R (SEQ ID NO: 10) или вариант связывающего нейтрокин-альфа домена BAFF-R, имеющий аминокислотную последовательность из остатков 2-70 SEQ ID NO: 26.

25. Способ по любому из пп.1-20, где антагонист нейтрокина-альфа представляет собой связывающий нейтрокин-альфа пептид, пептидное антитело или антитело против рецептора для нейтрокина-альфа.

26. Способ по любому из пп.1-20, где антагонист нейтрокина-альфа представляет собой антитело против нейтрокина-альфа.

27. Способ по п.26, где антитело содержит аминокислотные последовательности набора VH- и VL-доменов, выбранные из группы, состоящей из:

(a) VH-домена и VL-домена SEQ ID NO: 13;

(b) VH-домена и VL-домена SEQ ID NO: 14;

(c) VH-домена и VL-домена SEQ ID NO: 15;

(d) VH-домена и VL-домена SEQ ID NO: 16;

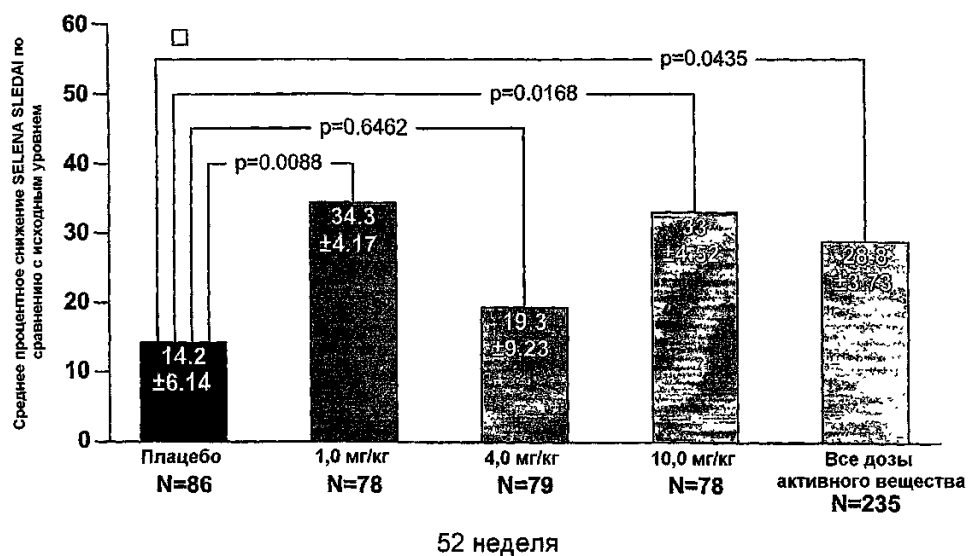
(e) VH-домена и VL-домена SEQ ID NO: 17;

(f) VH-домена и VL-домена SEQ ID NO: 18;

(g) VH-домена SEQ ID NO: 19 и VL-домена SEQ ID NO: 20 и

(h) VH-домена SEQ ID NO: 21 и VL-домена SEQ ID NO: 22.

Среднее (\pm SE) процентное снижение SELENA SLEDAI по сравнению с исходным уровнем показателя на 52 неделе у субъектов, которые обладают титром ANA $\geq 1:80$ и уровнем антител против дцДНК ≥ 30 МЕ/мл на исходном уровне



Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2