



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **128715** (13) **C2**
(51) МПК (2024.01)
C07K 16/24 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 29/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2018 09317**
(22) Дата подання заявки: **16.03.2017**
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **10.10.2024**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **16160907.8**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **17.03.2016**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **EP**
(41) Публікація відомостей про заявку: **10.04.2019, Бюл.№ 7**
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: **09.10.2024, Бюл.№ 41**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **РСТ/EP2017/056237, 16.03.2017**

(72) Винахідник(и):
**Гунде Теа (CH),
Мейер Себастьян (CH),
Фуррер Естер Марія (CH)**
(73) Володілець (володільці):
**ТІПЛОТТС ФАРМА АГ,
Baslerstrasse 15, 4310 Rheinfelden,
Switzerland (CH)**
(74) Представник:
**Петров Андрій Володимирович, реєстр.
№139**
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
EP 2623515 A1, 07.08.2013
WO 2012/007880 A2, 19.01.2012
WO 2015/144852 A1, 01.10.2015
WO 2015/065987 A1, 07.05.2015
WIEKOWSKI M., ANTONI CH. Infliximab (Remicade). Handbook of therapeutic antibodies. 2007. P. 885 - 904
Adalimumab (Humira) / H. Kupper et al. Handbook Of Therapeutic Antibodies. 2007. 38 p.
Certolizumab pegol / Melmed G.Y. et al. Nature reviews. Drug discovery. 2008.Vol. 7 (8). P. 641-642
Golimumab. MAZUMDAR S., GREENWALD D mABs. 2009. Vol. 1 (5). P. 422-431
CDP 571: anti-TNF monoclonal antibody, BAY 103356, BAY W 3356, Humicade. Drugs in R&D. 2003. Vol. 4 (3). P.174-178
DÜBEL S. Molecular Engineering I: Humanization. Handbook of Therapeutic Antibodies. 2007. P. 119-144
Epitope mapping - The first step in developing epitope-based vaccines / J.M. Gershoni, et al. Biodrugs. 2007. Vol. 21 (3). P. 145-156
Single amino acid substitution altering antigen-binding specificity / Rudikoff S. et al. Proceedings national academy of sciences PNAS. 1982. Vol. 79 (6). P.1979-1983
Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review / D. Tracey et al. Pharmacology & Therapeutics. 2008. Vol. 117. P. 244-279

UA 128715 C2

(54) АНТИТІЛО ДО ФНП α ТА ЙОГО ФУНКЦІОНАЛЬНІ ФРАГМЕНТИ

(57) Реферат:

Винахід стосується антитіла або його функціонального фрагмента, що зв'язується з фактором некрозу пухлини альфа (ФНП α) людини. Також винахід стосується нуклеїнової кислоти, вектора, клітини, фармацевтичної композиції та способу одержання такого антитіла.

Даний винахід відноситься до молекул антитіл та їх функціональних фрагментів, що здатні зв'язуватися з фактором некрозу пухлини альфа (ФНП α), способів їх одержання та їх терапевтичного застосування.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

5 ФНП α являє собою гомотримерний прозапальний цитокін, який вивільняється клітинами імунної системи та взаємодіє з ними. Також була продемонстрована позитивна регуляція ФНП α при багатьох захворюваннях людини, включаючи хронічні захворювання, такі як ревматоїдний артрит, хвороба Крона, виразковий коліт і розсіяний склероз.

10 Антитіла до ФНП α були запропоновані для профілактики та лікування ендотоксичного шоку (Beutler et al., Science, 234, 470-474, 1985). У джерелах Bodmer et al. (Critical Care Medicine, 21, S441-S446, 1993) і Wherry et al. (Critical Care Medicine, 21, S436-S440, 1993) розкривається терапевтичний потенціал антитіл до ФНП α при лікуванні септичного шоку. Застосування антитіл до ФНП α при лікуванні септичного шоку також обговорюється у джерелі Kirschenbaum et al. (Critical Care Medicine, 26, 1625-1626, 1998). Із застосуванням
15 моноклонального антитіла до ФНП α може бути ефективно здійснене лікування колаген-індукованого артриту (Williams et al. (PNAS-USA, 89, 9784-9788, 1992)).

Застосування антитіл до ФНП α при лікуванні ревматоїдного артриту та хвороби Крона описане у джерелах Feldman et al. (Transplantation Proceedings, 30, 4126-4127, 1998), Adorini et al. (Trends in Immunology Today, 18, 209-211, 1997) і Feldman et al. (Advances in Immunology, 64, 283-350, 1997). Антитіла до ФНП α , що застосовувалися раніше при такому лікуванні, зазвичай, являють собою химерні антитіла, такі як описано у патенті США № 5919452.

Моноклональні антитіла до ФНП α описані у рівні техніки. У джерелі Meager et al. (Hybridoma, 6, 305-311, 1987) описані моноклональні антитіла миші до рекомбінантного ФНП α . У джерелі Fendly et al. (Hybridoma, 6, 359-370, 1987) описане застосування моноклональних
25 антитіл миші до рекомбінантного ФНП α при визначенні нейтралізуючих епітопів ФНП α . Крім того, у міжнародній патентній заявці WO 92/11383 розкриті рекомбінантні антитіла, включаючи CDR-щеплені антитіла, що є специфічними до ФНП α . У джерелі Rankin et al. (British J. Rheumatology, 34, 334-342, 1995) описане застосування таких CDR-щеплених антитіл при лікуванні ревматоїдного артриту. У патенті США № 5919452 розкриті химерні антитіла до
30 ФНП α та їх застосування при лікуванні патологій, що зв'язані з присутністю ФНП α . Додатково антитіла до ФНП α розкриті у джерелі Stephens et al. (Immunology, 85, 668-674, 1995), GB-A-2 246 570, GB-A-2 297 145, US 8673310, US 2014/0193400, EP 2 390 267 B1, US 8293235, US 8697074, WO 2009/155723 A2 і WO 2006/131013 A2.

Молекули рекомбінантних антитіл до ФНП α , що відомі з рівня техніки, у цілому мають знижену афінність до ФНП α у порівнянні з антитілами, з яких одержують гіперваріабельні ділянки або CDR. Усі інгібітори ФНП α , що доступні у даний час на ринку, вводять внутрішньовенно або підшкірно з тижневими або більше тривалими інтервалами у вигляді
35 болусних ін'єкцій, у результаті одержуються високі вихідні концентрації, які поступово знижуються до наступної ін'єкції.

40 Біотерапевтичні засоби, які схвалені до застосування у даний час, що націлені на ФНП α , включають (i) інфліксимаб, химерне моноклональне антитіло, що містить фрагмент IgG людини (Remicade®; Wiekowski M et al: "Infliximab (Remicade)", Handbook of Therapeutic Antibodies, WILEY-VCH; Weinheim, 2007-01-01, p.885-904); (ii) етанерцепт, димерний гібридний білок TNFR2 і Fc IgG1 (Енбрел (Enbrel®)); (iii) адалімумаб, повністю людське моноклональне
45 антитіло (mAT) (Humira®; Kupper H et al: "Adalimumab (Humira)", Handbook of Therapeutic Antibodies, WILEY-VCH; Weinheim, 2007-01-01, p.697-732); (iv) цертолізумаб, пегільований Fab-фрагмент (Cimzia®; Melmed GY et al: "Certolizumab pegol", Nature Reviews. Drug Discovery, Nature Publishing Group, GB, Vol. 7, No. 8, 2008-08-01, p.641-642); (v) голімумаб, моноклональне антитіло IgG1K людини (Simponi®; Mazumdar S et al: "Golimumab", mAbs, Landes
50 Bioscience, US, Vol. 1, No. 5, 2009-09-01, p.422-431). При цьому розробляються різні біоеквівалентні лікарські засоби, і міметик інфліксимабу, що відомий як Ремсіма (Remsima), вже схвалений до застосування в Європі.

Інфліксимаб має відносно низьку афінність до ФНП α ($K_D > 0,2$ nM; Weir et al., 2006, Therapy 3: 535) й обмежену нейтралізуючу здатність в аналізі з L929. Крім цього, інфліксимаб демонструє по суті відсутність перехресної реактивності з ФНП α яванських макак (Cynomolgus) або макак-резусів (Rhesus). Проте, для антитіл до ФНП α перехресна реактивність з ФНП α від мавп вельми бажана, оскільки це дозволяє проводити дослідження на тваринах-приматах, що у багатьох аспектах відображає ситуацію у людей.

Етанерцепт, хоча й є бівалентною молекулою, зв'язується з ФНП α у відношенні один
60 тример на одну молекулу етанерцепту, виключаючи утворення великих комплексів антиген-

біотерапевтичний засіб (Wallis, 2008, Lancet Infect Dis, 8:601). Він не придушує індуковану ліпополісахаридами (ЛПС) секрецію цитокінів моноцитами (Kirchner et al., 2004, Cytokine, 28: 67).

Активність адалімумабу аналогічна активності інфліксимабу. Іншим недоліком адалімумабу є його невисока стабільність, наприклад, при визначенні в аналізі теплової денатурації. Було визначено, що температура плавлення ($T_{пл}$) адалімумабу в такому аналізі становить 67,5 °C. Однак, чим нижче значення $T_{пл}$ антитіла, тим нижче його загальна стабільність. Більше низька $T_{пл}$ робить антитіла менше підходящими для фармацевтичного застосування, наприклад, для перорального введення.

Активність цертолізумабу трохи вище, ніж активність інфліксимабу, але все ще не є задовільною. Цертолізумаб не придушує проліферацію Т-клітин у змішаній культурі лімфоцитів (ЗКЛ) (Vos et al., 2011, Gastroenterology, 140: 221).

В EP2623515 A1 розкриті гуманізовані антитіла до ФНП α та їх антигензв'язуючі фрагменти (Fab). Як стає зрозуміло з наведених у зазначеному джерелі прикладів, активність одержаних гуманізованих Fab-фрагментів порівняна з активністю інфліксимабу в аналізі нейтралізації з L929 (див. таблиці 2 і 5). Єдине антитіло IgG до ФНП α , що досліджене відносно перехресної реактивності, лише слабо зв'язується з ФНП- α макака-резуса (див. [0069]; фіг. 3). Перехресна реактивність з ФНП α яванського макака не була досліджена. Більше того, спостерігається слабке зв'язування з ФНП β людини (див. фіг. 3). Таким чином, в EP2623515 A1 не розкриті антитіла до ФНП α або їх функціональні фрагменти, які мають більше високу здатність придушувати індукований ФНП α апоптоз у клітинах L929 у порівнянні з інфліксимабом, й які мають перехресну реактивність з ФНП α макака-резуса та ФНП α яванського макака.

У WO 2012/007880 A2 розкрита модифікована однодоменна антигензв'язуюча молекула (SDAB) у формі гібридного білка, що містить один або більше окремих антигензв'язуючих доменів, які зв'язуються з однією або більше мішенями (наприклад, ФНП α), лінкер й одну або більше молекул полімеру. Єдиний наведений конкретний приклад названий SDAB-01 і містить два антигензв'язуючих домени, які зв'язуються з ФНП α , що з'єднані гнучким лінкером, і С-кінцевий цистеїн, що забезпечує сайт-специфічне пегілювання (див. фіг. 3). Авторам WO 2012/007880 A2 не вдалося порівняти активність SDAB-01 з відомими антитілами до ФНП α , такими як інфліксимаб, в аналізі нейтралізації на основі клітин L929 або оцінити інші специфічні для SDAB-01 характеристики, такі як ефективність блокування взаємодії ФНП α -TNFRI/II і селективність зв'язування ФНП α у порівнянні з ФНП β . У дослідженні, де порівнюють лікування із застосуванням SDAB-01 й із застосуванням інфліксимабу у моделі поліартриту у трансгенних мишей, що супроводжується надекспресією ФНП α людини, (див. с. 54, приклад 8), обидва засоби є однаково ефективними для запобігання подальшому розвитку артриту (наприклад, фіг. 17 і 18). Однак доза, що наведена у цьому прикладі, вводить в оману, оскільки молекулярна маса SDAB-01 становить менше половини від молекулярної маси інфліксимабу. Таким чином, у WO 2012/007880 не розкриті антитіла до ФНП α , що мають більше високу здатність придушувати індукований ФНП α апоптоз у клітинах L929, ніж інфліксимаб.

У WO 2015/144852 A1 досліджені властивості scFv до ФНП- α , що позначений "scFv1". Цей scFv продемонстрував нейтралізуючу здатність відносно ФНП α в аналізі клітин PK-15, яку можна зіставити з нейтралізуючою здатністю інфліксимабу (див. [0236]). Крім цього, scFv, мабуть, має деяку перехресну реактивність з ФНП- α макака-резуса й яванського макака (див. приклад 8). У WO 2015/144852 дані про афінність не представлені. Однак одноланцюговий фрагмент антитіла DLX105 (також відомий як ESBA 105), який, як відомо, має лише помірну афінність ($K_D=157$ nM; див. Urech et al. 2010 Ann Rheum Dis 69: 443), демонструє краще зв'язування з ФНП- α , ніж scFv1 (див. фіг. 1 у WO 2015/144852 A1). Таким чином, у WO 2015/144852 A1 не розкриті антитіла до ФНП- α , що мають високу афінність до ФНП- α людини ($K_D<125$ pM).

У WO 2015/065987 A1 описані антитіла до ФНП- α , антитіла до ІЛ-6 і біспецифічні антитіла, що зв'язуються з обома антигенами. Деякі антитіла до ФНП α демонструють деяку перехресну реактивність з ФНП α яванського макака (фіг. 17). Однак зазначені антитіла до ФНП α проявляли значно більше низьку активність в аналізі нейтралізації з L929, ніж інфліксимаб ([0152]; фіг. 5). Таким чином, у WO 2015/065987 A1 не розкриті антитіла до ФНП α , що мають більше високу здатність придушувати індукований ФНП α апоптоз у клітинах L929, ніж інфліксимаб.

У джерелі Drugs in R & D, Vol. 4 No. 3, 2003, р. 174-178 описане гуманізоване антитіло "Humicade" (CDP 571; BAY 103356), моноклональне антитіло до ФНП α з високою афінністю. Однак здатність Humicade придушувати індукований ФНП α апоптоз у клітинах L929, мабуть, є обмеженою (див., наприклад, US 2003/0199679 A1 у [0189]). Таким чином, у зазначеному джерелі не розкриті антитіла до ФНП- α , що мають більше високу здатність придушувати

індукований ФНП α апоптоз у клітинах L929, ніж інфліксимаб.

У джерелі Saldanha JW et al: "Molecular Engineering I: Humanization", Handbook of Therapeutic Antibodies, Chapter 6, 2007-01-01, WILEY-VCH, Weinheim, p.119-144 розкриті різні стратегії гуманізації моноклональних антитіл, включаючи пересадку CDR, змінення

поверхні/рекомбінацію поверхневих залишків, перенесення SDR і технологію деімунізації. Існує потреба у поліпшених молекулах антитіл для лікування хронічних запальних захворювань, таких як запальні розлади кишечника. Молекули антитіл повинні мати щонайменше (i) високу афінність до ФНП α людини (тобто $K_D < 125$ пМ), (ii) високу здатність придушувати індукований ФНП α апоптоз у клітинах L929, (iii) високу здатність придушувати індуковану ЛПС секрецію цитокінів, (iv) істотну афінність до ФНП α яванського макака та макака-резуса (наприклад, $K_D < 1$ нМ) і (v) високу температуру плавлення варіабельного домену при визначенні в експерименті з теплової денатурації (наприклад, $T_{пл} > 70$ °C).

КОРОТКИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Автори винаходу, що запропонований у даній заявці, виявили, що деякі антитіла до ФНП α та їх функціональні фрагменти проявляють комбінацію сприятливих властивостей, включаючи високу афінність до ФНП α людини ($K_D < 125$ пМ), більше високу у порівнянні з інфліксимабом здатність придушувати індукований ФНП α апоптоз у клітинах L929, більше високу у порівнянні з адаліумабом здатність придушувати індуковану ЛПС секрецію цитокінів, істотну афінність ($K_D < 1$ нМ) до ФНП α тварин, таких як яванський макак (*Macaca fascicularis*) і/або макак-резус (*Macaca mulatta*). Крім цього, зазначені антитіла та їх функціональні фрагменти були специфічними для ФНП α , оскільки вони у значній мірі не зв'язувалися з ФНП β , і проявляють значну стабільність при визначенні в аналізі теплової денатурації варіабельного домену.

У даному винаході запропоновані молекули антитіл та їх функціональні фрагменти.

Таким чином, даний винахід відноситься до об'єктів, що визначені у наступних пунктах (1)-(48):

(1) Антитіло або його функціональний фрагмент, яке здатне зв'язуватися з фактором некрозу пухлини альфа (ФНП α) людини, де зазначене антитіло або його функціональний фрагмент містить (i) домен VL, що містить ділянку CDR1, яка має амінокислотну послідовність, що відповідає амінокислотній послідовності, яка представлена у SEQ ID NO:1, ділянку CDR2, яка має амінокислотну послідовність, що відповідає амінокислотній послідовності, яка представлена у SEQ ID NO:2, і ділянку CDR3, яка має амінокислотну послідовність, що відповідає амінокислотній послідовності, яка представлена у SEQ ID NO:3, і (ii) домен VH, що містить ділянку CDR1, яка має амінокислотну послідовність, що відповідає амінокислотній послідовності, яка представлена у SEQ ID NO:4, ділянку CDR2, яка має амінокислотну послідовність, що відповідає амінокислотній послідовності, яка представлена у SEQ ID NO:5, і ділянку CDR3, яка має амінокислотну послідовність, що відповідає амінокислотній послідовності, яка представлена у SEQ ID NO:6.

(2) Антитіло або функціональний фрагмент за п. (1), де зазначене антитіло або функціональний фрагмент містить (i) домен VL, що містить ділянку CDR1, яка має амінокислотну послідовність, що представлена у SEQ ID NO:7, ділянку CDR2, яка має амінокислотну послідовність, що представлена у SEQ ID NO:8, і ділянку CDR3, яка має амінокислотну послідовність, що представлена у SEQ ID NO:9, і (ii) домен VH, що містить ділянку CDR1, яка має амінокислотну послідовність, що представлена у SEQ ID NO:10, ділянку CDR2, яка має амінокислотну послідовність, що представлена у SEQ ID NO:11, і ділянку CDR3, яка має амінокислотну послідовність, що представлена у SEQ ID NO:12.

(3) Антитіло або функціональний фрагмент за будь-яким із попередніх пунктів, де зазначене антитіло або функціональний фрагмент містить домен VH, що має амінокислотну послідовність, яка представлена у SEQ ID NO:13.

(4) Антитіло або функціональний фрагмент за будь-яким із попередніх пунктів, де зазначене антитіло або функціональний фрагмент містить домен VL, що має амінокислотну послідовність, яка вибрана з SEQ ID NO:14 і SEQ ID NO:54, що переважно має амінокислотну послідовність, яка представлена у SEQ ID NO:14.

(5) Антитіло або функціональний фрагмент за будь-яким із попередніх пунктів, де зазначене антитіло або його функціональний фрагмент специфічно зв'язується з ФНП α людини.

(6) Антитіло або функціональний фрагмент за будь-яким із попередніх пунктів, де зазначене антитіло або його функціональний фрагмент у значному ступені не зв'язується з ФНП β .

(7) Антитіло або функціональний фрагмент за будь-яким із попередніх пунктів, де зазначене антитіло або функціональний фрагмент

(i) зв'язується з ФНП α людини з константою дисоціації (K_D) менше 125 пМ;

(ii) має перехресну реактивність з ФНП α *Macaca mulatta* та ФНП α *Macaca fascicularis*;

(iii) має більше високу активність, ніж інфліксимаб, при визначенні за допомогою аналізу з L929 і/або

(iv) здатний зв'язуватися з ФНП α _{Тример} людини у стехіометричному відношенні (антитіло: ФНП α _{Тример}), що становить щонайменше 2.

5 (8) Антитіло або функціональний фрагмент за будь-яким із попередніх пунктів, яке зв'язується з ФНП α людини з KD менше 100 пМ, переважно менше 50 пМ.

(9) Антитіло або функціональний фрагмент за будь-яким із попередніх пунктів, яке зв'язується з ФНП α *Macaca mulatta* з KD менше 1 нМ.

10 (10) Антитіло або функціональний фрагмент за будь-яким із попередніх пунктів, яке зв'язується з ФНП α *Macaca fascicularis* з KD менше 1 нМ.

(11) Антитіло або функціональний фрагмент за будь-яким із попередніх пунктів, де здатність зазначеного антитіла або функціонального фрагмента придушувати індукований ФНП α апоптоз у відношенні до здатності інфліксимабу (відносна здатність), що визначена в аналізі з L929, становить понад 5, і де зазначена відносна здатність являє собою відношення значення IC50 у нг/мл інфліксимабу в аналізі з L929 до значення IC50 у нг/мл антитіла у формі scFv в аналізі з L929.

(12) Антитіло або функціональний фрагмент за будь-яким із попередніх пунктів, де температура плавлення варіабельного домену антитіла у вигляді scFv, що визначена за допомогою диференціальної скануючої флуориметрії, становить щонайменше 65 °C.

20 (13) Антитіло або функціональний фрагмент за будь-яким із попередніх пунктів, де температура плавлення варіабельного домену антитіла у вигляді scFv, що визначена за допомогою диференціальної скануючої флуориметрії, становить щонайменше 68 °C.

(14) Антитіло або функціональний фрагмент за будь-яким із попередніх пунктів, де температура плавлення, що визначена за допомогою диференціальної скануючої флуориметрії, становить щонайменше 70 °C.

25 (15) Антитіло або функціональний фрагмент за будь-яким із попередніх пунктів, де втрата вмісту мономера після п'яти послідовних циклів заморожування-відтаювання становить менше 0,2 %.

(16) Антитіло або функціональний фрагмент за будь-яким із попередніх пунктів, де втрата вмісту мономера після зберігання при 4 °C протягом чотирьох тижнів становить менше 1 %.

(17) Антитіло або функціональний фрагмент за будь-яким із попередніх пунктів, де здатність антитіла або функціонального фрагмента блокувати взаємодію ФНП α людини з рецептором ФНП I (TNFRI) по відношенню до здатності інфліксимабу (відносна здатність) при визначенні за допомогою інгібіторного ELISA становить щонайменше 2, де зазначена відносна здатність являє собою відношення значення IC50 у нг/мл інфліксимабу до значення IC50 у нг/мл антитіла у формі scFv.

(18) Антитіло або функціональний фрагмент за будь-яким із попередніх пунктів, де здатність антитіла або функціонального фрагмента блокувати взаємодію ФНП α людини з рецептором ФНП II (TNFRII) по відношенню до здатності інфліксимабу (відносна здатність) при визначенні за допомогою інгібіторного ELISA становить щонайменше 2, де зазначена відносна здатність являє собою відношення значення IC50 у нг/мл інфліксимабу до значення IC50 у нг/мл антитіла у формі scFv.

(19) Антитіло або функціональний фрагмент за будь-яким із попередніх пунктів, яке здатне придушувати клітинну проліферацію мононуклеарних клітин периферичної крові в реакції змішаної культури лімфоцитів.

(20) Антитіло або функціональний фрагмент за будь-яким із попередніх пунктів, яке здатне придушувати індуковану ЛПС секрецію інтерлейкіну-1 β CD14+ моноцитами.

(21) Антитіло або функціональний фрагмент за п. (20), де значення IC50 для придушення індукованої ЛПС секреції інтерлейкіну-1 β становить менше 1 нМ.

50 (22) Антитіло або функціональний фрагмент за п. (21), де значення IC50 для придушення індукованої ЛПС секреції інтерлейкіну-1 β , що розраховане у вигляді молярної концентрації, менше, ніж значення IC50 адаліумабу.

(23) Антитіло або функціональний фрагмент за будь-яким із попередніх пунктів, яке здатне придушувати індуковану ЛПС секрецію ФНП α CD14+ моноцитами.

55 (24) Антитіло або функціональний фрагмент за п. (23), де значення IC50 для придушення індукованої ЛПС секреції ФНП α становить менше 1 нМ.

(25) Антитіло або функціональний фрагмент за п. (24), де значення IC50 для придушення індукованої ЛПС секреції ФНП α , що розраховане у вигляді молярної концентрації, менше, ніж значення IC50 адаліумабу.

60 (26) Антитіло за будь-яким із попередніх пунктів, яке являє собою імуноглобулін G (IgG).

(27) Функціональний фрагмент за будь-яким із пп. (1)-(25), який являє собою однопептидний варіабельний фрагмент (scFv).

(28) Функціональний фрагмент за п. (27), де зазначений scFv містить амінокислотну послідовність, яка вибрана з SEQ ID NO:15 і SEQ ID NO:55, переважно амінокислотну послідовність, що представлена у SEQ ID NO:15, або складається із зазначеної амінокислотної послідовності.

(29) Функціональний фрагмент за будь-яким із пп. (1)-(25), який являє собою діатіло.

(30) Функціональний фрагмент за п. (29), де зазначене діатіло містить амінокислотну послідовність, що представлена у SEQ ID NO:51, або складається із зазначеної амінокислотної послідовності.

(31) Антитіло або його функціональний фрагмент, яке зв'язується з по суті тим самим епітопом ФНП α людини, що й антитіло, яке містить домен VH, що має амінокислотну послідовність, яка представлена у SEQ ID NO:13, і домен VL, що має амінокислотну послідовність, яка представлена у SEQ ID NO:14, зокрема, де зазначене антитіло або функціональний фрагмент демонструє одну або більше ознак, що згадані вище у пп. (1)-(30).

(32) Антитіло або функціональний фрагмент за будь-яким із попередніх пунктів, де сума (i) кількості амінокислот у каркасних ділянках I-III варіабельного домену легкого ланцюга зазначеного антитіла або функціонального фрагмента, які відрізняються від відповідних консенсусних послідовностей Vk1 людини з SEQ ID NOs: 56-58 (див. таблицю 15), і (ii) кількості амінокислот у каркасній ділянці IV варіабельного домену легкого ланцюга зазначеного антитіла або функціонального фрагмента, які відрізняються від найбільше схожої послідовності λ зародкової лінії людини, що вибрана з SEQ ID NOs: 59-62 (див. таблицю 16), становить менше 7, переважно менше 4.

(33) Антитіло або функціональний фрагмент за будь-яким із попередніх пунктів, де зазначені каркасні ділянки I-III варіабельного домену легкого ланцюга зазначеного антитіла або функціонального фрагмента складаються з консенсусних послідовностей Vk1 людини з SEQ ID NOs: 56-58, відповідно, а каркасна ділянка IV складається з послідовності λ зародкової лінії людини, що вибрана з SEQ ID NOs: 59-62.

(34) Нуклеїнова кислота, яка кодує антитіло або функціональний фрагмент за будь-яким із попередніх пунктів.

(35) Вектор або плазмід, які містять нуклеїнову кислоту за п. (34).

(36) Клітина, яка містить нуклеїнову кислоту за п. (35) або вектор або плазмід за п. (34).

(37) Спосіб одержання антитіла або функціонального фрагмента за будь-яким із пп. (1)-(33), який включає культивування клітини за п. (36) у середовищі за умов, що забезпечують можливість експресії нуклеїнової кислоти, яка кодує зазначене антитіло або функціональний фрагмент, і виділення антитіла або функціонального фрагмента із зазначених клітин або середовища.

(38) Фармацевтична композиція, яка містить антитіло або функціональний фрагмент за будь-яким із пп. (1)-(33), і, необов'язково, фармацевтично прийнятний носій та/або допоміжну речовину.

(39) Антитіло або функціональний фрагмент згідно з визначенням у будь-якому з пп. (1)-(33) для застосування у способі лікування запального розладу або розладу, що зв'язаний з ФНП α .

(40) Антитіло або функціональний фрагмент для застосування відповідно до п. (39), де зазначений запальний розлад вибраний з переліку захворювань та розладів, що перераховані нижче у розділі "Розлади, що підлягають лікуванню".

(41) Антитіло або функціональний фрагмент для застосування відповідно до п. (39), де зазначений запальний розлад являє собою запальний розлад шлунково-кишкового тракту.

(42) Антитіло або функціональний фрагмент для застосування відповідно до п. (41), де зазначений запальний розлад шлунково-кишкового тракту являє собою запальне захворювання кишечника.

(43) Антитіло або функціональний фрагмент для застосування відповідно до п. (41) або (42), де зазначений запальний розлад шлунково-кишкового тракту являє собою хворобу Крона.

(44) Антитіло або функціональний фрагмент для застосування відповідно до п. (43), де зазначена хвороба Крона вибрана з групи, що складається з хвороби Крона з ураженням клубової кишки, товстого кишечника, клубової кишки та товстого кишечника та/або хвороби Крона з ізольованим ураженням верхніх відділів (шлунка, дванадцятипалої кишки і/або тонкої кишки) і включає нестриктуруючий/непенетруючий, стриктуруючий, пенетруючий характер перебігу захворювання, і включає періанальні ураження, з можливістю будь-якої комбінації локалізації та характеру перебігу захворювання із зазначених вище.

(45) Антитіло або функціональний фрагмент для застосування відповідно до п. (41) або (42),

де зазначений запальний розлад шлунково-кишкового тракту являє собою виразковий коліт.

(46) Антитіло або функціональний фрагмент для застосування відповідно до п. (45), де зазначений виразковий коліт вибраний з групи, що складається з виразкового проктиту, проктосигмоїдиту, лівобічного коліту, виразкового панколіту та паучиту.

5 (47) Антитіло або функціональний фрагмент для застосування відповідно до п. (41) або (42), де зазначений запальний розлад шлунково-кишкового тракту являє собою мікроскопічний коліт.

(48) Антитіло або функціональний фрагмент для застосування відповідно до будь-якого з пп. (39)-(47), де зазначений спосіб включає пероральне введення антитіла або функціонального фрагмента суб'єкту.

10 КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

Фігура 1: схематичне представлення процесу гуманізації.

Фігура 2: хроматограми ексклюзійної ВЕРХ (SE-HPLC) очищених препаратів гуманізованих scFv. Мономерний scFv елюється з часом утримування від 8,5 до 9,5 хвилин, у той час як компоненти буфера елюються > 10 хв. Усі піки мертвого об'єму колонки до відповідного мономерного scFv об'єднували як агрегати/олігомери і використовували для розрахунку відносною площі піка.

15 Фігура 3: криві теплової денатурації за даними диференціальної скануючої флуориметрії (DSF) двох конструкцій scFv. Для кожної конструкції показані дані двох вимірів. Одержані значення T_{пл} були визначені шляхом підбору значень рівняння Больцмана для одержання середньої точки переходу.

20 Фігура 4: залежність вмісту мономера двох конструкцій scFv від часу при зберіганні. Представлений графік вмісту мономера, що визначений методом ексклюзійної ВЕРХ, для температур зберігання 4, -20 і <-65 °C протягом 4 тижнів.

25 Фігура 5: накладення хроматограм ексклюзійної ВЕРХ для двох молекул scFv. Для кожного scFv представлений зразок (10 мг/мл) у початковий момент часу та після зберігання при 4 °C протягом 4 тижнів. Крім цього, представлена хроматограма зразка після 5 циклів заморожування та відтаювання. На вставленій панелі показано приблизно 15-кратне збільшення осі у для кожної молекули для візуалізації, у тому числі мінімальних змін у вмісті олігомерів.

30 Фігура 6: залежність вмісту мономера гуманізованих scFv від часу при зберіганні. Представлений графік вмісту мономера, що визначений методом ексклюзійної ВЕРХ, для зразків з концентрацією 10 мг/мл при температурі зберігання 37 °C протягом 4 тижнів.

35 Фігура 7: здатність двох scFv нейтралізувати ФНП α людини в аналізі з L929. Для кожного експерименту представлені криві залежності "доза-відповідь" для scFv й еталонного антитіла, що являє собою інфліксимаб. Максимальні концентрації scFv й інфліксимабу та негативні контролю брали за 100 % і 0 % зростання.

40 Фігура 8: здатність двох scFv нейтралізувати ФНП α приматів, які не є людиною, і ФНП α людини в аналізі з L929. Представлені криві залежності "доза-відповідь" для нейтралізації ФНП α людини, яванського макака та макака-резуса. Максимальну концентрацію scFv і негативні контролю брали за 100 % і 0 % зростання.

Фігура 9: здатність двох scFv блокувати взаємодію ФНП α -TNFRI. Представлені криві залежності "доза-відповідь". Максимальну концентрацію scFv і негативні контролю брали за 0 % і 100 % зв'язування ФНП α з TNFRI.

45 Фігура 10: здатність двох scFv блокувати взаємодію ФНП α -TNFRII. Представлені криві залежності "доза-відповідь". Максимальну концентрацію scFv і негативні контролю брали за 0 % і 100 % зв'язування ФНП α з TNFRII.

Фігура 11: специфічність scFv до мішені. Здатність придушувати взаємодію біотинільованого ФНП α з scFv із застосуванням ФНП α і ФНП β аналізували методом конкурентного ELISA. Представлені дозозалежні ефекти ФНП α і ФНП β .

50 На фігурі 12 зображене утворення комплексів 16-22-H5-scFv: ФНП α , що визначене методом ексклюзійної ВЕРХ (приклад 4).

На фігурі 13 зображене одночасне зв'язування двох молекул ФНП α з 16-22-H5-scDb, що визначене методом поверхневого плазмонного резонансу (SPR) (приклад 5).

На фігурі 14A зображене утворення комплексів 16-22-H5-IgG: ФНП α (приклад 5).

55 На фігурі 14B зображене утворення комплексів 16-22-H5-scDb: ФНП α (приклад 5).

На фігурі 15 представлено придушення проліферації клітин у реакції ЗКЛ після обробки антитілами до ФНП α . *: p < 0.05; **: p < 0.01 у порівнянні з контрольним IgG (приклад 6).

60 На фігурі 16 представлена здатність різних форм антитіл 16-22-H5 й адаліумабу дозозалежним чином придушувати індуковану ЛПС секрецію ІЛ-1 β (фігура 16A) і ФНП α (фігура 16B) моноцитами (приклад 7).

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Даний винахід відноситься до антитіла або його функціонального фрагмента, що здатний зв'язуватися з ФНП α людини.

У контексті даної заявки термін "антитіло" використаний як синонім для терміна "імуноглобулін" (Ig), який визначений як білок, що належить до класу IgG, IgM, IgE, IgA або IgD (або будь-якого їх підкласу), і включає всі традиційно відомі антитіла та їх функціональні фрагменти. У контексті даного винаходу "функціональний фрагмент" антитіла/імуноглобуліну визначений як антигензв'язуючий фрагмент або інше похідне вихідного антитіла, яке по суті зберігає одну або більше властивостей такого вихідного антитіла, що згадані вище у пп. (1)-(30) даного опису. "Антигензв'язуючий фрагмент" антитіла/імуноглобуліну визначений як фрагмент (наприклад, варіабельна ділянка IgG), який зберігає антигензв'язуючу ділянку. "Антигензв'язуюча ділянка" антитіла, зазвичай, знаходиться в одній або більше гіперваріабельній ділянці (ділянках) антитіла, тобто ділянках CDR-1, -2 та/або -3. "Антигензв'язуючі фрагменти" згідно з даним винаходом включають домен F(ab')₂-фрагмента та Fab-фрагмент. "Функціональні фрагменти" згідно з даним винаходом включають scFv, dsFv, діатіла, тріотіла, тетратіла та Fc-гібридні білки. F(ab')₂ або Fab може бути сконструйований таким чином, щоб мінімізувати або повністю видалити міжмолекулярні дисульфідні взаємодії, що відбуваються між доменами CH1 і CL. Антитіла або функціональні фрагменти згідно з даним винаходом можуть являти собою частину бі- або багатофункціональних конструкцій.

Переважними функціональними фрагментами у даному винаході є scFv і діатіла. scFv являє собою одноланцюговий Fv-фрагмент, в якому варіабельний домен легкого ланцюга ("V_L") і варіабельний домен важкого ланцюга ("V_H") з'єднані пептидним містком.

Діатіло являє собою димер, що складається з двох фрагментів, кожний з яких має варіабельні ділянки, що з'єднані лінкером або тому подібним (що далі зветься фрагментами, що утворюють діатіло), і, зазвичай, містить два V_Ls і два V_Hs. Фрагменти, що утворюють діатіло, включають фрагменти, що складаються з V_L і V_H, V_L і V_L, V_H і V_H і т. п., переважно V_H і V_L. У фрагментах, що утворюють діатіло, лінкер, який з'єднує варіабельні ділянки, не має конкретних обмежень, але переважно є досить коротким, щоб уникнути утворення нековалентних зв'язків між варіабельними ділянками одного фрагмента. Довжина такого лінкера може бути визначена фахівцями у даній галузі техніки в залежності від ситуації, але, зазвичай, становить 2-14 амінокислот, переважно 3-9 амінокислот, зокрема 4-6 амінокислот. У цьому випадку V_L і V_H, що кодуються в одному і тому самому фрагменті, з'єднані досить коротким лінкером, щоб уникнути утворення нековалентних зв'язків між V_L і V_H в одному ланцюзі та щоб уникнути утворення одноланцюгових фрагментів варіабельної ділянки для того, щоб могли бути одержані димери з іншим фрагментом. Димери можуть бути утворені за допомогою ковалентних зв'язків, нековалентних зв'язків або і тих, й інших між фрагментами, що утворюють діатіло.

Більше того, фрагменти, що утворюють діатіло, можуть бути з'єднані лінкером або тому подібним з одержанням одноланцюгових діатіл (sc(Fv)₂). При з'єднанні фрагментів, що утворюють діатіло, довгим лінкером, що складається з приблизно 15-20 амінокислот, можуть бути утворені нековалентні зв'язки між фрагментами, що утворюють діатіло, які розташовані в одному ланцюзі, з одержанням димерів. Базуючись на тому самому принципі, що і при одержанні діатіл, полімеризовані антитіла, такі як тримери або тетрамери, також можуть бути одержані шляхом з'єднання трьох або більше фрагментів, що утворюють діатіло.

Переважно антитіло або функціональний фрагмент згідно з даним винаходом специфічно зв'язується з ФНП α . У контексті даного опису антитіло або його функціональний фрагмент "специфічно розпізнає" або "специфічно зв'язується з" ФНП α людини, коли антитіло або функціональний фрагмент здатне/здатний розрізняти ФНП α людини й одну або більше молекул порівняння. Переважно значення IC₅₀ для зв'язування з кожною молекулою порівняння щонайменше у 1000 разів перевищує значення IC₅₀ для зв'язування з ФНП α , зокрема як описано у прикладі 2, розділ 2.1.4. У найбільше загальній формі (та коли не згадується певне посилення), "специфічне зв'язування" відноситься до здатності антитіла або функціонального фрагмента розрізняти ФНП α людини і неспоріднені біомолекули, при визначенні, наприклад, відповідно до конкретних методів аналізу, що відомі у даній галузі техніки. Такі методи включають, але не обмежуються ними, методи вестерн-блотингу й ELISA. Наприклад, може бути виконаний стандартний аналіз ELISA. Зазвичай, визначення специфічності зв'язування проводять з використанням не однієї молекули порівняння, а групи з приблизно трьох-п'яти неспоріднених біомолекул, таких як сухе молоко, БСА, трансферин або тому подібне. В одному з варіантів реалізації специфічне зв'язування відноситься до здатності антитіла або фрагмента розрізняти ФНП α людини і ФНП β людини.

Антитіло згідно з даним винаходом або функціональний фрагмент згідно з даним винаходом

містить домен V_L і домен V_H . Домен V_L містить ділянку CDR1 (CDRL1), ділянку CDR2 (CDRL2), ділянку CDR3 (CDRL3) та каркасні ділянки. Домен V_H містить ділянку CDR1 (CDRH1), ділянку CDR2 (CDRH2), ділянку CDR3 (CDRH3) та каркасні ділянки.

Термін "CDR" відноситься до однієї з шести гіперваріабельних ділянок у варіабельних доменах антитіла, що переважно беруть участь у зв'язуванні антигена. Одне з визначень, що найбільше часто використовується для шести CDR, було запропоноване Кабатом (Kabat E. A. et al., (1991) Sequences of proteins of immunological interest. NIH Publication 91-3242). У контексті даного опису визначення CDR згідно з Кабатом може бути застосоване тільки для CDR1, CDR2 і CDR3 варіабельного домену легкого ланцюга (CDR L1, CDR L2, CDR L3, або L1, L2, L3), а також для CDR2 і CDR3 варіабельного домену важкого ланцюга (CDR H2, CDR H3, або H2, H3). CDR1 варіабельного домену важкого ланцюга (CDR H1, або H1), однак, у контексті даного опису, визначається наступними залишками (нумерація Кабата): починається з положення 26 і закінчується до положення 36.

Ділянка CDR1 домену V_L складається з амінокислотної послідовності, що відповідає амінокислотній послідовності, яка представлена у SEQ ID NO:1. Переважно ділянка CDR1 домену V_L складається з амінокислотної послідовності, що вибрана з групи, яка складається з SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21 і SEQ ID NO:22. Найбільше переважно ділянка CDR1 домену V_L складається з амінокислотної послідовності, що представлена у SEQ ID NO:7.

Ділянка CDR2 домену V_L складається з амінокислотної послідовності, що відповідає амінокислотній послідовності, яка представлена у SEQ ID NO:2. Переважно ділянка CDR2 домену V_L складається з амінокислотної послідовності, що вибрана з групи, яка складається з SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 і SEQ ID NO:26. Найбільше переважно ділянка CDR2 домену V_L складається з амінокислотної послідовності, що представлена у SEQ ID NO:8.

Ділянка CDR3 домену V_L складається з амінокислотної послідовності, що відповідає амінокислотній послідовності, яка представлена у SEQ ID NO:3. Переважно ділянка CDR3 домену V_L складається з амінокислотної послідовності, що вибрана з групи, яка складається з SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31 і SEQ ID NO:32. Найбільше переважно ділянка CDR3 домену V_L складається з амінокислотної послідовності, що представлена у SEQ ID NO:9.

Ділянка CDR1 домену V_H складається з амінокислотної послідовності, що відповідає амінокислотній послідовності, яка представлена у SEQ ID NO:4. Переважно ділянка CDR1 домену V_H складається з амінокислотної послідовності, що вибрана з групи, яка складається з SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35 і SEQ ID NO:36. Найбільше переважно ділянка CDR1 домену V_H складається з амінокислотної послідовності, що представлена у SEQ ID NO:10.

Ділянка CDR2 домену V_H складається з амінокислотної послідовності, що відповідає амінокислотній послідовності, яка представлена у SEQ ID NO:5. Переважно ділянка CDR2 домену V_H складається з амінокислотної послідовності, що вибрана з групи, яка складається з SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40 і SEQ ID NO:41. Найбільше переважно ділянка CDR2 домену V_H складається з амінокислотної послідовності, що представлена у SEQ ID NO:11.

Ділянка CDR3 домену V_H складається з амінокислотної послідовності, що відповідає амінокислотній послідовності, яка представлена у SEQ ID NO:6. Переважно ділянка CDR3 домену V_H складається з амінокислотної послідовності, що вибрана з групи, яка складається з SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47 і SEQ ID NO:48. Найбільше переважно ділянка CDR3 домену V_H складається з амінокислотної послідовності, що представлена у SEQ ID NO:12.

У конкретному варіанті реалізації антитіла згідно з даним винаходом або функціональний фрагмент згідно з даним винаходом містить (i) домен V_L , що містить ділянку CDR1, яка має амінокислотну послідовність, що відповідає амінокислотній послідовності, яка представлена у SEQ ID NO:1, ділянку CDR2, яка має амінокислотну послідовність, що відповідає амінокислотній послідовності, яка представлена у SEQ ID NO:2, і ділянку CDR3, яка має амінокислотну послідовність, що відповідає амінокислотній послідовності, яка представлена у SEQ ID NO:3, і (ii) домен V_H , що містить ділянку CDR1, яка має амінокислотну послідовність, що відповідає амінокислотній послідовності, яка представлена у SEQ ID NO:4, ділянку CDR2, яка має амінокислотну послідовність, що відповідає амінокислотній послідовності, яка представлена у SEQ ID NO:5, і ділянку CDR3, яка має амінокислотну послідовність, що відповідає амінокислотній послідовності, яка представлена у SEQ ID NO:6.

У конкретному варіанті реалізації антитіло згідно з даним винаходом або функціональний фрагмент згідно з даним винаходом містить (i) домен V_L , що містить ділянку CDR1, яка має амінокислотну послідовність, що представлена у SEQ ID NO:7, ділянку CDR2, яка має амінокислотну послідовність, що представлена у SEQ ID NO:8, і ділянку CDR3, яка має амінокислотну послідовність, що представлена у SEQ ID NO:9, і (ii) домен V_H , що містить ділянку CDR1, яка має амінокислотну послідовність, що представлена у SEQ ID NO:10, ділянку CDR2, яка має амінокислотну послідовність, що представлена у SEQ ID NO:11, і ділянку CDR3, яка має амінокислотну послідовність, що представлена у SEQ ID NO:12.

У більше переважному варіанті реалізації антитіло згідно з даним винаходом або функціональний фрагмент згідно з даним винаходом містить домен V_H , що має амінокислотну послідовність, яка представлена у SEQ ID NO:13. В іншому більше переважному варіанті реалізації антитіло або функціональний фрагмент містить домен V_L , що має амінокислотну послідовність, яка представлена у SEQ ID NO:14 або SEQ ID NO:54. Найбільше переважно антитіло згідно з даним винаходом або функціональний фрагмент згідно з даним винаходом містить (i) домен V_H , що має амінокислотну послідовність, яка представлена у SEQ ID NO:13, і (ii) домен V_L , що має амінокислотну послідовність, яка представлена у SEQ ID NO:14.

В особливо переважному варіанті реалізації функціональний фрагмент являє собою однокланцюгове антитіло (scFv), що містить домен V_H , який має амінокислотну послідовність, що представлена у SEQ ID NO:13, і домен V_L , який має амінокислотну послідовність, що представлена у SEQ ID NO:14 або SEQ ID NO:54. Домен V_H і домен V_L переважно з'єднані пептидним лінкером. Пептидний лінкер (що далі зветься "лінкер А"), зазвичай, має довжину від приблизно 10 до приблизно 30 амінокислот, більше переважно від приблизно 15 до приблизно 25 амінокислот. Лінкер А, зазвичай, містить залишки гліцину (Gly) та серину (Ser), але можливі й інші амінокислоти. У переважних варіантах реалізації лінкер містить множинні повтори послідовності GGGGS (SEQ ID NO:50), наприклад, від 2 до 6, або від 3 до 5, або 4 послідовних повторів амінокислотної послідовності, що представлена у SEQ ID NO:50. Найбільше переважно лінкер А складається з амінокислотної послідовності, що представлена у SEQ ID NO:49. scFv може мати наступну структуру (N-кінець зліва та С-кінець справа):

V_L -лінкер А- V_H або

V_H -лінкер А- V_L .

Більше переважно функціональний фрагмент являє собою однокланцюгове антитіло (scFv), що складається з амінокислотної послідовності, яка представлена у SEQ ID NO:15 або SEQ ID NO:55. Найбільше переважно функціональний фрагмент являє собою однокланцюгове антитіло (scFv), що складається з амінокислотної послідовності, яка представлена у SEQ ID NO:15.

В іншому особливо переважному варіанті реалізації функціональний фрагмент являє собою діатіло, що містить домен V_H , який має амінокислотну послідовність, що представлена у SEQ ID NO:13, і домен V_L , який має амінокислотну послідовність, що представлена у SEQ ID NO:14 або SEQ ID NO:54. Домен V_H і домен V_L з'єднані пептидним лінкером. Пептидний лінкер (що далі зветься "лінкер В") переважно має довжину від приблизно 2 до приблизно 10 амінокислот, більше переважно приблизно 5 амінокислот. Лінкер В, зазвичай, містить залишки Gly і Ser, але можливі й інші амінокислоти. Найбільше переважно лінкер В складається з амінокислотної послідовності, що представлена у SEQ ID NO:50.

Діатіло переважно являє собою моноспецифічне діатіло, тобто спрямоване тільки на один епітоп. Діатіло переважно являє собою гомодимер. Діатіло може являти собою димер з двох поліпептидних ланцюгів, що нековалентно зв'язані один з одним. Кожний мономер може являти собою поліпептидний ланцюг, що має структуру:

V_L -Лінкер В- V_H або

V_H -Лінкер В- V_L .

Крім того, фрагменти, що утворюють діатіло, можуть бути з'єднані лінкером А або тому подібним з одержанням однокланцюгових діатіл ($sc(Fv)_2$). При з'єднанні фрагментів, що утворюють діатіло, з використанням довгого лінкера, який містить приблизно 15-20 амінокислот, можуть утворюватися нековалентні зв'язки між фрагментами, що утворюють діатіло, які знаходяться в одному ланцюзі, з одержанням димерів. Приклади структурної організації однокланцюгових діатіл включають наступні.

V_H – лінкер В – V_L – лінкер А- V_H лінкер В- V_L

V_L – лінкер В- V_H – лінкер А- V_L – лінкер В- V_H

Переважно діатіло згідно з даним винаходом має наступну структуру:

V_L – лінкер В- V_H – лінкер А- V_L – лінкер В- V_H

Найбільше переважно діатіло складається з амінокислотної послідовності, що представлена у SEQ ID NO:51.

Базуючись на тому самому принципі, що і при одержанні діатіл, полімеризовані антитіла, такі як тримери або тетрамери, також можуть бути одержані шляхом з'єднання трьох або більше фрагментів, що утворюють діатіло.

В іншому конкретному варіанті реалізації антитіло згідно з даним винаходом являє собою імуноглобулін, переважно імуноглобулін G (IgG). Підклас IgG згідно з даним винаходом не обмежений та включає IgG₁, IgG₂, IgG₃ й IgG₄. Переважно IgG згідно з даним винаходом належить до підкласу 1, тобто являє собою молекулу IgG₁. В одному з варіантів реалізації кожний легкий ланцюг молекули IgG згідно з даним винаходом має амінокислотну послідовність, що представлена у SEQ ID NO:52, і/або кожний важкий ланцюг молекули IgG згідно з даним винаходом має амінокислотну послідовність, що представлена у SEQ ID NO:53. Конкретний IgG згідно з даним винаходом складається з двох легких ланцюгів і двох важких ланцюгів, де кожний з двох легких ланцюгів має амінокислотну послідовність, що представлена у SEQ ID NO:52, і кожний з двох важких ланцюгів має амінокислотну послідовність, що представлена у SEQ ID NO:53.

Афінність

Антитіло або функціональний фрагмент згідно з даним винаходом має високу афінність до ФНП α людини. Термін "K_D" відноситься до константи рівноваги дисоціації конкретної взаємодії антитіло-антиген. Зазвичай, антитіло або функціональний фрагмент згідно з даним винаходом зв'язується з ФНП α людини з константою рівноваги дисоціації (K_D) менше приблизно 2×10⁻¹⁰ М, переважно менше 1,5×10⁻¹⁰ М, переважно менше 1,25×10⁻¹⁰ М, більше переважно менше 1×10⁻¹⁰ М, найбільше переважно менше 7,5×10⁻¹¹ М або навіть менше 5×10⁻¹¹ М, при визначенні за допомогою технології поверхневого плазмонного резонансу (SPR) на приладі BIACORE. Зокрема, визначення K_D проводять, як описано у прикладі 2, розділ 2.1.1.

Перехресна реактивність з ФНП α яванських макак або макак-резусів

У конкретних варіантах реалізації антитіло або функціональний фрагмент згідно з даним винаходом має істотну афінність до ФНП α тварин, таких як яванські макаки (*Macaca fascicularis*) та/або макаки-резуси (*Macaca mulatta*). Це є перевагою, оскільки доклінічні тести антитіл до ФНП α людини, такі як дослідження токсичності, переважно проводять з такими тваринами. Відповідно, антитіло або функціональний фрагмент згідно з даним винаходом переважно має перехресну реактивність з ФНП α тварин, таких як яванські макаки та/або макаки-резуси. Визначення афінності проводять, як описано у прикладі 2, розділ 2.1.1.

В одному з варіантів реалізації антитіло або функціональний фрагмент згідно з даним винаходом має перехресну реактивність з ФНП α *Macaca fascicularis*. Антитіло або функціональний фрагмент згідно з даним винаходом переважно має афінність до ФНП α *Macaca fascicularis*, яка менше ніж у 20 разів, зокрема менше ніж у 10 разів, ще більше конкретно менше ніж у 5 разів відрізняється від афінності до ФНП α людини. Зазвичай, антитіло або функціональний фрагмент згідно з даним винаходом зв'язується з ФНП α *Macaca fascicularis* з константою рівноваги дисоціації (K_D), де відношення R_{M.fascicularis} (i) K_D для зв'язування з ФНП α *Macaca fascicularis* до (ii) K_D для зв'язування з ФНП α людини становить менше 20.

$$R_{M.fascicularis} = \frac{K_D(M.fascicularis)}{K_D(людини)}$$

R_{M.fascicularis} переважно становить менше 20, зокрема менше 10, ще більше конкретно менше 5.

В іншому варіанті реалізації антитіло або функціональний фрагмент згідно з даним винаходом має перехресну реактивність з ФНП α *Macaca mulatta*. Антитіло або функціональний фрагмент згідно з даним винаходом переважно має афінність до ФНП α *Macaca mulatta*, яка менше ніж у 20 разів, більше конкретно менше ніж у 10 разів відрізняється від афінності до ФНП α людини. Зазвичай, антитіло або функціональний фрагмент згідно з даним винаходом зв'язується з ФНП α *Macaca mulatta* з константою рівноваги дисоціації (K_D), де відношення R_{M.mulatta} (i) K_D для зв'язування з ФНП α *Macaca mulatta* до (ii) K_D для зв'язування з ФНП α людини становить менше 20.

$$R_{M.mulatta} = \frac{K_D(M.mulatta)}{K_D(людини)}$$

R_{M.mulatta} переважно становить менше 20, зокрема менше 10.

В ще одному варіанті реалізації антитіло або функціональний фрагмент згідно з даним винаходом має перехресну реактивність з ФНП α *Mascaca fascicularis* і ФНП α *Mascaca mulatta*. Антитіло або функціональний фрагмент згідно з даним винаходом переважно має афінність до ФНП α *Mascaca fascicularis*, яка менше ніж у 20 разів, зокрема менше ніж у 10 разів, ще більше конкретно менше ніж у 5 разів відрізняється від афінності до ФНП α людини, і переважно має афінність до ФНП α *Mascaca mulatta*, яка менше ніж у 20 разів, більше конкретно менше ніж у 10 разів відрізняється від афінності до ФНП α людини. Відношення $R_{M.fascicularis}$ антитіла або функціонального фрагмента переважно становить менше 20, зокрема менше 10, ще більше конкретно менше 5, а відношення $R_{M.mulatta}$ антитіла або функціонального фрагмента переважно становить менше 20, зокрема менше 10.

Здатність придушувати індукований ФНП α апоптоз клітин L929

Антитіло або функціональний фрагмент згідно з даним винаходом має високу здатність придушувати індукований ФНП α апоптоз клітин L929. У конкретному варіанті реалізації антитіло або функціональний фрагмент згідно з даним винаходом має більше високу здатність придушувати індукований ФНП α апоптоз клітин L929 у порівнянні з відомим антитілом, що являє собою інфліксимаб.

Здатність відносно інфліксимабу може бути визначена в аналізі з L929, як описано у прикладі 2, розділ 2.1.2, даної заявки. Відносна здатність антитіла або функціонального фрагмента згідно з даним винаходом становить більше 1,5, переважно більше 2, більше переважно більше 3, більше переважно більше 5, більше переважно більше 7,5 або навіть більше 10, де відносна активність являє собою відношення (i) значення IC_{50} інфліксимабу в аналізі з L929 до (ii) значення IC_{50} антитіла або функціонального фрагмента згідно з даним винаходом в аналізі з L929 і де IC_{50} означає концентрацію відповідної молекули у нг/мл, що необхідна для досягнення 50 % максимального інгібування індукованого ФНП α апоптозу клітин L929.

В іншому варіанті реалізації відносна здатність антитіла або функціонального фрагмента згідно з даним винаходом становить більше 1,5, переважно більше 2, більше переважно більше 3, більше переважно більше 5, більше переважно більше 7,5 або навіть більше 10, де відносна здатність являє собою відношення (i) значення IC_{90} інфліксимабу в аналізі з L929 до (ii) значення IC_{90} антитіла або функціонального фрагмента згідно з даним винаходом в аналізі з L929 і де значення IC_{90} відноситься до концентрації відповідної молекули у нг/мл, що необхідна для досягнення 90 % максимального інгібування індукованого ФНП α апоптозу клітин L929.

Придушення індукованої ЛПС секреції цитокінів

Зазвичай, антитіло або функціональний фрагмент згідно з даним винаходом здатне/здатний придушувати індуковану ЛПС секрецію цитокінів моноцитами. Індукована ЛПС секреція цитокінів моноцитами може бути визначена, як описано у прикладі 7.

В одному з варіантів реалізації антитіло або функціональний фрагмент згідно з даним винаходом здатне/здатний придушувати індуковану ЛПС секрецію інтерлейкіну-1 β CD14⁺ моноцитами. Значення IC_{50} для придушення індукованої ЛПС секреції інтерлейкіну-1 β переважно становить менше 1 нМ і/або менше 100 пг/мл. Значення IC_{50} для придушення індукованої ЛПС секреції інтерлейкіну-1 β , що розраховане у вигляді молярної або масо-об'ємної концентрації, переважно є більше низьким, ніж значення IC_{50} адаліумабу.

В іншому варіанті реалізації антитіло або функціональний фрагмент згідно з даним винаходом здатне/здатний придушувати індуковану ЛПС секрецію ФНП α CD14⁺ моноцитами. Значення IC_{50} для придушення індукованої ЛПС секреції ФНП α переважно становить менше 1 нМ і/або менше 150 пг/мл. Значення IC_{50} для придушення індукованої ЛПС секреції ФНП α , що розраховане у вигляді молярної або масо-об'ємної концентрації, переважно є більше низьким, ніж значення IC_{50} адаліумабу.

Придушення клітинної проліферації

Антитіло або функціональний фрагмент згідно з даним винаходом, зазвичай, здатне/здатний придушувати клітинну проліферацію мононуклеарних клітин периферичної крові у реакції змішаної культури лімфоцитів. Придушення клітинної проліферації може бути визначено, як описано у прикладі 6. Індекс стимуляції антитіла або функціонального фрагмента, наприклад, scFv або діатіла згідно з даним винаходом, що визначений відповідно до прикладу 6, переважно становить менше 5, більше переважно менше 4,5. У конкретних варіантах реалізації індекс стимуляції антитіла, наприклад, IgG згідно з даним винаходом, становить менше 4 або навіть менше 3.

Придушення взаємодії ФНП α з рецептором ФНП

Зазвичай, антитіло або функціональний фрагмент згідно з даним винаходом здатне/здатний придушувати взаємодію ФНП α людини з рецептором ФНП I (TNFRI). Придушення взаємодії

ФНП α людини з TNFR I може бути визначено за допомогою інгібіторного ELISA, як описано нижче у прикладі 2, розділ 2.1.3.

Здатність антитіла або функціонального фрагмента згідно з даним винаходом придушувати взаємодію ФНП α людини з TNFR I відносно інфліксимабу (відносна здатність) при визначенні за допомогою інгібіторного ELISA переважно становить щонайменше 2, де зазначена відносна здатність являє собою відношення значення IC $_{50}$ у нг/мл інфліксимабу до значення IC $_{50}$ у нг/мл антитіла або його функціонального фрагмента.

Зазвичай, антитіло або функціональний фрагмент згідно з даним винаходом здатне/здатний придушувати взаємодію ФНП α людини з рецептором ФНП II (TNFR II). Придушення взаємодії ФНП α людини з TNFR II може бути визначено за допомогою інгібіторного ELISA, як описано нижче у прикладі 2, розділ 2.1.3.

Здатність антитіла або функціонального фрагмента згідно з даним винаходом придушувати взаємодію ФНП α людини з TNFR II відносно інфліксимабу (відносна здатність) при визначенні за допомогою інгібіторного ELISA переважно становить щонайменше 2, більше переважно щонайменше 3, де зазначена відносна здатність являє собою відношення значення IC $_{50}$ у нг/мл інфліксимабу до значення IC $_{50}$ у нг/мл антитіла або його функціонального фрагмента.

Стехіометрія та перехресне зв'язування

Антитіло або функціональний фрагмент згідно з даним винаходом, зазвичай, здатне/здатний зв'язуватися з ФНП $\alpha_{\text{Тример}}$ людини у стехіометричному відношенні (антитіло: ФНП $\alpha_{\text{Тример}}$), що становить щонайменше 2. Стехіометричне відношення (антитіло: ФНП $\alpha_{\text{Тример}}$) переважно становить більше 2, або щонайменше 2,5, або щонайменше 3. В одному з варіантів реалізації стехіометричне відношення (антитіло: ФНП $\alpha_{\text{Тример}}$) становить приблизно 3. Стехіометричне відношення (антитіло: ФНП $\alpha_{\text{Тример}}$) може бути визначено, як описано у прикладі 4 нижче.

В іншому варіанті реалізації антитіло або функціональний фрагмент згідно з даним винаходом здатне/здатний утворювати комплекс з ФНП α людини, де зазначений комплекс містить щонайменше дві молекули ФНП α і щонайменше три молекули антитіла або функціонального фрагмента. Функціональний фрагмент згідно з цим варіантом реалізації містить щонайменше два окремих сайти зв'язування для ФНП α , таких як, наприклад, діатіла. Утворення комплексу може бути визначено, як описано у прикладі 5 нижче.

В одному з варіантів реалізації антитіло являє собою IgG і здатне утворювати з ФНП α комплекс з молекулярною масою щонайменше 600 кДа. В іншому варіанті реалізації функціональний фрагмент являє собою діатіло та здатний утворювати з ФНП α комплекс з молекулярною масою щонайменше 300 кДа.

Селективність відносно мішені

У деяких варіантах реалізації антитіло або функціональний фрагмент згідно з даним винаходом має високу селективність відносно мішені, тобто може розрізняти ФНП α і ФНП β . Переважно значення IC $_{50}$ для ФНП β щонайменше у 1000 разів перевищує значення IC $_{50}$ для ФНП α при визначенні за допомогою конкурентного ELISA, як описано у прикладі 2, розділ 2.1.4. Більше переважно значення IC $_{50}$ для ФНП β щонайменше у 5000 разів, найбільше переважно щонайменше у 10000 разів перевищує значення IC $_{50}$ для ФНП α при визначенні за допомогою конкурентного ELISA, як описано у прикладі 2, розділ 2.1.4.

Вихід продукту експресії та вихід продукту рефолдингу

В інших варіантах реалізації антитіло або функціональний фрагмент згідно з даним винаходом, переважно scFv або діатіло, можуть бути рекомбінантно експресовані з високими виходами у мікроорганізмах, таких як бактерії, або в інших клітинах. Переважно вихід продукту експресії в *E. coli*, що визначений, як описано у прикладі 2, становить щонайменше 0,25 г/л. Зокрема, це може бути застосовано до функціональних фрагментів, таких як scFv.

Вихід продукту рефолдингу, що визначений, як описано у прикладі 2, становить щонайменше 5 мг/л, більше переважно щонайменше 10 мг/л, більше переважно щонайменше 15 мг/л, і найбільше переважно щонайменше 20 мг/л. Зокрема, це застосовно до функціональних фрагментів, таких як scFv.

Стабільність

Зазвичай, антитіло або функціональний фрагмент згідно з даним винаходом, переважно scFv або діатіло, має високу стабільність. Стабільність може бути оцінена за допомогою різних методик. "Температура плавлення" T $_{\text{пл}}$ варіабельного домену антитіла або функціонального фрагмента згідно з даним винаходом, що визначена за допомогою диференціальної скануючої флуориметрії (DSF), як описано у прикладі 2, розділ 2.2.4, переважно становить щонайменше 65 °C, більше переважно щонайменше 68 °C, найбільше переважно щонайменше 70 °C. "Температура плавлення варіабельного домену" у контексті даного опису відноситься до температури плавлення scFv, що складається з послідовності V $_{\text{L}}$ - Лінкер A-V $_{\text{H}}$, де

амінокислотна послідовність лінкера А складається з амінокислотної послідовності, що представлена у SEQ ID NO:49. Наприклад, температура плавлення варіабельного домену IgG визначена як температура плавлення scFv, що відповідає йому, як визначено вище.

Втрата вмісту мономера (при концентрації 10 г/л; вихідний вміст мономера > 95 %) після зберігання протягом чотирьох тижнів при 4 °С, що визначена за допомогою аналітичної ексклюзійної хроматографії, як описано у прикладі 2, розділ 2.2.5, переважно становить менше 5 %, більше переважно менше 3 %, більше переважно менше 1 %, найбільше переважно менше 0,5 %. Втрата вмісту мономера (при концентрації 10 г/л; вихідний вміст мономера > 95 %) після зберігання протягом чотирьох тижнів при -20 °С, що визначена за допомогою аналітичної ексклюзійної хроматографії, як описано у прикладі 2, розділ 2.2.5, переважно становить менше 5 %, більше переважно менше 3 %, більше переважно менше 1 %, найбільше переважно менше 0,5 %. Втрата вмісту мономера (при концентрації 10 г/л; вихідний вміст мономера > 95 %) після зберігання протягом чотирьох тижнів при -65 °С, що визначена за допомогою аналітичної ексклюзійної хроматографії, як описано у прикладі 2, розділ 2.2.5, переважно становить менше 5 %, більше переважно менше 3 %, більше переважно менше 1 %, найбільше переважно менше 0,5 %.

Втрата мономера після п'яти послідовних циклів заморожування-відтаювання, що визначена, як описано у прикладі 2, становить менше 5 %, більше переважно менше 1 %, більше переважно менше 0,5 %, найбільше переважно менше 0,2 %, наприклад, 0,1 % або 0,0 %.

Антитіла та функціональні фрагменти

Конкретні варіанти реалізації даного винаходу відносяться до функціональних фрагментів антитіл, що описані в даному описі. Функціональні фрагменти включають, але не обмежуються ними, F(ab')₂-фрагмент, Fab-фрагмент, scFv, діатіла, тріотіла та тетратіла. Переважно функціональний фрагмент являє собою однокланове антитіло (scFv) або діатіло. Більше переважно послідовності scFv або діатіла, що не є CDR, являють собою послідовності людини.

Переважно для мінімізації потенціалу імуногенності у людей вибраний акцепторний каркас складається з каркасних ділянок, що одержані з консенсусних послідовностей людини або послідовностей зародкової лінії людини. Зокрема, каркасні ділянки I-III варіабельного домену легкого ланцюга складаються з консенсусних послідовностей Vk1 людини, що відповідають SEQ ID NOs: 56-58, і каркасної ділянки IV послідовності λ зародкової лінії, що вибрана з SEQ ID NOs: 59-62. Оскільки залишки, які не є залишками консенсусної послідовності людини або послідовності зародкової лінії людини, можуть викликати імунні реакції, кількість таких залишків у кожному варіабельному домені (VH або VL) повинна бути якомога низькою, переважно менше 7, більше переважно менше 4, найбільше переважно 0.

Переважно антитіло являє собою моноклональне антитіло. Термін "моноклональне антитіло" у контексті даного опису не обмежений антитілами, що одержані за допомогою гібридомної технології. Термін "моноклональне антитіло" відноситься до антитіла, яке одержують з одного клону, включаючи будь-який еукаріотичний, прокаріотичний або фаговий клон, а не до способу, яким його одержують. Моноклональні антитіла можуть бути одержані із застосуванням широкого спектра методик, що відомі у даній галузі техніки, включаючи застосування гібридомної, рекомбінантної технологій та технології фагового дисплея або їх комбінації. (Harlow and Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual" CSH Press 1988, Cold Spring Harbor N.Y.).

В інших варіантах реалізації, включаючи варіанти реалізації, що відносяться до застосування антитіл до ФНП α in vivo у людей, можуть бути застосовані химерні, приматизовані, гуманізовані антитіла або антитіла людини. У переважному варіанті реалізації антитіло являє собою антитіло людини або гуманізоване антитіло, більше переважно моноклональне антитіло людини або моноклональне гуманізоване антитіло.

Термін "химерне" антитіло у контексті даного опису відноситься до антитіла, що містить варіабельні послідовності, які одержані з імуноглобуліну, що не є імуноглобуліном людини, такого як антитіло пацюка або миші, і константні ділянки імуноглобулінів людини, що, зазвичай, вибрані з матриці імуноглобуліну людини. Способи одержання химерних антитіл відомі у даній галузі техніки. Див., наприклад, Morrison, 1985, Science 229 (4719): 1202-7; Oi et al, 1986, BioTechniques 4: 214-221; Gillies et al., 1985, J. Immunol. Methods 125: 191-202; патенти США №№ 5807715; 4816567 і 4816397, які повністю включені в даний опис за допомогою посилання.

Середньому фахівцю у даній галузі техніки доступні різні рекомбінантні методики для того, щоб зробити антитіло, яке не є антитілом людини (наприклад, антитіло миші), більше подібним антитілу людини шляхом одержання імуноглобулінів, ланцюгів імуноглобулінів або їх фрагментів (таких як Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ або інші підпослідовності антитіл, що зв'язуються з

мішенню), які містять мінімальні послідовності, що одержані з такого імуноглобуліну, який не є імуноглобуліном людини. У цілому, одержане рекомбінантне антитіло буде містити по суті всі з щонайменше одного, а, зазвичай, двох, варіабельних доменів, в яких всі або по суті всі ділянки CDR відповідають ділянкам CDR імуноглобуліну, який не є імуноглобуліном людини, а всі або по суті всі ділянки FR являють собою ділянки FR послідовності імуноглобуліну людини, зокрема консенсусної послідовності імуноглобуліну людини. CDR-щеплені антитіла являють собою молекули антитіл, які мають одну або більше ділянок (CDR) антитіла, що визначають комплементарність, яке спочатку одержане від видів, що не є людиною, які зв'язуються з бажаним антигеном, і каркасні (FR) ділянки молекули імуноглобуліну людини (EP239400; публікація PCT WO 91/09967; патенти США №№ 5225539; 5530101 і 5585089). Часто у процесі, що зветься "гуманізацією", каркасні залишки у каркасних ділянках, які одержані з імуноглобуліну людини, будуть додатково заміщені відповідним залишком антитіла - донора CDR для змінення, переважно поліпшення зв'язування антигена. Ці каркасні заміни ідентифікують способами, що добре відомі у даній галузі техніки, наприклад, шляхом моделювання взаємодій CDR і каркасних залишків для ідентифікації каркасних залишків, важливих для зв'язування з антигеном, і порівняння послідовностей для ідентифікації незвичайних каркасних залишків у конкретних положеннях. Див., наприклад, Riechmann et al., 1988, Nature 332: 323-7 і Queen et al, патенти США №№ 5530101; 5585089; 5693761; 5693762 і 6180370 (кожне із зазначених джерел повністю включено за допомогою посилання). Антитіла можуть бути зроблені більше подібними антитілу людини із застосуванням множини додаткових методик, що відомі у даній галузі техніки, включаючи, наприклад, рекомбінацію поверхневих залишків або змінення поверхні (EP592106; EP519596; Padlan, 1991, Mol. Immunol, 28: 489-498; Studnicka et al, 1994, Prot. Eng. 7: 805-814; Roguska et al, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 969-973, і перестановку ланцюгів (патент США № 5565332), усі зазначені джерела повністю включені в даний опис за допомогою посилання. CDR-щеплене або гуманізоване антитіло також може містити щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну (Fc), зазвичай, константної ділянки вибраної матриці імуноглобуліну людини.

У деяких варіантах реалізації гуманізовані антитіла одержують, як описано у джерелі Queen et al, патентах США №№ 5530101; 5585089; 5693761; 5693762 і 6180370 (кожне із зазначених джерел повністю включено за допомогою посилання).

У деяких варіантах реалізації антитіла до ФНП α являють собою антитіла людини. Повністю "людські" антитіла до ФНП α можуть бути бажані для терапевтичного лікування пацієнтів, що є людьми. У контексті даного опису "антитіла людини" включають антитіла, що мають амінокислотну послідовність імуноглобуліну людини, і включають антитіла, що виділені з бібліотек імуноглобулінів людини або від тварин, що трансгенні за одним або більше імуноглобулінів людини та не експресують ендогенні імуноглобуліни. Антитіла людини можуть бути одержані різними способами, що відомі у даній галузі техніки, включаючи методи фагового дисплея, що описані вище, з використанням бібліотек антитіл, що одержані з послідовностей імуноглобулінів людини. Див. патенти США №№ 4444887 і 4716111 і публікації PCT WO 98/46645; WO 98/50433; WO 98/24893; WO 98/16654; WO 96/34096; WO 96/33735 і WO 91/10741, кожна з яких повністю включена в даний опис за допомогою посилання. Антитіла людини також можуть бути одержані з використанням трансгенних мишей, які не здатні експресувати функціональні ендогенні імуноглобуліни, але можуть експресувати гени імуноглобулінів людини. Див., наприклад, публікації PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; патенти США №№ 5413923; 5625126; 5633425; 5569825; 5661016; 5545806; 5814318; 5885793; 5916771 і 5939598, які повністю включені в даний опис за допомогою посилання. Повністю людські антитіла, які розпізнають вибраний епітоп, одержані з використанням методики, що зветься "керованим відбором". У цьому підході вибране моноклональне антитіло, що не є антитілом людини, наприклад, антитіло миші, використовують для керування відбором повністю людського антитіла, що розпізнає той самий епітоп (Jespersen et al, 1988, Biotechnology 12: 899-903).

У деяких варіантах реалізації антитіла до ФНП α являють собою приматизовані антитіла. Термін "приматизоване антитіло" відноситься до антитіла, що містить варіабельні ділянки антитіла мавпи та константні ділянки антитіла людини. Способи одержання приматизованих антитіл відомі у даній галузі техніки. Див., наприклад, патенти США №№ 5658570; 5681722 і 5693780, які повністю включені в даний опис за допомогою посилання.

У деяких варіантах реалізації антитіла до ФНП α являють собою дериватизовані антитіла. Наприклад, але не як обмеження, дериватизовані антитіла, які були модифіковані, наприклад, шляхом глікозилювання, ацетилювання, пегілювання, фосфорилювання, амідуювання, дериватизації відомими захисними/блокуючими групами, протеолітичного розщеплення,

зв'язування з клітинним лігандом або іншим білком (див. нижче опис кон'югатів антитіл) і т. п. Будь-яка з численних хімічних модифікацій може бути здійснена відомими способами, включаючи, але не обмежуючись ними, специфічне хімічне розщеплення, ацетилювання, формілювання, метаболічний синтез тунікаміцину та т. п. Крім того, похідна може містити одну або більше неканонічних амінокислот.

В інших аспектах антитіло до ФНПа містить одну або більше амінокислот, що введені в одну або більше з його гіперваріабельних ділянок, наприклад, як описано в US 2007/0280931.

Кон'югати антитіл

У деяких варіантах реалізації антитіла до ФНПа являють собою кон'югати антитіл, які модифіковані, наприклад, шляхом ковалентного приєднання молекули будь-якого типу до антитіла таким чином, що ковалентне приєднання не перешкоджає зв'язуванню з ФНПа. Методи кон'югування ефекторних фрагментів з антитілами добре відомі у даній галузі техніки (див., наприклад, Hellstrom et al., *Controlled Drug Delivery*, 2nd Ed., At pp. 623-53 (Robinson et al., Eds., 1987)); Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.* 62: 119-58, і Dubowchik et al., 1999, *Pharmacology and Therapeutics* 83: 67-123).

В одному з прикладів антитіло або його фрагмент піддають злиттю за допомогою ковалентного зв'язку (наприклад, а пептидного зв'язку), з N-кінця або C-кінця, з амінокислотою послідовністю іншого білка (або його частини, що переважно містить щонайменше 10, 20 або 50 амінокислот частини білка). Переважно антитіло або його фрагмент зв'язаний з іншим білком з N-кінця константного домену антитіла. Для здійснення такого злиття можуть бути застосовані технології рекомбінантної ДНК, наприклад, як описано у WO 86/01533 й EP0392745. В іншому прикладі ефекторна молекула може збільшувати період напівжиття *in vivo*. Приклади підходящих ефекторних молекул такого типу включають полімери, альбумін, альбумінзв'язуючі білки або сполуки, що зв'язують альбумін, такі як описані у WO 2005/117984.

У деяких варіантах реалізації антитіла до ФНПа можуть бути приєднані до фрагментів полі(етилєнглїколю) (ПЕГ). Наприклад, якщо антитіло являє собою фрагмент антитіла, фрагменти ПЕГ можуть бути приєднані через будь-який доступний бічний ланцюг амінокислоти або функціональну групу кінцевої амінокислоти, що розташована у фрагменті антитіла, наприклад, будь-яку вільну аміно, іміно, тіольну, гідроксильну або карбоксильну групу. Такі амінокислоти можуть знаходитися у фрагменті антитіла природним чином або можуть бути вбудовані у фрагмент методами генної інженерії з використанням методів рекомбінантної ДНК. Див., наприклад, патент США № 5219996. Для приєднання двох або більше молекул ПЕГ можуть бути використані декілька сайтів. Переважно фрагменти ПЕГ ковалентно зв'язані через тіольну групу щонайменше одного залишку цистеїну, що розташований у фрагменті антитіла. У випадку, якщо як місце приєднання використовують тіольну групу, можуть бути використані підходящим чином активовані ефекторні фрагменти, наприклад, похідні, що селективні відносно тіолів, такі як малеїміди та похідні цистеїну.

В іншому прикладі кон'югат антитіла до ФНПа являє собою модифікований Fab'-фрагмент, який є пегільованим, тобто містить ковалентно приєднаний до нього ПЕГ (полі(етилєнглїколь)), наприклад, згідно зі способом, що розкритий в EP0948544. Див. також *Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications*, (J. Milton Harris (ed.), Plenum Press, New York, 1992); *Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications*, (J. Milton Harris and S. Zalipsky, eds., American Chemical Society, Washington D. C, 1997); і *Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences*, (M. Aslam and A. Dent, eds., Grove Publishers, New York, 1998), а також Chapman, 2002 *Advanced Drug Delivery Reviews* 54: 531-545.

Фармацевтичні композиції та лікування

Лікування захворювання охоплює лікування пацієнтів, які вже мають згідно з діагнозом будь-яку форму захворювання на будь-якій клінічній стадії або у будь-яких проявах; затримку початку або розвитку, або посилення, або погіршення симптомів або ознак захворювання, і/або запобігання та/або зниження тяжкості захворювання.

"Суб'єкт" або "пацієнт", якому вводять антитіло до ФНПа або його функціональний фрагмент, може являти собою ссавця, такого як ссавець, що не є приматом (наприклад, корова, свиня, кінь, кішка, собака, пацюк і т. п.), або примата (наприклад, мавпу або людину). У деяких аспектах людина являє собою пацієнта дитячого віку. У деяких аспектах людина являє собою дорослого пацієнта.

Композиції, що містять антитіло до ФНПа і, необов'язково, один або більше додаткових терапевтичних агентів, таких як другі терапевтичні агенти, що описані нижче, описані в даному описі. Зазначені композиції, зазвичай, поставляються як частина стерильної фармацевтичної композиції, яка містить фармацевтично прийнятний носій. Ця композиція може знаходитися у будь-якій підходящій формі (в залежності від бажаного способу її введення пацієнту).

Антитіла до ФНП α і функціональні фрагменти можуть бути введені пацієнту різними шляхами, як то перорально, трансдермально, підшкірно, інтраназально, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, інтратекально, місцево або локально. Найбільше підходящий шлях введення у будь-якому конкретному випадку буде залежати від конкретного антитіла, суб'єкта, характеру та тяжкості захворювання та фізичного стану суб'єкта. Зазвичай, антитіло до ФНП α або його функціональний фрагмент вводять внутрішньовенно.

В особливо переважному варіанті реалізації антитіло або функціональний фрагмент згідно з даним винаходом вводять перорально. Якщо введення здійснюють пероральним шляхом, функціональний фрагмент переважно являє собою одноланцюгове антитіло (scFv), діатіло або IgG.

У типових варіантах реалізації антитіло до ФНП α або функціональний фрагмент присутній у фармацевтичній композиції в концентрації, що є достатньою для забезпечення внутрішньовенного введення в кількості від 0,5 мг/кг маси тіла до 20 мг/кг маси тіла. У деяких варіантах реалізації концентрація антитіла або фрагмента, що підходить для застосування в композиціях і способах, що описані в даному описі, включає, але не обмежується ними, 0,5 мг/кг, 0,75 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 2,5 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг, 10 мг/кг, 11 мг/кг, 12 мг/кг, 13 мг/кг, 14 мг/кг, 15 мг/кг, 16 мг/кг, 17 мг/кг, 18 мг/кг, 19 мг/кг, 20 мг/кг або концентрацію в діапазоні між будь-якими з вищезазначених значень, наприклад, від 1 мг/кг до 10 мг/кг, від 5 мг/кг до 15 мг/кг або від 10 мг/кг до 18 мг/кг.

Ефективна доза антитіла до ФНП α або функціонального фрагмента може становити від приблизно 0,001 до приблизно 750 мг/кг на одне (наприклад, болюсне) введення, множину введень або безперервне введення, або кількість, яка необхідна для досягнення концентрації у сироватці, що становить 0,01-5000 мкг/мл за одне (наприклад, болюсне) введення, множину введень або безперервне введення, або будь-який ефективний діапазон або значення всередині нього в залежності від стану, що підлягає лікуванню, шляху введення та віку, маси і стану суб'єкта. У деяких варіантах реалізації кожна доза може знаходитися в діапазоні від приблизно 0,5 мг до приблизно 50 мг на кілограм маси тіла або від приблизно 3 мг до приблизно 30 мг на кілограм маси тіла. Антитіло може бути приготовлено у вигляді водного розчину.

Фармацевтичні композиції з метою зручності можуть бути представлені в одиничних дозованих формах, що містять заздалегідь визначену кількість антитіла до ФНП α або функціонального фрагмента на дозу. Така одиниця може містити, наприклад, від 0,5 мг до 5 г, наприклад, але без обмеження, 1 мг, 10 мг, 20 мг, 30 мг, 40 мг, 50 мг, 100 мг, 200 мг, 300 мг, 400 мг, 500 мг, 750 мг, 1000 мг або будь-який діапазон між будь-якими двома з вищеперерахованих значень, наприклад, від 10 мг до 1000 мг, від 20 мг до 50 мг або від 30 мг до 300 мг. Фармацевтично прийнятні носії можуть приймати найрізноманітніші форми в залежності, наприклад, від стану, що підлягає лікуванню, або шляху введення.

Визначення ефективної дози, загальної кількості доз і тривалості лікування із застосуванням антитіла до ФНП α або його функціонального фрагмента знаходиться в межах можливостей фахівців у даній галузі техніки та може бути виконане за допомогою стандартного дослідження з підвищенням дози.

Терапевтичні склади антитіл до ФНП α і функціональних фрагментів, які підходять для способів, що описані в даному описі, можуть бути приготовлені для зберігання у вигляді ліофілізованих складів або водних розчинів шляхом змішування антитіла, що має бажаний ступінь чистоти, з необов'язковими фармацевтично прийнятними носіями, допоміжними речовинами або стабілізаторами, що зазвичай використовуються у даній галузі техніки (всі з яких згадуються в даному описі як "носії"), тобто буферними агентами, стабілізуючими агентами, консервантами, ізотонізуючими речовинами, неіонними детергентами, антиоксидантами й іншими різними добавками. Див. Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition (Osol, ed. 1980). Такі добавки повинні бути нетоксичними для реципієнтів у використовуваних дозах і концентраціях.

Буферні агенти забезпечують підтримку рН в діапазоні, що наближений до фізіологічних умов. Вони можуть бути присутніми в концентрації від приблизно 2 мМ до приблизно 50 мМ. Підходящі буферні агенти включають як органічні, так і неорганічні кислоти та їх солі, такі як цитратні буфери (наприклад, суміш однозаміщеного цитрату натрію та двозаміщеного цитрату натрію, суміш лимонної кислоти і тризаміщеного цитрату натрію, суміш лимонної кислоти й однозаміщеного цитрату натрію та т. п.), сукцинатні буфери (наприклад, суміш бурштинової кислоти й однозаміщеного сукцинату натрію, суміш бурштинової кислоти і гідроксиду натрію, суміш бурштинової кислоти і двозаміщеного сукцинату натрію та т.п.), тартратні буфери (наприклад, суміш винної кислоти і тартрату натрію, суміш винної кислоти і тартрату калію, суміш винної кислоти і гідроксиду натрію та т.п.), фумаратні буфери (наприклад, суміш

фумарової кислоти й однозаміщеного фумарату натрію, суміш фумарової кислоти і двозаміщеного фумарату натрію, суміш однозаміщеного фумарату натрію та двозаміщеного фумарату натрію та т.п.), глюконатні буфери (наприклад, суміш глюконової кислоти і глюконату натрію, суміш глюконової кислоти і гідроксиду натрію, суміш глюконової кислоти і глюконату калію та т.п.), оксалатний буфер (наприклад, суміш щавлевої кислоти й оксалату натрію, суміш щавлевої кислоти і гідроксиду натрію, суміш щавлевої кислоти й оксалату калію та т.п.), лактатні буфери (наприклад, суміш молочної кислоти і лактату натрію, суміш молочної кислоти і гідроксиду натрію, суміш молочної кислоти і лактату калію та т.п.) й ацетатні буфери (наприклад, суміш оцтової кислоти й ацетату натрію, суміш оцтової кислоти і гідроксиду натрію та т.п.). Додатково можуть бути використані фосфатні буфери, гістидинові буфери та солі триметиламіну, такі як Тріс.

Консерванти можуть бути додані для уповільнення зростання мікроорганізмів і можуть бути додані в кількостях від 0,2 % до 1 % (мас./об.). Підходящі консерванти включають фенол, бензиловий спирт, метакрезол, метилпарабен, пропілпарабен, октадецилдиметилбензиламонію хлорид, галогеніди бензалконію (наприклад, хлорид, бромід і йодид), гексаметонію хлорид й алкілпарабени, такі як метил- або пропілпарабен, катехін, резорцин, циклогексанол і 3-пентанол. Ізотонізуючі речовини, що іноді звуться "стабілізаторами", можуть бути додані для забезпечення ізотонічності рідких композицій та включають багатоатомні цукрові спирти, переважно трьох- або більше атомні або цукрові спирти, такі як гліцерин, еритритол, арабітол, ксилітол, сорбітол і манітол. Стабілізатори відносяться до широкої категорії допоміжних речовин, які можуть виконувати різні функції від наповнювача до добавки, яка солюбілізує терапевтичний агент або забезпечує запобігання денатурації або прилипання до стінки контейнера. Типові стабілізатори можуть являти собою багатоатомні цукрові спирти (що перераховані вище); амінокислоти, такі як аргінін, лізин, гліцин, глутамін, аспарагін, гістидин, аланін, орнітин, L-лейцин, 2-фенілаланін, глутамінова кислота, треонін і т.п., органічні цукри або цукрові спирти, такі як лактоза, трегалоза, стахіоза, манітол, сорбітол, ксилітол, рибітол, міоїнозитол, галактитол, гліцерин тощо, включаючи циклічні поліспирти, такі як інозитол; поліетиленгліколь; полімери амінокислот; сірковмісні відновники, такі як сечовина, глутатіон, тіоктова кислота, тіогліколят натрію, тіогліцерин, α -монотіогліцерин і тіосульфат натрію; низькомолекулярні поліпептиди (наприклад, пептиди, що складаються з 10 залишків або менше); білки, такі як людський сироватковий альбумін, бичачий сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полівінілпіролідон, моносахариди, такі як ксилоза, маноза, фруктоза, глюкоза; дисахариди, такі як лактоза, мальтоза, сахароза, і трисахариди, такі як рафіноза; і полісахариди, такі як декстран. Стабілізатори можуть бути присутніми в діапазоні від 0,1 до 10000 масових частин на масову частину активного білка.

Неіонні поверхнево-активні речовини або детергенти (також відомі як "змочуючі агенти") можуть бути додані для полегшення солюбілізації терапевтичного агента, а також для захисту терапевтичного білка від агрегації, яка викликана збовтуванням, що також дозволяє складу піддаватися напрузі зсуву поверхні без денатурації білка. Підходящі неіонні поверхнево-активні речовини включають полісорбати (20, 80 і т.д.), поліоксамери (184, 188 і т.д.), плуронілові поліолі, моноефіри поліоксіетиленсорбітану (TWEEN®-20, TWEEN®-80 і т.д.). Неіонні поверхнево-активні речовини можуть бути присутніми в діапазоні від приблизно 0,05 мг/мл до приблизно 1,0 мг/мл або в діапазоні від приблизно 0,07 мг/мл до приблизно 0,2 мг/мл.

Додаткові різні допоміжні речовини включають агенти-наповнювачі (наприклад, крохмаль), хелатуючі агенти (наприклад, ЕДТА), антиоксиданти (наприклад, аскорбінову кислоту, метіонін, вітамін Е), інгібітори протеаз і співрозчинники.

Склад згідно з даним описом також може містити другий терапевтичний агент на додаток до антитіла до ФНП α або його функціонального фрагмента. Приклади підходящих других терапевтичних агентів наведені нижче.

Графік введення може варіювати від одного разу на місяць до щоденного введення в залежності від ряду клінічних факторів, включаючи тип захворювання, тяжкість захворювання та чутливість пацієнта до антитіла до ФНП α або функціонального фрагмента. У конкретних варіантах реалізації, антитіло до ФНП α або його функціональний фрагмент вводять щодня, два рази на тиждень, три рази на тиждень, через день, кожні 5 днів, кожні 10 днів, кожні два тижні, кожні три тижні, кожні чотири тижні або один раз на місяць або у будь-якому діапазоні між будь-якими двома з перерахованих вище значень, наприклад, від одного разу на чотири дні до одного разу на місяць, від одного разу на 10 днів до одного разу на два тижні або від двох до трьох разів на тиждень та т.п.

Доза антитіла до ФНП α або функціонального фрагмента, яка підлягає введенню, буде варіювати в залежності від конкретного антитіла, суб'єкта та характеру, і тяжкості

захворювання, фізичного стану суб'єкта, схеми лікування (наприклад, чи буде застосований другий терапевтичний агент) і вибраного шляху введення; підходяща доза може бути легко визначена фахівцем у даній галузі техніки.

Фахівцю у даній галузі техніки буде зрозуміло, що оптимальна кількість та проміжок часу між окремими введеннями антитіла до ФНП α або його функціонального фрагмента будуть визначатися характером і ступенем стану, що підлягає лікуванню, формою, шляхом і місцем введення, а також віком і станом конкретного суб'єкта, що підлягає лікуванню, і що у кінцевому підсумку підходящі для застосування дози будуть визначені лікарем. Введення може повторюватися так часто, як це необхідно. При розвитку побічних явищ кількість та/або частота введень можуть бути змінені або зменшені відповідно до звичайної клінічної практики.

Захворювання, що підлягають лікуванню

Даний винахід відноситься до способу лікування або запобігання захворювання, що пов'язане з ФНП α людини, у суб'єкта, який включає введення суб'єкту антитіла або функціонального фрагмента, як визначено в даному описі. Термін "розлад, що пов'язаний з ФНП α " або "захворювання, що пов'язане з ФНП α " відноситься до будь-якого розладу, початку, прогресування або збереження симптомів або патологічних станів, для яких необхідна участь ФНП α . Ілюстративні розлади, що пов'язані з ФНП α , включають, але не обмежуються ними, хронічні й/або аутоімунні запальні стани у цілому, імуноопосередковані запальні розлади у цілому, запальне захворювання ЦНС, запальні захворювання, що вражають око, суглоб, шкіру, слизові оболонки, центральну нервову систему, шлунково-кишковий тракт, сечовивідні шляхи або легені, стан увеїту у цілому, ретиніт, HLA-B27+ увеїт, хворобу Бехчета (Behçet), синдром сухого ока, глаукому, синдром Шегрена (Sjögren), цукровий діабет (включаючи діабетичну нейропатію), резистентність до інсуліну, стани артриту у цілому, ревматоїдний артрит, остеоартрит, реактивний артрит і синдром Рейтера (Reiter), ювенільний артрит, анкілозуючий спондилоартрит, розсіяний склероз, синдром Гієна-Барре (Guillain-Barré), міастенію гравіс, бічний аміотрофічний склероз, саркоїдоз, гломерулонефрит, хронічну хворобу нирок, цистит, псоріаз (включаючи псоріатичний артрит), гнійний гідраденіт, панікуліт, гангренозну піддермію, синдром SAPHO (синовіт, акне, пустульоз, гіперостоз й остит), акне, синдром Світа (Sweet), пухирницю, хворобу Крона (включаючи позакишкові прояви), виразковий коліт, бронхіальну астму, гіперчутливий пневмоніт, загальні алергічні реакції, алергічний риніт, алергічний синусит, хронічну обструктивну хворобу легенів (ХОХЛ), фіброз легенів, гранулематоз Вегенера (Wegener), синдром Кавасакі (Kawasaki), гігантоклітинний артеріїт, васкуліт Черджа-Стросса (Churg-Strauss), вузликовий поліартеріїт, опіки, хворобу "трансплантат проти хазяїна", реакції "трансплантат проти хазяїна", епізоди відторгнення після трансплантації органів або кісткового мозку, системні та локальні стани васкуліту у цілому, системний та шкірний червоний вовчак, поліміозит і дерматоміозит, склеродермію, прееклампсію, гострий та хронічний панкреатит, вірусний гепатит, алкогольний гепатит, післяопераційне запалення, таке як після офтальмологічної операції (наприклад, операції при катаракті (заміна кришталика) або глаукомі), операції на суглобі (включаючи артроскопічну операцію), операції на структурах, що пов'язані з суглобом, (наприклад, зв'язках), щелепно-лицьової та/або стоматологічної операції, мінімально інвазивних серцево-судинних втручань (наприклад, ЧТКА, атеректомії, встановлювання стента), лапароскопічних й/або ендоскопічних інтраабдомінальних і гінекологічних втручань, ендоскопічних урологічних втручань (наприклад, операції на передміхуровій залозі, уретроскопії, цистоскопії, інтерстиціального циститу), або періопераційне запалення (запобігання) у цілому, бульозний дерматит, нейтрофільний дерматит, токсичний епідермальний некроліз, пустульозний дерматит, церебральну малярію, гемолітичний уремичний синдром, відторгнення алотрансплантату, отит середнього вуха, укуси змії, вузлувату еритему, мієлодиспластичні синдроми, первинний склерозуючий холангіт, серонегативну спондилоартропатію, аутоімунну гемолітичну анемію, гранулематоз в ротолицьовій області, вегетуючий гнійний стоматит, афтозний стоматит, десквамативний глосит (geographic tongue), мігруючий стоматит, хворобу Альцгеймера, хворобу Паркінсона, хворобу Хантінгтона, параліч Белла, хворобу Крейтцфельда-Якоба (Creutzfeldt-Jakob) та нейродегенеративні стани у цілому.

Пов'язаний з раком остеоліз, пов'язане з раком запалення, пов'язана з раком біль, пов'язана з раком кахексія, метастази у кістках, гострі та хронічні форми болю, незалежно від того, чи спричинені вони центральними або периферичними ефектами ФНП α і чи класифіковані вони як запальні, ноцицептивні або нейропатичні форми болю, ішіаз, біль у попереку, тунельний зап'ястковий синдром, комплексний регіонарний больовий синдром (КРБС), подагра, постгерпетична невралгія, фіброміалгія, місцеві больові стани, хронічні больові синдроми внаслідок метастатичної пухлини, дисменорея.

Конкретні розлади, що підлягають лікуванню, включають стани артриту у цілому,

ревматоїдний артрит, остеоартрит, реактивний артрит, ювенільний артрит; псоріаз, включаючи псоріатичний артрит; запальне захворювання кишечника, включаючи хворобу Крона, виразковий коліт, включаючи проктит, сигмоїдит, лівобічний коліт, поширений коліт і панколіт, невизначений коліт, мікроскопічний коліт, включаючи колагенозний та лімфоцитарний коліт, коліт при захворюванні сполучної тканини, коліт відкритої товстої кишки, коліт при дивертикулярній хворобі, еозинофільний коліт і паучит.

Найбільше переважно антитіло або функціональний фрагмент згідно з даним винаходом застосовують для лікування запального захворювання кишечника, зокрема, хвороби Крона, виразкового коліту або мікроскопічного коліту. Хвороба Крона може являти собою хворобу Крона з ураженням клубової кишки, товстого кишечника, клубової кишки та товстого кишечника або хвороба Крона з ізольованим ураженням верхніх відділів (шлунка, дванадцятипалої кишки та/або тонкої кишки), включаючи нестриктуруючий/непенетруючий, стриктуруючий, пенетруючий та характер перебігу захворювання, що включає періанальні ураження, з можливістю будь-якої комбінації локалізації та характеру перебігу захворювання із зазначених вище. Виразковий коліт може являти собою виразковий проктит, проктосигмоїдит, лівобічний коліт, виразковий панколіт і паучит.

Комбінована терапія та інші аспекти

Переважно пацієнт, який отримує лікування із застосуванням антитіла до ФНП α або його функціонального фрагмента, також отримує інший лікарський засіб, що зазвичай застосовується. Наприклад, пацієнт, який страждає запальним захворюванням кишечника, що особливо має захворювання від помірного до важкого, зазвичай, також отримує месалазин або його похідні або проліки, кортикостероїди, наприклад, будесонід або преднізолон (перорально або внутрішньовенно (в/в)), імунодепресанти, наприклад, азатіоприн/6-меркаптопурин (6-MP) або метотрексат, циклоспорин або такролімус. Інші лікарські засоби, які можуть бути спільно введені пацієнту, включають біологічні препарати, такі як інфліксимаб, адаліумаб, етанерцепт, цертолізумабу пегол або інші. Додаткові лікарські засоби, які можуть бути спільно введені пацієнту, включають імунодепресанти (наприклад, азатіоприн/6-MP або метотрексат, або пероральний циклоспорин) для підтримання стабільної або більше тривалої ремісії. Ще одним аспектом даного винаходу є застосування антитіла до ФНП α або функціонального фрагмента, як визначено вище в даному описі, для зниження запалення.

Ще одним аспектом даного винаходу є антитіло до ФНП α або функціональний фрагмент, як визначено вище в даному описі, для застосування для зниження запалення у пацієнта, що страждає від запального стану.

Іншим аспектом даного винаходу є спосіб лікування запального стану, який включає введення пацієнту, що потребує цього, ефективної кількості антитіла до ФНП α або функціонального фрагмента, як визначено вище в даному описі. Зазначений запальний стан переважно являє собою один із станів, що описані вище.

Іншим аспектом даного винаходу є спосіб запобігання запальному стану, який включає введення пацієнту, що потребує цього, ефективної кількості антитіла до ФНП α або функціонального фрагмента, як визначено вище в даному описі. Запальний стан переважно являє собою один із станів, що описані вище.

Таблиця 1

Зведені дані про амінокислотні послідовності

SEQ ID NO:	Опис
1	Генетично детермінований CDR L1
2	Генетично детермінований CDR L2
3	Генетично детермінований CDR L3
4	Генетично детермінований CDR H1
5	Генетично детермінований CDR H2
6	Генетично детермінований CDR H3
7	CDR L1 клону 16-22-H05
8	CDR L2 клону 16-22-H05 і клону 16-16-H10
9	CDR L3 клону 16-22-H05 і клону 16-16-H10
10	CDR H1 клону 16-22-H05, клону 16-16-B08 і клону 16-16-H10
11	CDR H2 клону 16-22-H05
12	CDR H3 клону 16-22-H05
13	V _H гуманізованого scFv клону 16-22-H05-sc02 і клону 16-22-H05-sc04

Зведені дані про амінокислотні послідовності

SEQ ID NO:	Опис
14	V _L гуманізованого scFv клону 16-22-H05-sc02
15	Гуманізований scFv клону 16-22-H05-sc02
16	CDR L1 клону 16-12-B11
17	CDR L1 клону 16-13-C08
18	CDR L1 клону 16-13-E05
19	CDR L1 клону 16-16-B08
20	CDR L1 клону 16-16-H10
21	CDR L1 клону 17-13-G07
22	CDR L1 клону 17-20-E06
23	CDR L2 клону 16-12-B11, клону 16-16-B08 і клону 17-13-G07
24	CDR L2 клону 16-13-C08
25	CDR L2 клону 16-13-E05
26	CDR L2 клону 17-20-E06
27	CDR L3 клону 16-12-B11
28	CDR L3 клону 16-13-C08
29	CDR L3 клону 16-13-E05
30	CDR L3 клону 16-16-B08
31	CDR L3 клону 17-13-G07
32	CDR L3 клону 17-20-E06
33	CDR H1 клону 16-12-B11 и клона 16-13-E05
34	CDR H1 клону 16-13-C08
35	CDR H1 клону 17-13-G07
36	CDR H1 клону 17-20-E06
37	CDR H2 клону 16-12-B11 і клону 17-13-G07
38	CDR H2 клону 16-13-C08
39	CDR H2 клону 16-13-E05
40	CDR H2 клону 16-16-B08 і клону 17-20-E06
41	CDR H2 клону 16-16-H10
42	CDR H3 клону 16-12-B11
43	CDR H3 клону 16-13-C08
44	CDR H3 клону 16-13-E05
45	CDR H3 клону 16-16-B08
46	CDR H3 клону 16-16-H10
47	CDR H3 клону 17-13-G07
48	CDR H3 клону 17-20-E06
49	Лінкерна послідовність у scFv
50	Лінкерна послідовність у діатілі
51	Гуманізоване діатіло клону 16-22-H05
52	Легкий ланцюг гуманізованого IgG клону 16-22-H05
53	Тяжкий ланцюг гуманізованого IgG клону 16-22-H05
54	V _L гуманізованого scFv клону 16-22-H05-sc04
55	Гуманізований scFv клону 16-22-H05-sc04
56	Консенсусна послідовність V _{k1} каркасної ділянки I (положення 1-23 за Кабатом)
57	Консенсусна послідовність V _{k1} каркасної ділянки II (положення 35-49 за Кабатом)
58	Консенсусна послідовність V _{k1} каркасної ділянки III (положення 57-88 за Кабатом)
59	послідовність V _L зародкової лінії каркасної ділянки IV (див. таблицю 16)
60	послідовність V _L зародкової лінії каркасної ділянки IV (див. таблицю 16)
61	послідовність V _L зародкової лінії каркасної ділянки IV (див. таблицю 16)
62	послідовність V _L зародкової лінії каркасної ділянки IV (див. таблицю 16)

Приклади

Приклад 1. Одержання антитіл кролика, що спрямовані на ФНП α людини

1. Результати

1.1 Імунізація

Кроликів піддавали імунізації очищеним рекомбінантним ФНП α людини (Peprotech, номер за каталогом 300-01A). В ході імунізації силу гуморальної імунної відповіді на антиген якісно оцінювали шляхом визначення максимального розведення (титру) сироватки кожного кролика, яке забезпечувало зв'язування поліклональних антитіл сироватки з антигеном, що виявляється. Титри антитіл сироватки до іммобілізованого рекомбінантного ФНП α людини оцінювали за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA, див. 2.2.1). Для всіх трьох кроликів були показані дуже високі титри, 10×10^6 -кратне розведення сироватки продовжувало забезпечувати позитивний сигнал (щонайменше у 3 рази більше високий, ніж сигнал, що одержаний для сироватки тварини, що не отримувала антиген, яку використовували як контроль фону) в ELISA. Крім цього, здатність різних сироваток кроликів придушувати біологічну активність ФНП α оцінювали за допомогою аналізу на основі клітин L929 миші (див. 2.2.3). Всі три сироватки придушували індукований ФНП α апоптоз фібробластів миші L929. Для кролика №3 була показана найбільше висока нейтралізуюча активність з 50 % придушенням (IC₅₀), що досягається при розведенні сироватки 1:155000. У порівнянні з кроликом №3, для кролика №2 і кролика №1 була показана приблизно у 3 і 21 разів більше низька активність з досягненням 50 % придушення при розведенні сироватки 1:55500 і 1:7210 відповідно.

Лімфоцити, що виділені з селезінки усіх трьох тварин, були вибрані для подальшого виявлення "хітів" (hit). Пріоритет тварин визначали на основі здатності придушувати біологічну активність ФНП α в аналізі з L929. Таким чином, найбільша кількість одержаних "хітів" мала походження від кролика №3, а найменша кількість "хітів" була одержана від кролика №1.

1.2 Виявлення "хітів"

1.2.1 Сорткування "хітів"

Була розроблена методика сортування на основі проточної цитометрії, яка забезпечує специфічне виявлення та дозволяє виділити В-клітини, що зв'язують ФНП α з високою афінністю (див. 2.1), після чого проводили процедуру виявлення "хітів".

Лімфоцити загальною кількістю 33×10^6 (що відповідає 1,5 % від загальної кількості виділених лімфоцитів), що одержані від усіх трьох кроликів, були охарактеризовані у двох незалежних циклах сортування. Із загальної кількості 33×10^6 проаналізованих клітин було виділено 3452 В-клітини, що експресують специфічні антитіла до ФНП α . Кількості клонованих лімфоцитів були різними для трьох кроликів, оскільки більшу кількість клітин виділяли від тих кроликів, сироватка яких показала сильне придушення ФНП α в аналізі з L929. Із числа виділених В-клітин 792 клони були одержані від кролика №1, 1144 клони - від кролика №2, і 1408 клонів - від кролика №3. Для 108 клонів походження від відповідного кролика невідомо, оскільки вони одержані з суміші залишкових лімфоцитів від усіх 3 кроликів для забезпечення оптимального використання невеликої кількості лімфоцитів із флаконів.

1.2.2 Скринінг "хітів"

Результати, що одержані на стадії скринінгу, основані на дослідженнях, що проведені з неочищеними антитілами з супернатантів культури клітин, які секретують антитіла (ASC), оскільки масштаб високопродуктивного культивування не дозволяє очищати окремі антитіла кроликів. Такі супернатанти використовували для ранжування великої кількості антитіл одне відносно одного, але не для одержання абсолютних значень (наприклад, для придушення біологічної активності ФНП α), винятком була афінність зв'язування. Супернатанти ASC піддавали скринінгу у високопродуктивному ELISA для аналізу зв'язування з рекомбінантним ФНП α людини. Супернатанти, що зв'язуються з ФНП α , додатково характеризували відносно зв'язування з ФНП α яванського макака методом ELISA, кінетики зв'язування та їх здатності нейтралізувати біологічну активність ФНП α людини в аналізі з L929. За винятком кінетики зв'язування, значення, що одержані при високопродуктивному скринінгу слід інтерпретувати як відповіді "так" або "ні", які основані на точкових вимірах (без урахування залежності "доза-відповідь"). Афінність до ФНП α яванського макака та миші аналізували для всіх 102 клонів, які були вибрані для ампліфікації та секвенування варіабельних доменів важкого та легкого ланцюга антитіла.

1.2.2.1 Зв'язування з ФНП α людини

Метою первинного скринінгу є виявлення клонів ASC, які продукують антитіла, специфічні до ФНП α людини. Для цієї мети супернатанти культури клітин 3452 клонів ASC аналізували на присутність антитіл до ФНП α людини методом ELISA (див. 2.2.1). Використовуваний метод ELISA оцінює "кількість" антитіл підтипу IgG, що зв'язані з рекомбінантним ФНП α людини, однак

не дає інформації про афінність або концентрацію антитіл. У цьому аналізі супернатанти з 894 клонів ASC викликали сигнал, який був явно вище фону. Частка "хітів" згідно зі скринінгом була схожою для кролика №1 і кролика №2: 153 "хіта" з 792 (19,3 %), що виявлені у кролика №1, і 225 "хітів" із 1144, що виявлені у кролика №2 (19,7 %). Для кролика №3 була продемонстрована значно більша частка "хітів" - 34,4 %, що обумовлювало виявлення 484 "хітів" із 1408. Для всіх 894 "хітів", що виявлені у цьому первинному скринінгу, проводили визначення кінетики зв'язування за допомогою SPR (вторинний скринінг).

1.2.2.2 Кінетика зв'язування з ФНП α

Метою вторинного скринінгу є одержання кількісної інформації про якість зв'язування з мішенню для кожного "хіта", що виявлений при первинному скринінгу, методом поверхневого плазмонного резонансу (SPR, див. 2.2.2). На відміну від ELISA, що використовується при проведенні первинного скринінгу, цей метод оцінює кінетику зв'язування з мішенню у вигляді функції від часу. Це дозволяє визначити константи швидкості для асоціації (k_a) та дисоціації (k_d) антитіла з мішенню. Відношення k_d/k_a дозволяє розрахувати константу рівноваги дисоціації (KD), яка відображає афінність антитіла відносно мішені. З 894 "хітів", що виявлені при первинному скринінгу, вдалося визначити афінність зв'язування з ФНП α людини для 839 моноклональних антитіл кролика. Для решти 55 антитіл афінність не могла бути визначена, оскільки концентрація антитіла у супернатанті ASC була нижче межі виявлення приладу для SPR при відповідних налаштуваннях. 839 антитіл до ФНП α , для яких можна було провести визначення, продемонстрували константи дисоціації (KD) в діапазоні від $1,36 \times 10^{-13}$ М до $1,14 \times 10^{-8}$ М. 69 % усіх проаналізованих антитіл мали KD нижче 0,5 нМ.

Медіанні значення KD, що становлять $2,21 \times 10^{-10}$ М і $2,09 \times 10^{-10}$ М, для "хітів", що виявлені при скринінгу від кроликів №2 і №3, були схожі, у той час як для кролика №1 були продемонстровані приблизно у 2 рази більше високі значення з медіанним значенням KD $4,65 \times 10^{-10}$ М. При розгляді тільки нейтралізуючих "хітів", що виявлені при скринінгу, розподіли афінності були однаковими для всіх трьох тварин, з більше низькими значеннями медіанної KD (медіанне значення KD від $1,4 \times 10^{-10}$ М до $1,27 \times 10^{-10}$ М). Афінність менше 0,041 нМ, 0,029 нМ і 0,026 нМ була визначена для 5 % "хітів", що виявлені при скринінгу, від кроликів №1, №2 і №3 відповідно. Для 2 % супернатантів афінність знаходилась навіть у низькому пікомолярному діапазоні (менше 6,2 пМ, 7,9 пМ і 11 пМ). Високий рівень виходу високоафінних антитіл, що одержаний в результаті вторинного скринінгу, забезпечує широку основу для вибору найбільше підходящих антитіл для гуманізації та зміни формату.

1.2.2.3 Активність

Для оцінки активності був розроблений аналіз на основі клітин (аналіз з L929) (див. 2.2.3). Для 506 із 894 вибраних антитіл (56,6 %) придушували індукований ФНП α апоптоз в аналізі з L929 більше ніж на 50 %. Відповідно до результатів, що одержані при аналізі титрів, найбільший відсотковий вміст нейтралізуючих "хітів" був одержаний у кролика №3, де частка "хітів" становила 62,8 %, потім йде кролик №2 з часткою "хітів" 56,4 % і кролик №1 з найменшою часткою "хітів" 39,9 %. Афінність цих нейтралізуючих антитіл знаходилась в діапазоні від $1,36 \times 10^{-13}$ до $1,19 \times 10^{-9}$ М.

1.2.2.4 Видова перехресна реактивність (яванський макак)

Всі 894 "хіти", що виявлені при первинному скринінгу, аналізували відносно видової перехресної реактивності з ФНП α яванського макака за допомогою ELISA (див. 2.2.1). Метою цього додаткового скринінгу було одержання можливості відбору клонів ASC, для яких відомо, що вони мають перехресну реактивність з ФНП α яванського макака. Використовуваний метод ELISA дозволяє оцінити "кількість" антитіл підтипу IgG, що зв'язані з рекомбінантним ФНП α яванського макака, однак не дає інформації про афінність або концентрацію антитіл. Супернатанти від 414 (46 %) клонів ASC викликали явний сигнал (оптична щільність (OD) ≥ 1). Відсотковий вміст "хітів", що мають перехресну реактивність з ФНП α яванського макака, був близьким для кролика №1 і кролика №3 і становив 81 "хіт" із 153 (52,9 %), що виявлені у кролика №1, і 236 "хітів" із 484, що виявлені у кролика №3 (48,8 %). Для кролика №2 був продемонстрований декілька менший відсотковий вміст "хітів", що мають перехресну реактивність, яка становить 37,8 %, що призводило до виявлення 82 "хітів" із 225.

1.2.2.5 Вибір клонів для ЗТ-ПЛР

Як попередня умова для підтвердження одержання "хітів", аналізу послідовності генів і подальшої гуманізації антитіл кролика необхідно одержати генетичну інформацію, яка кодує варіабельний домен антитіла кролика. Це було здійснено шляхом зворотної транскрипції (ЗТ) відповідної інформаційної РНК з одержанням комплементарної ДНК (кДНК) з наступною ампліфікацією дволанцюгової ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Вибір клонів ASC, що піддані ЗТ-ПЛР, перш за все був оснований на афінності та нейтралізуючій

активності. Як додатковий критерій враховували перехресну реактивність з ФНП α яванського макака. Всього для клонування генів за допомогою ЗТ-ПЛР було вибрано 102 клони ASC. Спочатку було вибрано 93 найбільше перспективних ASC (з точки зору афінності) з K_D менше 80 пМ, які придушували біологічну активність ФНП α в аналізі з L929 більше ніж на 50 % і демонстрували значне зв'язування з ФНП α яванського макака. Крім цього, всі 9 найбільше перспективних клонів ASC з K_D менше 20 пМ, які придушували активність ФНП α більше ніж на 50 %, але не зв'язувалися з ФНП α яванського макака, незважаючи на це також були вибрані. Всього були успішно ампліфіковані та секвензовані 12, 13 і 66 клонів ASC від кроликів №1, №2 і №3 відповідно.

1.2.2.6 Виявлення родинних клонів з бажаними властивостями

Для того, щоб охарактеризувати генетичну різноманітність панелі виділених клонів ASC, послідовності ділянок (CDR), що визначають комплементарність, піддавали екстракції та множинному вирівнюванню послідовностей, що забезпечувало можливість кластеризації послідовностей у філогенетичному дереві.

У той час як цей аналіз, з одного боку, дозволяє вибрати генетично різноманітний набір послідовностей клонів для подальших експериментів з гуманізації та змінення формату, він також дозволяє виявити гомологічні кластери послідовностей клонів, які, мабуть, мають загальний вихідний клон В-клітин у кролика. Відмінними ознаками цих кластерів послідовностей є висока гомологія послідовностей у CDR й єдина закономірність фармакодинамічних властивостей. Обидві ці властивості узагальнені для кластера з восьми клонів у таблицях 2 і 3. Незважаючи на збереження функцій у цьому кластері послідовностей, консенсусна послідовність у таблиці 3 демонструє, що певна варіабельність CDR допустима при збереженні бажаного фармакодинамічного профілю.

Таблиця 2

Фармакодинамічні властивості моноклональних антитіл у супернатантах ASC

С/н ASC	Афінність до ФНП α людини			Афінність до ФНП α яванського макака			аналіз з L929
	K_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	K_d (s ⁻¹)	K_D (M)	K_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	K_d (s ⁻¹)	K_D (M)	% придушення
16-12-B11	3,22E+06	1,87E-04	5,82E-11	2,15E+06	1,37E-03	6,34E-10	71
16-13-C08	1,77E+06	9,41E-05	5,33E-11	1,80E+06	1,77E-04	9,82E-11	93
16-13-E05	2,78E+06	8,27E-05	2,97E-11	2,53E+06	2,99E-04	1,18E-10	94
16-16-B08	2,27E+06	4,53E-05	1,99E-11	2,35E+06	1,52E-04	6,45E-11	73
16-16-H10	2,03E+06	1,59E-04	7,85E-11	2,20E+06	4,61E-04	2,10E-10	70
16-22-H05	1,90E+06	7,26E-05	3,82E-11	2,17E+06	6,97E-05	3,21E-11	67
17-13-G07	7,87E+05	1,37E-06	1,73E-12	7,80E+05	7,34E-05	9,41E-11	109
17-20-E06	1,19E+06	3,59E-06	3,03E-12	1,45E+06	3,27E-05	2,26E-11	101

Таблиця 3

Для зазначених вище клонів були одержані наступні дані про послідовності, що відносяться до CDR:

CDR	Клон	Послідовність*	SEQ ID NO:
CDR L1	16-22-H05	QASQSIFSGLA	7
	16-12-B11	QASQSI SNYLA	16
	16-13-C08	QASQSISTALA	17
	16-13-E05	QASQSIGRNL	18
	16-16-B08	QASQSI SNSLA	19
	16-16-H10	QASQSI YSGLA	20
	17-13-G07	QASQSIGSNLA	21
	17-20-E06	QASQSI SSSLA	22
		QASQSIXXXLA	1
CDR L2	16-22-H05	GASKLAS	8
	16-12-B11	RASTLAS	23
	16-13-C08	RASTLES	24
	16-13-E05	QASKLAS	25

Таблиця 3

Для зазначених вище клонів були одержані наступні дані про послідовності, що відносяться до CDR:

CDR	Клон	Послідовність*	SEQ ID NO:
	16-16-B08	RASTLAS	23
	16-16-H10	GASKLAS	8
	17-13-G07	RASTLAS	23
	17-20-E06	RASKLAS	26
		XASXLXS	2
CDR L3	16-22-H05	QSYYYSSSSSDGSYA	9
	16-12-B11	QSYYYSSSSSDGFFA	27
	16-13-C08	QSYYYSSSSSDGSFA	28
	16-13-E05	QSYYYSSSNSDGLA	29
	16-16-B08	QSYYYSSISSDGSYA	30
	16-16-H10	QSYYYSSSSSDGSYA	9
	17-13-G07	QSYYYSSSSSDGSVA	31
	17-20-E06	QSYYYTSTSDGSYA	32
		QSYYYXSXXSDGXXA	3
CDR H1	16-22-H05	GIDFNNGIG	10
	16-12-B11	GIDFSNYGIC	33
	16-13-C08	GIDFSNYGIS	34
	16-13-E05	GIDFSNYGIC	33
	16-16-B08	GIDFNNGIG	10
	16-16-H10	GIDFNNGIG	10
	17-13-G07	GIDFSTYGIS	35
	17-20-E06	GIDFSNYGIG	36
		GIDFXXYGIX	4
CDR H2	16-22-H05	YIYPGFAITNFANSVKG	11
	16-12-B11	YIYPGFGITNYANSVKG	37
	16-13-C08	YIYPGFGIRNYAHSVKG	38
	16-13-E05	YIYPGFGIRNYANSLKG	39
	16-16-B08	YIYPGFAIRNYANSVKG	40
	16-16-H10	YIYPGFGITNFANSVKG	41
	17-13-G07	YIYPGFGITNYANSVKG	37
	17-20-E06	YIYPGFAIRNYANSVKG	40
		YIYPGFXIXNXAXSXXKG	5
CDR H3	16-22-H05	DPVYATSSGYFDL	12
	16-12-B11	DPIYASSSGYLDL	42
	16-13-C08	DPVYSSDWGYFNL	43
	16-13-E05	DPVYASSSGYLDL	44
	16-16-B08	DPLYATSSGYFDL	45
	16-16-H10	DPVYASSSGYFDL	46
	17-13-G07	DPVYASSSAYYNL	47
	17-20-E06	DPLYSTSSGYFNL	48
		DPXYXXXXXXYXXL	6

* Амінокислоти, що позначені як "X", мають значення, що визначене у прикладеному переліку послідовностей.

1.2.2.7 Перехресна реактивність з ФНПа яванського макака (визначена методом SPR)

Внаслідок великої кількості "хітів" із високою афінністю, які ефективно нейтралізують ФНПа, видову перехресну реактивність оцінювали для всіх моноклональних антитіл кролика, які піддавали 3Т-ПЛР, для полегшення вибору клонів ASC для підтвердження одержання "хітів". Афінність до ФНПа яванського макака визначали методом SPR аналогічно описаному вище (див. також 2.2.2). Афінність 93 досліджених антитіл до ФНПа яванського макака знаходилася в діапазоні від $9,6 \times 10^{-12}$ до $2,1 \times 10^{-9}$ М. 38 із 93 антитіл, що мають перехресну реактивність, зв'язувалися з ФНПа людини й яванського макака з аналогічною афінністю (KD відрізнялися менше ніж у два рази). Крім того, афінність до ФНПа людини й яванського макака відрізнялася

менше ніж у 20 разів для 79 із 93 антитіл, що мають перехресну реактивність, і менше ніж у 10 разів для 62 із них, що робить їх прийнятними для доклінічних досліджень з використанням яванських макак.

2. Способи

5 2.1 Сортувальний аналіз

Процедуру сортування на основі проточної цитометрії для виділення антигенспецифічних В-клітин з лімфатичної тканини кролика виконували, як описано у джерелі Lalor et al (Eur J Immunol.1992; 22:3001-2011).

2.2 Скринінгове дослідження

10 2.2.1 Визначення зв'язування з ФНП α методом ELISA (ФНП α людини й яванського макака)

Рекомбінантний ФНП α людини (Peprotech, номер за каталогом 300-01) наносили на 96-ячковий планшет для мікротитрування для ELISA. Зв'язування антитіл кролика в супернатантах культури ASC з іммобілізованим ФНП α виявляли із застосуванням вторинного міченого HRP IgG до імуноглобулінів кролика (Jackson ImmunoResearch, номер за каталогом 111-035-046).
15 Додавали субстрат ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин, KPL, номер за каталогом 53-00-00) і зупиняли реакцію з розвитком фарбування шляхом додавання H_2SO_4 . Планшети зчитували з використанням пристрою для зчитування планшетів для мікротитрування (Infinity reader M200 Pro, Tecan) при довжині хвилі 450 нм.

Ефективність аналізу під час циклів скринінгу контролювали за допомогою комерційно доступного поліклонального антитіла кролика до ФНП α як позитивний контроль (AbD Serotec, номер за каталогом 9295-0174). Для цієї мети антитіло, яке є позитивним контролем, досліджували в концентрації 100 і 250 нг/мл у двох повторностях у кожному планшеті для скринінгу. Стійкість та точність відповіді позитивного контролю контролювали для кожного планшета. За кінцевих умов аналізу відношення сигнал-фон становило від 30 до 40 для позитивного контролю в концентрації 250 нг/мл, а коефіцієнт варіації (KB) позитивного контролю становив менше 10 %. Сигнал з оптичною щільністю ≥ 100 % відносно позитивного контролю в концентрації 250 нг/мл розглядали як "хіт" первинного скринінгу.

Для визначення титру сироватки використовували ті самі умови ELISA, як описано вище. Розведення сироватки вважали позитивним, коли сигнал зв'язування імунної сироватки був щонайменше у 3 рази більше високим у порівнянні з сигналом сироватки тварини, що не отримувала антиген.

Видову перехресну реактивність з яванським макаком визначали з використанням аналогічного ELISA, як описано вище. Рекомбінантний ФНП α яванського макака (Sino Biological, номер за каталогом 90018-CNAE) наносили на 96-ячковий планшет для мікротитрування для ELISA. Зв'язування антитіл кролика в супернатантах культури ASC з іммобілізованим ФНП α яванського макака виявляли із застосуванням вторинного міченого HRP антитіла, як зазначено вище. Імунну сироватку від кролика №2 використовували як позитивний контроль при розведенні 1:80000 і 1:320000. Стійкість та точність відповіді позитивного контролю контролювали для кожного планшета. За кінцевих умов аналізу відношення сигнал-фон становило від 20 до 30 для позитивного контролю при розведенні 1:80000, а KB позитивного контролю становили менше 10 %.

2.2.2 Кінетика зв'язування з ФНП α (людини й яванського макака), що визначена методом SPR

Афінність зв'язування антитіл з ФНП α людини визначали методом поверхневого плазмонного резонансу (SPR) з використанням приладу для SPR MASS-1 (Sierra Sensors). Продуктивність приладу визначали за допомогою стандартних еталонних розчинів, а також аналізу взаємодії еталонного антитіла з антигеном, такого як взаємодія інфліксимабу з ФНП α .

Для скринінгу афінності антитіло, що специфічне до Fc-ділянки IgG кролика (Bethyl Laboratories, номер за каталогом A120-111A), іммобілізували на сенсорному чипі (SPR-2 Affinity Sensor, High Capacity Amine, Sierra Sensors) з використанням стандартної методики кон'югації амінів. Моноклональні антитіла кролика у супернатантах ASC захоплювалися іммобілізованим антитілом до IgG кролика. Після захоплення моноклональних антитіл виконували ін'єкцію ФНП α людини (Peprotech, номер за каталогом 300-01) у проточні комірки протягом 3 хв у концентрації 90 нМ і залишали на 5 хв для протікання дисоціації білка від IgG, що захоплений на сенсорному чипі. Після кожного циклу ін'єкцій поверхню піддавали регенерації за допомогою двох ін'єкцій 10 мМ гліцин-HCl. Уявні константи швидкості дисоціації (k_d) й асоціації (k_a), і уявну константу рівноваги дисоціації (K_D) розраховували за допомогою програмного забезпечення для аналізу MASS-1 (Analyzer, Sierra Sensors) із застосуванням моделі зв'язування Ленгмюра "один до одного", а якість апроксимації контролювали на основі критерію χ^2 (χ^2 , що нормований на екстрапольований максимальний рівень зв'язування аналіта), який є мірою якості підбору

кривої. Для більшості "хітів" відносно значення Chi2 становило менше 15 %. Результати визнавали значущими, якщо значення одиниць відповіді (RU) для зв'язування ліганду становили щонайменше 2 % від значень RU для захоплення антитіла. Зразки зі значеннями RU для зв'язування ліганду, що становили менше ніж 2 % від значень RU для захоплення антитіла, розглядали як такі, що не демонструють специфічного зв'язування ФНП α із захопленням антитілом.

Видову перехресну реактивність з ФНП α яванського макака (Sino Biological, номер за каталогом 90018-CNAE) визначали з використанням тих самих умов аналізу та концентрацій ФНП α і застосуванням тих самих заходів якості. Відносний Chi2 становив менше 15 % для більшості проаналізованих супернатантів ASC.

2.2.3 Індукований ФНП α апоптоз фібробластів L929

Здатність IgG кролика із супернатантів культури ASC нейтралізувати біологічну активність рекомбінантного ФНП α людини оцінювали з використанням фібробластів миші L929 (ATCC/LGC Standards, номер за каталогом CCL-1). Клітини L929 сенсibiliзували до індукованого ФНП α апоптозу шляхом додавання 1 мкг/мл актиноміцину D. Клітини культивували у 96-ямкових планшетах для мікротитрування з плоским дном у присутності 50 % супернатанта культури ASC і 100 пМ (5,2 нг/мл) ФНП α людини (Peprotech, номер за каталогом 300-01) протягом 24 год. У порівнянні з очищеними антитілами, у присутності супернатантів ASC необхідно було використовувати більше високі концентрації ФНП α для скринінгу "хітів". Виживання клітин визначали за допомогою колориметричного аналізу із застосуванням реагенту для детекції проліферації клітин WST-8 (2-(2-метокси-4-нітрофеніл)-3-(4-нітрофеніл)-5-(2,4-дисульфофеніл)-2Н-тетразолій, мононатрієва сіль) (Sigma Aldrich, номер за каталогом 96992). WST-8 відновлюється під дією дегідрогеназ клітини з утворенням помаранчевого продукту формазану. Кількість формазану, що утворюється, прямо пропорційна кількості живих клітин. Дані аналізували із застосуванням чотирьохпараметричної логістичної моделі для підбору кривої, використовуючи програмне забезпечення для аналізу даних Softmax (Molecular Devices), і розраховували концентрацію інфліксимабу, яка необхідна для нейтралізації індукованого ФНП α апоптозу 50 % (IC50) при концентрації 36,2 нг/мл. Таким чином, нижня межа виявлення, що розрахована для цього аналізу, становить від 30 до 40 нг/мл. Це значення є лише приблизною оцінкою межі виявлення, оскільки здатність блокувати ФНП α залежить не тільки від концентрації моноклонального антитіла, але також від афінності антитіла до мішені. Однак чутливість аналізу достатня для скринінгу супернатантів, оскільки концентрації IgG у більшості супернатантів ASC перевищують концентрацію 40 нг/мл. Супернатанти, що призводять до 50 % нейтралізації індукованого ФНП α апоптозу, вважали позитивними.

Для забезпечення стійкої ефективності аналізу при проведенні циклів скринінгу антитіло інфліксимаб, що використовується як позитивний контроль, аналізували в концентраціях 115 нг/мл (0,8 нМ) і 58 нг/мл (0,4 нМ) у двох повторностях у кожному планшеті для скринінгу. Відсоток придушення та точність відповіді на позитивний контроль контролювали для кожного планшета, що використовувався для скринінгу. Критерії прийнятності для кожного планшета встановлювали наступним чином: щонайменше 60 % придушення антитіла, що використовується як позитивний контроль, в концентрації 115 нг/мл з коефіцієнтом варіації (KB) менше 20 %.

Приклад 2. Гуманізація й одержання scFv

1. Результати

1.1 Підтвердження одержання "хітів" і вибір "хітів" для гуманізації

73 унікальних набори вихідних варіабельних доменів легких і важких ланцюгів антитіл кролика були одержані під час скринінгу "хітів" і проаналізовані шляхом вирівнювання послідовностей. На підставі результатів скринінгового аналізу та гомології послідовностей окремих клонів IgG кролика були вибрані 30 кандидатів для підтвердження одержання "хітів". Було одержано 29 моноклональних антитіл, і найбільш ефективні клони з точки зору афінності й активності були вибрані для гуманізації й одержання кандидата-лідера (lead candidate). Критеріями вибору клонів були i) нейтралізація ФНП α людини в аналізі з L929, ii) висока афінність до ФНП людини, iii) перехресна реактивність з ФНП α яванського макака та макака-резуса та iv) різноманітність послідовностей. Для гуманізації був вибраний один клон (16-22-H05) як один із найбільше перспективних IgG з точки зору здатності до нейтралізації ФНП α людини в аналізі з L929. Відносно сили зв'язування переважна найбільша можлива афінність, оскільки необхідно передбачити деяку втрату афінності в результаті гуманізації та зміни формату на формат scFv.

Дані для клону IgG № 16-22-H05 наведені у таблиці 4.

Таблиця 4

Характеристики зв'язування й активності *in vitro*
очищеного моноклонального антитіла (16-22-H05)

Афінність до ФНП людини			Афінність до ФНП яванського макака			Афінність до ФНП макака-резуса			Нейтралізація ФНП в аналізі з L929	Блокування взаємодії ФНП із TNFR1	Блокування взаємодії ФНП із TNFR2
K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (M)	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (M)	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (M)	відн. IC ₅₀	відн. IC ₅₀	відн. IC ₅₀
4,04E+06	1,31E-04	3,25E-11	3,50E+06	4,89E-06	1,40E-12	2,01E+06	5,31E-04	2,65E-10	9,95	1,02	0,88

*: IC₅₀, інфліксимаб/IC₅₀, зразок, що досліджується

1.2 Одержання та відбір гуманізованих фрагментів scFv

Послідовності, які кодуєть ділянки (CDR), що визначають комплементарність, переносили *in silico* шляхом щеплення петлею CDR на каркасну послідовність варіабельного домену антитіла людини, як описано у WO 2014/206561. Крім цього, була одержана друга конструкція для кожного клону кролика, яка переносила додаткові амінокислоти з донорної послідовності у положення, що мають структурну значимість для позиціонування доменів імуноглобуліну та CDR. Був синтезований (з відповідних варіабельних легких і важких ланцюгів) штучний ген (з оптимізованим використанням кодонів для бактеріальної експресії), що кодує відповідне гуманізоване одноланцюгове антитіло Fv (scFv). Потім був одержаний поліпептид і згодом охарактеризований з використанням аналогічних досліджень, як описано для процесу підтвердження одержання "хітів".

1.2.1 Гуманізація й одержання гуманізованих scFv (активних фармакологічних інгредієнтів (API))

Гуманізація вибраного клону включала перенесення CDR антитіла кролика на акцепторний каркас scFv типу Vk1/VH3, як описано у WO 2014/206561. У цьому способі, який схематично представлений на фіг. 1, амінокислотна послідовність шести ділянок CDR була ідентифікована у донорній послідовності (мАТ кролика) та щеплена на каркасну послідовність акцептора з одержанням конструкції, що названа "трансплантат CDR".

Крім цього, був розроблений другий трансплантат, який включав додаткові модифікації амінокислот донорного антитіла кролика у положеннях L15, L22, L48, L57, L74, L87, L88, L90, L92, L95, L97, L99 і H24, H25, H56, H82, H84, H89, H108 (нумерація АНо), які, як було описано, потенційно впливають на позиціонування CDR і, відповідно, зв'язування антигена (Borras et al. JBC. 2010; 285: 9054-9066). Ця гуманізована конструкція названа "структурний (STR) трансплантат". У випадку, коли порівняння даних характеристик для цих двох вихідних конструкцій показало значну перевагу конструкції STR, були розроблені додаткові варіанти, які об'єднували CDR-щеплені VL із STR-щепленими VH. Було доведено, що ця комбінація часто є достатньою для збереження активності трансплантата STR (Borras et al., 2010 JBC, 285: 9054-9066) й у цілому є більше переважною, оскільки менша кількість змін, що не поєднані з антитілом людини, в акцепторному каркасі антитіла людини знижують ризик погіршення стабільності, а також потенціал імуногенності.

Після завершення розробки конструкції *in silico*, що описана у попередньому розділі, синтезували відповідні гени і конструювали вектори бактеріальної експресії. Послідовність експресійних конструкцій була підтверджена на рівні ДНК, і конструкції одержували відповідно до загальних протоколів експресії й очищення.

Гетерологічну експресію білків проводили в *E.coli* у вигляді нерозчинних тілець включення. Культуру експресії інокулювали експоненціально зростаючою вихідною культурою. Культивування проводили у струшуваних колбах в орбітальному шейкері з використанням комерційно доступних збагачених середовищ. Клітини вирощували до встановленої OD₆₀₀, що дорівнює 2, й індукували шляхом нічної експресії з додаванням 1 мМ ізопропіл-β-D-1-тіоґалактопіранозиду (IPTG). Після закінчення культивування клітини збирали центрифугуванням і гомогенізували за допомогою обробки ультразвуком. На цій стадії рівень експресії різних конструкцій визначали за допомогою електрофорезу лізату клітин у ПААГ з додаванням ДНС. Тільця включення виділяли з гомогенізованого залишку клітин з

використанням протоколу центрифугування, який включав декілька стадій промивання для видалення клітинного дебрису й інших домішок клітин-хазяїнів. Очищені тільця включення солюбілізували у денатуруючому буфері (100 мМ Tris/HCl, pH 8,0, 6 М гуанідин-HCl, 2 мМ EDTA) та піддавали scFv рефолдингу за допомогою масштабованого протоколу рефолдингу, який забезпечував одержання міліграмових кількостей мономерного scFv з нативною структурою. Для очищення scFv використовували стандартизований протокол, який включав наступні стадії. Продукт після рефолдингу захоплювали за допомогою афінної хроматографії з використанням агарози Capto L (GE Healthcare) з одержанням очищених scFv. Кандидати-лідери, які відповідали критеріям афінності й активності при початковій перевірці, додатково очищали, піддаючи заключній ексклюзійній хроматографії з використанням колонки HiLoad Superdex75 (GE Healthcare). Після виконання протоколу очищення білки були приготовлені у буферному сольовому розчині й охарактеризовані за допомогою різних біофізичних методів, методів аналізу білкових взаємодій та біологічних методів, як описано нижче. Продуктивність різних конструкцій порівнювали шляхом визначення кінцевого виходу очищеного білка на партію та нормалізації цього значення на 1 л об'єму рефолдингу.

1.2.2 Визначення біофізичних характеристик гуманізованого scFv

Біофізичні характеристики scFv відносно стабільності та продуктивності представлені у таблиці 5. Продуктивність та стабільність конструкції scFv була охарактеризована різними контрольними точками, як описано у наступних розділах.

scFv досліджували відповідно до визначених критеріїв, як пояснено нижче.

Критерій продуктивності повинен гарантувати, що вибрана структура scFv може бути експресована, піддана рефолдингу й очищена у достатніх кількостях для забезпечення подальшої розробки молекули-лідера (lead molecule). Певними критеріями були вихід продукту експресії scFv на літр культуральної рідини за оцінкою методом електрофорезу у ПААГ з додаванням ДНС і вихід продукту очищення, що досягається у загальному лабораторному способі, за оцінкою шляхом визначення кількості очищеного білка за допомогою УФ-спектрометрії у перерахунку на 1 літр розчину для рефолдингу.

Критерії стабільності були призначені для оцінки схильності до агрегації у процесі одержання молекул та їх структурної цілісності при зберіганні та подальшій обробці. Вміст мономера, що визначений за допомогою ексклюзійної ВЕРХ, дозволяє оцінити стабільність колоїдного розчину молекул у процесі очищення (2.2.3). У подальшому дослідженні стабільності вміст мономера визначали протягом 4 тижнів при концентрації 1 і 10 мг/мл і зберіганні при 4, -20 і <-65 °C. Крім цього, стабільність колоїдного розчину білків визначали після 5 циклів заморожування та відтаювання. Як додатковий показник стабільності визначали середню точку теплової денатурації методом диференціальної скануючої флуориметрії (DSF) (2.2.4), отримуючи дані з конформаційної стабільності кандидатів-лідерів.

Таблиця 5

Зведені дані біофізичних характеристик гуманізованих scFv

	ID клону	Конструкція	Стабільність					Продуктивність		
			Тпл [°C]	Зберігання [Δ %]			Заморожування / відтаювання [Δ %]	Чистота [%]	Експресія [г/л]	Вихід очищення [мг/л]
				-65 °C	-25 °C	4 °C				
16-22-H05-sc01		CDR	74,2	н/о	н/о	н/о	н/о	98,0	н/о	19,1
16-22-H05-sc02	16-22-05	STR	71,3	0,0	0,0	0,2	0,0	99,9	0,27	29,8
16-22-H05-sc04		CDR/STR	72,6	0,2	0,1	0,4	0,0	100,0	0,26	24,1

1.2.2.1 Оцінка продуктивності

Молекули scFv, що є кандидатами-лідерами, експресували шляхом культивування у струшуваних колбах у періодичному режимі й очищали за допомогою загального лабораторного способу з одержанням зразків білка для подальшого визначення характеристик. У ході цього процесу контролювали деякі ключові параметри продуктивності для порівняння молекул-кандидатів і виявлення конструкцій, що є потенційно складними для розробки.

Титр експресії визначали на рівні неочищеного лізата E.coli після збору клітин центрифугуванням. Під час збору очікується невелика втрата клітин, однак цей фактор було вирішено не враховувати при розрахунку виходу продукту експресії, надаючи перевагу більше консервативній оцінці продуктивності. Для кількісного визначення продукту scFv у лізаті був

5 вибраний відновлюючий електрофорез у ПААГ з додаванням ДНС з фарбуванням Кумасі (2.2.1) внаслідок високої специфічності цього методу, яка дозволяє відрізнити продукт від білків клітини-хазяїна у зразку.

Другим критерієм оцінки продуктивності є вихід продукту очищення scFv у розрахунку на літр розчину для рефолдингу. Цей параметр вказує на потенційний лімітуючий фактор в очікуваному способі одержання, який включає стадію рефолдингу білка. Оскільки доведено, що ефективність процедури рефолдингу є лімітуючою у порівнянних способах одержання, було

10 вирішено порівнювати продуктивність різних конструкцій, приймаючи до уваги продуктивність, що нормована на визначений об'єм рефолдингу. Для розрахунку виходу зразок кінцевого білка з кожної партії піддавали кількісній оцінці за поглинанням УФ (2.2.2) і ділили на фактичний об'єм рефолдингу відповідного очищення (таблиця 6).

Таблиця 6

Зведені дані про продуктивність для двох гуманізованих scFv. Титр експресії визначали за допомогою кількісного електрофорезу лізатів клітин на кінцевому етапі виробничого циклу у ПААГ з додаванням ДНС. Вихід партії визначали за допомогою вимірювання поглинання УФ пулу після кінцевого очищення. Вихід продукту очищення розраховували як кількість очищеного scFv на літр об'єму рефолдингу

ID конструкції	Титр експресії [г/л]	Продуктивність		
		Вихід партії [мг]	Об'єм рефолдингу [л]	Вихід очищення [мг/л]
16-22-H05-sc02	0,27	14,3	0,48	29,8
16-22-H05-sc04	0,26	11,9	0,49	24,1

1.2.2.2 Оцінка стабільності

Оцінка конформаційної стабільності, монодисперсності та структурної цілісності конструкцій scFv є невід'ємним компонентом ранжування різних молекул відносно можливості їх розробки. Попереднім етапом для коректного порівняння різних конструкцій є одержання очищених молекул схожої якості. Критерій "чистота мономера", що визначений методом ексклюзійної ВЕРХ, призначений для забезпечення порівняної якості різних досліджуваних речовин. Крім аналізу методом ексклюзійної ВЕРХ, для визначення чистоти та справжності білка проводили

20 електрофорез у ПААГ з додаванням ДНС для підтвердження порівняної якості досліджуваних препаратів.

Результати ексклюзійної ВЕРХ двох scFv показують, що всі препарати можуть бути очищені до досягнення вмісту мономера $\geq 99\%$ (фіг. 2).

Характер теплової денатурації кандидатів-лідерів досліджували методом диференціальної скануючої флуориметрії (DSF) для забезпечення ранжування молекул відносно їх очікуваної конформаційної стабільності. Нормалізований графік вихідних даних флуоресценції представлений на фіг. 3, де представлені результати вимірювань для кожного зразка у двох повторностях. Спостерігали кооперативний характер денатурації. Дві молекули 16-22-H05-sc02 і 16-22-H05-sc04 продемонстрували $T_{пл}$ 71,3 і 71,6 °C відповідно.

35 В другому аспекті оцінювання стабільності монодисперсність молекул контролювали протягом 4 тижнів при різних температурах. Результати дослідження стабільності й одержані вмісти мономера представлені на фіг. 4. Обидві молекули (16-22-H05-sc02 і 16-22-H05-sc04) від самого початку мають вміст мономера, що перевищує мінімум 95 % мономера, і втрачають менше 5 % мономера відносно відповідного вихідного значення в концентрації 10 мг/мл. У замороженому стані при -20 °C і <-65 °C для зразків показані лише мінімальні відмінності у часі. У найбільше жорстких умовах (4 °C) молекула 16-22-H05-sc02 втратила всього 0,2 % мономера протягом 4 тижнів. Крім цього дослідження стійкості до зовнішніх впливів проводили при температурі 37 °C і концентрації scFv 10 мг/мл у термін до 4 тижнів. За цих умов очікується більше сильний прояв відмінностей у схильності до агрегації різних конструкцій. Одержані дані, що наведені на фіг. 6, свідчать про втрату 15 % мономера через 28 днів. Обидва scFv продемонстрували гарну стабільність мономера в умовах навантаження. Хроматограми

дослідження стабільності при 4 °C наведені на фіг. 5, де показаний зразок в 0 день та через 28 днів при 4 °C. У вигляді накладеного зображення на цій хроматограмі також показані результати стабільності при заморожуванні/відтаюванні. Для цієї частини дослідження зразки неодноразово заморожували та відтаювали, всього проводили 5 циклів. Кількісна оцінка вмісту мономера, яка одержана за допомогою аналітичної ексклюзійної ВЕРХ, не виявила яких-небудь змін у двох зазначених зразках (таблиця 5).

Для двох scFv був проведений аналіз методом електрофорезу у ПААГ з додаванням ДНС для одержання допоміжних даних для кількісної оцінки за допомогою поглинання УФ, які підтверджують чистоту досліджуваного препарату та, таким чином, забезпечують специфічність кількісного визначення вмісту. В іншому аспекті цього аналізу результати електрофорезу у ПААГ з додаванням ДНС виявили відсутність деградації білка під час дослідження стабільності (28 днів при 4 °C і концентрації 10 мг/мл у порівнянні зі зразком у день 0, що зберігаються при < -65 °C), що є важливою характеристикою з точки зору можливості розробки.

Важливо відзначити, що різні дослідження, які проведені в рамках цього оцінювання, стосуються різних аспектів механізму стійкості білка. Визначення температури теплової денатурації білка дозволить одержати додаткові дані для визначення монодисперсності методом ексклюзійної ВЕРХ при зберіганні при підвищеній температурі. Хоча обидва методи призначені для одержання оцінки потенційного терміну зберігання та стабільності продукту, механізми, що розглядаються, глибоко різні. Середня точка переходу (Тпл), що визначена за допомогою теплової денатурації, є якісною мірою стабільності домену білка (не дозволяє термодинамічно визначити ΔG). Високостабільні домени білка (з високою Тпл) з меншою ймовірністю піддаються спонтанній денатурації при температурі навколишнього середовища та, відповідно, менше піддані незворотній агрегації/преципітації, що обумовлена взаємодіями денатурованих доменів. Висока стабільність домену вказує на щільну упаковку амінокислотних залишків, яка також корелює зі стійкістю до розщеплення протеазами. З іншого боку, оцінка методом ексклюзійної ВЕРХ забезпечує кількісне визначення вмісту мономерної фракції, а також розчинних олігомерів/агрегатів. Такі розчинні олігомери часто являють собою оборотні та відносно слабкі асоціати, що обумовлені електростатичними або гідрофобними взаємодіями між правильно укладеними білками. Існує певна кореляція між Тпл, що визначена за допомогою теплової денатурації, та схильністю до утворення олігомерів/агрегатів, що визначена методом ексклюзійної ВЕРХ, зокрема для білків з "граничною" стабільністю. До досягнення визначеного порогу Тпл, що становить приблизно 60 °C, варіабельні домени антитіл, зазвичай, досить стабільні, щоб бути стійкими до агрегації/преципітації та протеолітичної деградації внаслідок часткової денатурації домену при температурі навколишнього середовища. Однак олігомеризація, що обумовлена гідрофобними й/або електростатичними взаємодіями поверхневих залишків, все ж відбувається. Важливо відзначити, що при прискореному (навантажувальному) дослідженні стабільності при підвищеній температурі (наприклад, 37 °C) різні механізми утворення олігомерів і преципітації можуть діяти одночасно.

1.2.3 Визначення характеристик зв'язування й активності гуманізованих scFv in vitro

У подальшому гуманізовані scFv були охарактеризовані in vitro відносно їх властивостей зв'язування з мішенню й активності. Аналізували кінетику зв'язування (ka, kd і KD) з ФНП α людини та здатність до нейтралізації індукованого ФНП α апоптозу фібробластів L929. Додатково визначали здатність придушувати індукований ФНП α яванського макака (*Macaca fascicularis*) та макака-резуса (*Macaca mulatta*) апоптоз, а також здатність придушувати взаємодію ФНП α людини з TNFRI/TNFRII методом ELISA та селективність відносно мішені для зв'язування ФНП α у порівнянні з ФНП β .

Для розуміння результатів, що наведені нижче, важливо відзначити, що як перенесення CDR антитіла кролика на каркас варіабельного домену антитіла людини, так і зміна формату від повнорозмірного IgG до фрагмента scFv може впливати на фармакологічні властивості. Наприклад, певна втрата афінності зазвичай поєднана з гуманізацією. Крім того, внаслідок меншого розміру scFv у порівнянні з IgG здатність scFv перешкоджати взаємодії партнерів за допомогою стеричного затруднення у значній мірі знижується. Останнє, але не менш важливе, що слід відзначити - внаслідок бівалентного способу зв'язування з гомотримерним ФНП α афінність вихідного IgG може бути завищена (артефакт SPR). Відповідно, при порівнянні афінності вихідного бівалентного IgG кролика та гуманізованого моновалентного scFv зазначена "втрата афінності" може бути переоцінена.

1.2.3.1 Афінність

Афінність гуманізованих scFv до ФНП α людини визначали за допомогою SPR (див. також 2.1.1). Афінність визначали з використанням 2-кратних серійних розведень відповідних scFv. scFv були одержані з моноклонального антитіла кролика. Були одержані два варіанти scFv, що

названі "CDR" (CDR) і "структурний трансплантат" (STR). Щоб оцінити відносний внесок заміни у каркасах легкого та важкого ланцюга та при можливості зменшити кількість амінокислотних залишків кролика, що введені у каркас антитіла людини, проводили експерименти з перестановки доменів. Таким чином, для клону 16-22-H05 були одержані конструкції scFv, що

містять CDR-щеплений легкий ланцюг і структурно-щеплений важкий ланцюг (CDR/STR). Найбільше перспективні scFv 16-22-H05-sc02 (STR) і 16-22-H05-sc04 (CDR/STR) зв'язувалися з афінністю $4,5 \times 10^{-11}$ і $1,1 \times 10^{-10}$ М відповідно. 16-22-H05-sc04 показав лише невелике зменшення афінності у порівнянні з його варіантом - "структурним трансплантатом" (16-22-H04-sc02) (див. таблицю 7). Ці результати свідчать, що афінність гуманізованих scFv в основному залежить від декількох амінокислот кролика, що введені у каркас важкого ланцюга антитіла людини.

1.2.3.2 Активність

Здатність гуманізованих scFv нейтралізувати ФНП α людини аналізували з використанням аналізу з L929 (див. також 2.1.2). Здатність (IC₅₀ й IC₉₀) до нейтралізації індукованого ФНП α апоптозу аналізували для scFv, що одержані з 16-22-H5, і порівнювали зі здатністю еталонного антитіла - інфліксимабу, щоб забезпечити пряме порівняння значень IC₅₀ й IC₉₀ у різних планшетах для аналізу. Відносні значення IC₅₀ й IC₉₀ розраховували в одиницях маси (нг/мл) інфліксимабу та scFv. Аналіз активності виконували декілька разів у різні дні з різними партіями фрагментів антитіл. На фіг. 7 показані типові криві залежності відповіді від дози з одного експерименту для кожного з двох scFv. Середні значення паралельних визначень представлені у таблиці 7 (стандартні відхилення наведені у легенді таблиці).

Гуманізовані scFv придушували індукований ФНП α апоптоз з більше низькими значеннями IC₅₀ й IC₉₀, ніж інфліксимаб (див. таблицю 7). Відповідно до результатів SPR, варіант з переставленими доменами 16-22-H05-sc04 (CDR/STR) демонстрував рівну активність у порівнянні зі структурним трансплантатом 16-22-H05-sc02 (STR). scFv 16-22-H05-sc04 і 16-22-H05-sc02 продемонстрували чудову активність нейтралізації ФНП α зі значеннями IC₅₀, що у 14,6 і 13,1 разів кращі, ніж для інфліксимабу, відповідно. Значення IC₉₀ 16-22-H05-sc04 і 16-22-H05-sc02 були у 13,1 і 12,6 разів кращі, ніж для інфліксимабу, відповідно. Як й у випадку вихідних моноклональних антитіл кролика, не спостерігалось чіткої кореляції між афінністю й активністю антитіл (кореляція не наведена). Проте, scFv, що одержані з 16-22-H05, які проявляють найбільше високу афінність (16-22-H05-sc02 (STR) і 16-22-H05-sc04 (CDR/STR)), також продемонстрували найбільшу активність. Крім того, результати аналізу нейтралізації свідчать, що для ефективного придушення передачі сигналів ФНП α необхідне досягнення визначеної порогової афінності. Наприклад, scFv 16-14-D08-sc01 (CDR), 16-15-C09-sc01 (CDR), 16-24-H07-sc01 (CDR) і 17-20-G01-sc01 (CDR), усі з яких зв'язуються з ФНП α з афінністю вище 1 нМ, демонструють слабку здатність до нейтралізації ФНП α (дані не наведені).

1.2.3.3 Видова перехресна реактивність (ФНП α яванського макака та макака-резуса)

Видову перехресну реактивність для найбільше перспективних scFv визначали двома способами: 1) визначенням здатності до нейтралізації ФНП α яванського макака та макака-резуса в аналізі з L929 і 2) визначенням афінності до ФНП α яванського макака та макака-резуса методом SPR. Здатність до нейтралізації ФНП α від різних видів визначали за допомогою аналізу з L929, подібно до того, як описано вище для ФНП α людини, з використанням ФНП α яванського макака та макака-резуса відповідно (див. також 2.1.2). ФНП α від обох видів показали дуже схожу здатність індукувати апоптоз L929 (дані не наведені). Таким чином, для дослідження видової перехресної реактивності використовували однакові концентрації ФНП α людини та мавп. Крім того, визначали кінетику зв'язування (методом SPR) з ФНП α яванського макака та макака-резуса з використанням аналогічного аналізу, як і для ФНП α людини (див. також 2.1.1).

Всі scFv, що одержані з клону 16-22-H05, демонстрували перехресну реактивність з ФНП α яванського макака та макака-резуса (див. таблицю 7). Афінність була схожою, а саме $2,0 \times 10^{-10}$ і $2,3 \times 10^{-10}$ М для яванського макака та макака-резуса відповідно. Афінність до ФНП α людини та мавп відрізнялася приблизно у 5 разів. Здатність нейтралізувати ФНП α яванського макака, макака-резуса та людини гарно корелювала з афінністю до відповідних ФНП α . Відповідно, два клони, що одержані з 16-22-H05, показали у 5-7 разів більше низьку активність відносно ФНП α мавп у порівнянні з ФНП α людини (див. таблицю 7 і фіг. 8). У цілому, два scFv продемонстрували видову перехресну реактивність з ФНП α яванського макака та макака-резуса.

1.2.3.4 Блокування взаємодії ФНП α з TNFRI/II людини

Крім аналізу з L929, здатність кожного гуманізованого scFv придушувати взаємодію ФНП α людини з TNFRI/II оцінювали за допомогою ELISA (див. розділ 2.1.3). Аналогічно аналізу з L929, окремі значення IC₅₀ у кожному планшеті калібрували відносно IC₅₀ молекули порівняння

інфліксимабу, який також вносили у кожний планшет, і відносні значення IC_{50} й IC_{90} розраховували в одиницях маси (нг/мл) інфліксимабу та scFv.

Аналіз нейтралізації дозволяє виявити відмінності в активності цільових блокуючих антитіл тільки у тому випадку, якщо вони зв'язуються зі своєю мішенню з константою рівноваги зв'язування (KD), яка перевищує цільову концентрацію, що використовується в аналізі активності (KD > цільової концентрації). Для аналізу з L929 використовували концентрацію ФНП α , що становить 5 пМ, у той час як в інгібіторному ELISA з TNFRI/II використовували концентрацію ФНП α , що становить 960 пМ. Таким чином, теоретично аналіз з L929 дозволяє розрізнити активності scFv з KD>5 пМ, тоді як інгібіторний ELISA дозволяє розрізнити лише активності scFv з KD>960 пМ. Оскільки для усіх проаналізованих scFv показані KD нижче 960 пМ, активності scFv з різною афінністю (але схожим механізмом дії) можна розрізнити тільки в аналізі з L929.

16-22-H5-sc02 і 16-22-05-sc04 продемонстрували здатність блокувати взаємодію ФНП α з TNFRI, що у 2,8-3,5 рази більша у порівнянні з інфліксимабом, тоді як здатність у порівнянні з інфліксимабом в аналізі з L929 була значно вище (у 13,1 і 14,6 рази). При порівнянні відносних значень IC_{50} для вихідного IgG кролика (див. таблицю 2) з відносними значеннями IC_{50} для гуманізованих scFv (таблиця 7) активності scFv у цілому були декілька вище у порівнянні з вихідним IgG, хоча афінність у цілому знаходилась у тому самому діапазоні, що і для вихідного IgG кролика. Оскільки активності антитіл і scFv порівнювали в одиницях маси, кількість валентностей (сайтів зв'язування ФНП α) для кожної концентрації була приблизно у 2,9 рази вище для моновалентних scFv у порівнянні з тими, що мали більше ніж у п'ять разів більшу молекулярну масу, але бівалентним IgG. У випадку scFv, що зв'язуються з дуже високою афінністю, це призводить до більш ефективного блокування взаємодії ФНП α і TNFRI/II, оскільки відсутність авідності більше не є визначальною для активності. Навпаки, для низькоафінних одновалентних доменів були опубліковані протилежні дані (Coppieters et al., Arthritis & Rheumatism, 2006; 54: 1856-1866). Через зазначені вище причини результати інгібіторного ELISA не використовували для ранжування активностей різних антитіл, але спочатку застосовували для порівняння здатності антитіл блокувати взаємодію з TNFRI у порівнянні з TNFRII. Досліджувані scFv блокували взаємодію з обома рецепторами ФНП α з порівняними активностями (таблиця 9, фіг. 9 і фіг. 10).

1.2.3.5 Специфічність відносно мішені (селективність зв'язування з ФНП α у порівнянні з ФНП β)

Специфічність двох scFv (16-22-H05-sc02 і 16-22-H05-sc04) до ФНП α у порівнянні з ФНП β підтверджували шляхом оцінки відносної здатності ФНП β у порівнянні з ФНП α забезпечувати половину максимального придушення зв'язування ФНП α з кожним scFv і визначали за допомогою конкурентного ELISA (див. також розділ 2.1.4). Якість рекомбінантного ФНП β людини була оцінена виробником білка 1) відносно чистоти за допомогою електрофорезу у ПААГ у присутності ДСН й аналізу методом ВЕРХ і 2) відносно біологічної активності в аналізі цитотоксичності на клітинах L929 миші. Як показано на фіг. 11, взаємодія кожного з scFv з біотинільованим ФНП α блокувалася неміченим ФНП α зі значеннями IC_{50} , що знаходяться в діапазоні від 60 до 260 нг/мл, тоді як ФНП β не показав будь-якого значущого ефекту навіть у самій високій дослідженій концентрації ФНП β (1250 мкг/мл). Відповідно, всі проаналізовані scFv специфічно зв'язуються з ФНП α , але не з його найближчим гомологом, ФНП β . ФНП β не показав будь-якого значущого придушення зв'язування ФНП α з scFv у досліджених концентраціях. Таким чином, концентрація ФНП β , яка необхідна для забезпечення половини максимального придушення зв'язування ФНП α , повинна бути значно вище, ніж найбільша концентрація ФНП β , що використана в аналізі (1250 мкг/мл). При порівнянні концентрацій ФНП α і ФНП β , що необхідні для забезпечення половини максимального придушення зв'язування ФНП α з scFv, селективність зв'язування з ФНП α у порівнянні з ФНП β була значно вище, ніж приблизно у 5000-20000 разів, для усіх досліджених фрагментів (див. також таблицю 7). Тому, зв'язування будь-якого з scFv поза мішенню є дуже мало ймовірним.

Результати експериментів, що описані вище, наведені у таблицях 7-9.

Таблиця 7

Здатність зв'язування й активність гуманізованих scFv in vitro. CDR: "трансплантат CDR", STR: "структурний трансплантат". Аналіз активності виконували декілька разів у різні дні з різними партіями фрагментів антитіла з наступними стандартними відхиленнями: 16-22-H05-sc02 (n=3): відн. IC₅₀=13,1±1,8 і відн. IC₉₀=12,6±3,5; 16-22-H05-sc04 (n=2): відн. IC₅₀=14,6±0,6 і відн. IC₉₀=13,1±2,4

scFv	Дизайн	Афінність до ФНПа людини			Афінність до ФНПа яванського макака			Афінність до ФНПа макака-резуса			Активність		Видоспецифічність IC ₅₀ [нг/мл]			Специфічність до мішені відн. IC ₅₀ для ФНПβ у порівнянні з ФНПа
		k _a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _d (s ⁻¹)	KD (M)	k _a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _d (s ⁻¹)	KD (M)	k _a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _d (s ⁻¹)	KD (M)	відн. IC ₅₀	відн. IC ₉₀ ^{&}	людина	яванський макак	макак-резус	
16-22-H05-sc02	STR	9,6E+05	4,3E-05	4,5E-11	4,9E+05	9,6E-05	2,0E-10	6,7E+05	1,5E-04	2,3E-10	13,1	12,6	0,6	2,9	3,0	>> 10000
16-22-H05-sc04	CDR / STR	6,8E+05	7,1E-05	1,1E-10	н/в			н/в			14,6	13,1	0,5	3,5	2,9	>> 10000

*: IC_{50,інфліксимаб} (нг/мл)/IC_{50,scFv} (нг/мл)

&: IC_{90,інфліксимаб} (нг/мл)/IC_{90,scFv} (нг/мл)

Таблиця 8

Описи гуманізованих scFv згідно з даним винаходом

	Експресія	Продуктивність	Стабільність		
	Вихід продукту експресії	Вихід продукту рефолдингу	Теплова денатурація	Втрата мономера при концентрації 10 г/л через 4 тиж. при 4 °C (-65, -20)	Втрата мономера після 5 циклів заморожування / відтаювання
	[г/л]	[мг/л]	[°C]	[Δ %]	[Δ %]
16-22-H05-sc02	0,26	29,8	71,3	0,2 (0,0, 0,0)	0,0
16-22-H05-sc04	0,26	24,1	72,6	0,4 (0,2, 0,1)	0

Таблиця 9

Здатність scFv блокувати взаємодію ФНПа з TNFR1 і ФНПа з TNFR2

scFv	Блокування взаємодії ФНПа з TNFR1				Блокування взаємодії ФНПа з TNFR2			
	відн. IC ₅₀ [*]	відн. IC ₉₀ ^{&}	IC ₅₀ [нг/мл]	IC ₉₀ [нг/мл]	відн. IC ₅₀ [*]	відн. IC ₉₀ ^{&}	IC ₅₀ [нг/мл]	IC ₉₀ [нг/мл]
16-22-H05-sc02	3,5	2,4	13,9	39,8	5,7	3,3	20,0	56,9
16-22-H05-sc04	2,8	2,1	17,7	45,3	3,5	1,5	32,6	127

*: IC_{50,інфліксимаб} (нг/мл)/IC_{50,scFv} (нг/мл)

&: IC_{90,інфліксимаб} (нг/мл)/IC_{90,scFv} (нг/мл)

5

2. Способи

2.1 Аналіз характеристик "лідера"

2.1.1 Визначення кінетики зв'язування та видової перехресної реактивності методом SPR

Афінність зв'язування scFv з ФНПа людини визначали методом поверхневого плазмонного

резонансу (SPR) з використанням приладу для SPR MASS-1 (Sierra Sensors). Ефективність дослідження методом SPR була підтверджена за допомогою аналізу взаємодії еталонного антитіла з антигеном, такого як взаємодія цертолізумабу з ФНП α . Пегільований Fab-фрагмент цертолізумабу був вибраний як еталон внаслідок його моновалентного способу зв'язування, що аналогічний способу зв'язування scFv. При використанні тих самих умов проведення аналізу, що і для визначення афінності scFv, було визначено значення афінності цертолізумабу до ФНП α , що становить $9,94 \times 10^{-11}$ М. Це значення добре узгоджується з опублікованими значеннями KD, що становлять $9,02 \pm 1,43 \times 10^{-11}$ М (заявка на ліцензування біопрепарату (BLA) цертолізумабу; номер BLA: 125160; дата подання: 30 квітня 2007 р.)

Для визначення афінності scFv ФНП α людини (Peprotech, номер за каталогом 300-01) іммобілізували на сенсорному чипі (SPR-2 Affinity Sensor, Amine, Sierra Sensors) шляхом кон'югації амінів до досягнення рівня іммобілізації від 50 до 100 резонансних одиниць (RU) (рівні іммобілізації, що досягнуті у процесі проведення аналізу SPR, становили від 40 до 120 RU). На першій стадії проводили скринінг афінності scFv із застосуванням тільки однієї концентрації scFv (90 нМ). На другій стадії, для найкращої характеристики властивостей scFv, визначали кінетичні характеристики у циклі з однократною ін'єкцією (single injection cycle kinetics; SiCK), використовуючи цикл з однократною ін'єкцією шляхом одночасного введення шести зразків, що аналізуються, у різних концентраціях у кожний з восьми паралельних каналів системи MASS-1. Для скринінгу афінності гуманізовані scFv вводили у проточні комірки в концентрації 90 нМ протягом трьох хвилин і контролювали процес дисоціації протягом 12 хвилин. Для подальших більше точних визначень афінності у проточні комірки протягом трьох хвилин вводили двократні серійні розведення scFv в діапазоні від 45 до 1,4 нМ і залишали на 12 хвилин для протікання дисоціації білка з комплексу з ФНП α , що іммобілізований на сенсорному чипі. Уявні константи швидкості дисоціації (k_d) й асоціації (k_a) й уявну константу рівноваги дисоціації (K_D) розраховували за допомогою програмного забезпечення для аналізу MASS-1 (Analyzer, Sierra Sensors) із застосуванням моделі зв'язування Ленгмюра "один до одного", а якість апроксимації контролювали на підставі критерію χ^2 , який є мірою якості підбору кривої. Чим менше значення χ^2 , тим більше точною є апроксимація до моделі зв'язування Ленгмюра "один до одного". Для скринінгу афінності результати визнавали значущими, якщо χ^2 становив менше 10 для концентрації, що аналізується. У тих випадках, коли аналізували декілька концентрацій scFv, результати визнавали значущими, якщо середнє значення χ^2 за всіма дослідженими концентраціями становило менше 10. Критерії прийнятності були дотримані для всіх досліджених scFv.

Видову перехресну реактивність з ФНП α (Peprotech, номер за каталогом 315-01A) яванського макака (Sino Biological, номер за каталогом 90018-CNAE) та макака-резуса (R & D Systems, номер за каталогом 1070-RM-025/CF) визначали із застосуванням тих самих умов проведення аналізу та тих самих показників якості, які описані вище для ФНП α людини. Для ФНП α яванського макака та макака-резуса були досягнуті рівні іммобілізації, що знаходяться в діапазоні від 50 до 180 RU і від 90 до 250 RU, відповідно. ScFv аналізували із застосуванням двократних серійних розведень з концентраціями, що становлять від 45 до 1,4 нМ. Середні значення χ^2 становили менше 10 для всіх досліджених scFv.

2.1.2 Індукований ФНП α апоптоз у фібробластах L929 (нейтралізація ФНП α людини та ФНП α приматів, які не є людиною, під дією scFv)

Здатність scFv нейтралізувати біологічну активність рекомбінантного ФНП α людини оцінювали з використанням фібробластів миші L929 (ATCC/LGC Standards, номер за каталогом CCL-1). Клітини L929 сенсibiliзували до індукованого ФНП α апоптозу шляхом додавання 1 мкг/мл актиноміцину D. Трикратні серійні розведення еталонного антитіла до ФНП α або scFv (3000-0,05 нг/мл) і 5 пМ рекомбінантного ФНП α людини (Peprotech, номер за каталогом 300-01) попередньо інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години. Використовувана концентрація ФНП α (5 пМ) індукувала субмаксимальний апоптоз (EC_{90}) клітин L929. Після додавання сумішей агоністів/інгібіторів клітини інкубували протягом 24 годин. Виживання клітин визначали за допомогою колориметричного аналізу із застосуванням реагенту для детекції проліферації клітин WST-8 (2-(2-метокси-4-нітрофеніл)-3-(4-нітрофеніл)-5-(2,4-дисульфофеніл)-2Н-тетразолій, мононатрієва сіль) (Sigma Aldrich, номер за каталогом 96992). WST-8 відновлюється під дією дегідрогенази клітини з утворенням помаранчевого продукту формазану. Кількість формазану, що утворюється, прямо пропорційна кількості живих клітин. Дані аналізували із застосуванням чотирьохпараметричної логістичної моделі для підбору кривої, використовуючи програмне забезпечення для аналізу даних Softmax (Molecular Devices), і розраховували концентрацію еталонного антитіла або scFv, яка необхідна для нейтралізації індукованого ФНП α апоптозу на 50 % і 90 % (IC_{50} й IC_{90}) (див. також фігуру 7). Для забезпечення

можливості безпосереднього порівняння значень IC_{50} й IC_{90} між експериментами, які були проведені у різні дні або у різних планшетах для аналізу, значення IC_{50} й IC_{90} калібрували відносно еталонного антитіла, що являє собою інфліксимаб. Для контролю точності відповіді криві залежності відповіді від дози аналізували у двох повторностях. Стандартні відхилення та

коєфіцієнти варіації (KB) розраховували для кожної експериментальної точки (KB <20 %).

Видову перехресну реактивність з ФНП α яванського макака (Sino Biological, номер за каталогом 90018-CNAE) і макака-резуса (R&D Systems, номер за каталогом 1070-RM-025/CF) визначали із застосуванням тих самих умов проведення аналізу та тих самих показників якості, які описані вище для ФНП α людини. Як й у випадку аналога з організму людини, для дослідження видової перехресної реактивності використовували концентрації ФНП α , які індукували субмаксимальний апоптоз (EC_{90}) у клітинах L929. ФНП α обох видів демонстрував здатність індукувати апоптоз у фібробластах миші L929, яка дуже схожа з аналогічною здатністю ФНП α людини. Відповідно, для обох досліджуваних видів використовували ту саму концентрацію ФНП α (5 nM). При проведенні аналізу видової перехресної реактивності значення KB для більшості повторних експериментальних точок становили менше 10 %.

2.1.3 Інгібіторний ELISA ФНП α

Інгібуючу дію scFv на зв'язування з лігандами оцінювали із застосуванням ELISA, біохімічного методу, що відтворює виключно взаємодію ФНП α з TNFRI і TNFRII.

У випадку першого інгібіторного ELISA позаклітинний домен TNFRI, що злитий з Fc-фрагментом IgG людини (R&D Systems, номер за каталогом 372-RI), наносили на 96-ямковий планшет для ELISA Maxisorp в концентрації 0,5 мкг/мл. У випадку другого інгібіторного ELISA позаклітинний домен TNFRII, що злитий з Fc-фрагментом IgG людини (R&D Systems, номер за каталогом 726-R2), наносили в концентрації 2 мкг/мл. Всі наступні етапи були ідентичними для обох аналізів. Для детекції зв'язування ФНП α з TNFRI і TNFRII ФНП α біотинільовали перед застосуванням. Біотинільований ФНП α людини (960 pM, 50 нг/мл) спочатку інкубували з гуманізованими scFv до ФНП α , що взяті у трьохкратних серійних розведеннях, й інфліксимабом (10000 нг/мл-0,2 нг/мл) протягом 1 години при кімнатній температурі. Суміші ФНП α /фрагмент антитіла переносили у планшети, що містять іммобілізований рецептор ФНП, і детектували зв'язування незаблокованого ФНП α з іммобілізованим рецептором ФНП α після інкубації протягом 20 хвилин при кімнатній температурі за допомогою біотинзв'язуючого кон'югату стрептавідину з пероксидазою хрому (стрептавідин-HRP) (SDT Reagents, номер за каталогом SP40C). Додавання субстрату 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (ТМБ) призводило до одержання зчитувальних колориметричних показань, які пропорційні зв'язуванню ФНП α з TNFRI і TNFRII. Перед застосуванням у конкурентному ELISA біологічну активність біотинільованого ФНП α підтверджували в аналізі з L929. EC_{50} біотинільованого ФНП α була аналогічна EC_{50} неміченого ФНП α (дані не наведені). Аналогічно аналізу L929, що описаний вище, дані аналізували із застосуванням чотирьохпараметричної логістичної моделі для підбору кривої, використовуючи програмне забезпечення для аналізу даних Softmax (Molecular Devices), і розраховували концентрації scFv, що необхідні для придушення взаємодії ФНП α з TNFR на 50 % і 90 % (IC_{50} й IC_{90}). Для забезпечення можливості безпосереднього порівняння значень IC_{50} й IC_{90} між експериментами, які були проведені у різні дні або у різних планшетах для аналізу, значення IC_{50} й IC_{90} калібрували відносно еталонного антитіла, що являє собою інфліксимаб.

Для контролю точності відповіді криві залежності відповіді від дози аналізували у двох повторностях. Стандартні відхилення та KB розраховували для кожної експериментальної точки (KB <25 %).

2.1.4 Специфічність відносно мішені

Для підтвердження специфічності scFv до ФНП α оцінювали зв'язування з найбільше гомологічним членом родини ФНП β . Здатність немічених ФНП β (Peprotech, номер за каталогом 300-01B) і ФНП α (Peprotech, номер за каталогом 300-01) придушувати взаємодію біотинільованого ФНП α з scFv аналізували за допомогою конкурентного ELISA. З цією метою scFv наносили на 96-ямковий планшет для проведення ELISA Maxisorp в концентрації 1 мкг/мл. Зв'язування біотинільованого ФНП α (75 нг/мл) з scFv, що нанесені на планшет, у присутності немічених ФНП α (50 мкг/мл-0,00013 мкг/мл) або ФНП β (1250 мкг/мл-0,00013 мкг/мл), що взяті у п'ятикратних серійних розведеннях, детектували із застосуванням біотинзв'язуючого кон'югату стрептавідин-HRP (SDT Reagents, номер за каталогом SP40C), як описано вище. При побудові кривої залежності відповіді від дози для ФНП α дані аналізували із застосуванням чотирьохпараметричної логістичної моделі для підбору кривої, використовуючи програмне забезпечення для аналізу даних Softmax (Molecular Devices), і розраховували концентрацію неміченого ФНП α , яка необхідна для блокування взаємодії біотинільованого ФНП α з scFv на 50 % (IC_{50}), що нанесені на планшет. ФНП β не показав будь-якого значущого придушення

взаємодії біотинільованого ФНП α з scFv (див. також фігуру 11). Для кількісного визначення відносної здатності ФНП β у порівнянні з ФНП α придушувати зв'язування ФНП α з кожним scFv розраховували IC₅₀, що характеризує придушення взаємодії під дією ФНП β відносно ФНП α . Оскільки при використанні ФНП β у концентраціях, що приблизно у 5000-20000 разів перевищують IC₅₀ для ФНП α , не спостерігали будь-якого значущого інгібування, було визначено, що селективність зв'язування з ФНП α перевищує селективність зв'язування з ФНП β більше ніж у 5000-20000 разів. Для контролю точності відповіді криві залежності відповіді від дози аналізували у двох повторностях. Стандартні відхилення та КВ розраховували для кожної експериментальної точки (КВ <25 % для всіх, крім однієї з досліджених концентрацій ФНП α / β).
Всі scFv задовольняли цьому критерію.

2.1 Обробка й аналіз даних за хімічними властивостями, процесу виробництва та контролю якості (chemistry, manufacturing and controls; CMC)

2.2.1 Відновлювальний електрофорез у ПААГ у присутності ДСН

Електрофорез у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію (електрофорез у ПААГ у присутності ДСН) являє собою метод аналізу, що застосовується для якісної характеристики та контролю чистоти білків. Згідно з Фармакопеєю США (United States Pharmacopeia; USP) (Глава 1056 Фармакопеї США), аналітичний гель-електрофорез є підходящим і рутинним способом ідентифікації й оцінки гомогенності білків у лікарських речовинах.

Даний метод застосовують для визначення кількості продукту scFv у лізатах E. coli для встановлення виходу продукту експресії після ферментації. Іншим застосуванням цього методу є перевірка справжності досліджуваних речовин, що оснований на визначенні їх молекулярної маси відносно теоретичних значень. У допоміжних цілях цей метод застосовують для кількісної оцінки чистоти досліджуваних зразків з точки зору наявності домішок, що поєднані з процесом одержання (білків клітини-хазяїна), і домішок, що поєднані з продуктом (продукти розкладання або аддукти).

Дослідження методом електрофорезу у ПААГ у присутності ДСН проводили за допомогою комерційно доступної збірної системи для приготування гелів "Mini Protean", що придбана у компанії Bio-Rad Laboratories Inc. Гуманізовані scFv аналізували на розділяючих гелях типу "Any kD" (номер за каталогом 456-9036). В обох випадках використовували буферну систему тріс/гліцин, що рекомендована виробником. Для детекції білкових зон застосовували або фарбування Кумасі із застосуванням розчину для фарбування SimplyBlue™ (Life Technologies Corp., номер за каталогом LC6060), або фарбування сріблом із застосуванням набору Pierce Silver Stain Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., номер за каталогом 24612). При проведенні процедур фарбування слідували протоколам відповідної компанії-постачальника.

Документування й аналіз забарвлених білкових гелів проводили із застосуванням системи для документування ChemiDoc XRS System (Bio-Rad Laboratories Inc., номер за каталогом 170-8265) і програмного забезпечення Image Lab, версія 4.0.1 (Bio-Rad Laboratories Inc., номер за каталогом 170-9690).

Визначення титру в зразках лізатів

Електрофорез у ПААГ у присутності ДСН забезпечує специфічну детекцію цільового білка в суміші білків клітини-хазяїна. На кожний гель наносили серійні розведення стандартного зразка в лінійному діапазоні методу (який був визначений заздалегідь). Для розрахунку стандартної кривої, яку, у свою чергу, використовували для екстраполяції вмісту scFv у зразку, застосовували лінійну регресію інтенсивностей зон (що виміряні за допомогою денситометрії) в залежності від номінальних концентрацій стандартного зразка.

Зразки лізатів з невідомими концентраціями продукту наносили у різних розведеннях (щонайменше 1:10 у буфері для розведення) таким чином, щоб щонайменше одна концентрація scFv знаходилась в лінійному діапазоні методу. Кількість продукту розраховували на основі виміряних інтенсивностей зон scFv, і концентрацію визначали з використанням кратності розведення препарату зразка. Значення усереднювали для всіх зразків, які знаходилися в межах лінійного діапазону стандартної кривої.

Як додаткову перевірку придатності даного методу для кількісного визначення в зразках лізатів проводили аналіз придушення/посилення сигналу шляхом додавання в зразок лізата відомої кількості стандартного зразка. Розрахунок ступеня витягання при розведенні зразка 1:10 на буфері для розведення призводив до значення 95,4 %, яке знаходиться на тому самому рівні точності, що і спостережуване значення для стандартного зразка у буфері для розведення. Таким чином, не спостерігали будь-яку суттєву інтерференцію з матриксом в клітинних лізатах, і цей метод вважали підходящим для кількісного визначення вмісту scFv в клітинних лізатах.

Вміст і чистота білків

Для того, щоб показати придатність методу для визначення вмісту та, відповідно, також чистоти досліджуваних зразків, нижню межу виявлення (НМВ) для еталонного scFv визначали візуально (шляхом ідентифікації білкової зони) при номінальному навантаженні 0,02 мкг, при цьому оцінка гістограми інтенсивності для відповідної доріжки показувала, що відношення сигнал/шум при цьому навантаженні становило приблизно 2. Крім того, лінійний діапазон для кількісної оцінки визначали шляхом денситометричного аналізу основних зон.

Апроксимація даних методом лінійної регресії призводила до коефіцієнта змішаної кореляції (R^2), який становить 0,9998, що вказувало на гарну якість апроксимації. На додаток до загальної якості апроксимації визначали відносну помилку для кожної окремої експериментальної точки з метою підтвердження придатності способу у вибраному діапазоні. Відносні помилки становили менше 10 % для всіх експериментальних точок, що вказувало на гарну точність цього способу.

2.2.2 Поглинання УФ випромінювання при 280 нм

Метод вимірювання поглинання УФ випромінювання при 280 нм являє собою аналіз вмісту загального білка, як описано у Главі 1057 Фармакопеї США. Розчини білків поглинають УФ випромінювання з довжиною хвилі 280 нм завдяки наявності ароматичних амінокислот. Поглинання УФ випромінювання залежить від вмісту залишків тирозину та триптофану у білку та пропорційне концентрації білка. Поглинання розчину з невідомим вмістом білка може бути визначено, відповідно до Глави 851 Фармакопеї США, що присвячена спектроскопії, шляхом застосування закону Бера $A = \epsilon \cdot l \cdot c$, де поглинання (A) дорівнює добутку молярного коефіцієнта поглинання (ϵ), довжини оптичного шляху та концентрації речовини. Молярний коефіцієнт поглинання для scFv розраховували за допомогою програмного забезпечення Vector NTI® (Life Technologies Corporation).

Вимірювання поглинання УФ випромінювання проводили із застосуванням рідера Infinity M200 Pro, що оснащений планшетом Nanoquant (Tecan Group Ltd.). Поглинання зразків білка вимірювали при 280 нм і 310 нм, при цьому остання довжина хвилі служила базовим сигналом, який віднімали із сигналу на 280 нм. Для обліку можливої інтерференції з матриксом зразків для кожного вимірювання виконували віднімання сигналу контрольної проби. Одержаний підсумковий сигнал поглинання зразка білка використовували для розрахунку концентрації білка із застосуванням закону Ламберта-Бера.

Всі вимірювання проводили в межах діапазону, що зазначений у специфікаціях до приладів, в діапазоні вимірювання 0-4 одиниці ОЩ, для якого виробник вказує відтворюваність <1 % й однаковість вимірювань <3 %.

2.2.3 Ексклюзійна ВЕРХ (ексклюзійна вискоефективна рідинна хроматографія)

Ексклюзійна ВЕРХ являє собою метод розділення, що оснований на застосуванні твердої нерухомої фази та рідкої рухомої фази, як зазначено у главі 621 Фармакопеї США. Цей метод забезпечує розділення молекул на основі їх розміру та форми за рахунок застосування гідрофобної нерухомої фази та водної рухомої фази. Розділення молекул відбувається між мертвим об'ємом (V_0) і повним об'ємом розчинника (V_t) конкретної колонки. Визначення за допомогою ексклюзійної ВЕРХ проводили у системі для ВЕРХ Chromaster (Hitachi High-Technologies Corporation), що оснащена пристроєм для автоматичного введення зразків й УФ-детектором, що налаштований на довжину хвилі детектування 280 нм. Керування обладнанням здійснювали за допомогою програмного забезпечення EZChrom Elite (Agilent Technologies, версія 3.3.2 SP2), яке також підтримує функцію аналізу одержаних хроматограм. Зразки білка доводили до прозорого стану шляхом центрифугування та зберігали при температурі 6 °C в автодозаторі до введення. Для аналізу зразків ScFv використовували колонку Shodex KW402.5-4F (Showa Denko Inc, номер за каталогом F6989201) зі стандартним сольовим буфером як рухому фазу (50 mM ацетат натрію, pH 6,0, 250 mM хлорид натрію) при рекомендованій швидкості потоку 0,35 мл/хв. Кількість цільового зразка на кожне введення проби становило 5 мкг. Детекцію зразків здійснювали за допомогою УФ-детектора при довжині хвилі 280 нм, і дані реєстрували із застосуванням підходящого пакета програмного забезпечення. Одержані хроматограми аналізували в діапазоні від V_0 до V_t , виключаючи таким чином піки, що пов'язані з матриксом, зі значенням часу елювання > 10 хв.

З метою забезпечення внутрішньолaborаторної відтворюваності методу регулярно проводили вимірювання для стандартного зразка на початку й у кінці кожного процесу ВЕРХ. Стандартний зразок, що використовується для перевірки придатності цієї системи, являв собою ScFv, який був одержаний у вигляді однієї порції та розділений на аліквоти, що використовуються для вимірювання у кожній часовій точці.

2.2.4 ДСФ (диференціальна скануюча флуориметрія)

Метод ДСФ являє собою нефармакопейний спосіб вимірювання денатурації білка, що

залежна від температури. Вимірювання температури теплової денатурації методом ДСФ проводили за допомогою апарата для кількісної ПЛР MX3005P (Agilent Technologies), що керувався пакетом програмного забезпечення MX Pro (Agilent Technologies) й оснащений фільтром збудження/емісії, що встановлений на 492/610 нм. Реакції проводили у білих планшетах для ПЛР Thermo fast 96 (Abgene, номер за каталогом AB-0600/W). Для детекції денатурації білка використовували комерційно доступний стоковий розчин барвника SYPRO orange (Molecular Probes; номер за каталогом S6650) у кінцевому розведенні 1:1000. Зразки білка розводили для вимірювань денатурації до кінцевої концентрації 50 мкг/мл у стандартному буферному сольовому розчині. Теплову денатурацію здійснювали за допомогою запрограмованого змінення температури, що починається з 25 °C і доводиться до 96 °C з кроком 1 °C з тривалістю 30 секунд. У процесі запрограмованого змінення температури реєстрували емісію флуоресценції кожного зразка. Зареєстровані необроблені дані обробляли й оцінювали із застосуванням пакета шаблонів Microsoft Excel (Niesen, Nature Protocols 2007, Vol. 2 No.9), і дані з флуоресценції апроксимували за допомогою рівняння Больцмана із застосуванням програми GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.) для одержання середньої точки температурного переходу (T_m).

Для забезпечення надійних і стійких до помилок вимірювань середньої точки денатурації вимірювання виконували щонайменше у двох повторностях. Що стосується якості даних, то враховували лише вимірювання з якістю апроксимації (R^2) > 0,9900 і 95 % довірчим інтервалом для T_m менше 0,5 %.

Для оцінки внутрішньолабораторної відтворюваності у кожне вимірювання включали стандартний зразок (відомий охарактеризований scFv), що забезпечувало можливість порівняння результатів виконання аналізу у різні дні.

2.2.5 Дослідження стабільності

Для оцінки стабільності різних конструкцій scFv як реєстрованого показника придатності цих молекул для подальших розробок був створений протокол короткострокового дослідження стабільності. Конструкції білків концентрували у простому буферному сольовому складі (див. вище) до цільових концентрацій, що становлять 1 і 10 мг/мл. Вміст мономера визначали за допомогою ексклюзійної ВЕРХ для підтвердження того, що чистота перевищує необхідний критерій, який становить > 95 %. Далі зразки білка зберігали при температурі <-65, -20, 4 і 37 °C протягом 4 тижнів, й аліквоти аналізували у різні моменти часу. Первинний реєстрований показник являв собою аналіз методом ексклюзійної ВЕРХ, який забезпечував кількісне визначення розчинних олігомерів й агрегатів з більше високою молекулярною масою. Як допоміжні вимірювання визначали вміст білка за поглинанням УФ випромінювання при 280 нм, яке дозволяло судити про те, чи відбувалася протягом періоду зберігання втрата істотних кількостей білка за рахунок осадження. Для зберігання використовували пробірки з кришкою, що загвинчується (Sarstedt, номер за каталогом 72.692.005), які заповнювали кількостями 30-1500 мкг на кожну аліквоту. Крім того, визначали чистоту за допомогою електрофорезу у ПААГ у присутності ДСН, який свідчив про стабільність конструкції відносно деградації або ковалентної мультимеризації.

Приклад 3: Одержання гуманізованого діатіла й IgG

Конструкція одноланцюгового діатіла була розроблена шляхом розташування варіабельних доменів у конфігурації VLA-L1-VHB-L2-VLB-L3-VHA. У цих конструкціях домени VLA і VHA і VLB і VHB спільно утворюють сайт зв'язування для ФНП α . Пептидні лінкери L1-L3, що поєднують варіабельні домени, були сконструйовані з повторів гліцин/серин. Два коротких лінкери L1 і L3 складаються з єдиного повтору G₄S, тоді як довгий лінкер L2 складається з послідовності (G₄S)₄. Нуклеотидні послідовності, що кодують гуманізовані варіабельні домени (приклад 2; розділ 1.2.1.), були синтезовані de novo та клоновані в адаптований вектор для експресії в E. coli, що одержаний на основі послідовності плазміди pET26b(+)(Novagen). Експресію й очищення здійснювали, як описано для scFv у прикладі 2; розділі 1.2.1.

Гуманізований IgG був сконструйований шляхом клонування варіабельних доменів у підходящий вектор для експресії в клітинах ссавців для транзитornoї гетерологічної експресії, що містить лідерну послідовність та відповідні константні домени, наприклад, вектори rFUSE-IgG (Invivogen). Транзитornу експресію функціонального IgG здійснювали шляхом спільної трансфекції векторів, що кодують важкий та легкий ланцюги, у клітини CHO S із застосуванням системи FreeStyle™ MAX. Після культивування протягом декількох днів збирали для очищення супернатант від клітин, що секретують антитіла. Далі секретовані IgG піддавали афінному очищенню на сорбенті білок А-сефароза (GE Healthcare). Елюйовані фракції аналізували за допомогою електрофорезу у ПААГ у присутності ДСН, вимірювання поглинання УФ випромінювання при 280 нм й ексклюзійної ВЕРХ.

Афінність молекул антитіла визначали з використанням приладу Віасоре, як описано у прикладі 2 у розділі 2.1.1.

Таблиця 10

	$K_a (M^{-1}c^{-1})$	$K_d (c^{-1})$	$K_D (M)$
IgG	$1,90 \times 10^6$	$7,92 \times 10^{-5}$	$4,17 \times 10^{-11}$
scDb	$9,40 \times 10^5$	$2,02 \times 10^{-5}$	$2,15 \times 10^{-11}$
scFv	$8,93 \times 10^5$	$3,38 \times 10^{-5}$	$3,79 \times 10^{-11}$

- 5 Активності молекул антитіл визначали в аналізі L929 (спосіб описаний у прикладі 2 у розділі 2.1.2).

Таблиця 11

	Активність IC ₅₀ (нМ)
IgG	0,02
scDb	0,01
scFv	0,03

Приклад 4: Визначення стехіометрії зв'язування ФНПа

- 10 Стехіометрію зв'язування 16-22-Н5 з ФНПа визначали за допомогою ексклюзивної ВЕРХ. 16-22-Н5-scFv і ФНПа інкубували у двох різних молярних відношеннях, а саме у молярному відношенні 1:1 і 4,5:1. Оскільки ФНПа існує в розчині у вигляді тримера, зазначені молярні відношення відносяться до ФНПа_{тример}. Таким чином, у відношенні 4,5:1 16-22-Н5-scFv знаходиться у надлишку та повинні займати всі точки зв'язування ФНПа_{тример}, в результаті чого утворюються комплекси 1 ФНПа_{тример} з 3 scFv. Однак у умовах еквімолярного відношення наявного scFv не достатньо для насичення всіх трьох теоретичних сайтів зв'язування ФНПа. Тому, також були очікуваними варіанти комплексу з менше ніж 3 зв'язаними scFv. ФНПа і 16-22-Н5-scFv інкубували протягом 2 годин при кімнатній температурі для забезпечення утворення комплексу. Потім зразки центрифугували при 4 °C протягом 10 хв. 10 мкл кожного зразка аналізували за допомогою ексклюзивної ВЕРХ. Аналіз за допомогою ексклюзивної ВЕРХ проводили з 50 мМ фосфатним буфером рН 6,5, 300 мМ NaCl як елюентом при швидкості потоку 0,35 мл/хв. Елюювані піки білка детектували на довжині хвилі 280 нм. Колонку заздалегідь калібрували із застосуванням калібрувального набору для гель-фільтрації від компанії GE Healthcare (низькомолекулярні стандарти, високомолекулярні стандарти) для визначення уявних молекулярних мас.

- 25 На нижній панелі фіг. 12 показаний профіль елюції для еквімолярних кількостей scFv і ФНПа, який перекривався з профілями ФНПа_{тример} і scFv, що взяті окремо. Внаслідок тримеризації ФНПа в розчині теоретично існує до трьох еквівалентних сайтів зв'язування для scFv, що присутні у кожному тримері, та, відповідно, молекули scFv є лімітуючими. У цих умовах були ідентифіковані всі три види комплексу (3:1, 2:1, 1:1). На верхній панелі фіг. 12 показаний профіль елюції комплексу з надлишковими кількостями scFv. Надлишок незв'язаного scFv елюювався з очікуваним значенням часу утримування. Пік ФНПа кількісно витрачався на утворення комплексів і повністю зникав. Пік цього комплексу зміщувався у бік більше низьких значень часу утримування та добре корелював з часом утримування піка з найбільшою молекулярною масою, який одержаний в умовах еквімолярного відношення. З цієї причини був зроблений висновок, що всі доступні сайти зв'язування на молекулі ФНПа були зайняті scFv, і, відповідно, стехіометрія зв'язування становить 3:1 (scFv: ФНПа), якщо scFv є доступний у надлишку.

- 40 На додаток до цих якісних спостережень, уявну стехіометрію зв'язування також розраховували на основі уявної молекулярної маси комплексу 16-22-Н5-scFv:ФНПа, що визначена за допомогою ексклюзивної ВЕРХ. На підставі часу утримування було розраховано, що уявна молекулярна маса становила 139,7 кДа. Згідно з наведеним нижче рівнянням (1) було розраховано, що уявна стехіометрія зв'язування становила 3,3. Це добре корелює з теоретичним числом трьох еквівалентних сайтів зв'язування, що доступні для scFv на молекулі ФНПа_{тример}, і наведеними вище спостереженнями, згідно з якими була визначена стехіометрія зв'язування 3:1.

Рівняння (1):

стехіометрія зв'язування (scFv:ФНПа) = (молекулярна маса (комплекс, уяв.) - молекулярна

маса (ФНП α , теор.) / молекулярна маса (scFv, теор.)

молекулярна маса (комплекс, уяв.): 139,7 кДа

молекулярна маса (ФНП α , теор.): 52,2 кДа

молекулярна маса (scFv, теор.): 26,5 кДа.

5 Приклад 5: Утворення комплексів ФНП α : антитіло (перехресне зв'язування ФНП α)

Здатність 16-22-H5-scDb зв'язуватися одночасно з двома молекулами ФНП α досліджували на приладі Biacore T200 у буфері HEPES, що містить 10 mM HEPES, 150 mM NaCl і 0,05 % Твін. Біотинільований ФНП α (Acro Biosystems) захоплювали за допомогою біотинільованого олігонуклеотиду на основі одноланцюгової ДНК із застосуванням набору Biotin CAPture (GE Healthcare) відповідно до інструкцій виробника. 0,25 мкг/мл біотинільованого ФНП α вводили зі швидкістю потоку 10 мкл/хв протягом 3 хв для досягнення рівня захоплення, що становить приблизно від 200 до 300 RU (резонансних одиниць). Антитіла 16-22-H5-scDb і 16-22-H5-scFv, як контроль, вводили зверху поверхні, що містить іммобілізований ФНП α , протягом 2 хв при швидкості потоку 30 мкл/хв у концентрації 90 нМ. Після асоціації фрагментів антитіла вводили ФНП α (Perotech) протягом 5 хв при швидкості потоку 30 мкл/хв у концентрації 90 нМ. Концентрації антитіл і ФНП α були вибрані близько до насичення зв'язування. Вимірювання проводили при 25 °С. На фіг. 13 показано, що двовалентний 16-22-H5-scDb був здатний зв'язувати дві молекули ФНП α одночасно, тоді як моновалентний 16-22-H5-scFv, як й очікувалося, зв'язувався тільки з однією молекулою ФНП α .

20 Додатково утворення комплексів ФНП α -антитіла оцінювали при різних відношеннях ФНП α і форм антитіл 16-22-H5 із застосуванням ексклюзійної ВЕРХ. 16-22-H5-IgG (150 кДа) і 16-22-H5-scDb (52 кДа) інкубували з ФНП α (52 кДа) у різних молярних відношеннях (1:3, 1:1, 3:1) відносно кількості сайтів зв'язування. Таким чином, IgG і scDb містять 2, а ФНП α містить 3 сайти зв'язування. Суміші антитіло-ФНП α інкубували протягом щонайменше 30 хв при 37 °С, охолоджували протягом 10 хв при кімнатній температурі та зберігали протягом ночі при 2-8 °С. Від 5 до 10 мкл суміші білків з концентрацією приблизно 1 мг/мл вводили у колонку TOSHO TSKgel UP-SW3000. Аналіз проводили з 150 mM фосфатним буфером рН 6,8, 100 mM NaCl як елюентом при швидкості потоку 0,3 мл/хв. Елюйовані піки білків детектували на довжині хвилі 214 нм. Колонку заздалегідь калібрували з використанням стандартної суміші білків ВЕН450 SEC (Waters) для визначення приблизної молекулярної маси комплексів. На фіг. 14А показане утворення комплексів 16-22-H5-IgG: ФНП α . Комплекси з молекулярною масою $\geq$ 600 кДа вказують на утворення комплексів, що складаються з $\geq$ 2 молекул ФНП α і $\geq$ 3 молекул IgG. На фіг. 14В показане утворення комплексів 16-22-H5-scDb:ФНП α . Комплекси з молекулярною масою $\geq$ 300 кДа вказують на утворення комплексів, що складаються з $\geq$ 2 молекул ФНП α і $\geq$ 3 молекул scDb.

35 Приклад 6: Інгібування проліферації клітин

Здатність різних форм антитіл 16-22-H5 й адалімумабу інгібувати проліферацію мононуклеарних клітин периферичної крові (МКПК) досліджували в реакції змішаних лімфоцитів (РЗЛ). МКПК від 2 здорових донорів культивували (RPMI1640) у відношенні 1:1 в 96-ямкових планшетах протягом 48 год. при 37 °С /5 % CO₂. Після активації клітини обробляли антитілами до ФНП α або контрольним антитілом IgG (всі в кінцевій концентрації 10 мкг/мл) у шести повторностях протягом ще 5 днів при 37 °С/5 % CO₂. За 24 год. до закінчення інкубації в кожному ямку додавали бромдезоксіуридин (BrdU) (20 мкл/ямка) і визначали проліферацію шляхом визначення включення BrdU із застосуванням комерційно доступного ELISA для детекції проліферації клітин (Roche Diagnostics). Індекс стимуляції визначали шляхом розрахунку відношення включення BrdU між клітинами, що оброблені антитілами, і клітинами, що оброблені мітоміцином С (25 нг/мл). Таблиця 12 і фіг. 15 ілюструють, що всі досліджені форми антитіл 16-22-H5 значно інгібували проліферацію Т-клітин у ступені, що порівняний з адалімумабом.

Таблиця 12

	концентрація (мкг/мл)	Індекс стимуляції	
		середнє	СО
Контрольний IgG	10	5,2	0,5
Адаліумаб	10	2,6**	0,6
16-22-H5-IgG	10	2,5**	0,6
16-22-H5-scDb	10	4,1*	0,7
16-22-H5-scFv	10	4,0**	0,6

*p < 0,05; **p < 0,01

Приклад 7: Інгібування індукованої ЛПС секреції цитокінів

- Моноцити CD14⁺ у RPMI1640 висіювали у 96-ямкові планшети й інкубували протягом 16 год. при 37 °C/5 % CO₂ в інкубаторі зі зволоженням. Потім клітини обробляли антитілами до ФНП α або контрольним антитілом IgG у двох повторностях протягом 1 години із застосуванням кінцевих концентрацій антитіл, що знаходяться в діапазоні від 2 до 2000 нг/мл. Моноцити промивали три рази середовищем для культивування клітин і потім інкубували з ЛПС (100 нг/мл) протягом 4 год. при 37 °C/5 % CO₂. Концентрації ІЛ-1 β і ФНП α у супернатантах культури клітин визначали із застосуванням комерційно доступних наборів для ELISA (R&D Systems). Результати надані у таблицях 13 і 14 і на фіг. 16А і В. IC₅₀ визначали з використанням чотирьохпараметричної логістичної моделі для підбору кривої. Що стосується секреції ІЛ-1 β , значення IC₅₀ для 16-22-H5-IgG, 16-22-H5-scDb, 16-22-H5-scFv й адаліумабу наведені у таблиці 13 нижче.

Таблиця 13

Секреція ІЛ-1 β

	IC ₅₀ (пг/мл)	IC ₅₀ (нМ)
Адаліумаб	121,3	0,81
16-22-H5-IgG	81,55	0,54
16-22-H5-scDb	30,51	0,59
16-22-H5-scFv	16,98	0,65

Що стосується секреції ФНП α , значення IC₅₀, що визначені для 16-22-H5-IgG, 16-22-H5-scDb, 16-22-H5-scFv, наведені у таблиці 14.

Таблиця 14

Секреція ФНП α

	IC ₅₀ (пг/мл)	IC ₅₀ (нМ)
Адаліумаб	174,0	1,16
16-22-H5-IgG	120,5	0,80
16-22-H5-scDb	17,18	0,33
16-22-H5-scFv	13,48	0,52

Таблиця 15

Консенсусні послідовності V_K1 (перебудовані)

	Положення за Кабатом:	SEQ ID №:	Послідовність
Каркасна ділянка I	1-23	56	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC
Каркасна ділянка II	35-49	57	WYQQKPGKAPKLLIY
Каркасна ділянка III	57-88	58	GVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYC

Таблиця 16

Послідовності V_L зародкової лінії каркасної ділянки IV

SEQ ID №:	Послідовність
59	FGTGTKVTVL
60	FGGGTKLTVL
61	FGGGTQLIIL
62	FGSGTKVTVL

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

- 5 <110> Tillotts Pharma AG
- <120> Антитіла до ФНП-альфа та їх функціональні фрагменти
- 10 <130> PWO00278TIL
- <150> EP16160907.8
- <151> 2016-03-17
- 15 <160> 62
- <170> PatentIn, версія 3.5
- <210> 1
- 20 <211> 11
- <212> PRT
- <213> Штучна послідовність
- <220>
- 25 <223> CDR
- <220>
- 30 <221> ПЕРЕМІННА ОЗНАКА
- <222> (7)..(7)
- <223> Хаа являє собою Phe, Ser, Gly або Tyr
- <220>
- 35 <221> ПЕРЕМІННА ОЗНАКА
- <222> (8)..(8)
- <223> Хаа являє собою Ser, Asn, Thr або Arg
- <220>
- 40 <221> ПЕРЕМІННА ОЗНАКА
- <222> (9)..(9)
- <223> Хаа являє собою Gly, Tyr, Ala, Asn або Ser
- <400> 1
- 45 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Xaa Xaa Xaa Leu Ala
- 1 5 10

<210> 2
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 5
 <220>
 <223> CDR
 10
 <220>
 <221> ПЕРЕМІННА ОЗНАКА
 <222> (1)..(1)
 <223> Хаа являє собою Gly, Arg або Gln
 15
 <220>
 <221> ПЕРЕМІННА ОЗНАКА
 <222> (4)..(4)
 <223> Хаа являє собою Lys або Thr
 20
 <220>
 <221> ПЕРЕМІННА ОЗНАКА
 <222> (6)..(6)
 <223> Хаа являє собою Ala або Glu
 25
 <400> 2
 Хаа Ala Ser Хаа Leu Хаа Ser
 1 5
 30
 <210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 35
 <220>
 <223> CDR
 40
 <220>
 <221> ПЕРЕМІННА ОЗНАКА
 <222> (6)..(6)
 <223> Хаа являє собою Ser або Thr
 45
 <220>
 <221> ПЕРЕМІННА ОЗНАКА
 <222> (8)..(8)
 <223> Хаа являє собою Ser або Ile
 50
 <220>
 <221> ПЕРЕМІННА ОЗНАКА
 <222> (9)..(9)
 <223> Хаа являє собою Ser, Thr або Asn
 55
 <220>
 <221> ПЕРЕМІННА ОЗНАКА
 <222> (13)..(13)
 <223> Хаа являє собою Ser або Phe
 60
 <220>
 <221> ПЕРЕМІННА ОЗНАКА
 <222> (14)..(14)
 <223> Хаа являє собою Tyr, Phe, Leu або Val
 65
 <400> 3
 Gln Ser Tyr Tyr Tyr Хаа Ser Хаа Хаа Ser Asp Gly Хаа Хаа Ala
 1 5 10 15
 70

<210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 5
 <220>
 <223> CDR

 10 <220>
 <221> ПЕРЕМІННА ОЗНАКА
 <222> (5)..(5)
 <223> Хаа являє собою Asn або Ser

 15 <220>
 <221> ПЕРЕМІННА ОЗНАКА
 <222> (6)..(6)
 <223> Хаа являє собою Asn або Thr

 20 <220>
 <221> ПЕРЕМІННА ОЗНАКА
 <222> (10)..(10)
 <223> Хаа являє собою Gly, Cys або Ser

 25 <400> 4
 Gly Ile Asp Phe Хаа Хаа Tyr Gly Ile Хаа
 1 5 10

 30 <210> 5
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 35
 <220>
 <223> CDR

 40 <220>
 <221> ПЕРЕМІННА ОЗНАКА
 <222> (7)..(7)
 <223> Хаа являє собою Ala або Gly

 45 <220>
 <221> ПЕРЕМІННА ОЗНАКА
 <222> (9)..(9)
 <223> Хаа являє собою Thr або Arg

 50 <220>
 <221> ПЕРЕМІННА ОЗНАКА
 <222> (11)..(11)
 <223> Хаа являє собою Phe або Tyr

 55 <220>
 <221> ПЕРЕМІННА ОЗНАКА
 <222> (13)..(13)
 <223> Хаа являє собою Asn або His

 60 <220>
 <221> ПЕРЕМІННА ОЗНАКА
 <222> (15)..(15)
 <223> Хаа являє собою Val або Leu

 65 <400> 5
 Tyr Ile Tyr Pro Gly Phe Хаа Ile Хаа Asn Хаа Ala Хаа Ser Хаа Lys
 1 5 10 15

 70

Gly

5 <210> 6
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

10 <220>
 <223> CDR

15 <220>
 <221> ПЕРЕМІННА ОЗНАКА
 <222> (3)..(3)
 <223> Хаа являє собою Val, Ile або Leu

20 <220>
 <221> ПЕРЕМІННА ОЗНАКА
 <222> (5)..(5)
 <223> Хаа являє собою Ala або Ser

25 <220>
 <221> ПЕРЕМІННА ОЗНАКА
 <222> (6)..(6)
 <223> Хаа являє собою Thr або Ser

30 <220>
 <221> ПЕРЕМІННА ОЗНАКА
 <222> (7)..(7)
 <223> Хаа являє собою Asp або Ser

35 <220>
 <221> ПЕРЕМІННА ОЗНАКА
 <222> (8)..(8)
 <223> Хаа являє собою Trp або Ser

40 <220>
 <221> ПЕРЕМІННА ОЗНАКА
 <222> (9)..(9)
 <223> Хаа являє собою Gly або Ala

45 <220>
 <221> ПЕРЕМІННА ОЗНАКА
 <222> (11)..(11)
 <223> Хаа являє собою Phe, Leu або Tyr

50 <220>
 <221> ПЕРЕМІННА ОЗНАКА
 <222> (12)..(12)
 <223> Хаа являє собою Asp або Asn

55 <400> 6
 Asp Pro Хаа Tyr Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Tyr Хаа Хаа Leu
 1 5 10

60 <210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

65 <220>
 <223> CDR

<400> 7

70 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Phe Ser Gly Leu Ala

	1	5	10
5	<210> 8 <211> 7 <212> PRT <213> Штучна послідовність		
10	<220> <223> CDR <400> 8		
15	Gly Ala Ser Lys Leu Ala Ser 1 5		
20	<210> 9 <211> 15 <212> PRT <213> Штучна послідовність		
25	<220> <223> CDR <400> 9		
30	Gln Ser Tyr Tyr Tyr Ser Ser Ser Ser Ser Asp Gly Ser Tyr Ala 1 5 10 15		
35	<210> 10 <211> 10 <212> PRT <213> Штучна послідовність		
40	<220> <223> CDR <400> 10		
45	Gly Ile Asp Phe Asn Asn Tyr Gly Ile Gly 1 5 10		
50	<210> 11 <211> 17 <212> PRT <213> Штучна послідовність		
55	<220> <223> CDR <400> 11		
60	Tyr Ile Tyr Pro Gly Phe Ala Ile Thr Asn Phe Ala Asn Ser Val Lys 1 5 10 15		
65	Gly		
70	<210> 12 <211> 13 <212> PRT <213> Штучна послідовність		
	<220> <223> CDR		

<400> 12

5 Asp Pro Val Tyr Ala Thr Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 13
<211> 122
10 <212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> гуманізований домен VH клону 16-22-H05-sc02 і клону
15 16-22-H05-sc04

<400> 13

20 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ile Asp Phe Asn Asn Tyr
25 20 25 30

Gly Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

30 Thr Tyr Ile Tyr Pro Gly Phe Ala Ile Thr Asn Phe Ala Asn Ser Val
50 55 60

35 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

40 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Pro Val Tyr Ala Thr Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Leu Trp
100 105 110

45 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

50 <210> 14
<211> 114
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

55 <220>
<223> гуманізований домен VL клону 16-22-H05-sc02

<400> 14

60 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

65 Asp Arg Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Phe Ser Gly
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

70

Tyr Gly Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 5
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 10
 Ala Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Tyr Tyr Ser Ser Ser
 85 90 95
 15
 Ser Ser Asp Gly Ser Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val
 100 105 110
 20
 Leu Gly
 25
 <210> 15
 <211> 257
 <212> PRT
 <213> штучна послідовність
 30
 <220>
 <223> гуманізований scFv клону 16-22-H05-sc02
 <400> 15
 Met Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 35
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Phe Ser
 20 25 30
 40
 Gly Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60
 50
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80
 55
 Pro Ala Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Tyr Tyr Ser Ser
 85 90 95
 60
 Ser Ser Ser Asp Gly Ser Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
 100 105 110
 65
 Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 70
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
 130 135 140
 Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser
 145 150 155 160

Gly Ile Asp Phe Asn Asn Tyr Gly Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro
 165 170 175
 5
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Thr Tyr Ile Tyr Pro Gly Phe Ala Ile
 180 185 190
 10
 Thr Asn Phe Ala Asn Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp
 195 200 205
 15
 Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
 210 215 220
 20
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Val Tyr Ala Thr Ser
 225 230 235 240
 Ser Gly Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 245 250 255
 25
 Ser
 30
 <210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 35
 <220>
 <223> CDR
 <400> 16
 40
 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr Leu Ala
 1 5 10
 45
 <210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 50
 <220>
 <223> CDR
 <400> 17
 55
 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Ala Leu Ala
 1 5 10
 60
 <210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 65
 <220>
 <223> CDR
 <400> 18
 70
 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Arg Asn Leu Ala
 1 5 10

5 <210> 19
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 10 <220>
 <223> CDR
 <400> 19

 15 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Ser Leu Ala
 1 5 10

 20 <210> 20
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 25 <220>
 <223> CDR
 <400> 20

 30 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Ser Gly Leu Ala
 1 5 10

 35 <210> 21
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 40 <220>
 <223> CDR
 <400> 21

 45 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Asn Leu Ala
 1 5 10

 50 <210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 55 <220>
 <223> CDR
 <400> 22

 60 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Ser Leu Ala
 1 5 10

 65 <210> 23
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 70 <220>
 <223> CDR
 <400> 23

 Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5

5 <210> 24
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 10 <220>
 <223> CDR
 <400> 24

 Arg Ala Ser Thr Leu Glu Ser
 1 5
 15

 20 <210> 25
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> CDR
 25 <400> 25

 Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser
 1 5
 30
 <210> 26
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 35
 <220>
 <223> CDR
 <400> 26
 40
 Arg Ala Ser Lys Leu Ala Ser
 1 5

 45 <210> 27
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 50
 <220>
 <223> CDR
 <400> 27
 55 Gln Ser Tyr Tyr Tyr Ser Ser Ser Ser Ser Asp Gly Phe Phe Ala
 1 5 10 15

 60 <210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 65 <220>
 <223> CDR
 <400> 28
 70 Gln Ser Tyr Tyr Tyr Ser Ser Ser Ser Ser Asp Gly Ser Phe Ala
 1 5 10 15

5 <210> 29
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 10 <220>
 <223> CDR
 <400> 29

 15 Gln Ser Tyr Tyr Tyr Ser Ser Ser Asn Ser Asp Gly Ser Leu Ala
 1 5 10 15

 20 <210> 30
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 25 <220>
 <223> CDR
 <400> 30

 30 Gln Ser Tyr Tyr Tyr Ser Ser Ile Ser Ser Asp Gly Ser Tyr Ala
 1 5 10 15

 35 <210> 31
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 40 <220>
 <223> CDR
 <400> 31

 45 Gln Ser Tyr Tyr Tyr Ser Ser Ser Ser Ser Asp Gly Ser Val Ala
 1 5 10 15

 50 <210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 55 <220>
 <223> CDR
 <400> 32

 60 Gln Ser Tyr Tyr Tyr Thr Ser Ser Thr Ser Asp Gly Ser Tyr Ala
 1 5 10 15

 65 <210> 33
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 70 <220>
 <223> CDR
 <400> 33

 Gly Ile Asp Phe Ser Asn Tyr Gly Ile Cys
 1 5 10

5 <210> 34
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 10 <220>
 <223> CDR
 <400> 34

 Gly Ile Asp Phe Ser Asn Tyr Gly Ile Ser
 1 5 10
 15

 20 <210> 35
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> CDR
 25 <400> 35

 Gly Ile Asp Phe Ser Thr Tyr Gly Ile Ser
 1 5 10
 30
 <210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 35
 <220>
 <223> CDR

 <400> 36
 40
 Gly Ile Asp Phe Ser Asn Tyr Gly Ile Gly
 1 5 10

 45 <210> 37
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 50 <220>
 <223> CDR
 <400> 37

 55 Tyr Ile Tyr Pro Gly Phe Gly Ile Thr Asn Tyr Ala Asn Ser Val Lys
 1 5 10 15

 60 Gly

 65 <210> 38
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> CDR
 70

<400> 38

5 Tyr Ile Tyr Pro Gly Phe Gly Ile Arg Asn Tyr Ala His Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

10

<210> 39

<211> 17

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

15

<220>

<223> CDR

<400> 39

20

Tyr Ile Tyr Pro Gly Phe Gly Ile Arg Asn Tyr Ala Asn Ser Leu Lys
1 5 10 15

25

Gly

30

<210> 40

<211> 17

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

35

<220>

<223> CDR

<400> 40

40

Tyr Ile Tyr Pro Gly Phe Ala Ile Arg Asn Tyr Ala Asn Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

45

<210> 41

<211> 17

<212> PRT

50

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR

55

<400> 41

Tyr Ile Tyr Pro Gly Phe Gly Ile Thr Asn Phe Ala Asn Ser Val Lys
1 5 10 15

60

Gly

65

<210> 42

<211> 13

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

70

<220>

<223> CDR
 <400> 42
 5 Asp Pro Ile Tyr Ala Ser Ser Ser Gly Tyr Leu Asp Leu
 1 5 10
 <210> 43
 10 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 15 <223> CDR
 <400> 43
 20 Asp Pro Val Tyr Ser Ser Asp Trp Gly Tyr Phe Asn Leu
 1 5 10
 <210> 44
 25 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 30 <223> CDR
 <400> 44
 35 Asp Pro Val Tyr Ala Ser Ser Ser Gly Tyr Leu Asp Leu
 1 5 10
 <210> 45
 40 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 45 <223> CDR
 <400> 45
 50 Asp Pro Leu Tyr Ala Thr Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10
 <210> 46
 55 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 60 <223> CDR
 <400> 46
 65 Asp Pro Val Tyr Ala Ser Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10
 <210> 47
 70 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>

<223> CDR
 <400> 47

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

10 <210> 48
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

15 <220>
 <223> CDR
 <400> 48

20 Asp Pro Leu Tyr Ser Thr Ser Ser Gly Tyr Phe Asn Leu
 1 5 10

25 <210> 49
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

30 <220>
 <223> лінкерна послідовність у scFv
 <400> 49

35 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
 20

40 <210> 50
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

45 <220>
 <223> лінкерна послідовність діатіла
 <400> 50

50 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

55 <210> 51
 <211> 503
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

60 <220>
 <223> Гуманізоване діатіло клону 16-22-H05
 <400> 51

65 Met Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15

70 Gly Asp Arg Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Phe Ser
 20 25 30

5 Gly Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 10 Ile Tyr Gly Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60
 15 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80
 20 Pro Ala Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Tyr Tyr Ser Ser
 85 90 95
 25 Ser Ser Ser Asp Gly Ser Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
 100 105 110
 30 Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 115 120 125
 35 Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala
 130 135 140
 40 Ser Gly Ile Asp Phe Asn Asn Tyr Gly Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala
 145 150 155 160
 45 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Thr Tyr Ile Tyr Pro Gly Phe Ala
 165 170 175
 50 Ile Thr Asn Phe Ala Asn Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser
 180 185 190
 55 Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 195 200 205
 60 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Val Tyr Ala Thr
 210 215 220
 65 Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 225 230 235 240
 70 Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 245 250 255
 75 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 260 265 270
 80 Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
 275 280 285
 85 Gln Ser Ile Phe Ser Gly Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 290 295 300

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val
305 310 315 320

5 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
325 330 335

10 Ile Ser Gly Leu Gln Pro Ala Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser
340 345 350

15 Tyr Tyr Tyr Ser Ser Ser Ser Ser Asp Gly Ser Tyr Ala Phe Gly Gly
355 360 365

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
370 375 380

20 Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
385 390 395 400

25 Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ile Asp Phe Asn Asn Tyr Gly Ile Gly
405 410 415

30 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Thr Tyr Ile
420 425 430

35 Tyr Pro Gly Phe Ala Ile Thr Asn Phe Ala Asn Ser Val Lys Gly Arg
435 440 445

Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met
450 455 460

40 Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp
465 470 475 480

45 Pro Val Tyr Ala Thr Ser Ser Gly Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly
485 490 495

50 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
500

<210> 52
<211> 221
55 <212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> легкий ланцюг гуманізованого IgG клону 16-22-H05
60 <400> 52

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

65 Asp Arg Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Phe Ser Gly
20 25 30

70

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 5 Tyr Gly Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 10 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 15 Ala Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Tyr Tyr Ser Ser Ser
 85 90 95
 Ser Ser Asp Gly Ser Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val
 100 105 110
 20 Leu Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
 115 120 125
 25 Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
 130 135 140
 30 Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
 145 150 155 160
 35 Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
 165 170 175
 Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
 180 185 190
 40 Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
 195 200 205
 45 Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220
 <210> 53
 50 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 55 <223> важкий ланцюг гуманізованого IgG клону 16-22-H05
 <400> 53
 60 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ile Asp Phe Asn Asn Tyr
 20 25 30
 65 Gly Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 70

	Thr	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Gly	Phe	Ala	Ile	Thr	Asn	Phe	Ala	Asn	Ser	Val
	50						55					60				
5	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr
	65					70					75					80
10	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85						90					95	
15	Ala	Arg	Asp	Pro	Val	Tyr	Ala	Thr	Ser	Ser	Gly	Tyr	Phe	Asp	Leu	Trp
				100					105					110		
20	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
			115					120					125			
25	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr
		130					135					140				
30	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
	145					150					155					160
35	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
				165						170					175	
40	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr
				180					185					190		
45	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn
			195					200					205			
50	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser
		210					215					220				
55	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
	225					230					235					240
60	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Gln	Leu
					245					250					255	
65	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
				260					265					270		
70	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu
			275					280					285			
75	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr
		290					295					300				
80	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn
	305					310					315					320
85	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro
					325					330					335	

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 5 340 345 350
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 10 355 360 365
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 15 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 20 385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 25 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 30 420 425 430
 Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 35 435 440 445
 Ser Pro Gly Lys
 40 450
 <210> 54
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 45 <220>
 <223> гуманізований VL клону 16-22-H05-sc04
 <400> 54
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 50 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Phe Ser Gly
 55 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 60 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 65 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro
 70 65 70 75 80
 Ala Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Tyr Tyr Ser Ser Ser
 85 90 95
 Ser Ser Asp Gly Ser Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val
 100 105 110

Leu Gly

5

<210> 55

<211> 257

<212> PRT

10 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> гуманізований scFv клону 16-22-H05-sc04

15 <400> 55

Met Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

20

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Phe Ser
20 25 30

25

Gly Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

30

Ile Tyr Gly Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

35

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Pro Ala Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Tyr Tyr Ser Ser
85 90 95

40

Ser Ser Ser Asp Gly Ser Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
100 105 110

45

Val Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

50

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
130 135 140

55

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser
145 150 155 160

Gly Ile Asp Phe Asn Asn Tyr Gly Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro
165 170 175

60

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Thr Tyr Ile Tyr Pro Gly Phe Ala Ile
180 185 190

65

Thr Asn Phe Ala Asn Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp
195 200 205

70

Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
210 215 220

5 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Val Tyr Ala Thr Ser
 225 230 235 240
 Ser Gly Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 245 250 255
 10 Ser
 15 <210> 56
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 20 <220>
 <223> Консенсусна послідовність Vkl каркасної ділянки I (положення за
 Кабатом 1-23)
 <400> 56
 25 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 30 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20
 35 <210> 57
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 40 <223> Консенсусна послідовність Vkl каркасної ділянки II (положення за
 Кабатом 35-49)
 <400> 57
 45 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15
 50 <210> 58
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 55 <223> Консенсусна послідовність Vkl каркасної ділянки III (положення за
 Кабатом 57-88)
 <400> 58
 60 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 65 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30
 70 <210> 59
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Послідовність V лямбда зародкової лінії каркасної ділянки IV
 5 <400> 59
 Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 1 5 10
 10
 <210> 60
 <211> 10
 <212> PRT
 15 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Послідовність V лямбда зародкової лінії каркасної ділянки IV
 20 <400> 60
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 1 5 10
 25
 <210> 61
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 30
 <220>
 <223> Послідовність V лямбда зародкової лінії каркасної ділянки IV
 <400> 61
 35
 Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Ile Ile Leu
 1 5 10
 40
 <210> 62
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 45
 <220>
 <223> Послідовність V лямбда зародкової лінії каркасної ділянки IV
 <400> 62
 50
 Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 1 5 10

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 55 1. Антитіло або його функціональний фрагмент, яке (який) зв'язується з фактором некрозу пухлини альфа (ФНП α) людини, де зазначене антитіло або його функціональний фрагмент містить:
 (i) домен VL, який має амінокислотну послідовність, що вибрана з SEQ ID NO:14 і SEQ ID NO:54,
 i
 60 (ii) домен VH, який має амінокислотну послідовність, що представлена у SEQ ID NO:13.
 2. Антитіло або його функціональний фрагмент за п. 1, де зазначене антитіло або його функціональний фрагмент:
 (i) зв'язується з ФНП α людини з константою дисоціації (KD) менше 125 нМ;
 (ii) має перехресну реактивність з ФНП α *Macaca mulatta* (макака-резус) та ФНП α *Macaca fascicularis* (яванського макака);
 65 (iii) має більш високу здатність пригнічувати індукований ФНП α апоптоз у порівнянні з інфліксимабом при визначенні за допомогою аналізу з L929;

(iv) містить варіабельний домен, який має температуру плавлення, що визначена за допомогою диференціальної скануючої флуориметрії, яка становить щонайменше 70 °C, і/або
(v) здатне(ий) зв'язуватися з ФНП_αтример людини у стехіометричному співвідношенні (антитіло:ФНП_αтример), що становить щонайменше 2.

5 3. Антитіло або його функціональний фрагмент за будь-яким із попередніх пунктів, яке (який) зв'язується з ФНП_α людини з KD менше 50 пМ.

4. Функціональний фрагмент за будь-яким із попередніх пунктів, який являє собою одноланцюговий варіабельний фрагмент (scFv).

10 5. Функціональний фрагмент за п. 4, де зазначений scFv має амінокислотну послідовність, що представлена у SEQ ID NO:15 або SEQ ID NO:55.

6. Антитіло за будь-яким із пп. 1-3, яке являє собою імуноглобулін G (IgG).

15 7. Антитіло або його функціональний фрагмент за будь-яким із попередніх пунктів, де сума (i) кількості амінокислот у каркасних ділянках I-III варіабельного домену легкого ланцюга зазначеного антитіла або його функціонального фрагмента, які відрізняються від відповідних консенсусних послідовностей Vk1 людини з SEQ ID NO:56-58, і (ii) кількості амінокислот у каркасній ділянці IV варіабельного домену легкого ланцюга зазначеного антитіла або його функціонального фрагмента, які відрізняються від найбільш схожої послідовності λ зародкової лінії людини, що вибрана з SEQ ID NO:59-62, становить менше 7, переважно менше 4.

20 8. Антитіло або його функціональний фрагмент за будь-яким із попередніх пунктів, де зазначені каркасні ділянки I-III варіабельного домену легкого ланцюга зазначеного антитіла або його функціонального фрагмента складаються з консенсусних послідовностей Vk1 людини з SEQ ID NO:56-58, відповідно, а каркасна ділянка IV складається з послідовності λ зародкової лінії людини, що вибрана з SEQ ID NO:59-62.

25 9. Нуклеїнова кислота, яка кодує антитіло або його функціональний фрагмент за будь-яким із попередніх пунктів.

10. Вектор або плазміда, які містять нуклеїнову кислоту за п. 9.

11. Клітина, яка містить нуклеїнову кислоту за п. 9 або вектор, або плазмід за п. 10.

30 12. Спосіб одержання антитіла або його функціонального фрагмента за будь-яким із пп. 1-8, який включає культивування клітини за п. 11 у середовищі за умов, що забезпечують можливість експресії нуклеїнової кислоти, яка кодує зазначене антитіло або його функціональний фрагмент, і виділення антитіла або його функціонального фрагмента із зазначених клітин або середовища.

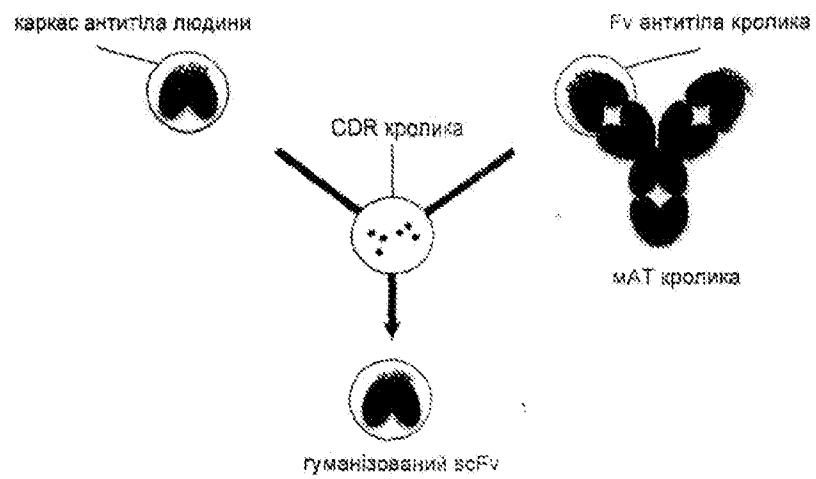
35 13. Фармацевтична композиція, яка містить антитіло або його функціональний фрагмент за будь-яким із пп. 1-8 і, необов'язково, фармацевтично прийнятний носій та/або допоміжну речовину.

14. Антитіло або його функціональний фрагмент за будь-яким із пп. 1-8 для застосування у способі лікування запального розладу або розладу, що поєднаний з ФНП_α.

15. Антитіло або його функціональний фрагмент для застосування за п. 14, де зазначений запальний розлад являє собою запальний розлад шлунково-кишкового тракту.

40 16. Антитіло або його функціональний фрагмент для застосування за п. 15, де зазначений запальний розлад шлунково-кишкового тракту являє собою запальне захворювання кишечника.

17. Антитіло або його функціональний фрагмент для застосування за п. 15 або 16, де зазначений запальний розлад шлунково-кишкового тракту являє собою хворобу Крона або виразковий коліт.



Фіг.1

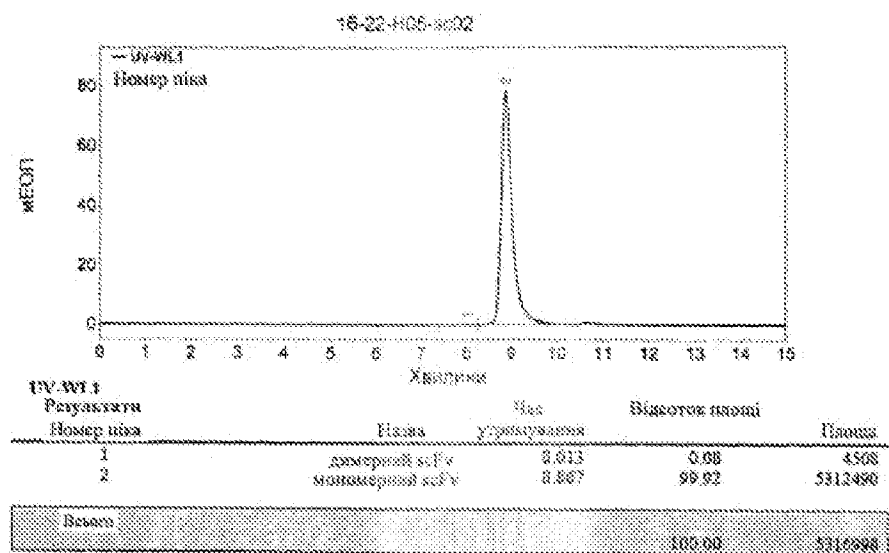
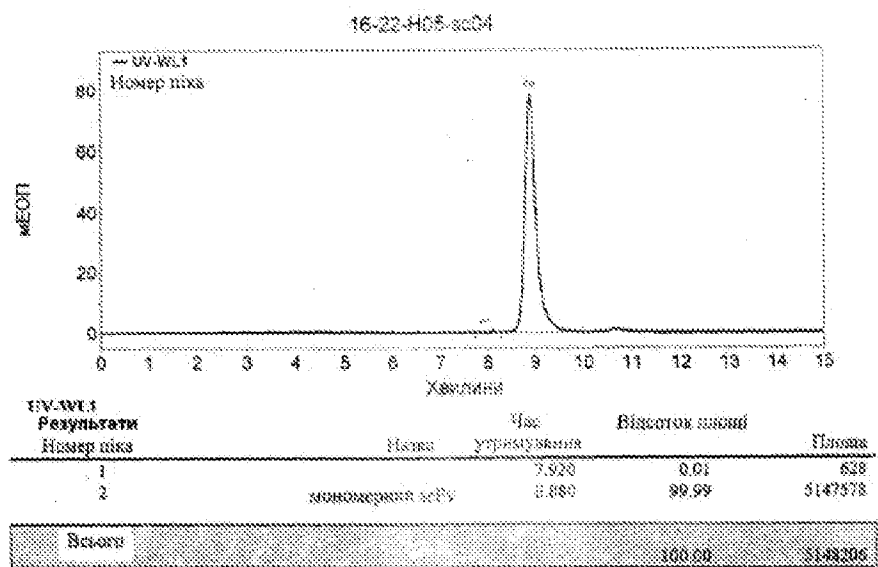


Fig.2

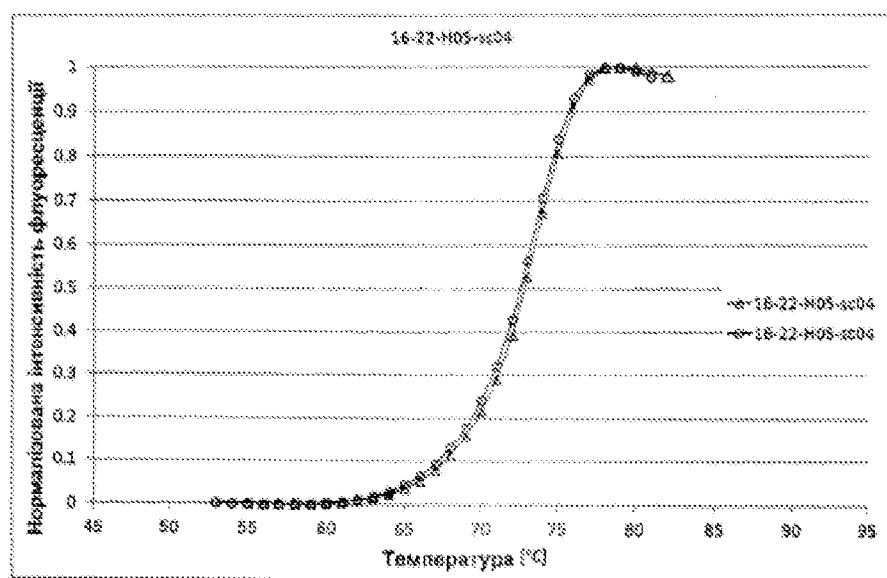
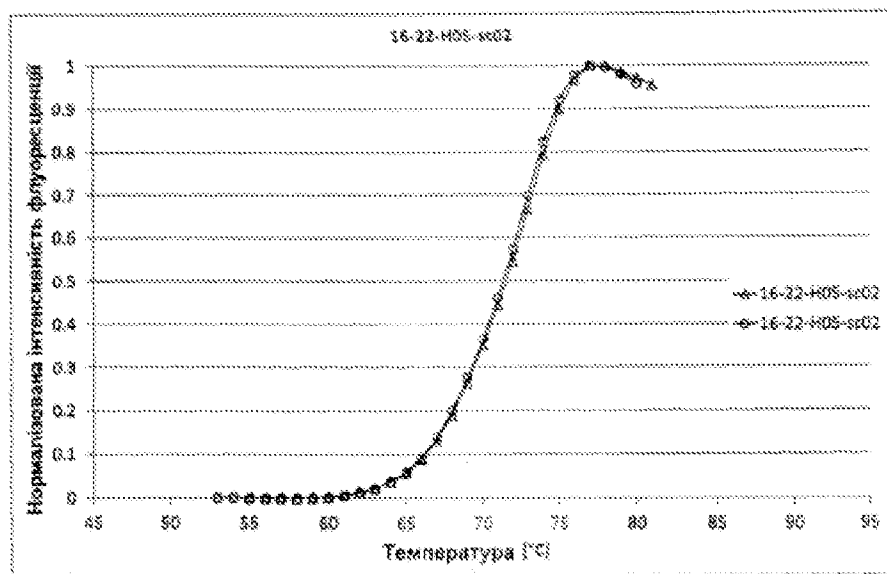


Fig.3

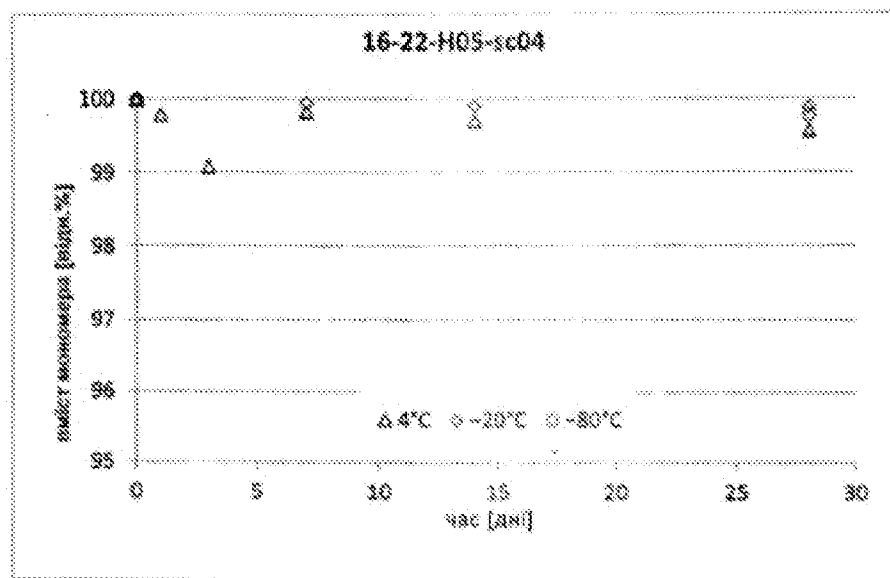
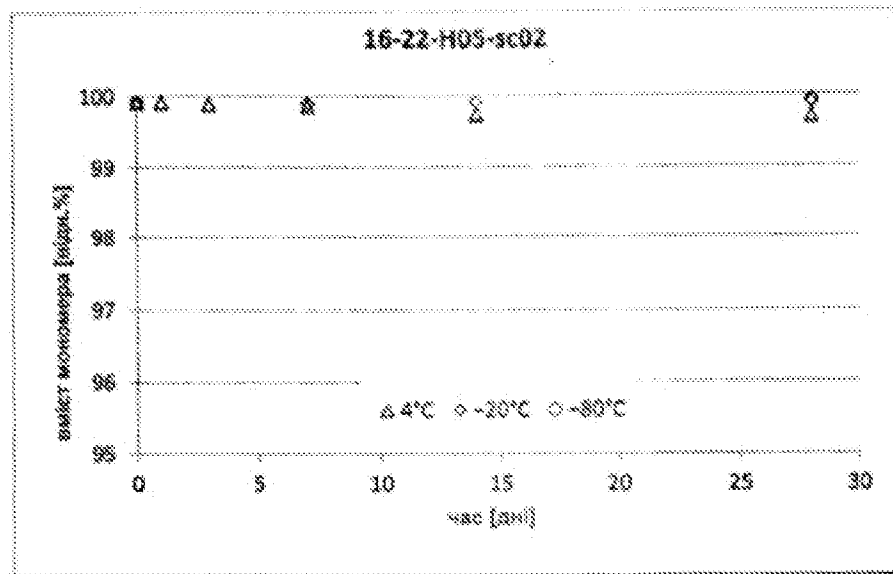
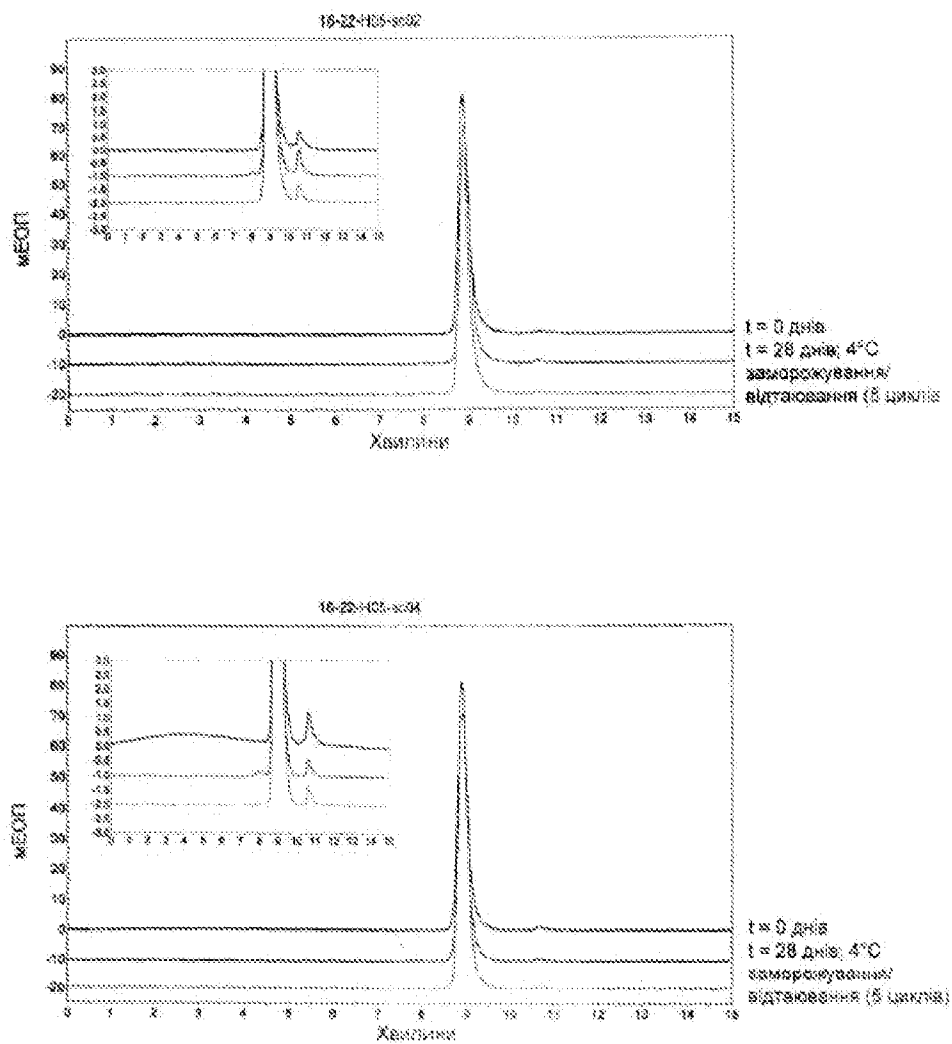
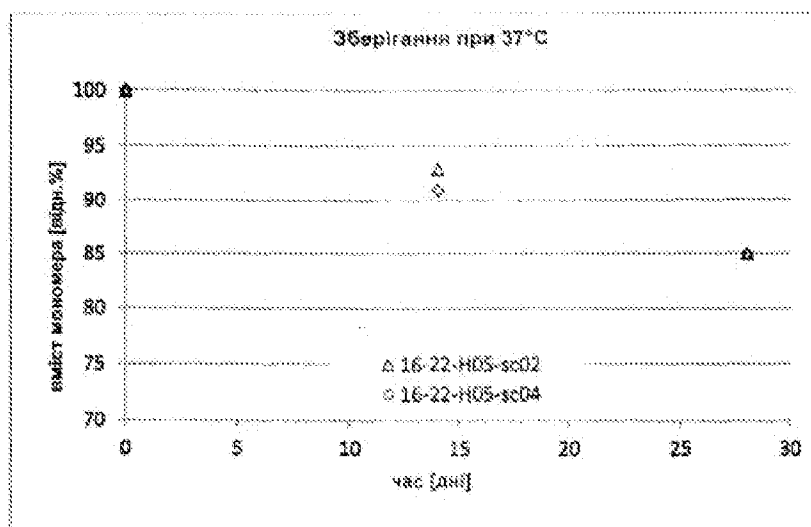


Fig.4



Фіг.5



Фіг.6

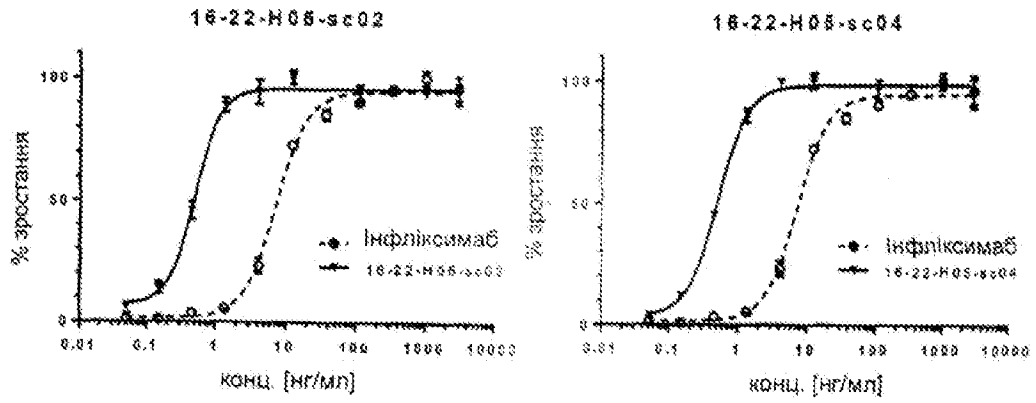


Fig.7

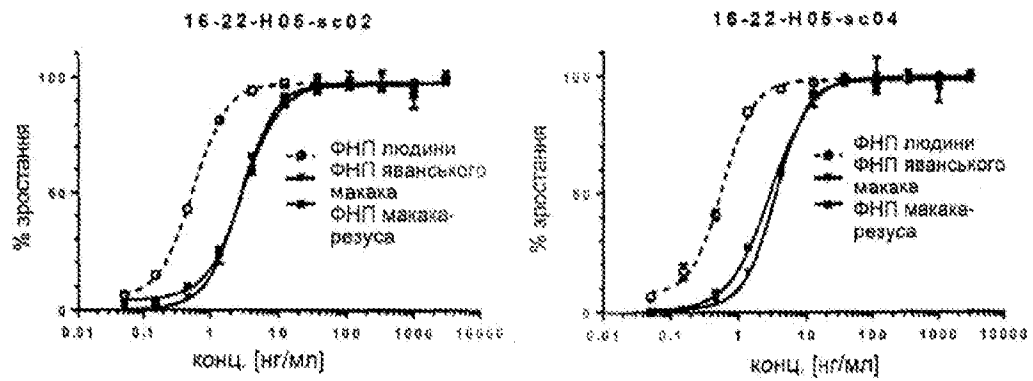


Fig.8

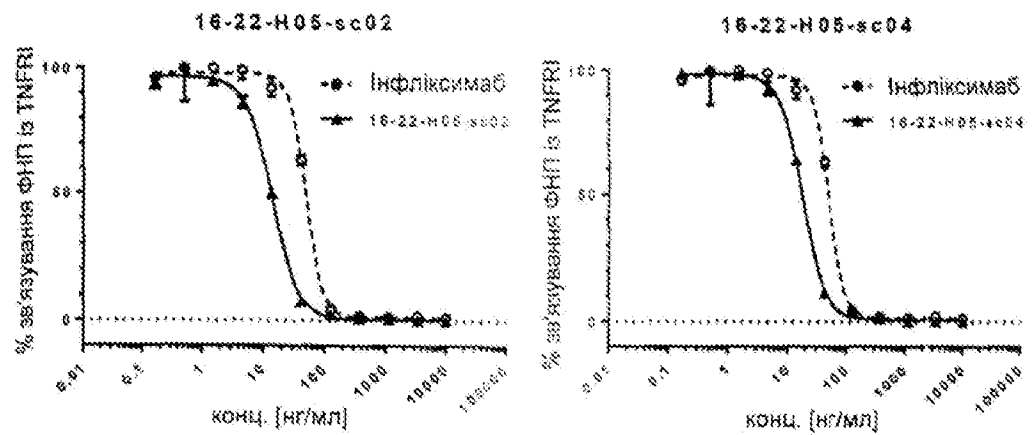
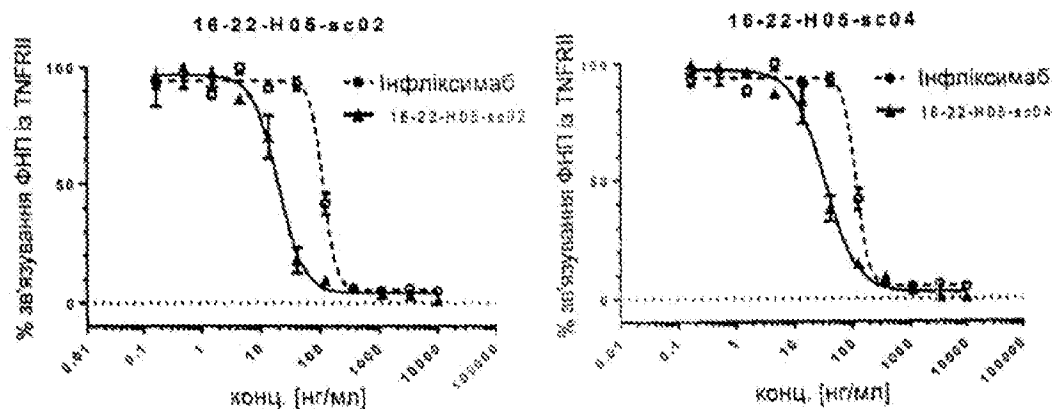
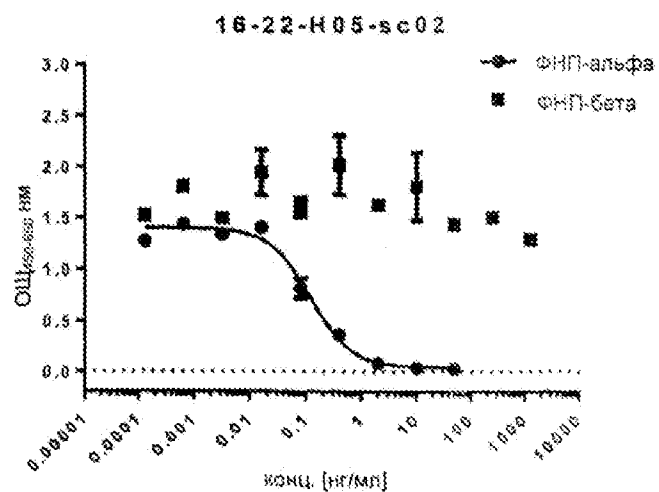


Fig.9



Фіг.10



Фіг.11

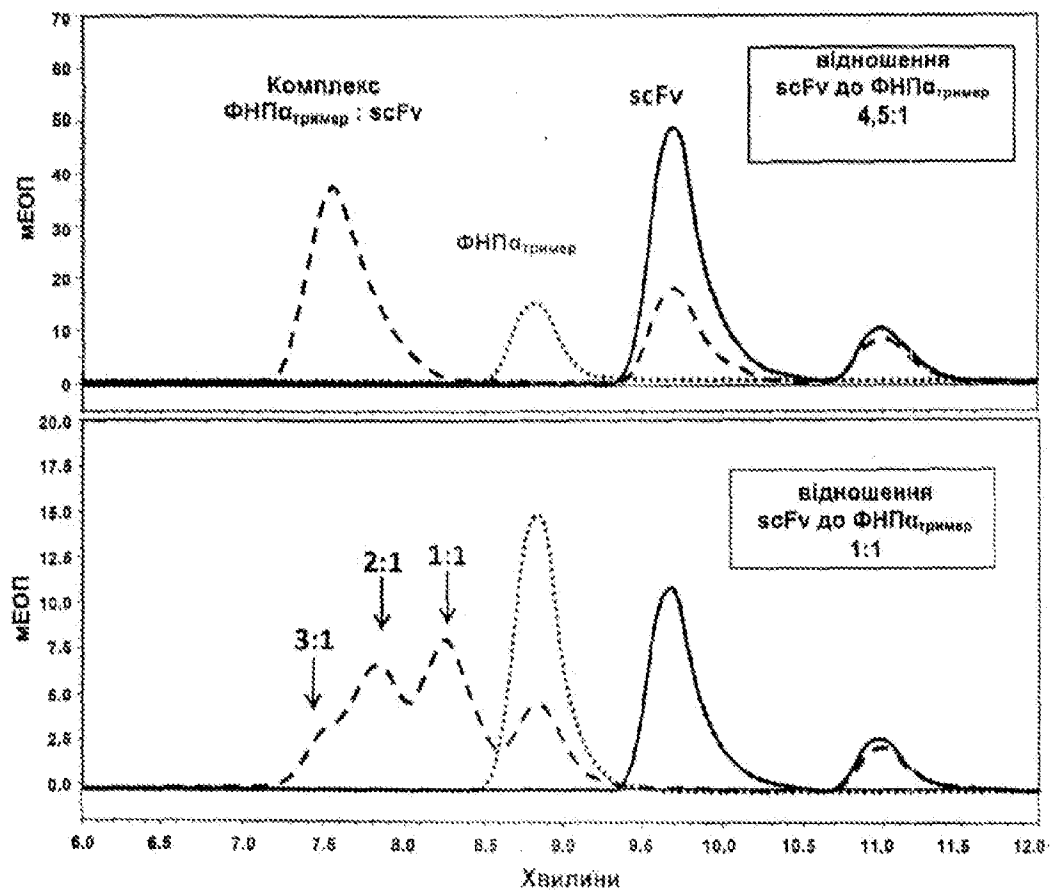
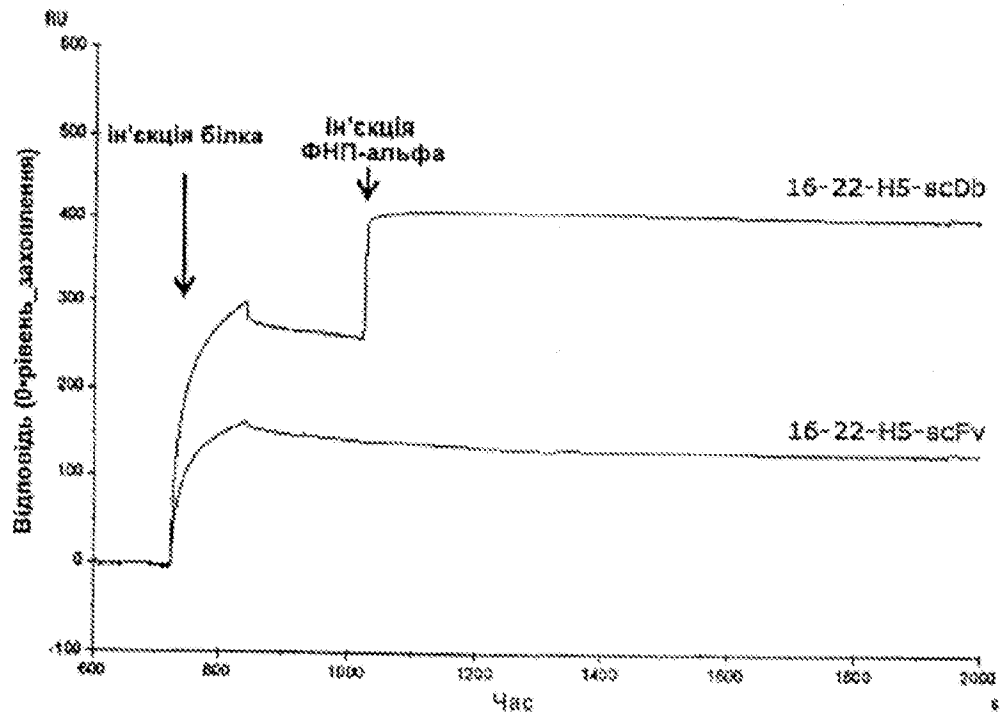
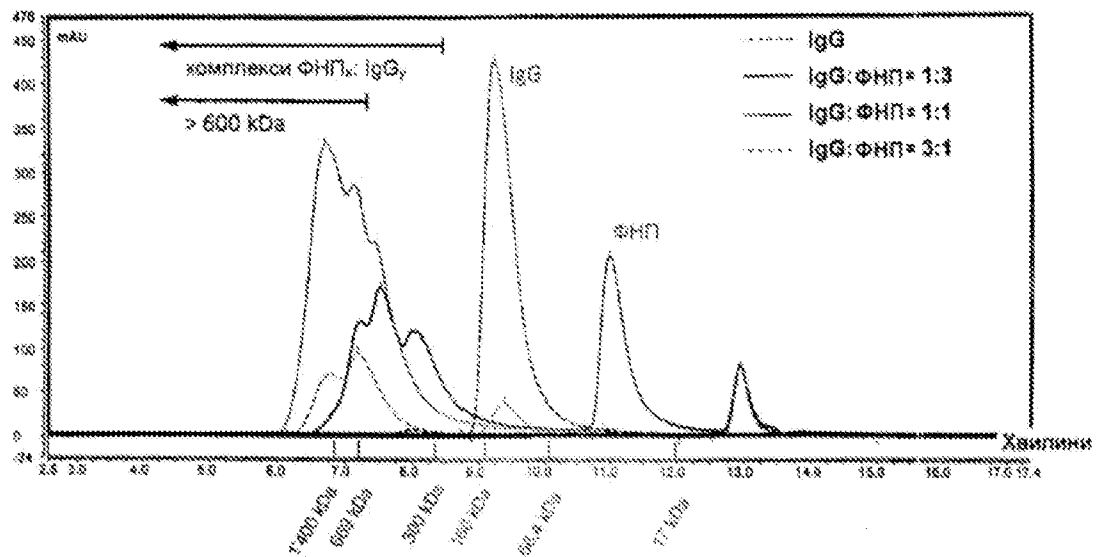


Fig.12



Фіг.13



Фіг.14А

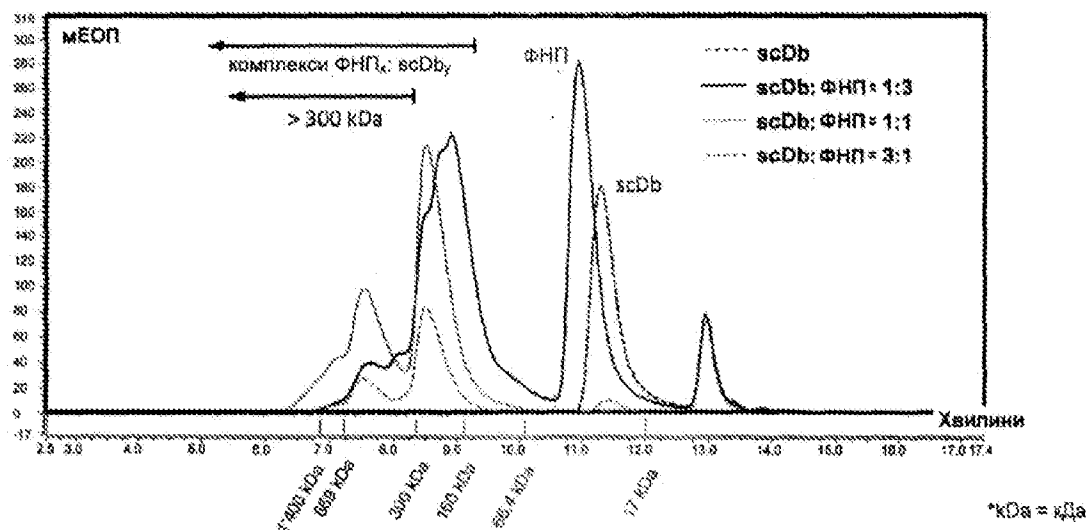


Fig.14B

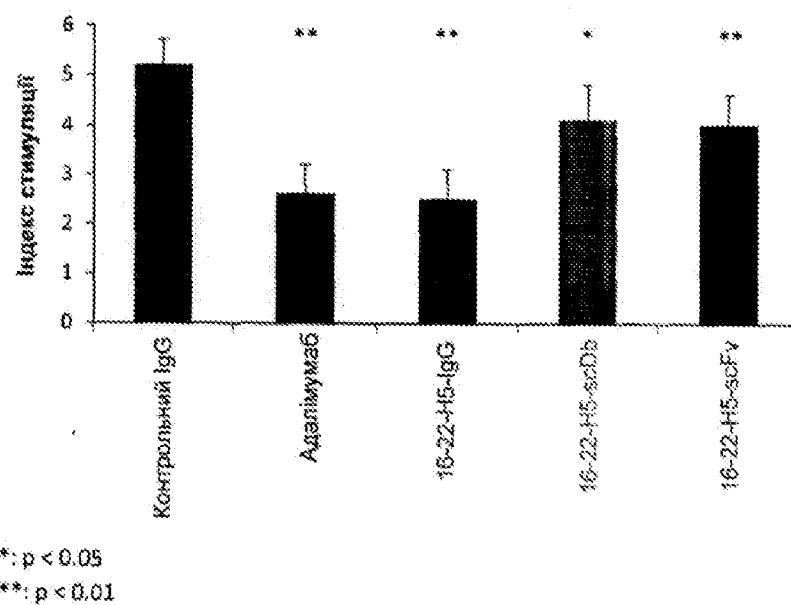
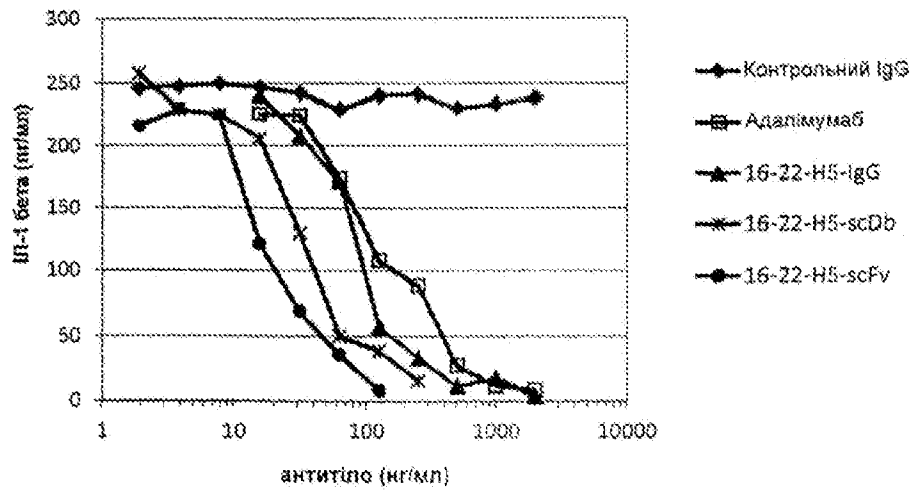
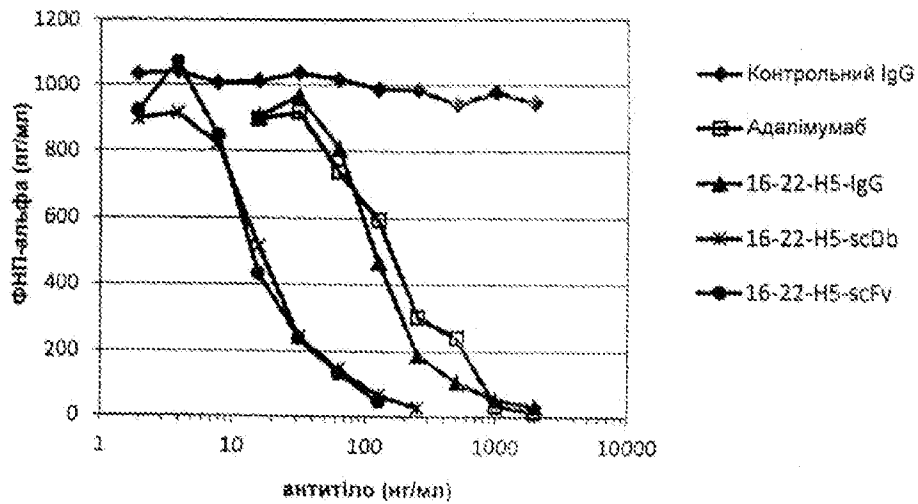


Fig.15



Фіг.16А



Фіг.16В