

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) BG

(11) 107045 A
7(51) C 07 K 16/00

ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ
ЗА
ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 107045

(22) Заявено на 02.09.2002

(24) Начало на действие
на патента от:

Приоритетни данни

(31) 181608 (32) 10.02.2000 (33) US

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 5 на 30.05.2003

(45) Отпечатано на

(46) Публикувано в бюлетин №
на

(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(71) Заявител(и):

ABBOTT LABORATORIES
ABBOTT PARK, IL (US)

(72) Изобретател(и):

Tariq Ghayur, Holliston, MA
Richard W. Dixon, North Grafton, MA
Michael Roguska, Ashland, MA
Michael White, Framingham, MA
Boris Labkovsky, Marlborough, MA
Jochen G. Salfeld, North Grafton, MA (US)
Alexander Robert Duncan,
Simon Mark Brocklehurst, Cambridge (GB)
John Mankovich, Andover, MA (US)
Celia Patricia Shorrock,
Julia Elizabeth Thompson, Cambridge
Simon Nicholas Lennard, Cambridgeshire (GB)

(74) Представител по индустриална
собственост:

Георги Цветанов Перев, 1124 София,
ул. "Леонардо да Винчи" 3

(86) № и дата на PCT заявка:

PCT/US01/04170, 09.02.2001

(87) № и дата на PCT публикация:

WO01/58956, 16.08.2001

(54) АНТИТЕЛА, КОИТО СЕ СВЪРЗВАТ С ЧОВЕШКИ ИНТЕРЛЕВКИН-18, МЕТОДИ ЗА ПОЛУЧАВАНЕТО И ИЗПОЛЗВАНЕТО ИМ

(57) Антителата се свързват с човешки интерлевкин-18 (hIL-18), по-специално с епитопа(ите) на човешки IL-18. Те могат да бъдат изцяло човешки, рекомбинантни или моноклонални антитела. Предпочитаните антитела имат висок афинитет към hIL-18 и неутрализират активността на hIL-18 in vitro и in vivo. Антитялото съгласно изобретението може да бъде с пълната дължина на антитяло или антигенсвързваща негова част. Изобретението се отнася също до метод за получаване и до метод за използване на посочените антитела. Антителата или частите от тях се използват в медицината за детекция на hIL-18 и за инхибиране на активността на hIL-18, например при пациенти, страдащи от заболявания, при които активността на hIL-18 е вредна.

60 претенции, 5 фигури

BG 107045 A

**АНТИТЕЛА, КОИТО СЕ СВЪРЗВАТ С ЧОВЕШКИ
ИНТЕРЛЕВКИН-18 И МЕТОДИ ЗА ПОЛУЧАВАНЕ И
ИЗПОЛЗВАНЕ**

СХОДНИ ЗАЯВКИ

Тази заявка е не-временна заявка, претендираща за предимство с U.S. временен Сериен Номер 60/181,608, подадена на 10 Февруари 2000, озаглавена "Антитела, които се свързват с човешки интерлевкин-18 и методи за получаване и използване", съдържанието на която е въведено тук в литературата. Също така, съдържанията на всички цитирани източници, включително литературни източници, приети патенти и публикувани патентни заявки, цитирани в тази заявка са изрично включени тук в литературата.

ПРЕДШЕСТВАЩО НИВО НА ТЕХНИКАТА

Интерлевкин-18 (IL-18) първоначално е описан през 1989, като интерферон-гама индуциращ фактор (IGIF) и е про-възпалителен цитокин с разнообразни функции, освен това че индуцира интерферон гама. Тези биологични свойства включват активирането на NF-kb, експресията на Fas лиганд, индуцирането на CC и CXC хемокини и увеличена продукция на конкурентен вирус на човешкия имунодефицит.

Поради способността на IL-18 да индуцира продукцията на интерферон гама в Т-клетки и макрофаги, той играе важна роля в имунните отговори тип T-h1 и има значение както за врождения, така и за придобития имунитет. IL-18 се отнася до семейството на IL-1, по

отношение и на структурата и на функцията. За преглед на структурата на IL-18, функцията му и биологичната му активност, виж например Dinarello, C. et. al. (1998) *J. Leukoc. Biol.* 63:658-654; Dinarello, C.A. (1999) *Methods* 19:121-132; and Dinarello, C.A. (1999) *J. Allergy Clin. Immunol.* 103:11-24.

Желателно е да се приложи модулиране на IL-18 в различите човешки имунни отговори. По-специално антитела, които свързват и неутрализират IL-18 са специално желателни. Още повече, *in vivo* използването на миши антитела срещу IL-18 е ограничено, поради проблеми свързани с въвеждането на миши антитела в хора, такива като кратко им време на полуживот в серума, неспособността да се насочат към определени човешки ефекторни функции и такива като появата на нежелателен човешки имунен отговор срещу миши антитела (реакция "човешки анти-миши антитела" (НАМА)).

Най-общо, опити да се преодолеят проблемите, свързани с използване на пълни миши антитела в хора, включват генетично конструирани антитела, които повече "наподобяват човешките". Например, приготвят се химерни антитела, в които различни райони от веригите на антителата са с миши произход, а веригите на константните райони са с човешки произход (Junghans, et. al. (1990) *Cancer Res.* 50:1495-1502; Brown et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:2663-2667; Kettleborough et al. (1991) *Protein Engineering.* 4:773-783). Обаче, тъй като тези химерни и наподобяващи човешките антитела, все още притежават някои миши последователности, те могат да доведат до нежелана имунна реакция, до реакцията на човешките анти-химерни антитела (НАМА), по специално когато се въвеждат за по-продължителни периоди.

Предпочитан инхибиторен агент на IL-18 към миши антитела или негови производни (например химерни или наподобяващи човешките антитела) може да е да е изцяло човешко анти-IL-18

антитяло, тъй като такъв агент няма да предизвика НАМА реакция, дори когато се използва за продължителни периоди. Обаче, такива антитела не са описани в областта и ето защо все още са необходими.

ТЕХНИЧЕСКА СЪЩНОСТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Това изобретение се отнася до съединения, такива като антитела, които свързват човешки IL-18, и също до методи за тяхното получаване и използване, като съединения или антитела.

В един аспект, изобретението се отнася до съединение, способно да свързва аминокиселинна последователност от човешки IL-18, или част от нея, където аминокиселината включва N- или C-крайната част на човешкия IL-18, които са осигурени от SEQ ID NO:70 или SEQ ID NO: 71. В един вариант, съединението е все още малка молекула, пептид, полипептид, антитяло или фрагмент от антитяло, като напълно човешко антитяло или фрагмент.

В друг аспект, изобретението се отнася до човешко моноклонално антитяло или до неговата антиген-свързващата част, способно да се свързва с човешкия IL-18. В други варианти, антитялото или неговия фрагмент се дисоциира от човешкия IL-18, като се определя от плазмон резонанса, със k_{off} скоростна константа $0.1s^{-1}$ или по-ниска, $1 \times 10E-2s^{-1}$ или по-ниска, $1 \times 10E-3s^{-1}$ или по-ниска, $1 \times 10E-4s^{-1}$ или по-ниска, $1 \times 10E-5s^{-1}$ или по-ниска, $1 \times 10E-6s^{-1}$ или по-ниска, или инхибира активността на човешкия IL-18 с IC 50 с $1 \times 10E-6$ или по-ниска, $1 \times 10E-7$ или по-ниска, $1 \times 10E-8$ или по-ниска, $1 \times 10E-9$ или по-ниска, $1 \times 10E-10$ или по-ниска, или $1 \times 10E-11$ или по-ниска.

В друг аспект, изобретението се отнася до изолирано антитяло или антиген-свързваща негова част, която се свързва с епитопа на човешки IL-18, включва аминокиселините последователности PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO:1), VIRNLNDQVLFDIQ (SEQ ID

NO:33) или част от една от тях. За предпочитане, антиятлото е неутрализиращо антиятло. За предпочитане е, антиятлото да е човешко антиятло. В различни варианти, антиятлото е рекомбинантно антиятло (например еднoверижно антиятло (scFv)) или моноклонално антиятло.

В други варианти, изолираното антиятло, или антиген-свързващата негова част, се свързва с епитоп на човешкия IL-18, или с част от една или друга аминокиселинна последователност, където антиятлото или антиген-свързващата негова част, се дисоциира от човешкия IL-18 с скоростна константа $k_{\text{off}} 0.1\text{s}^{-1}$ или по-ниска, която се определя чрез повърхностен плазмон резонанс, или която инхибира активността на човешкия IL-18 с IC_{50} от $1 \times 10^{-6}\text{M}$ или по-ниска. От друга страна, антиятлото или антиген-свързващата негова част, може да дисоциира от човешкия IL-18 със скоростна константа $k_{\text{off}} 1 \times 10^{-2}\text{s}^{-1}$ или по-ниска, която се определя чрез повърхностния плазмон резонанс, или може да инхибира активността на човешки IL-18 с $\text{IC}_{50} 1 \times 10^{-7}\text{M}$ или по-ниска. От друга страна, антиятлото или антиген-свързващата негова част може да дисоциира от човешкия IL-18 със скоростна константа $k_{\text{off}} 1 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ или по-ниска, която се определя чрез повърхностния плазмон резонанс, или може да инхибира активността на човешки IL-18 с $\text{IC}_{50} 1 \times 10^{-8}\text{M}$ или по-ниска. От друга страна, антиятлото или антиген-свързващата негова част може да дисоциира от човешкия IL-18 със скоростна константа $k_{\text{off}} 1 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$ или по-ниска, която се определя чрез повърхностния плазмон резонанс, или може да инхибира активността на човешки IL-18 с $\text{IC}_{50} 1 \times 10^{-9}\text{M}$ или по-ниска. От друга страна, антиятлото или антиген-свързващата негова част може да дисоциира от човешкия IL-18 със скоростна константа $k_{\text{off}} 1 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$ или по-ниска, която се определя чрез повърхностния плазмон резонанс, или може да инхибира активността на човешки IL-18 с $\text{IC}_{50} 1 \times 10^{-10}\text{M}$ или по-ниска. От друга страна,

антитялото или антиген-свързващата негова част може да дисоциира от човешкия IL-18 със скоростна константа $k_{\text{off}} 1 \times 10^{-6} \text{s}^{-1}$ или по-ниска, която се определя чрез повърхностния плазмон резонанс, или може да инхибира активността на човешки IL-18 с $\text{IC}_{50} 1 \times 10^{-11} \text{M}$ или по-ниска.

Друг аспект от изобретението се отнася до изолирано човешко антитяло, или антиген-свързваща негова част, включваща най-малко един вариабилен район CDR домен, способен да се свърже с епитопа на човешки IL-18. В сходни варианти, изолираното антитяло или антиген-свързваща негова част, има вариабилен район включващ тежката и/или леката верига CDR1 домен, CDR2 домен или CDR3 домен, както е показано в Таблица 6 или 9, който може да има, например едно или повече аминокиселинни замествания или инсерции на или в близост до която и да е от Kabat позициите, посочени в Таблицы 7-8 и 10-11. В предпочитан вариант, изолираното антитяло, или антиген-свързващата негова част включва вариабилна област на леката верига (LCVR), включващ аминокиселинна последователност SEQ ID NO:29 и вариабилния район на тежката верига (HCVR) включващ аминокиселинна последователност SEQ ID NO: 26. В друг предпочитан вариант, изолираното антитяло, или антиген-свързващата негова част, включва вариабилния район на леката верига (LCVR), включващ аминокиселинна последователност SEQ ID NO:29 и вариабилния район на тежката верига (HCVR) включващ аминокиселинна последователност SEQ ID NO: 27.

Друг аспект от изобретението се отнася до фармацевтични състави, включващи антитяло, или антиген-свързваща негова част от изобретението и фармацевтично приемлив носител. В един вариант, фармацевтичният състав, по-нататък включва най-малко един допълнително терапевтично средство за лечение на нарушения при които активността на IL-18 е вредна.

Друг аспект от изобретението се отнася до методи за получаване на антитела, които свързват човешки интерлевкин-18 (IL-18). Изобретението осигурява метод, който включва излагането на репертоар от антитела на антиген-включващ епитоп на човешки IL-18, включващ амникосиселинните последователности PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO: 1), VIRNLNDQVLFIDQ (SEQ ID NO: 33) или част от една от двете, и селекция от репертоара на антитяло, което свързва епитоп на човешки IL-18, включващ аминокиселинните последователности PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO: 1), VIRNLNDQVLFIDQ (SEQ ID NO: 33) или част от една от двете.

В един вариант, репертоарът от антителата е *in vivo* репертоар в животно и методът включва имунизирание на животното с антиген, включващ епитоп от човешки IL-18, включващ амникосиселинните PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO: 1), VIRNLNDQVLFIDQ (SEQ ID NO: 33), N- или C- терминалният участък на човешкия IL-18 (SEQ ID NOS: 70-71) или част от който и да е от тези епитопи. В друг вариант на изобретението, репертоарът от антитела е рекомбинантна библиотека на антитела и методът включва скрининг на библиотеката с антиген, включващ епитопът на IL-18, който включва амникосиселинните последователности PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO: 1), VIRNLNDQVLFIDQ (SEQ ID NO: 33), пептидите представени от секвенции SEQ ID NOS: 31-32 и 34-60 или част от която и да е от дадените по-горе. За предпочитане е библиотеката да е библиотека на човешки антитела.

В друг аспект, изобретението осигурява изолирана нуклеинова киселина, кодираща антитяло на който и да е от горе-описаните аспекти, например вариабилната област на тежката и/или леката верига, или част от тях. В сходни варианти, изолираната нуклеинова киселина, кодираща анти-IL-18 антитяло, или част от него е

рекомбинантен експресионен вектор, например за експресия в компетентни клетки.

Така в друг аспект, изобретението се отнася до метод, който използва гореспоменатите компетентни клетки, в които се въвежда експресионния рекомбинантен вектор, за да синтезират анти тяло, което свързва човешки IL-18, чрез култивиране на компетентните клетки в хранителна среда, докато анти тялото, което свързва човешки IL-18 не се синтезира от клетките.

Друг аспект от изобретението се отнася до метод за инхибиране на активността на човешкия IL-18, включващ осъществяването на контакт между човешкия IL-18 с анти тялото, или антиген-свързващата негова част от изобретението, като се инхибира активността на човешкия IL-18.

Един друг аспект на изобретението се отнася до метод за инхибиране на активността на човешкия IL-18 в обект-човек, страдащ от нарушения при които активността на IL-18 е вредна, включващ въвеждане в човека на анти тяло, или антиген-свързваща негова част от изобретението, така че активността на човешкия IL-18 в обекта-човек се инхибира. В един друг вариант на изобретението, анти-IL-18 анти тялото може да бъде въведено, например преди, по време на или след допълнително средство, като анти-IL-12 анти тяло или антиген-свързващ негов фрагмент, метотрексат, анти-TNF анти тяло или антиген-свързващ негов фрагмент, кортикостероиди, циклоспорин, рапамицин, FK506 или не-стероидни противо-възпалително средство.

КРАТКО ОПИСАНИЕ НА ФИГУРИТЕ

Фиг. 1 показва структурен модел на IL-18 (в центъра) сравнен с IL-1 β (вляво) и IL1RA (вдясно).

Фиг. 2 показва структурен модел на IL-18 в комплекс с IL-18 рецептора, където пептидният епитоп, включващ амникосиселините PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO: 1) от IL-18 е маркиран с тъмно сиво. Този пептиден епитоп е свързан със анти-IL-18 антитялото 2E1.

Фиг. 3 показва структурен модел на IL-18, в комплекс със IL-18 рецептор, където пептидният епитоп включващ амникосиселинна последователност VIRNLNDQVLFIDQ (SEQ ID NO: 33) е маркиран с тъмно сиво. Този пептиден епитоп е свързан със анти-IL-18 антитялото LT28.

Фиг. 4 показва структурен модел на IL-18, в комплекс със IL-18 рецептор. Сферичните по-светли и тъмно-сивите епитопи представляват N- и C- терминалните контактни епитопи на IL-18 (съответно SEQ ID NOS: 70 и 71).

Фиг. 5 показва афинитетът на три различни анти-IL-18 антитела при неутрализирането на биологичните ефекти на IL-18 като функция от инхибирането на INF- γ индукцията в KG1 клетки. IC50 стойностите за антителата 125H (квадратчета) и за 2E1 антитялото, като IgG антитяло (кръгчета) или като едно-верижно антитяло (триъгълничета), са съответно 2.1E-10, 9.0E-10 и 3.3E-9.

ПОДРОБНО ОПИСАНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Това изобретение се отнася до селекцията на пептиден епитоп, който е способен да генерира неутрализиращи антитела за IL-18 медираната сигнална трансдукция, получаване на антитела към тези епитопи и използването на такива антитела, включително използването за лечение на нарушения, включващи IL-18. Стратегията при избор на епитопи е последвана от конструиране на хомоложен модел на IL-18 белтъка и съответния негов рецептор. Комбинацията от визуални оценки и оценки на база на изчисления, се използва след

това за избор на представителни пептидни сегменти за синтеза и генериране на антитяло. Аминокоселинните последователности, показани тук са представени със стандартни едно-буквени кодове.

Избор на епитопи на IL-18

Използва се Програмата Modeler (Sali, A. et al., Evolution of comparative protein modeling by MODELLER. Proteins: Struct., Funct., Genet. (1995), 23 (3), pp. 318-26. CODEN: PSFGEY; ISSN: 0887-3585) се използва за създаване на хомоложни модели за IL-18 и за IL-18 рецептора. Рентгенов кристално структурен анализ на IL-1 β (Priestle, J., et al. The three-dimensional structure of human interleukin-1 beta. refined to 2.0. Å resolution. Prog. Clin. Biol. Res. (1990), 349 (Cytokines Lipocortins Inflammation Differ.) pp. 297-307) и IL-1RA (Schreuder, H. et al., Refined crystal structure of the interleukin-1 receptor antagonist: presence of a disulfide link and a cis-proline. Eur. J. Biochem. (1995), 227 (3), pp. 838-47) са налични и са използвани като литература, която ръководи конструирането на модела на IL-18. IL-1 рецепторната структура (Vigers, G., et al., Crystal structure of the type-I interleukin-1 receptor complexed with interleukin-1. beta. Nature (London) (1997), 386 (6621), pp. 190-194) се използва за моделиране на IL-18 рецептора.

Структурният модел на изграждане на IL-18 и IL-18 рецептора е описан по-нататък по-долу.

Конструиране на модел на IL-18

Цялата последователност е с по-малка хомология по отношение на тези два белтъка (IL-1 β и IL-18), обаче има неоспорими доказателства, че IL-18 е член на IL-1 семейството (виж Dinarello,

C.A., IL-18: TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J. Allergy Clin. Immunol.* (1999), 103 (1, Pt. 1), pp. 11-24) и че като цяло пептидните вериги са много подобни. Както IL-1 β , така и IL-18 се секретира първоначално като форма-предшественик. И двата предшественика - на IL-1 β и на IL-18 се активират чрез IL-1 β конвертиращ ензим (ICE) (Fantuzzi, G. and Dinarello, C.A. Interleukin-18 and interleukin-1 β : two cytokine substrates for ICE (caspase-1). *J. Clin. Immunol.* (1999), 19 (1), pp. 1-11). Също е известно, че IL-1 рецептора и IL-18 рецептора са подобни (Dinarello, C.A. et al. Overview of interleukin-18: more than an interferon- γ inducing factor. *J. Leukocyte Biol.* (1998), 63 (6), 658-664). IL-1 β е способен да се свърже с рецептора на IL-18. Като последен аргумент, IL-1 β и IL-1RA показват идентично нагъване, дори и цялостната структурна хомология със секвенциите на тези два белтъка е такава, каквато е хомологията със секвенцията на IL-18. Подредбата в секвенциите между тези три белтъка (т.е. IL-18, IL-1 β и IL-1RA) е конструирана ръчно с програмата InsightII. Тази подредба може да се види в Таблица 1.

ТАБЛИЦА 1: ПОДРЕЖДАНЕ НА СЕКВЕНЦИИТЕ ЗА IL-18, СХОДНИ С**ТЕЗИ НА IL-1 В И IL-1RA**

24		
IL-18:	YFGK-LESKLS-VIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE--DMT-DSDCRD--NAP	
IL-1 β :	AP-VRS-LNCTLRDSQQKSLVMS-G--P-YELKALHLQGQ--D--MEQ	
IL-1RA:	SSKMQA-FR--IWDVNQKTFYLR-N--N--QLVAGYLQGP--NVNLEE	
80		
IL-18:	RTIFIISMY-KDSQPRG-MAVTISVKCEKISTLSC----ENK-IISFKEM	
IL-1 β :	QVVFMS-FVQGEESNDKIPVALGLK-EKNLYLSCVLK-DDKPTLQLESV	
IL-1RA:	KI--DV---VP-IEPH---ALFLGIH-GGKMCLSCV-KSGDETRLQLEAV	
123		
IL-18:	NPPDNI-KDTKSDIIF-FQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLACE-KERDL	
IL-1 β :	DPKNYP-KK-KMEKR FVFNK-I-EINNKLEFESAQFPNWIISTS-QAENM	
IL-1RA:	NITDLSNR-KQDKRFAFIR-S-DSGPTTSFESAACPGWFLCTAMEADQ-	
170		
IL-18:	FKLILKKED-ELGDRSIM-FTVQNE	(SEQ ID NO: 4)
IL-1 β :	-PVFL--GG-TKGGQDITDFTMQFVSS	(SEQ ID NO: 5)
IL-1RA:	-PVSL--TNMPDEGVMVTKFYFQED	(SEQ ID NO: 6)

Хомологията между тези секвенции, е дадена в Таблица 2. Най-горният триъгълник е процент на точна секвенционна идентичност, а най-ниският триъгълник е процент консервативни хомоложни секвенции. Само части от целите секвенции дадени в Таблица 1 са представени в Таблица 2. Както е споменато по-горе, цялостната хомология е по-малка, но е в съответствие с тази на семейството.

**ТАБЛИЦА 2: ХОМОЛОГИЯ МЕЖДУ СЕКВЕНЦИИТЕ НА ЧЛЕНОВЕТЕ
НА IL-1 СЕМЕЙСТВОТО**

Молекула	IL-18	IL-1 β	IL-1RA	IL-1 Rec	IL-18 Rec
IL-18	-	20.0	21.8	-	-
IL-1 β	53.5	-	27.5	-	-
IL-1RA	50.6	54.4	-	-	-
IL-1 Rec	-	-	-	-	26.1
IL-18 Rec	-	-	-	50.5	-

Получената IL-18 структура е показана на Фигура 1 заедно със тези на IL-1 β и IL-1RA. Цялостното качество, оценено чрез програмата What_Check (Hoof, R.W. et al., Errors in Protein Structures. Nature (1996) 381, pp. 272) е приемливо, но малко ниско (виж Таблица 3, по-долу).

**ТАБЛИЦА 3: СТРУКТУРНИ Z-ТОЧКИ ОТ WHAT CHECK
(ПОЛОЖИТЕЛНИТЕ СА ПО-ГОЛЕМИ ОТ СРЕДНИТЕ)**

	IL-1 β	IL-1RA	IL-1 Rec	IL-18 (модел)	IL-18 Rec (модел)
Качество на нагъване	-1.6	-2.3	-3.6	-5.5	-5.7
Ramachandran плот	-2.0	-1.3	-2.9	-3.3	-2.3
Нормалност на ротамерията	-1.6	-0.8	-1.5	-0.6	-0.6
Конформация на оста	-1.7	+0.5	-1.6	-5.6	-2.7

Оценките на препоръчаните от What_Check структури обаче са ниски, което предполага че този тип белтъчно нагъване е слабо

представено в базата данни на препоръчаните структури. Въпреки това и въпреки нашата увереност за цялостното белтъчно нагъване, без съмнение ниската хомология на секвенциите допринася малко за перфектната крайна структура. Счита се обаче, че за целта при избора на епитопи за създаване на анти тяло, тази структура е достатъчна.

Конструиране на модел на IL-18 рецептор

Структурата на IL-18 рецепторът също се прави от програмата Modler. Препоръчаните координати са на IL-1 рецептора. Както е при случая за цитокините, свързани с тези рецептори, цялостната идентичност на секвенциите е ниска, но достатъчна за създаване на подредба. Хомологията на секвенциите е представена в Таблица 2 по-горе. Подредбата се създава ръчно, като се използва програмата InsightII и е представена в Таблица 4.

ТАБЛИЦА 4. СЕКВЕНЦИОННА ПОДРЕДБА НА РЕЦЕПТОРА НА IL-18

ОТНЕСЕНА КЪМ РЕЦЕПТОРА НА IL-1

	22
IL-18 Rec:	CTSRPHITVVEGEPFYLKHCSCSLAHEIETTTKSWYKSSGSQEHVELNPR
IL-1 Rec :	CKEREEKIILVSSANEIDVRPCPLNPNEHKGITITWYKDD-SKTPVSTEQA
	72
IL-18 Rec:	SSSRIALHDCVLEFWPVELNDTGSYFFQMKNYTQKWKLVIRRNKHS---
IL-1 Rec :	S--RIHQHKEKLWFVPAKVEDSGHYVCVRNSSYCLRIKISAKFVENEPN
	119
IL-18 Rec:	-CFTERQVTSKIVEVKKFFQITCENSYYQTLVNST----SLYKNCKKLLL
IL-1 Rec :	LCYNAQAIFKQKLPVAGDGGVCPYMEFFKNENNELPKLQWYKDKPLLL
	163
IL-18 Rec:	EN-----NKNPTIKKNAEFEDQGYSCVHFLHHNGKLFNITKTFNITIVE
IL-1 Rec :	DNIHFGVKDRILIVMNVAEKHRGNYTCHASYTYLGKQYPITRVIEFITLE
	209
IL-18 Rec:	DRSNIVPVLLGPKLNHVAVELGKNVRLNCSALLNEEDVIYWMF-GEE-NG
IL-1 Rec :	ENKPTRPVIVSPANETMEVDLGSQIQLICNVGTQLSDIAYKWNGSVIDE
	257
IL-18 Rec:	SDPNIHEE-KEMRIMTPEGKWHASKVLRIENIGESNLNVLYNCTVASTGG
IL-1 Rec :	DDPVLGEDYYSVENPANKRRSTLITVLNISEIESRFYKHPFTCFKANTHG
	306
IL-18 Rec:	TDTKSFILVRKAD (SEQ ID NO: 7)
IL-1 Rec :	IDAAYIQLIYPVT (SEQ ID NO: 8)

Цялостното качество на структурата на IL-18 рецептора определено, като се използва програмата Modler, е приемливо, но отново точките са ниски по отношение на What_Check (Таблица 3 по-горе). Увереността, която може да бъде дадена върху цялостното нагъване се дължи най-напред на факта, че IL-1 β се свързва и с рецептора на IL-1 и с рецептора на IL-18. Ниската хомология между секвенциите със сигурност допринася до качеството на крайната структура, обаче, както е в случая при свързването с цитокините по-горе, тази настояща структура се счита за достатъчна. Като допълнителен контрол, пептидният епитоп за IL-18, като се свързва с LT28 (SEQ ID NO: 33) е моделиран в комплекс с IL-18 рецептора (Фиг.3). Като краен контрол, моделът на IL-18/IL-18 рецепторния комплекс е изграден на базата на IL-1 β /IL-1 рецепторната структура (Фиг.4). Тази структура се получава, чрез нанасяне отгоре на цитокиновите структури и рецепторните структури. Нито един опит не е направен да се минимизира енергията на крайната структура.

Селекция на пептидни епитопи

Първоначалната цел на създаването на структурни модели е да бъде възможен изборът на подходящи пептиди, който да се осъществява първоначално на базата на визуална преценка. Вземат се под внимание областите на белтъците, разположени откъм разтворителя и на части от белтъците които са едновременно хидрофилни и разположени в комплекса рецептор/цитокин. Крайният елемент, който се взима под внимание се базира на селективен критерий. Селекцията на пептиден епитоп, ще бъде различна при секвенции от подобни участъци на други членове от семейството. На базата на този критерий, е избран пептид от IL-18. В допълнение, голямата област на припокриване (SEQ ID NOS: 31-60)

представляваща пълната секвенция на IL-18 (SEQ ID NO: 61) също е направена и секвенцията на всички тези IL-18 подобни пептиди е показана на Таблица 5, по-долу.

ТАБЛИЦА 5. ИЗБРАНИ ПЕПТИДИ, ПРЕДСТАВЯЩИ IL-18

Пептидна секвенция	SEQ ID NO:
PLFEDMTDSDCRDNA	(SEQ ID NO: 1)
CPLFEDMTDSDCRDNA	(SEQ ID NO: 2)
PLFEDMTDSDCR	(SEQ ID NO: 3)
YFGKLESKLSVIRN	(SEQ ID NO: 31)
ESKLSVIRNLNDQV	(SEQ ID NO: 32)
VIRNLNDQVLFIDQ (LT28 binding epitope)	(SEQ ID NO: 33)
NDQVLFIDQGNRPL	(SEQ ID NO: 34)
FIDQGNRPLFEDMT	(SEQ ID NO: 35)
NRPLFEDMTDSDCR (2E1 binding epitope)	(SEQ ID NO: 36)
EDMTDSDCRDNAPR	(SEQ ID NO: 37)
SDCRDNAPRTIFII	(SEQ ID NO: 38)
NAPRTIFIISMYKD	(SEQ ID NO: 39)
IFIISMYKDSQPRG	(SEQ ID NO: 40)
MYKDSQPRGMAVTI	(SEQ ID NO: 41)
QPRGMAVTISVKCE	(SEQ ID NO: 42)
AVTISVKCEKISTL	(SEQ ID NO: 43)
VKCEKISTLSCENK	(SEQ ID NO: 44)
ISTLSCENKIISFK	(SEQ ID NO: 45)
CENKIISFKEMNPP	(SEQ ID NO: 46)

ISFKEMNPPDNIKD	(SEQ ID NO: 47)
MNPPDNIKDTKSDI	(SEQ ID NO: 48)
NIKDTKSDIIFQQR	(SEQ ID NO: 49)
KSDIIFQQRSVPGH	(SEQ ID NO: 50)
FFQRSVPGHDNKMQ	(SEQ ID NO: 51)
VPGHDKMQFESSS	(SEQ ID NO: 52)
NKMQFESSSYEGYF	(SEQ ID NO: 53)
ESSSYEGYFLACEK	(SEQ ID NO: 54)
EGYFLACEKERDLF	(SEQ ID NO: 55)
ACEKERDLFKLILK	(SEQ ID NO: 56)
RDLFKLILKKEDEL	(SEQ ID NO: 57)
LILKKEDELGDRSI	(SEQ ID NO: 58)
EDELGDRSIMFTVQ	(SEQ ID NO: 59)
DRSIMFTVQNE	(SEQ ID NO: 60)
YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTD	(SEQ ID NO: 61)
SDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEK	LT28 and 2E1 Епитопи, показани в болд
ISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFQQR	
VPGHDKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK	
EDELGDRSIMFTVQNE	

N-крайният цистеин на IL-18 пептида, представен на SEQ ID NO:2 не е част от нативната IL-18 последователност, но е добавен като свързващо място. Съответно, в нативната IL-18 аминокиселинна последователност, района съответстващ на избрания епитоп включва аминокиселинни остатъци имащи аминокиселинна последователност PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO: 1).

Схематичен модел на пептида на IL-18 (SEQ ID NO: 1) в комплекс с IL-18 рецептора е показан на Фиг.2, като този пептиден епитоп е маркиран в тъмно сиво.

Резултатния сбор на антигенните свойства се образува на базата на IL-18 пептидните секвенции, тъй като точно този пептид дава добър резултат. Този пептид се синтезира и се използва като епитоп за генериране на антитела в заск-гостоприемник. Данните от молекулярното моделиране са получени, като се използва пептида на IL-18 PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO: 1) или YFGKLESKLSVIRN

(SEQ ID NO: 31) при сравнение със сходен рецептор, т.е. IL-18 рецептора, който е показан на Фигури 2 и 3, осигуряващ индикация кои остатъци или съединения ще взаимодействат с неутрализиращото анти тяло.

Като алтернативен метод, селекцията на пептиден епитоп може да бъде направена в отсъствие на каквото и да е молекулно моделиране, чрез скрининг на панел от представени пептиди, като се използва имуноселекция. При един подход, всички представени припокриващите се пептиди могат да бъдат използвани. В по-ограничен подход, само определени епитопи са представени от панела на пептидите. В комбиниран подход, молекулното моделиране може да бъде използвано за идентифициране на епитопи, които са вероятно значими. Идентифицираната(те) епитопна(и) секвенция може да бъде използвана след това за конструиране на панел от пептиди (напр. припокриващи се пептиди) в които е представен идентичен епитоп(и). Методи за изработване на желани пептидни последователности, могат да бъдат направени, като се използват стандартни техники, известни в областта.

Веднъж избрани свързаните пептид или пептидите (напр. панел от припокриващи се пептиди) се провежда имуно-скрининга за сроден рецептор. От друга страна имуно-скрининг може да бъде проведен със избран сроден рецептор, така че пептид, който има определен свързващ афинитет може да бъде идентифициран. Всеки един от имуно-скринираните белтъци, може да бъде използван или като желан рецептор или като желан пептид, който може да бъде идентифициран като кандидат за свързваща молекула за по-нататъшно изследване. Такива техники на "примамка" и "плячка" за анализиране на белтък-белтък взаимодействия, за идентифициране на кандидат-свързващи молекули и/или за скриниране на свързващите

афинитети са описани в областта. Една от предпочитаните техники е приспособила използването на фаг, както е описано тук.

Анти-IL-18 антитела

Изобретението осигурява антитела, също и части от тях, които се свързват с IL-18. За предпочитане е, антителата или техните части да са изолирани антитела. За предпочитане е антителата, или техните участъци да са неутрализиращи антитела.

Терминът “антитяло”, както се използва тук се отнася до имуноглобулинови молекули, представени от четири полипептидни вериги, две тежки (H) и две леки (L) вериги, свързани помежду си чрез дисулфидни мостове. Всяка тежка верига включва вариабилен район на тежката верига (съкратен тук като HCVR или VH) и константен район на тежката верига. Константният район на тежката верига е включва три домена, CH1, CH2 и CH3. Всяка лека верига е представена от вариабилен район на леката верига (съкратен тук като LCVR или VL) и константен район на леката верига. Константният район на леката верига включва един домен CL. VH и VL районите могат по-нататък да се подразделят на хипервариабилни, наречени още комплементарни определящи райони (CDR), разпръснати в районите, които са по-консервативни, наречени рамкови райони (FR). Всеки VH и VL е изграден от три CDRs и четири FRs, разположени от посока на аминок-краищата към карбокси-краищата в следния ред: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Терминът “антиген-свързваща част” на антитялото (или за по-кратко “част от антитялото”), се използва тук, отнесен като един или повече фрагменти от антитяло, което запазва способността си да свързва специфично антигена (напр. hIL-18). Показано е, че антиген-свързващата функция на антитяло може да бъде изпълнена от

фрагменти, разположени по цялото дължина на антицялото. Примери за свързващи фрагменти, спадащи към термина "антиген-свързваща част" на антицялото включват (i) Fab фрагмент, моновалентен фрагмент, включващ VL, VH, CL и CH1 домени, (ii) Fab(ab')₂ фрагмент, бивалентен фрагмент, включващ два Fab фрагмента, свързани чрез дисулфиден мост в подвижния район; (iii) Fd фрагмент, включващ VH и CH1 домени; (iv) Fv фрагмент, включващ VL и VH домени на единично рамо на антицяло; (v) dAb фрагмент (Ward et al, (1989 Nature 341:544-546), който включва VH домен; и (vi) изолирана комплементарен определящ район (CDR). По-нататък, въпреки че двата домена на Fv фрагмента, VL и VH са кодирани от отделни гени, те могат да бъдат свързани, чрез използване на рекомбинантни методи, чрез синтетичен линкер, който им позволява да направят единична белтъчна верига, в която VL и VH районите се сдвояват за да образуват моновалентни молекули (известни като едноверижни Fv (scFv); виж напр. Bird et al., (1988) Science 242:423-426; и Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Такива едно-верижни антицяла също могат да бъдат отнесени към термина "антиген-свързваща част" на антицялото. Други форми на едно-верижни антицяла, като "двойни антицяла" също се включват в този термин. "Двойните антицяла", представляват бивалентни, би-специфични антицяла, в които VH и VL домените се експресират върху една полипептидна верига, но за сдвояването между двата домена на една и съща верига се използва линкер, който е много къс, ето защо насилват домените да се сдвоят с комплементарни домени на друга верига и създават две антиген-свързващи места (виж напр. Holliger, P., et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R.J., et al., (1994) Structure 2:1121-1123).

Също така, по-нататък антицялото или неговият антиген-свързваща част могат да са част от по-големи имуноадхезионни

молекули, образувани чрез ковалентни или не-ковалентни свързвания на антицялото или частта от антицялото с един или повече белтъка или пептиди. Примери за такива имуноадхезионни молекули включват използването на област от стрептавидинова сърцевина за да се направи тетрамерна scFv молекула (Kipriyanov, S.M., et al., (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101) и използването на цистеинов остатък, маркерен пептид и C-терминален tag - полихистидин за да се направят бивалентни и биотинилирани scFv молекули (Kipriyanov, S.M., et al. (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058). Участват на антицяло, като Fab и Fab(ab)₂ фрагментите, могат да бъдат приготвени от цели антитела, като се използват конвенционални техники, като рязане съответно на целите молекули на антителата с папаин или пепсин. Още повече, антителата, участващите на антителата и имуноадхезионните молекули могат да бъдат получени като се използват стандартни ДНК техники, както е описано тук.

“Изолирано антицяло”, както се използва тук, има за цел да се отнася до антицяло, което е значително пречистено от други антитела, които имат различни специфичности към антигена (напр. изолирано антицяло, което специфично свързва hIL-18 и е значително пречистено от антитела, които специфично свързват други антигени освен IL-18). Изолирано антицяло, което специфично свързва hIL-18 може обаче да има крос-реактивност по отношение на други антигени, като IL-18 молекули от други видове. Още повече, изолираното антицяло, може да бъде значително пречистено от други клетъчни материали и/или химикали. По-нататък, изолирано антицяло, например изолирано човешко антицяло, може да бъде химерно антицяло където, напр. вариабилните райони, CDR домените или изотиповете произлизат от различни човешки източници и са присадени към родителското човешко антицяло.

“Съединение”, както се използва тук, се отнася до свързващи молекули, като антитела, напр. поликлонални антитела, моноклонални антитела, свързващи техни фрагменти (напр. Fab фрагменти), едно-верижни антитела (напр. scFv), пептиди или имитатори на пептиди, както и не-пептидни базови молекули, като малки молекули, които имат лиганд-свързваща активност.

“Неутрализиращо антитяло”, както се използва тук (или “антитяло, което неутрализира активността на hIL-18”), има за цел да бъде отнесено към антитяло, чието свързване към hIL-18 води до инхибиране на биологичната активност на hIL-18. Това инхибиране на биологичната активност на hIL-18 може да бъде оценено по един или повече индикатори на hIL-18 биологичната активност. Тези индикатори на hIL-18 биологичната активност могат да бъдат оценени, чрез един или повече от няколко стандартни *in vitro* или *in vivo* анализи, известни в областта.

Терминът “повърхностен плазмон резонанс”, както се използва тук, се отнася до оптичен феномен, който позволява анализ на действителното време на биоспецифични взаимодействия, чрез детекция на промените в концентрациите на белтъка, посредством биосензорен матрикс, например чрез използване на BIAcore система (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, NJ). За по-нататъшни описания, виж Jonsson, U., et. al., (1993) *Ann.Biol.Clin.* 51:19-26; Jonsson, U., et al. (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Johnsson, B., et al. (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131; and Johnson, B. et al. (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277.

Терминът “ K_{off} ”, използван тук, има за цел да се отнесе до скоростната константа на дисоциация на антитялото, от комплекса антиген-антитяло.

Терминът "K_d", както се използва тук, има за цел да се отнесе към дисоциационна константа на специфичното взаимодействие антицяло-антиген.

В един аспект, изобретението се отнася до изолирано антицяло или антиген-свързваща негова част, която се свързва с епитопа на човешки IL-18, включва аминокиселините последователности PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO:1), VIRNLNDQVLFDIQ (SEQ ID NO:33) или част от който и да е от тези епитопи. За предпочитане, антицялото е неутрализиращо антицяло. За предпочитане е антицялото е човешко антицяло. В различни варианти, антицялото е рекомбинантно антицяло или моноклонално антицяло.

В други варианти, изолираното антицяло, или антиген-свързващата негова част, се свързва с епитоп на човешкия IL-18, включващ аминокиселините PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO:1), където антицялото или антиген-свързващата негова част, се дисоциира от човешкия IL-18 със скоростна константа $k_{\text{off}} 0.1\text{s}^{-1}$ или по-ниска, която се определя чрез повърхностен плазмон резонанс, или която инхибира активността на човешкия IL-18 с IC₅₀ от $1 \times 10^{-6}\text{M}$ или по-ниска. От друга страна, антицялото или антиген-свързващата негова част, може да дисоциира от човешкия IL-18 със скоростна константа $k_{\text{off}} 1 \times 10^{-2}\text{s}^{-1}$ или по-ниска, която се определя чрез повърхностния плазмон резонанс, или може да инхибира активността на човешкия IL-18 с IC₅₀ $1 \times 10^{-7}\text{M}$ или по-ниска. От друга страна, антицялото или антиген-свързващата негова част може да дисоциира от човешкия IL-18 със скоростна константа $k_{\text{off}} 1 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ или по-ниска, която се определя чрез повърхностния плазмон резонанс, или може да инхибира активността на човешкия IL-18 с IC₅₀ $1 \times 10^{-8}\text{M}$ или по-ниска. От друга страна, антицялото или антиген-свързващата негова част може да дисоциира от човешкия IL-18 със скоростна константа $k_{\text{off}} 1 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$ или по-ниска, която се определя чрез повърхностния

плазмон резонанс, или може да инхибира активността на човешки IL-18 с IC_{50} $1 \times 10^{-9} M$ или по-ниска. От друга страна, антиятлото или антиген-свързващата негова част може да дисоциира от човешкия IL-18 със скоростна константа k_{off} $1 \times 10^{-5} s^{-1}$ или по-ниска, която се определя чрез повърхностния плазмон резонанс, или може да инхибира активността на човешки IL-18 с IC_{50} $1 \times 10^{-10} M$ или по-ниска. От друга страна, антиятлото или антиген-свързващата негова част може да дисоциира от човешкия IL-18 със скоростна константа k_{off} $1 \times 10^{-6} s^{-1}$ или по-ниска, която се определя чрез повърхностния плазмон резонанс, или може да инхибира активността на човешки IL-18 с IC_{50} $1 \times 10^{-11} M$ или по-ниска.

Афинитетно зреење на идентифицирани анти-IL-18 антитела

Изобретеният също осигурява за следваща модификация на идентифицирано антиятло, като свързване към IL-18 епитоп. Модификацията на идентифицирано анти-IL-18 антиятло е с цел да подобри свързващата и/или неутрализиращата активност.

Терапевтични състави и методи за въвеждане

Изобретението също осигурява фармацевтични състави, включващи антиятло, или антиген-свързваща негова част, от изобретението и фармацевтично приемлив носител. В един вариант, фармацевтичният състав по-нататък включва най-малко един допълнителен терапевтичен агент за лечение на нарушения, които са свързани с вредна активност на IL-18.

Антителата и частите на антителата от изобретението могат да бъдат въведени във фармацевтични състави, подходящи за въвеждане в обект. Обикновено, фармацевтичният състав включва антиятло или

част на антияло от изобретението и фармацевтично приемлив носител. Както се използва тук "фармацевтично приемлив носител" включва който и да е от всички разтворители, дисперсионни среди, покрития, антибактериални и антигъбни вещества, изотоници и вещества, задържащи адсорбцията и други подобни физиологично съвместими вещества. Примери за фармацевтично приемливи носители включват един или повече от вода, физиологичен разтвор, фосфатен буфер, декстроза, глицерол, етанол и други подобни, както и техни комбинации. В повечето случаи, за предпочитане е да се включат изотонични агенти, например захари, полиалкохоли, като манитол, сорбитол, или натриев хлорид в състава. Фармацевтично приемливи носители могат по-нататък да включват малки количества от ауксиларни субстанции, като попиващи или емулгиращи вещества, презервативи или буфери, които увеличават живота или ефективността на антиялото или на частта на антиялото.

Антителата или частите на антителата от изобретението могат да бъдат въведени във фармацевтични състави, подходящи за парентерално въвеждане. За предпочитане, антиялото или частта на антиялото ще бъде приготвен като се инжектиращ се разтвор, съдържащ 0.1-250 mg/ml антияло. Инжектиращият се разтвор може да включва също течна или лиофилизирана дозирана форма във кремъчна или кехлибарена фиолка, ампула или предварително напълнена спринцовка. Буферът може да бъде L-хистидин (1-50 mM), оптимално 5-10 mM с pH 5.0 до 7.0 (оптимално pH 6.0). Други подходящи буфери включват, но не се ограничават до натриев сукцинат, натриев цитрат, натриев фосфат или калиев фосфат. Натриевият хлорид може да бъде използван за модифициране на токсичността на разтвора при концентрация от 0-300 mM (оптимално 150 mM за течна дозирана форма). Криопротектори могат да бъдат включени в лиофилизираните дозирани форми, принципно 0-10%

захароза (оптимално 0.5 - 1.0%). Други подходящи криопротектори включват трехалоза и лактоза. Вещества придаващи обем могат да бъдат включени в лиофилизираната дозирана форма, принципно 1-10% манитол (оптимално 2-4%). Стабилизатори могат да бъдат включени и в течната и в лиофилизираната дозирана форми, принципно 1-50 mM L-метионин (оптимално 5-10mM) Други подходящи придаващи обем вещества, включват глицин, аргинин, може да бъде включен 0-0,05% полисорбат-80 (оптимално 0,005-0,01%). Допълнителни сърфактанти включват, но не се ограничават до полисорбат 20 и BRU сърфактанти.

Съставите на това изобретение могат да бъдат разнообразни форми. Те включват например, течна, полу-твърда и твърда дозирани форми, като течни разтвори (напр. инжектиращи се и инфузиращи се разтвори), дисперсии или суспензии, таблетки, хапчета, пудри, липозоми и супозитории. Предпочитаната форма, зависи от това по какъв начин се възнамерява въвеждането и терапевтичното приложение. Типични предпочитани състави са под формата на инжектиращи се и инфузиращи се разтвори, като състави подобни на тези, използвани за пасивна имунизация на хора с други антитела. Предпочитан начин на въвеждане е парентералния (напр. интравенозно, подкожно, интраперитонеално, вътремускулно). В предпочитан вариант, антиятлото се въвежда чрез интравенозна инфузия или чрез инжекция. В друг предпочитан вариант, антиятлото се въвежда чрез вътремускулно или подкожно инжектиране.

Терапевтичните състави обикновено трябва да бъдат стерилни и стабилни при условията на производство и съхранение. Съставите могат да бъдат формулирани като разтвор, микроемулсия, дисперсия, липозома или други подредени структури, подходящи при високи концентрации на лекарствен препарат. Стерилни инжектиращи се разтвори могат да бъдат приготвени чрез въвеждане на активни

съединения (т.е. антиляло или част на антиляло) в изискващото се количество в подходящ разтворител с една или в комбинация от съставките изброени по-горе, както се изисква и последваща стерилизация, чрез филтруване. Обикновено, дисперсиите се приготвят чрез въвеждане на активните съставки в стерилно средство, което съдържа базова дисперсионна среда и изисква други съставки от тези, изброени по-горе. В този случай на стерилни, лиофилизирани прахове, за приготвянето на стерилни инжекционни разтвори, предпочитани методи за приготвяне са изсушаване под вакуум и спрей-изсушаване, което води до получаване на прах от активна съставка, плюс която и да е допълнителна желана съставка от предходните стерилно филтрувани техни разтвори. Подходящата флуидност на разтвора може да бъде поддържана, например, чрез използване на покрития, като лецитин, чрез поддържане на изисквания размер на частиците в случая на дисперсия и чрез използване на сърфактанти. Продължителна абсорбция на инжектираните съединения може да бъде проведена чрез включване в състава на вещество, забавящо абсорбцията, например соли на моностеарата и желатин.

Антителата и частите на антителата от настоящето изобретение могат да бъдат въведени чрез много методи, известни в областта, въпреки че за много терапевтични приложения, предпочитаният път/начин на въвеждане е подкожно инжектиране, интравенозно инжектиране и инфузия. Както ще бъде оценено високо от специалистите в областта, пътят и/или начинът на въвеждане ще варира в зависимост от желания резултат. В определени варианти, активното съединение може да бъде приготвено с носител, който ще защитава съединението от бързо освобождаване, като формулировка за контролирано освобождаване, включваща импланти, трансдермални парчета и системи за микроенкапсулирано доставяне.

Биодеградиращи, биосъвместими полимери могат да бъдат използвани, като етилен винил ацетат, полианхидриди, полигликолова киселина, колаген, полиортоестери и полимлечна киселина. Много методи за приготвяне на такива формулировки са патентовани или всеобщо известни на специалистите в областта. Виж напр. *Sustained and controlled release drug delivery systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

В определени варианти, анти тяло или част на анти тяло от изобретението може да бъде въведено орално, например с инертен разтворител или чрез приемлив за ядене носител. Съединението (и другите съставки, ако са необходими) може също да бъде запечатано в твърда или мека желатинова капсула, компресирано в таблетки или включено директно в диетата на обектите. За орално терапевтично въвеждане, съединенията могат да бъдат включени в ексципиенти и използвани под формата на входящи таблетки, орални таблетки, таблетки, капсули, еликсири, суспензии, сиропи, лепенки и други подобни. За въвеждането, може да бъде необходимо да се покрие съединението с или да се въведе паралелно съединение с материал, който предпазва инактивирането.

Допълнително активни съединения, могат също да бъдат въведени в съставите. В определени варианти, анти тяло или част от анти тялото от настоящето изобретение се формулира едновременно и/или се въвежда едновременно с едно или повече допълнителни терапевтични средства, които се използват за лечение на нарушения при които активността на IL-18 е вредна. Например, анти-hIL-18 анти тяло или част от анти тялото от изобретението, може да бъде формулирано едновременно и/или едновременно въведено с един или повече допълнителни анти тела, които свързват други прицелни молекули (напр. анти тела, които свързват други цитокини или клетъчно-повърхностни молекули). По-нататък, едно или повече

антитела от изобретението могат да бъдат използвани в комбинация с два или повече от гореспоменатите терапевтични вещества. Такива комбинирани терапии могат предимно да приспособят по-ниски дози на въвежданите терапевтични вещества, като по този начин се избягва възможни токсични ефекти или усложнения, свързани с различни монотерапии.

Терапевтични приложения

Интерлевкин 18 играе важна роля при патологията, свързана с различни заболявания, включващи имунни и имуновъзпалителни елементи. Тези заболявания включват, но не се ограничават до, ревматоиден артрит, остеоартрит, младежки хроничен артрит, артрит на Lyme, псориазисен артрит, реактивен артрит, спондилоартропатия, системен лупус еритрематозус, болест на Crohn, язвен колит, чревно възпалително заболяване, инсулин зависим диабет, милетус, тирондит, астма, алергични заболявания, псориазис, дерматитна склеродерма, заболяване свързано с отхвърляне на трансплантант, отхвърляне на трансплантирани органи, остро и хронично имуноно заболяване, свързано с трансплантиране на органи, саркоидоза, атеросклероза, разпространяваща се интраваскуларна коагутинация, болест на Kawasaki, болест на Grave, нефротичен синдром, синдром на хронична умора, грануломатозис на Wegner, Henoch-Schoenlin пурпура, микроскопичен васкулит на бъбреците, хроничен активен хепатит, увент, септичен шок, синдром на токсичен шок, сепсис синдром, кахексия, инфекциозни заболявания, паразитни заболявания, придобит имунодефицитен синдром, остър трансверзен миелит, хореа на Huntington, паркинсонова болест, болест на Алцхаймер, удар, първична жлъчна цироза, хемолитична анемия, малигнени образувания, сърдечни нарушения, инфаркт на миокарда,

болест на Addison, спорадична болест, полигландуларен дефицит тип I и полигландуларен дефицит тип II, синдром на Schmidt, остър респираторен дистрес синдром при възрастните, алопеция, алопеция ареата, серонегативна артепатия, артропатия, болест на Retier, псориатозна артропатия, артропатия свързана с язвен колит, ентеропатичен синовит, артропатии свързани с *chlamydia*, *yersinia* и *salmonella*, спондилоартропатия, атероматозна лещ/атериосклерозис, атопична алергия, аутоимунно булос заболяване, *pemphigus vulgaris*, *pemphigus foliaceus*, пемфигоид, линейна IgA болест, аутоимунна хемолитична анемия, Combs позитивна хемолитична анемия, придобита перникозна анемия, младежка перникозна анемия, миалгичен енцефалит/Royal Free Disease, хронична мукокутанеусена кандидоза, артерит на големите клетки, първичен склерозен хепатит, криптогенен имунен хепатит, синдром на придобитата имунна недостатъчност, заболявания, свързани със синдрома на придобитата имунна недостатъчност, хепатит C, обикновени вариации на имунодефицит (обикновени вариации на хипогамаглобулинемия), късна кардиомиопатия, женски стерилитет, овариално нарушение, нарушение в овариалното зреење, фиброзно белодробно заболяване, криогенен фиброзен алвеолит, пост-възпалително интерстициално белодробно заболяване, интерстициални пневмонити, болест на съединителната тъкан, свързана с интерстициални белодробни заболявания, смесена болест на съединителната тъкан, свързана с белодробни заболявания, системна склероза, свързана с интерстициални белодробни заболявания, ревматоиден артрит свързан с вътрешни белодробни заболявания, системен лупус еритроцитозис, свързан с интерстициални белодробни заболявания, дерматомиозит/полимиозит, свързан с интерстициални белодробни заболявания, болест на Sjorgen, свързана с белодробни заболявания, анкилозен спондилит, свързан с белодробни заболявания,

васкулитична дифузна белодробна болест, хемосидероза, свързана с белодробни заболявания, индуцирано от лекарствени препарати интерстициално белодробно заболяване, фиброза в резултат от радиация, бронхиолит облитеранс, хронична еозинофилна пневмония, белодробно заболяване, свързано с инфилтриране на лимфоци, слединфекционно интерстициално белодробно заболяване, артрит от подагра, автоимунен хепатит, тип-1 автоимунен хепатит (класически автоимунен или лупоиден хепатит), тип-2 автоимунен хепатит (хепатит с анти-LKM антитела), автоимунно медирана хипогликемия, тип В инсулин резистентност с *acanthosis nigricans*, хипопаратирозидизъм, остро имунно заболяване, свързано с органна трансплантация, хронично имунно заболяване, свързано с органна трансплантация, остеоартроза, първичен склерозен холангит, псориазис тип 1, псориазис тип 2, идиопатична левкопения, автоимунна неутропения, бъбречно заболяване NOS, гломерулонефрит, микроскопски васулит на бъбреците, болест на Lyme, дискоиден лупус еритематозус, мъжки стерилитет идиопатичен или NOS, спермален автоимунитет, множествена склероза (всички подтипове), симпатиковска офталмия, повишено белодробно налягане, вторично заболяване-следствие от болест на съединителната тъкан, синдром на Goodpasture, белодробна проява на полиартеритис нодоза, остри ревматични гадения, ревматоиден спондилит, болест на Still, системна склероза, синдром на Sjorgen, болест на Takayasu/артерит, автоимунна тромбоцитопения, идиопатична тромбоцитопения, автоимунна тироидна болест, хипетироидизъм, гушев автоимунен хипотироидизъм (болест на Hashimoto), атрофия с автоимунен хипотироидизъм, първична миксоедема, факогенен увеит, първичен васкулит и витилго. Човешките антитела и частите на антителата от изобретението могат да бъдат използвани за лечение на хора, страдащи от автоимунни

заболявания, по-специално тези свързани с възпалителни реакции, включително ревматоиден спондилит, алергия, автоимунен диабет, автоимунен уветит, остри чернодробни заболявания, хронични чернодробни заболявания, алергии и астма, умствени нарушения (напр. депресия и шизофрения), Th2- и Th1- тип медиранни заболявания.

За предпочитане, антителата от изобретението или антиген-свързващите техни части се използват за лечение на ревматоиден артрит, болест на Crohn, множествена склероза, инсулин зависим диабет, мелитус и псориазис.

Антитяло или част на антитяло от изобретението може също да бъде въведено с едно или повече терапевтични вещества, които се използват за лечение на автоимунни и възпалителни заболявания.

Антитела от изобретението или антиген свързващи техни части, могат да бъдат използвани самостоятелно или в комбинация за лечение на тези заболявания. Ще се разбере, че антителата от изобретението или антиген свързващите техни части могат да бъдат използвани самостоятелно или в комбинация с допълнителни вещества, напр. терапевтични средства, наречени допълнителни вещества, които са избрани от специалистите в областта за техните цели. Например, допълнително вещество може да бъде терапевтично средство, познато в областта което се използва за лечение на заболяване или състояние, което се лекува от антитялото на настоящето изобретение. Допълнително вещество, може също да бъде вещество, което има полезно приложение за терапевтичния състав, напр. вещество, което оказва ефект върху вискозността на състава.

По-нататък може да се разбере, че комбинациите, които са включени в това изобретение са тези комбинации, полезни за техните цели. Комбинациите които са част от това изобретение, могат да

бъдат антитела от настоящето изобретение и най-малко едно допълнително вещество, избрано от списъка по-долу. Комбинацията може също да включва повече от едно допълнително вещество, например две или три допълнителни вещества, ако комбинацията е такава, че да се образува състав, който може да изпълнява необходимата функция.

Предпочитани комбинации са не-стероидни противовъзпалителни лекарствени препарати, които се отнасят като NSAIDS, които включват лекарствени препарати като ибупрофен. Други предпочитани комбинации са кортикостероиди, включващи преднизолон; добре известните странични ефекти на употребата на стероиди може да бъдат намалени или даже елиминирани, чрез подсилване на стероидната доза, която е необходима, когато пациентите се лекуват в комбинация с анти-IL-18 антитела на изобретението. Не-ограничаващи примери за терапевтични вещества за ревматоиден артрит, с които антитялото или частта на антитялото от изобретението могат да бъдат комбинирани, включват следните: цитокин супресиращ анти-възпалителен лекарствен препарат(и) (CSAIDS); антитела за или антагонисти на други човешки цитокини или растежни фактори, например, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-15, IL-16, EMAP-II, GM-CSF, FGF и PDGF. Антитела от изобретението или антиген-свързващи техни части могат да бъдат комбинирани с антитела за клетъчно повърхностни молекули като, CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90 или техни лиганди включващи CD 154 (gp39 или CD40L).

Предпочитани комбинации от терапевтични средства могат да бъдат въведени на различни етапи от автоимунната и съответната възпалителна каскада; предпочитани примери включват TNF антагонист, като химерни, наподобяващи човешките или човешки

TNF антители, D2E7 (PCT Publication No. WO 97/29131) , CA2 (Remicade™), CDP 571, и разтворимите TNF рецептори - p55 или p75, техни производни, (p75TNFR1gG (Enbrel™) или p55TNFR1gG (Lenercept) и също инхибитори на TNF α конвертиращия ензим (TACE); подобни инхибитори на IL-1 (инхибитори на Интерлевкин-1-конвертиращия ензим, IL-1RA и т.н.) могат да бъдат ефективни поради същите причини. Други предпочитани комбинации включват Интерлевкин 11. Още една предпочитана комбинация са други ключови участници в автоимунния отговор, които могат да действат паралелно, в зависимост или съгласно функцията на IL-18; по-специално предпочитани са антагонисти на IL-12 включително IL-12 антители или разтворими рецептори на IL-12 или IL-12 свързващи белтъци. Показано е, че IL-12 и IL-18 имат припокриващи се, но различни функции и комбинацията от антагонистите на двата могат да бъдат по-ефективни. Още една предпочитана комбинация са намаляващите инхибитори на анти-CD4. Също така, други предпочитани комбинации включват антагонисти на костимулаторния път CD 80 (В 7.1) или CD 86 (В 7.2), включващи антители, разтворими рецептори или антагонисти на лигандите.

Антителата от изобретението, или антиген-свързващите техни участъци, могат също да бъдат комбинирани с вещества, такива като метотрексат, 6-MP, азатиоприен сулфасалазин, месалазин, олсалазин хлорохинин/хидроксихлорохин, пенициламин, ауротиомалат (вътремускулен и орален), азатиоприн, кохицин, кортикостероиди (орални, инхалационни и локални инжекции), бета-2 адренорецепторни агонисти (салбутамол, тербуталин, салметерал), ксантини (теофилин, аминофилин), кромогликат, недокромил, кетотефен, ипратропиум и окситропиум, циклоспорин, FK506, рапамицин, микофенолат мофетил, лефлуномид, NSAIDs, например, ибупрофен, сох-2 инхибитори, сох-2 селективни инхибитори (напр.

рофекоксиб (VIOXX [™], Merck & Co., Inc.)) кортикостероиди като преднизолон, инхибитори на фосфодиестеразите, агонисти на аденозина, антитромбични вещества, инхибитори на комплемента, адренергични вещества, вещества, които се наместват в сигналните пътища на про-възпалителните цитокини, такива като TNF α или IL-1 (напр. IRAK, NIK, IKK, p38 или MAP киназни инхибитори), инхибитори на IL-1 β конвертиращите ензими, инхибитори на TNF α конвертиращите ензими (TACE), инхибитори на Т-клетъчните сигнални пътища, такива като киназни инхибитори, металопротеиназни инхибитори, сулфасалазин, азатиоприн, 6-меркаптопурини, инхибитори на ангиотензин конвертиращия ензим, разтворими рецептори на цитокини и техни производни (напр. разтворимите p55 или p75 рецептори на TNF и техни производни p75INFRlgG (Enbrel [™] и p55TNFRlgG (Lenercept)), sIL-IRI, sIL-1RII, sIL-6R) и противовъзпалителни цитокини (напр. IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 и TGF β). Предпочитани комбинации включват метотрексат или лефлуномид и в случаите на среден или остър ревматоиден артрит, циклоспорин.

Не-лимитиращи примери за терапевтични вещества за чревни възпалителни заболявания, с които антитяло или част на антитяло от изобретението може да бъде комбиниран включва следните: буденозид; епидермален растежен фактор; кортикостероиди; циклоспорин; сулфасалазин; аминосалицилати; 6-меркаптопурин; азатиоприн; метронидазол; инхибитори на липоксигеназата; мазаламин; олсалазин; балсалазид; антиоксиданти; тромбоксанови инхибитори; IL-1 рецепторни антагонисти, анти-IL-1 β моноклонални антитела; анти-IL-6 моноклонални антитела; растежни фактори; инхибитори на еластазата; пиридинил-имидазолови съединения; антитела разпознаващи или антагонисти на други човешки цитокини или растежни фактори, например, TNF, LT, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-

12, IL-15, IL-16, EMAP-II, GM-CSF, FGF и PDGF. Антитела от изобретението, или антиген-свързващи техни части, могат да бъдат комбинирани с антитела към клетъчно повърхностни молекули, такива като CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 или техни лиганди. Антителата от изобретението, или антиген-свързващите техни части, могат също да бъдат комбинирани с вещества, такива като метотрексат, циклоспорин, FK506, рапамицин, микофенолат мофетил, лефлуномид, NSAIDs, например, ибупрофен, кортикостероиди като преднизолон, инхибитори на фосфодиестеразите, агонисти на аденозина, антитромбични вещества, инхибитори на комплемента, адренергични вещества, вещества, които се наместват в сигналните пътища на про-възпалителните цитокини, такива като $\text{TNF}\alpha$ или IL-1 (напр. IRAK, NIK, IKK, p38 или MAP киназни инхибитори), инхибитори на IL-1 β конвертиращите ензими, инхибитори на $\text{TNF}\alpha$ конвертиращите ензими, инхибитори на T-клетъчните сигнални пътища, такива като киназни инхибитори, металопротеиназни инхибитори, сулфасалазин, азатиоприн, 6-меркаптопурины, инхибитори на ангиотензин конвертиращия ензим, разтворими рецептори на цитокини и техни производни (напр. разтворимите p55 или p75 рецептори на TNF, sIL-IRI, sIL-1RII, sIL-6R) и противовъзпалителни цитокини (напр. IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 и TGF β).

Предпочитани примери за терапевтични вещества за болест на Crohn, в които антитялото или антиген свързващата негова част може да включва следните: TNF антагонисти, например анти-TNF антитела, D2E7 (PCT Publication No. WO 97/29131), CA2 (Remicade™), CDP 571, TNFR-Ig конструкции, (p75TNFR1gG (Enbrel™) или p55TNFR1gG (Lenercept), инхибитори на PDE4. Антителата от изобретението или антиген-свързващите техни части, могат да бъдат комбинирани с кортикостероиди, например буденозид и

дексаметазон. Антителата от изобретението и антиген-свързващите техни части могат също да бъдат комбинирани с вещества, като сулфасалазин 5-аминосалицилова киселина и олсалазин и с вещества, които се намесват в синтеза или действието на про-възпалителните цитокини, като IL-1, например инхибитори на Интерлевкин-1 β -конвертиращия ензим, инхибитори на IL-1 α . Антителата от изобретението или антиген-свързващите техни участъци могат също да бъдат използвани с инхибитори на Т-клетъчните сигнални пътища, например тирозин киназни инхибитори, 6-меркаптопурины. Антителата от изобретението или антиген-свързващите техни участъци, могат да бъдат комбинирани с IL-11.

Не-ограничаващи примери за терапевтични средства за мултитиплена склероза, с които антитялото или частта на антитялото от изобретението могат да бъдат комбинирани, включват следните: кортикостероиди; преднизолон; метилпреднизолон; азатиоприн; циклофосфамид; циклоспорин; метотрексат; 4-аминопиридин; тизанидин; интерферон- β 1a (Авонекс, Биоген), интерферон- β 1b (Бетасерон; Chorion/Berelex); Кополимер 1 (Cop-1; Копаксон; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); кислород под високо налягане; интравенозен имуноглобулин; клабрибин; антитела срещу антагонисти или други човешки цитокини или растежни фактори, например, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-15, IL-16, EMAP-II, GM-CSF, FGF и PDGF. Антитела от изобретението или антиген-свързващи техни части могат да бъдат комбинирани с антитела към клетъчно повърхностни молекули като, CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 или техни лиганди. Антителата от изобретението, или антиген-свързващите техни части, могат също да бъдат комбинирани с вещества, такива като метотрексат, циклоспорин, FK506, рапамицин, микофенолат мофетил, лефлуномид, NSAIDs, например, ибупрофен, кортикостероиди като

преднизолон, инхибитори на фосфодиестеразите, агонисти на аденозина, антитромбични вещества, инхибитори на комплемента, адренергични вещества, вещества, които се наместват в сигналните пътища на про-възпалителните цитокини, такива като $\text{TNF}\alpha$ или IL-1 (напр. IRAK, NIK, IKK, p38 или MAP киназни инхибитори), инхибитори на IL-1 β конвертиращите ензими, TACE инхибитори, инхибитори на Т-клетъчните сигнални пътища, такива като киназни инхибитори, металопротеиназни инхибитори, сулфасалазин, азатиоприн, 6-меркаптопурины, инхибитори на ангиотензин конвертиращия ензим, разтворими рецептори на цитокини и техни производни (напр. разтворимите p55 или p75 рецептори на TNF, sIL-IRI, sIL-1RII, sIL-6R) и противовъзпалителни цитокини (напр. IL-4, IL-10, IL-13 и TGF β).

Предпочитани примери за терапевтични агенти за множествена склероза, в които антиятлото или антиген свързващата негова част може да бъде комбинирано да включва интерферон- β , например INF β 1a и INF β 1b; копаксон, кортикостероиди, инхибитори на IL-1, инхибитори на TNF и антитела за CD40 лиганда и CD 80.

Фармацевтичните състави от изобретението могат да включват “терапевтично ефективно количество” или “профилактично ефективно количество” от антиятло или част на антиятло от изобретението. “Терапевтично ефективно количество” се отнася до количество ефективно по отношение на дозирането за необходим период от време, и с цел да се получи желания терапевтичен резултат. Терапевтично ефективното количество от антиятло или част на антиятло, може да варира съгласно фактори, като етап от заболяването, възраст, пол, тегло на индивида и способност на антиятлото или частта на антиятлото да осъществи желания отговор в индивида. Терапевтично ефективно количество може също да е това, при което всички токсични или вредни ефекти на антиятлото или

частта на антитялото са преодолені от терапевтично полезните ефекти. Обикновено, тъй като профилактичната доза се използва за обекти преди или в същия етап от заболяването, профилактично ефективното количество ще е по-малко от терапевтично ефективното количество.

Дозовият режим може да бъде нагласен, така че да осигури оптималният желан отговор (напр. терапевтичен или профилактичен отговор). Например, единичен болус може да бъде въведен, като няколко отделни дози могат да бъдат въведени извънредно или дозата може да бъде пропорционално редуцирана или увеличена както се налага при неотложните случаи на терапевтичната ситуация. Специално предимство е да се приготвят парентерални състави в единица дозирана форма за улеснение при въвеждането и еднообразието на дозата. Единица дозирана форма, както се използва тук, се отнася до физически дискретни единици разпределени, като единични дози за бозайници, които трябва да бъдат лекувани; всяка единица съдържа по-малко от вредното количество от активно съединение, изчислено така че да доведе до желания терапевтичен ефект, във връзка с желания фармацевтичен носител. Спецификацията на единиците дозирани форми от изобретението са продиктувани от и директно зависят от (а) уникалните характеристики на активните съединения и специфичните терапевтични или профилактични ефекти, които трябва да бъдат постигнати, и (б) ограниченията присъщи в областта при формулиране на съединения, като активно съединение за лечение на чувствителност в индивидите.

Примерен, не-ограничаващ диапазон на терапевтично или профилактично ефективно количество от антитяло или частта на антитяло от изобретението е 0.1-20 mg/kg, за предпочитане 1-10 mg/kg. Трябва да се отбележи, че дозовите стойности могат да варират с типа и остротата на състоянието което трябва да се

облекчи. Трябва по-нататък да се разбере за всеки отделен обект, специфичния дозов режим, който трябва да бъде нагласен извънредно, съгласно индивидуалната необходимост и професионалното поставяне за въвеждане в човека или контрол на въвеждането на съставите, и че дозовите диапазони изложен тук са само примерни и нямат за цел да ограничат обхвата или практиката на заявените състави.

Методи за получаване на анти-IL-18 антитела

Анти-IL-18 антителата от изобретението се приготвят, като се използват много методи, известни в областта за получаване на антитела и чрез използване на антигени, включващи пептидния епитоп на IL-18, описан в подглава I, т.е. епитоп на човешки IL-18, включващ аминокиселините LFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO:1).

Най-общо, методите от изобретението за получаване на антитяло, което се свързва с човешки интерлевкин - 18 (IL-18) включва:

излагане на репертоар от антитела на антиген включващ епитоп на човешки IL-18, включващ аминокиселините PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO:1), или негови части (напр. SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:33); и

избор от репертоара от антитела на антитяло, което се свързва с епитопа на човешки IL-18, включващ аминокиселините PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO:1), или негови части (напр. SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:33).

В един вариант, репертоарът от антителата е *in vivo* репертоар на животно и методът включва имунизирание на животно с антиген, включващ епитоп от човешки IL-18, включващ аминокиселинните последователности PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO: 1). В друг

вариант на изобретението, репертоарът от антитела е рекомбинантна библиотека на антитела и методът включва скрининг на библиотеката с антиген, включващ епитопът на IL-18, който включва аминокиселинните последователности PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO: 1) За предпочитане е библиотеката да е библиотека на човешки антитела.

Методи за имунизирание на животно с антиген за да се получат специфични антитела към антигена са добре известни в областта. IL-18 антигенът, включващ епитоп на човешки IL-18, включващ аминокиселините PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO: 1) може да бъде въведен в животно за да доведе до получаването на поликлонални антитела, които се свързват с епитопа, които могат да бъдат изолирани, чрез селекция от тези поликлонални антитела, които се свързват с епитопа (напр. чрез пропускане на поликлонален антисерум през колона, която съдържа пептида, включващ аминокиселините PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO: 1) на hIL-18). Антигенът който се използва да доведе до образуването на поликлонални антитела може да бъде интактен (т.е. в пълната си дължина) hIL-18 или може да бъде част от hIL-18, който да включва съответният епитоп, например синтетичен пептид, включващ аминокиселините PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO: 1) на hIL-18. По-нататък, моноклонални антитела срещу епитопа могат да бъдат приготвени от гореспоменатите животни, като се използва стандартна хибридомна технология и селекция на тези хибридоми, които секретират антитяло, което специфично се свързва със съответния епитоп, напр. чрез скрининг на хибридоми за пептиди, включващи аминокиселините PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO: 1) на hIL-18 и избор на антитела, които се свързват специфично с пептида.

In vitro методи също могат да бъдат използвани, за да се направят антитела от изобретението, като се скринира библиотека от

антитела за да се идентифицира антиляло, което има желаната свързваща специфичност. Методи за такъв скрининг от рекомбинантни библиотеки на антитела са добре известни в областта и включват методи описани в, например Lander et al. U.S. Патент No. 5, 223.409; Kang et al. PCT Publication No. WO 92/18619; Dower et al. PCT Publication No. WO 91/17271; Winter et al. PCT Publication No. WO 92/20791; Markland et al. PCT Publication No. WO 92/15679; Breitling et al. PCT Publication No. WO 93/01288; McCafferty et al. PCT Publication No. WO 92/01047; Garrard et al. PCT Publication No. WO 92/09690; Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay et al. (1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81-85; Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281; McCafferty et al., Nature (1990) 348:552-554; Griffiths et al. (1993) EMBO J 12:725-734; Hawkins et al. (1992) J Mol Biol 226:889-896; Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628; Gram et al. (1992) PNAS 89:3576-3580; Garrad et al (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137; и Barbas et al. (1991) PNAS 88:7978-7982 и PCT Publication No. WO 97/29131, съдържанията на всеки от които са въведени тук в литературната справка.

Библиотеката на рекомбинантните антитела може да бъде от лице, имунизирано с IL-18 или част на IL-18, включващ епитоп от аминокиселините PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO: 1). От друга страна, библиотеката от рекомбинантните антитела може да бъде от лице, което досега не е било имунизирано с IL-18, като библиотека на човешки антитела от човек, който не е бил имунизиран с човешки IL-18. Антителата от изобретението са избрани чрез скрининг на библиотека на рекомбинантни антитела, с епитота от аминокиселините PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO: 1) на човешкия IL-18, за да се изберат тези антитела, които разпознават епитопа. Методи за провеждане на такъв скрининг и селекция са добре известни в

областта, както е описано в литературната справка от предишния параграф.

За да се изберат антитела от изобретението, които имат специфична свързваща активност по отношение на hIL-18, може да се използва добре познатият в областта метод на повърхностния плазмон резонанс. За да се изберат антитела, които имат специфична неутрализираща активност по отношение на hIL-18, могат да се използват стандартни методи, известни в областта за оценка на инхибирането на активността на hIL-18. Също така в областта са известни методи за имунизирание на мишки, които са трансгенно променени, за да кодират репертоар от човешки имуноглобулини и да са способни да експресират цели човешки антитела в отговор на имуноген (виж. напр. U.S.P.N.s 5,877,397 и 6,150,584).

Използване на анти-IL-18 антитела

Поради тяхната способност да се свързват с hIL-18, анти-hIL-18 антителата или техни участъци от изобретението могат да бъдат използвани за детекция на hIL-18 (напр. в биологични проби, като серум или плазма), като се прилага общоприет имуноанализ, като ензимно свързан имуносорбентен анализ (ELISA), радиоимуноанализ (RIA) или тъканна имунохистохимия. Изобретението осигурява метод за детекция на hIL-18 в биологична проба, включваща контакт на биологичната проба с анти тяло или с част на анти тяло от изобретението и детекция на анти тялото (или частта на анти тялото) свързано с hIL-18 и на несвързано анти тяло (или част на анти тяло), за да се направи по този начин детекция на hIL-18 в биологичната проба. Анти тялото се бележи директно или индиректно със субстанция за детекция за да се улесни детекцията на свързаното или не-свързаното анти тяло. Подходящи субстанции за детекция,

включват различни ензими, простетични групи, флуоресцентни материали, луминисцентни материали и радиоактивни материали. Примери за подходящи ензими включват пероксидаза от хрян, алкална фосфатаза, β -галактозидаза или ацетилхолинестераза; примери за комплекси на подходящи простетични групи включват стрептавидин/биотин и авидин/биотин; примери за подходящи флуоресцентни материали включват умбелиферон, флуоресцин, флуоресцин изотиоцианат, родамин, дихлоротразиниламин флуоресцин, данзил хлорид или фикоеретрин; пример за луминисцентен материал включва луминол; и примери за подходящи радиоактивни материали включват ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ^{32}P , ^{33}P , или ^3H .

От друга страна, белязането на антителата, hIL-18 може да бъде анализиран в биологични течности, чрез конкурентен имуноанализ, с използване на rhIL-18 стандарти, белязани със субстанция за детекция и с небелязано анти-hIL-18 антитяло. При този анализ, биологичната проба, белязаните rhIL-18 стандарти и анти-hIL-18 антитяло се смесват и се определя количеството на белязания rh-IL-18 стандарт, който се свързва с небелязаното антитяло. Количеството на hIL-18 в биологичната проба е обратно пропорционално на количеството белязан rhIL-18 стандарт, свързан към анти-hIL-18 антитялото.

Антителата и участъците на антителата от изобретението за предпочитане са способни да неутрализират активността на hIL-18 *in vitro* и *in vivo*. Съгласно този факт, такива антитела и участъци на антитела от изобретението могат да бъдат използвани за да инхибират активността на hIL-18, напр. в клетъчна култура, съдържаща hIL-18, в хора или в други бозайници, които имат IL-18, с който антитялото от изобретението може да крос-реагира. В един вариант, изобретението осигурява метод за инхибиране на активността на IL-18, включващ, осъществяването на контакт между човешкия IL-18 с антитялото или частта на антитялото от изобретението, като се инхибира активността

на IL-18. За предпочитане, IL-18 е човешки IL-18. Например, в клетъчна култура, която съдържа или, която се предполага че съдържа hIL-18, антиятлото или частта на антиятлото от изобретението, могат да бъдат добавени към културалната среда за да се инхибира активността на hIL-18 в културата.

В друг вариант, изобретението осигурява метод за инхибиране на активността на IL-18 в човек, страдащ от нарушения при които активността на IL-18 е вредна. Изобретението осигурява методи за инхибиране на активността на IL-18 в обект, страдащ от нарушение, който метод включва въвеждане в обект на антиятло или част на антиятло от изобретението, така че активността на IL-18 в обекта да бъде инхибирана. За предпочитане IL-18 е човешки IL-18 и обекта е човек. От друга страна, обекта може да бъде бозайник, който експресира IL-18, с който антиятлото от изобретението крос-реагира. Още по-нататък обектът може да бъде бозайник, в който се въвежда hIL-18 (напр. чрез въвеждане на hIL-18 или чрез експресия на трансгенен hIL-18). Антиятло от изобретението може да бъде въведено в човек с терапевтични цели. Още повече, антиятло от изобретението може да бъде въведено в бозайник, не-човек, който експресира IL-18 с който антиятлото крос-реагира, с ветеринарни цели или за създаване на животински модел на човешки заболявания. Що се отнася до последното, такива животински модели могат да се използват за оценка на терапевтичната ефективност на антителата от изобретението (напр. тестване на дозировките и времевият курс на въвеждане).

По-специално, като животински модел на активността на IL-18 в животно се използват NOD-SCID мишки, в които са трансплантирани моноклеарни клетки на периферна човешка кръв. След две до четири седмици след приемането на трансплантанта (което се определя, чрез измерването на титъра на човешки IgG в

серума), мишките се инжектират с LPS (липополизахарид). След четири до шест часа по-късно се определя титъра на LPS-индуцирания интерферон-гама. Ефективността (силата) на анти-IL-18 антителата (напр. IL-18 неутрализиращите антитела) се определя чрез инжектиране на антиелата (ip) един ден преди LPS въвеждането, последвано от проследяване на тестваните животни за способността да редуцират титъра на интерферон-гама в серума (функцията на IL-18 *in vivo*) в сравнение с контроли (виж напр. Holmes et al., *Hybridoma*, 19:363367 (2000)).

Както се използва тук, терминът “нарушение при което активността на IL-18 е вредна” има за цел да включи заболявания или други нарушения за които е показано или се подозира, че присъствието на IL-18 в обекта, страдащ от нарушението, е отговорно за патофизиологията или за нарушението, или е фактор допринасящ за влошаване на нарушението. Съгласно това, нарушение, при което активността на IL-18 е вредна, е нарушение, при което инхибирането на активността на IL-18 се очаква да облекчи симптомите и/или прогресията на нарушението. Такива нарушения могат да бъдат доказани, например, чрез увеличаване на концентрацията на IL-18 в биологичните течности на обекта, страдащ от нарушение (напр. повишена концентрация на IL-18 в серума, плазмата, синовиалната течност и т.н. на обекта), който може да бъде детектиран, например чрез използване на анти-IL-18 антитела, както е описано по-горе.

Не-ограничаващи примери на нарушения, могат да бъдат лекувани с антитела от изобретението, отнасящи се до фармацевтични състави на антителата от изобретението, включително тези нарушения, дискутирани в главата по-горе.

Други характеристики на изобретението, които не са конструирани с цел да ограничат обхвата на изобретението, ще станат очевидни от следващите примери.

ПРИМЕРИ ЗА ИЗПЪЛНЕНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Най-общо, практиката на настоящето изобретение използва, освен ако не показва, конвенционални техники на химията, молекулярната биология, рекомбинантната ДНК технология, PCR технологията, имунологията (по-специално напр. технологията, касаеща антителата) и всички необходими техники за клетъчно култивиране и отглеждане на животни, които са известни за специалистите в областта и са напълно обяснени в литературата. Виж напр. Sambrook, Fritsch and Maniatis, *Molecular Cloning*: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); *DNA Cloning*, Vols. 1 and 2, (D.N. Glover, Ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, Ed. 1984); *PCR Handbook Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, Beaucage, Ed. John Wiley & Sons (1999) (Editor); *Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure*, Neidle, Ed., Oxford Univ Press (1999); *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis et al., Academic Press (1990); *PCR Essential Techniques: Essential Techniques*, Burke, Ed, John Wiley & Son Ltd (1996); *The PCR Technique: RT-PCR*, Siebert, Ed., Eaton Pub. Co. (1998); *Quantitative PCR Protocols*, Kochanowski et al., Eds., Humana Press (1999); *Clinical Applications of PCR*, Lo, Ed, Humana Press (1998); *Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology)*, 510, Paul, S., Humana Pr 1996; *Antibody Engineering A Practical Approach (Practical Approach Series, 169)*, McCafferty, Ed. Irl Pr (1996); *Antibodies A Laboratory Manual*, Harlow et al., Press, Pub (1991); *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons (1992); *Large-Scale Mammalian Cell Culture Technology*, Lubiniecki, A., Ed., Marcel Dekker, Pub., (1990); and *Manipulating the Mouse Embryo*, Hogan et al., C.S.H.L. Press, Pub (1994).

В примерите са използвани гореспоменатите методи, освен ако не е показано друго,

ПРИМЕР 1

Изолиране на анти-IL-18 антитела

Антителата за hIL-18 се изолират, чрез скрининг на отделни scFv фагови библиотеки, приготвени, чрез използването на човешки VL и VH кДНКи от иРНК, получени от човешки В-клетки (например от сливиците или далака). Конструирането на библиотеката и методите за селекция са изложени във Vaughan et al. (1996) Nature Biotech. 14:309-314.

Библиотеките се скринират, като се използва пълната дължина на човешкия IL-18 (SEQ ID NO: 61), пептиден епитоп на IL-18 (SEQ ID NOS: 1-3) или панел от припокриващи се пептиди, включващи 15 аминокиселини, представящи IL-18 (епитопната секвенция, представена в Таблица 5; SEQ ID NOS: 31-60). Специфичните антитела за IL-18 са избрани чрез покриване с антиген на имуноспруветките, като се използват стандартни процедури (Marks et al., (1991) J. Mol. Biol. 222:581-597). svFv библиотеките се скринират, като се използва IL-18, пептиден епитоп на IL-18 или панел от IL-18 пептиди, за да се създаде значителен брой IL-18 специфично свързващи се антитела. Няколко различни клонотипове се избират, определят се чрез моделите на ензимно рестриктазно рязане и се потвърждават, чрез секвениране.

За да се идентифицират IL-18 антителата, които се свързват специфично с пълната дължина на IL-18 или с представителен неин пептид, супернатантата, съдържаща scFv се титрува върху биотин,

свързан с IL-18, чрез ELISA и се определят характеристиките на свързване.

Две анти-IL-18 едно-верижни антитела са получени, едното е наречено 2E1, независимо изолирано, чрез използването на пептиден епитоп и пептиден панел, и второто анти-IL-18 антитяло е наречено LT28, изолирано, чрез използване на пълната дължина на IL-18. Тези родителски анти-IL-18 антитела са избрани за по-нататъшно изследване и модификация.

ПРИМЕР 2

Афинитетно зреење на анти-IL-18 антителата

Версия на едно-верижното Fv антитяло 2E1, което притежава доказана IL-18 свързваща способност, секвенциите на тежката и леката верига на което са показани в Таблица 6, е по-нататък модифицирано, с цел подобряване способността за неутрализиране на активността на IL-18.

ТАБЛИЦА 6 СЕКВЕНЦИЯ НА ЕДНО-ВЕРИЖНОТО АНТИ-IL-18

АНТИТЯЛО 2E1

2E1 тежка верига (SEQ ID NO: 18)	
CDR1 (SEQ ID NO: 9) QVQLVQSGAEVKKPGASMKVSCKTSGYTF <u>FTGYIYI</u> HWVRQAHGQGFEWI	
CDR2 (SEQ ID NO: 10) <u>GRINPTTG</u> DANFAEK <u>FQ</u> GRVALTRDTSISTAYLQLDSLKSDDTAVYYCAG <u>KEGA</u> WGQG TLVTVSS	CDR3 (SEQ ID NO: 11) <u>KEGA</u> WGQG

ТАБЛИЦА 6 СЕКВЕНЦИЯ НА ЕДНО-ВЕРИЖНОТО АНТИ-IL-18**АНТИТЯЛО 2E1 (ПРОДЪЛЖЕНИЕ)**

2E1 лека верига (SEQ ID NO: 19)	
CDR1 (SEQ ID NO: 12)	CDR2 (SEQ ID NO: 13)
SSELTQDPAVSVALGQTVRITC <u>QGDSLRHFYP</u> PNWYQQKPGQAPV	LVIY <u>GKNNRPS</u>
CDR3 (SEQ ID NO: 14)	
GIPDRFSGSGSGNTGSLTITGAQAEDEADYYC <u>GSRDSSGIHV</u> VFGGGTKVTVLG	

Анти-IL-18 антитялото 2E1 е независимо избрано, чрез използване на IL-18 пептид и след това, на панел от припокриващи се пептиди, представителни за IL-18 (виж Табл.6).

Специфичните аминокиселинни остатъци на вариабилния район на тежката верига, избрани за мутагенезиса са обобщени в Таблица 7. По-специално, по отношение на района на тежката верига, отделни аминокиселинни самествания са тествани в позиции H30, H31, H32, H33 и H35 от CR1, позициите H52, H52a, H53, H54, H56 и H58 от CDR2 и H95, H96, H97 и H98 от CDR3.

По отношение на леката верига, аминокиселинните остатъци, избрани за мутагенез са L30, L31, L32, L33 и L35 от CR1, позициите L50, L52, L53 и L55 от CDR2 и L89, L90, L91, L92, L93, L94, L95, L95a, L95b, L96 и L97 от CDR3.

ТАБЛИЦА 7. АМИНОКИСЕЛИННИ ЗАМЕШТАВАНИЯ В ТЕЖКАТА**ВЕРИГА, ВЪВЕДЕНИ В 2Е1**

Мутации в тежката верига	
CDR / Kabat	заместен остатък
Позиция	
CDR1	
H30	A, R, N, D, C, G, H, I, F, P, S, or V
H31	A, C, H, S, T, or Y
H32	R, N, C, H, P, S, or T
H33	N, D, C, Q, H, L, M, F, S, or V
H35	N, D, L, or F
CDR2	
H52	T
H52a	R, Q, L, S, T, or W
H53	A, R, N, L, P, S, or Y
H54	A, R, N, D, Q, L, K, M, P, S, or Y
H56	A, R, N, C, G, H, I, L, or F
H58	A, R, Q, E, H, I, L, K, M, F, S, T, Y, P, S, T, W, Y, or V
CDR3	
H95	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H96	A, R, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H97	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H98	R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C

ТАБЛИЦА 8. АМИНОКИСЕЛИННИ ЗАМЕШТАВАНИЯ В ЛЕКАТА**ВЕРИГА, ВЪВЕДЕНИ В 2Е1**

Мутации в леката верига	
CDR / Kabat	заместен остатък
Позиция	
CDR1	

L30	N, D, C, G, I, L, S, W, or Y
L31	R, N, D, C, G, H, I, L, P, S, T, or Y
L32	R, N, D, E, G, I, L, P, S, T, or V
L34	A, R, N, D, E, H, I, L, K, M, F, P, S, T, Y, or V
CDR2	
L50	A, N, I, L, F, P, S, W, Y, or V
L52	A, R, D, E, H, I, L, M, F, P, S, T, or V
L53	A, R, C, I, L, K, M, P, S, or T
L55	A, R, N, D, C, G, H, I, L, S, T, or Y
CDR3	
L89	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
L90	A, R, E, Q, Y, V, H, P, W, or C
L91	R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
L92	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
L93	A, R, E, Q, Y, V, H, P, W, or C
L94	A, R, E, Q, Y, V, H, P, W, or C
L95	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
L95a	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
L95b	A, R, E, Q, S, Y, V, P, W, or C
L96	A, R, E, Q, S, Y, H, P, W, or C
L97	A, R, E, Q, S, Y, H, P, W, or C

Заместванията са въведени, като се използват стандартни техники (напр., както е описано в Taylor et al., *Nucleic Acids Res.* 13:8764-8758 (1985); Nakamaye et al., *Nucleic Acids Res.* 14:9679-9698 (1986); и Olsen et al., *Methods in Enzymology*, 217:189 (1993)). Накратко, олигонуклеотидни мутанти на даден кодон се синтезират за всяка от позициите, подлежаща на мутагенез. Едно-верижна ДНК матрица се приготвя от оригинален плазмид, носещ едноверижната версия на Fv на гена на антицялото 2E1. Секвенцията от нуклеинови киселини на тежката и лека вериги на 2E1 антицялото е осигурена във

SEQ ID NOS: 62 и 64. Мутантните олигонуклеотиди се използват за да се създаде комплементарна ДНК верига и накрая двойно-верижен плазмид, като по този начин се въвежда тази мутация или различни мутации в даден кодон от анти тялото. По-специално, CDR3 районът на тежката и леката вериги на 2E1 се променя, като се използва QuikChange Kit (Stratagene), съгласно инструкциите на производителя.

Представителен брой клонове, после се получават от всяка мутагенна реакция (т.е. 7 до 36 клона) и тези представляват променена форма на родителското едноверижно 2E1 анти тяло, чиято секвенцията се експресира в бактерии и се пречиства за по-нататъшни *in vitro* и *in vivo* тестове, както е описано по-долу.

При друго скриниране, чрез използване на пълната дължина на IL-18 лиганд, второ анти-IL-18 анти тяло е идентифицирано и избрано за по-нататъшни подобрения, като се използва афинитетно зреење. По-специално, чрез използване на техники, описани по-горе, LT28 анти тялото, което има секвенция на тежката и леката вериги, показани в Таблица 9 (и нуклеиново-киселинната последователност, осигурена в SEQ ID NOS: 66 и 68) по-нататък се модифицира.

ТАБЛИЦА 9. СЕКВЕНЦИЯ НА ЕДНО-ВЕРИЖНОТО АНТИ-IL-18

АНТИ ТЯЛО LT28

LT28 Тежка верига (SEQ ID NO: 28)	
CDR1 (SEQ ID NO: 20)	CDR2 (SEQ ID NO: 21)
LVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS	AI SGSGGSTYYADSVKG
CDR3 (SEQ ID NO: 22)	
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD DDDYDFDYWGRGTMVTVSS	

ТАБЛИЦА 9. СЕКВЕНЦИЯ НА ЕДНО-ВЕРИЖНОТО АНТИ-IL-18**АНТИТЯЛО LT28 (ПРОДЪЛЖЕНИЕ)**

LT28 Лека верига (SEQ ID NO: 29)	
CDR1 (SEQ ID NO: 23)	CDR2 (SEQ ID NO: 24)
QSVLTQPPSASGTPGQRTISC <u>SGSSSNIGINAVN</u> WYQQLPGTAPKLLIY <u>GNDQ</u> RPS	
CDR3 (SEQ ID NO: 25)	
GVPDFRFGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC <u>AAWDDSLSGP</u> VFGGGTKLTVLG	

По отношение на района на тежката верига, аминокиселинни замествания са въведени в позиции H31, H32, H33 и H35 от CDR1, в позициите H50, H51, H52, H52a, H53, H54, H56 и H58 от CDR2 и H95, H96, H97, H98, H99, H100, H100a, H101 и H102 от CDR3.

По отношение на леката верига, аминокиселинните остатъци, избрани за мутациите, заместванията са въведени в позиции L30, L31, L32, L34 от CDR1, в позициите L50, L52, L53 и L55 от CDR2 и L89, L90, L91, L92, L93, L94, L95, L95a, L95b, L96 и L97.

ТАБЛИЦА 10. АМИНОКИСЕЛИННИ ЗАМЕСТВАНИЯ, ВЪВЕДЕНИ**В ТЕЖКАТА ВЕРИГА НА LT 28**

Мутации в тежката верига	
CDR / Kabat	заместен остатък
Позиция	
CDR1	
H31	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H32	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H33	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H35	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C

CDR2	
H50	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H51	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H52	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H52a	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H53	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H54	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H56	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H58	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
CDR3	
H95	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H96	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H97	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H98	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H99	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H100	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H100a	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H101	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H102	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C

ТАБЛИЦА 11. АМИНОКИСЕЛИННИ ЗАМЕСТВАНИЯ, ВЪВЕДЕНИ**В ЛЕКАТА ВЕРИГА НА LT 28**

Мутации в леката верига	
CDR / Позиция	заместен остатък
CDR1	
L30	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L31	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L32	R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C, G
L34	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
CDR2	
L50	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, C
L52	A, R, E, S, Y, V, H, P, W, C
L53	A, R, E, S, Y, V, H, P, W, C, N
L55	A, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
CDR3	
L89	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L90	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L91	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L92	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L93	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L94	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L95	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L95a	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L95b	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L96	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L97	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C

Заместванията са въведени, както е описано по-горе. Представителен брой клонове са получени след това, от всяка реакция на мутагенез и те представляват променени родителски LT28 едноверижни антитела, секвенциите на които се експресират в бактерии и се пречистват по-нататък, както е описано по-долу.

ПРИМЕР 3

Свързваща активност на човешките антитела за IL-18

Реалното време за свързване на лиганда (биотинилиран рекомбинантен човешки IL-18 (rhIL-18) имобилизиран върху биосензорен матрикс) и аналитичен разтвор (антителата в разтвора) се измерват чрез повърхностен плазмон резонанс (SPR), като се използва BIAcore система (Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ). Системата използва оптичните качества на SPR за детекция на промени в концентрацията на белтък в декстранов биосензорен матрикс. Белтъците са ковалентно свързани с декстрановия матрикс, като се знаят концентрациите. Антителата се инжектират през декстрановия матрикс и специфичното свързване на антителата и имобилизирания лиганд води до повишаване на белтъчната концентрация в матрикса и съответно до промяна в SPR сигнала. Тези промени в SPR сигнала се записват като резонансни единици (RU) и е показана зависимостта от времето на у-оста на сензиограмата.

За да се улесни имобилизирането на биотинилиран rhIL-18 върху биосензорния матрикс, към свободните amino групи на декстрановия матрикс се свързва ковалентно стрептавидин, като първо се активират карбоксилните групи на матрикса със 100 mM N-хидроксисукцинимид (NHS) и 400 mM N-етил-N'-(3-диетиламинопропил) карбодимид хидрохлорид (EDC). След това, стрептавидинът се инжектира през активирания матрикс. Тридесет и пет микролитра стрептавидин (25 µg/ml), разтворен в натриев ацетат, pH 4.5 се инжектира през активирания биосензор и свободните амини на белтъка се свързват директно с активираните карбоксилни групи. Нереактивните матриксни EDC-естери се деактивират чрез инжектиране на 1M етаноламин. Стрептавидин-свързаните

биосензорни чипове също са достъпни в търговската мрежа (Pharmacia BR-1000-16, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ).

Биотинилиран rhIL-18 се приготвя първо, чрез разтваряне на 5.0 mg биотин (N-хидроксисукцинимид естер на D-биотинил-ε-аминокапроевата киселина, Boehringer Mannheim Cat. No. 1008 960) в 500 μl диметилсулфоксид за да се направи разтвор 10 mg/ml. Десет микролитра биотин се добавят за 1 ml от rhIL-18 (2.65 mg/ml) за моларно съотношение 2:1 биотин спрямо rhIL-18. Реакционната смес се разбърква внимателно и се инкубира за два часа на стайна температура на тъмно. PD-10 колона, Sephadex G-25M (Pharmacia Catalog No. 17-0851-01) се еквилибрира с 25 ml изстуден PBS и се натоварва с 2 ml rh-IL-18-биотин на колона. Колоната се елуира с 10 x 1 ml изстуден PBS. Фракциите се събират и се отчита OD280 (1.0 OD = 1.25 mg/ml). Подходящите фракции се събират и се съхраняват на -80 °C преди употреба.

Биотинилираният rhIL-18 за да бъде имобилизиран върху матрикс, чрез стрептавидин, е разреден в PBS разделящ буфер (Gibco Cat. No. 14190-144, Gibco BRL, Grand Island, NY). Към него се добавят 0.05% (BIAcore), сърфактант P20 (Pharmacia BR-1000-54, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ). За да се определи капацитета на rhIL-18-специфичните антитела на свързване с биотинилиран rhIL-18, се провежда анализ на свързване както следва. Аликвоти от биотинилиран rhIL-18 (25 nM, 10 μl аликвоти) се инжектират през стрептавидин-свързан декстранов матрикс със скорост на потока 5 μl/min. Преди инжектирането на белтъка и непосредствено след това, през всяка клетка се пропуска само PBS буфер. Чистата разлика в сигнала между базовата линия и приблизително 30 секунди след инжектирането на биотинилиран rhIL-18 се взема, за да се покаже свързващата стойност. Измерва се директното свързване на rhIL-18-специфичното антитяло. Антителата (20 μg/ml) се разреждат в PBS

разделящ буфер и 25 μ l аликвоти се инжектират през имобилизираните белтъчни матрикси със скорост на потока 5 μ l/min. Преди инжектирането на анти тяло и непосредствено след това, през всяка клетка се пропуска само PBS. Чистата разлика на сигнала на базовата линия и сигнала след инжектирането на анти тялото се взема за да се покаже свързващата стойност на всяка проба. Биосензорните матрикси се регенерират, като се използва 100 mM HCl преди инжектирането на следващата проба. За да се установят скоростната константа (K_{off}), скоростната константа (K_{on}), асоциационната скоростна константа (K_a) и дисоциационна скоростна константа (K_d), се прави оценка чрез BIAcore кинетичен софтуер (версия 2.1).

Представителни резултати за подобрен кандидат на анти-IL-18 анти тяло, свързващо се към биотинилиран rhIL-18, в сравнение с родителските анти тела 2E1 и LT28 (и миши контроли), са представени в Таблица 12 по-долу. За всяко сравнение, IC50 стойностите от клетъчно-неутрализиращ анализ са също включени и са описани в Пример 4. Всички клонове се приготвят, като едноверижни Fv анти тела, за тестване се провеждат чрез BIAcore анализ и клетъчно-базиран анализ, описан по-долу. Родителските клонове включват немутирали родителски тежка и лека верига, където мутанти на единична верига съдържат една родителска верига и една мутирала верига, където мутантната верига е определена, независимо дали е тежка (H) или лека (L), в зависимост от Kabat позицията и природата на аминокиселинното заместване.

ТАБЛИЦА 12. СВЪРЗВАНЕ НА АНТИ-IL-18 АНТИТЕЛА, С ПРОИЗХОД

ОТ 2E1 И LT28

Антитяло Клон	Скорост на свързване ($M^{-1}s^{-1}$)	Скорост на дисоцииране (s^{-1})	Kd (M)	IC50 стойност*
2E1 родителски и мутантни				
2E1 _{родителско} ScFv	2.6E+3	6.42E-03	1.5E-07	3.3E-8M
2E1 _{родителско} IgG				9.0E-10M
L34S		1.69E-04		1.5E-8M
H53R		2.34E-03		2.5E-8M
H53Y		-		1.5E-8M
H58Q		-		1.6E-8M
L34S + H53R (2E1RS)	2.7E+03	6.82E-05	2.3E-08	3.0E-09M
L34S + H58Q		-		1.5E-8M
L34S + H53Y		5.28E-05		6.7E-9M
H53R + H58Q		-		1.2E-8M
H53Y + H58Q		-		1.2E-8M
L34S + H53R + H58Q		6.18E-05		2.8E-9M
L34S + H53Y + H58Q		-		8.0E-9M
L90C				4x
L93C				2-4x
L94P, Q, or R				2-4x
L95R, Y				3-8x
L95bE, W				2-4x
LT28 родителски и мутантни				
LT28 _{родителско}	1.3E+04	4.8E-04	3.9E-08	9.0E-8M
H54Q				2-3x
H58W				2-3x
1				
125-2H	1.7E+05	1.1E-04	6.2E-10	2.E-10M
318-M	1.2E+04	1.1E-04	9.6E-09	4.0E-9M

* Показани са някои стойности на подобро нагъване, в сравнение с родителките.

ПРИМЕР 4

Неутрализираща активност на анти-IL-18 антителата

За да се изследва неутрализиращата активност на човешките анти-IL-18 антитела от изобретението, се провежда изкуствен анализ на реорганизация, за контрол на активността на IL-18.

Накратко, в анализа се използват KG1 клетки (ATCC #CCL-246, миелогенни левкимични костно мозъчни клетки), които се култивират, съгласно стандартни техники (напр. чрез използването на RPMI 1640 културална среда Gibco # 21870-076; (допълнена с 10 % фетален говежди серум (BioWhittaker#14-501F); 2mM L-glutamine (Gibco#25030-081); 50 единици/ml пеницилин, 50ug/ml стрептомицин (Gibco#15070-063); и 0,75% натриев бикарбонат.

За да се тества за неутрализиране на IL-18, 3×10^5 KG-1 клетки, стимулирани с 20 ng/ml hTNF-алфа (Lot#19130132) се инкубират с 50 μ l анти-IL-18 антитяло (4 x Конц.) и 50 μ l IL-18 (4 x Конц. = 8ng/ml) и се инкубират на 37 ° C за 1 час или 16-20 часа. За да се определи количествено неутрализирането на IL-18, което се проявява като функция от индуцирането на hINF-гама продукцията, се провежда ELISA, като се използват налични в търговската мрежа ELISA китове (R&D #DIF00/Endogen # EH-IFNG), съгласно инструкциите на производителя и hINF-гама продукцията се изчислява (pg/ml) от стандартна крива.

При всичките четири мутантни антитела, т.е. получени от 2E1 - L34S, H53R, H53Y и H58Q, се наблюдава по-висока степен на неутрализиране на IL-18, в сравнение с родителското 2E1 антитяло (виж Таблица 12). Подобренятия в IC50 стойностите, при използване на KG-1 анализа са от порядъка от 2 до 5 пъти, и са определени чрез BIAcore анализ, подобно на подобрените резултати за свързването.

Много комбинации от мутантни клонове също са направени и тествани и тези данни са обобщени в Таблица 12. Най-добрият комбиниран клон L34S-K35R показва по-голямо от 10 пъти подобрение, в сравнение с родителското антитяло 2E1 и при двата анализа - KG-1 анализа и BIAcore анализа. Полученото антитяло се означава с името 2E1RS.

Няколко други мутантни клона на 2E1, показват подобрена сила, т.е. подобрена способност за неутрализиране на IL-18, както е определено от KG-1 анализа. Мутантът L95Y показва от 5 до 8 пъти по-добри IC50 стойности, в сравнение с 2E1 антитялото. Няколко други мутанти, показват от 2 до 3 пъти подобрение и това са 2E1 мутантите H96A, H96Q, H96S, H98S, L90C, L90W, L93C, L94P, L94Q, L94R, L94W, L95R, L95aA, L95aH, L95aP, L95aR, L95aW, L95bE, L95bW, L95bY, L97C и L97E.

Също се сравнява свързването на 2E1 под формата на ScFv антитяло или IgG антитяло (виж Фиг. 5).

Още по-нататък, два мутанта, произлизащи от LT28 родител, биха подобрили неутрализирането на IL-18 активността, в сравнение с родителското антитяло.

Тези резултати показват, че напълно неутрализиращи човешкия IL-18 антитела, могат да бъдат получени, като се използват методите и съставите на изобретението.

ЕКВИВАЛЕНТИ

Специалистите в областта ще разпознаят, или ще бъдат способни да разберат, като използват не повече от рутинни експерименти, многото еквиваленти на специфичните варианти от изобретението, описани тук. Такива еквиваленти са с цел да влезнат в обхвата на дадените по-долу патентни претенции.

ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Съединение, способно да се свързва с аминокиселинната последователност на човешки IL-18, или част от нея, където аминокиселинната последователност включва секвенция, избрана от групата включваща SEQ ID NO:67 и SEQ ID NO: 68.

2. Съединение, съгласно претенция 1, където споменатото съединение е избрано от групата, включваща малка молекула, пептид, полипептид, антитяло и фрагмент от антитяло.

3. Съединение, съгласно претенция 2, където споменатото антитяло, или фрагмент от антитяло е изцяло човешко.

4. Човешко моноклонално антитяло, или антиген-свързваща негова част, способна да се свързва с човешкия IL-18.

5. Антитялото, съгласно претенция 4, където антитялото или антиген-свързващата негова част, се дисоциира от човешкия IL-18 със скоростна константа $k_{\text{off}} 0.1 \text{ s}^{-1}$ или по-малка, което се определя от повърхностен плазмон резонанс, или която инхибира активността на човешкия IL-18 с IC 50 от $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ или по-малка.

6. Антитялото, съгласно претенция 4, където антитялото или антиген-свързващата негова част, се дисоциира от човешкия IL-18 със скоростна константа $k_{\text{off}} 1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ или по-малка, което се определя от повърхностен плазмон резонанс, или която инхибира активността на човешкия IL-18 с IC 50 от $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ или по-малка.

7. Антитялото, съгласно претенция 4, където антитялото или антиген-свързващата негова част, се дисоциира от човешкия IL-18 със скоростна константа $k_{\text{off}} 1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ или по-малка, което се определя от повърхностен плазмон резонанс, или която инхибира активността на човешкия IL-18 с IC 50 от $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ или по-малка.

8. Антитялото, съгласно претенция 4, където антитялото или антиген-свързващата негова част, се дисоциира от човешкия IL-18 със

скоростна константа $k_{\text{off}} 1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ или по-малка, което се определя от повърхностен плазмон резонанс, или която инхибира активността на човешкия IL-18 с IC 50 от $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ или по-малка.

9. Антитялото, съгласно претенция 4, където антитялото или антиген-свързващата негова част, се дисоциира от човешкия IL-18 със скоростна константа $k_{\text{off}} 1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ или по-малка, което се определя от повърхностен плазмон резонанс, или която инхибира активността на човешкия IL-18 с IC 50 от $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ или по-малка.

10. Антитялото, съгласно претенция 4, където антитялото или антиген-свързващата негова част, се дисоциира от човешкия IL-18 със скоростна константа $k_{\text{off}} 1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ или по-малка, което се определя от повърхностен плазмон резонанс, или която инхибира активността на човешкия IL-18 с IC 50 от $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ или по-малка.

11. Изолирано антитяло или антиген-свързваща негова част, което се свързва с епитопа на човешки IL-18, или с част от него, включващо аминокиселинна секвенция, избрана от групата, включваща SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:33.

12. Антитялото или антиген-свързващата негова част, съгласно претенция 11, където антитялото е неутрализиращо антитяло.

13. Антитялото или антиген-свързващата негова част, съгласно претенция 11, което е човешко антитяло.

14. Антитялото или антиген-свързващата негова част, съгласно претенция 11, което е рекомбинантно антитяло.

15. Антитялото или антиген-свързващата негова част, съгласно претенция 11, което е моноклонално антитяло.

16. Изолирано антитяло или антиген-свързваща негова част, което се свързва с епитопа на човешки IL-18, където антитялото или антиген-свързващата негова част, се дисоциира от човешкия IL-18 със скоростна константа $k_{\text{off}} 0.1 \text{ s}^{-1}$ или по-малка, което се определя от

повърхностен плазмон резонанс, или което инхибира активността на човешкия IL-18 с IC 50 от 1×10^{-6} M или по-малка.

17. Изолираното анти тяло, съгласно претенция 16 или антиген-свързваща негова част, което се дисоциира от човешкия IL-18 със скоростна константа $k_{\text{off}} 1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ или по-малка, което се определя от повърхностен плазмон резонанс, или което инхибира активността на човешкия IL-18 с IC 50 от 1×10^{-7} M или по-малка.

18. Изолираното анти тяло, съгласно претенция 16 или антиген-свързваща негова част, което се дисоциира от човешкия IL-18 със скоростна константа $k_{\text{off}} 1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ или по-малка, което се определя от повърхностен плазмон резонанс, или което инхибира активността на човешкия IL-18 с IC 50 от 1×10^{-8} M или по-малка.

19. Изолираното анти тяло, съгласно претенция 16 или антиген-свързваща негова част, което се дисоциира от човешкия IL-18 със скоростна константа $k_{\text{off}} 1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ или по-малка, което се определя от повърхностен плазмон резонанс, или което инхибира активността на човешкия IL-18 с IC 50 от 1×10^{-9} M или по-малка.

20. Изолираното анти тяло, съгласно претенция 16 или антиген-свързваща негова част, което се дисоциира от човешкия IL-18 със скоростна константа $k_{\text{off}} 1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ или по-малка, което се определя от повърхностен плазмон резонанс, или което инхибира активността на човешкия IL-18 с IC 50 от 1×10^{-10} M или по-малка.

21. Изолираното анти тяло, съгласно претенция 16 или антиген-свързваща негова част, което се дисоциира от човешкия IL-18 със скоростна константа $k_{\text{off}} 1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ или по-малка, което се определя от повърхностен плазмон резонанс, или което инхибира активността на човешкия IL-18 с IC 50 от 1×10^{-11} M или по-малка.

22. Изолирано човешко анти тяло или антиген-свързваща негова част, включващо най-малко един вариабилен район CDR домен, способен да се свърже с епитопа на човешки IL-18.

23. Изолираното антитяло или антиген-свързваща негова част, съгласно претенция 22, където споменатото антитяло, или антиген-свързваща негова част, съдържа най-малко едно аминокиселинно заместване или инсерция, което подобрява свързващата активност на IL-18, в сравнение с не-модифицирано антитяло, или антиген-свързваща негова част.

24. Изолираното антитяло или антиген-свързваща негова част, съгласно претенция 22, където споменатото антитяло, или антиген-свързваща негова част, съдържа най-малко едно аминокиселинно заместване или инсерция, което подобрява неутрализиращата активност на IL-18, в сравнение с не-модифицирано антитяло, или антиген-свързваща негова част.

25. Изолираното антитяло или антиген-свързваща негова част, съгласно претенция 22, където споменатият вариабилен район включва CDR домен, избран от групата на:

тежка верига CDR1 домен, която има аминокиселинна последователност на SEQ ID NO:9 или модифицирана последователност на SEQ ID NO:9, чрез най-малко едно аминокиселинно заместване;

тежка верига CDR2 домен, която има аминокиселинна последователност на SEQ ID NO:10 или модифицирана последователност на SEQ ID NO:10, чрез най-малко едно аминокиселинно заместване;

тежка верига CDR3 домен, която има аминокиселинна последователност на SEQ ID NO:11 или модифицирана последователност на SEQ ID NO:11, чрез най-малко едно аминокиселинно заместване;

26. Изолираното анти тяло или антиген-свързваща негова част, съгласно претенция 25, където споменатият вариабилен район включва CDR домен, избран от групата на:

тежка верига CDR1 домен, модифицирана от SEQ ID NO:9, чрез най-малко едно аминокиселинно заместване в позиция Н 30, Н31, Н32, Н33 или Н35;

тежка верига CDR2 домен, модифицирана от SEQ ID NO:10, чрез най-малко едно аминокиселинно заместване в позиция Н 52, Н52а, Н53, Н54, Н56 или Н58; и

тежка верига CDR3 домен, модифицирана от SEQ ID NO:11, чрез най-малко едно аминокиселинно заместване в позиция Н 95, Н96, Н97, или Н98.

27. Изолираното анти тяло или антиген-свързваща негова част, съгласно претенция 22, където споменатият вариабилен район включва CDR домен, избран от групата на:

лека верига CDR1 домен, която има аминокиселинна последователност на SEQ ID NO:12 или модифицирана последователност на SEQ ID NO:12, чрез най-малко едно аминокиселинно заместване;

лека верига CDR2 домен, която има аминокиселинна последователност на SEQ ID NO:13 или модифицирана последователност на SEQ ID NO:13, чрез най-малко едно аминокиселинно заместване;

лека верига CDR3 домен, която има аминокиселинна последователност на SEQ ID NO:14 или модифицирана последователност на SEQ ID NO:14, чрез най-малко едно аминокиселинно заместване;

28. Изолираното анти тяло, или антиген-свързваща негова част, съгласно претенция 27, където споменатият вариабилен район включва CDR домен, избран от групата на:

лека верига CDR1 домен, модифицирана от SEQ ID NO:12, чрез най-малко едно аминокиселинно заместване в позиция L 30, L31, L32 или L34;

лека верига CDR2 домен, модифицирана от SEQ ID NO:13, чрез най-малко едно аминокиселинно заместване в позиция L 50, L52, L53 или L55; и

лека верига CDR3 домен, модифицирана от SEQ ID NO:14, чрез най-малко едно аминокиселинно заместване в позиция L 89, L90, L91, L92, L 93, L94, L95, L 95a, L95b, L96 или L97.

29. Изолирано антитяло или антиген-свързваща негова част, с вариабилен район, включващ аминокиселинна секвенция, избрана от групата на SEQ ID NO: 15, 16 и 17.

30. Изолирано антитяло или антиген-свързваща негова част, вариабилен район на леката верига (LCVR), включващ аминокиселинната секвенция SEQ ID NO: 15 и вариабилен район на тежката верига (HCVR), включващ аминокиселинната секвенция на SEQ ID NO: 16.

31. Изолирано антитяло или антиген-свързваща негова част, вариабилен район на леката верига (LCVR), включващ аминокиселинната секвенция SEQ ID NO: 15 и вариабилен район на тежката верига (HCVR), включващ аминокиселинната секвенция на SEQ ID NO: 17.

32. Изолираното антитяло или антиген-свързваща негова част, съгласно претенция 22, където споменатият вариабилен район включва CDR домен, избран от групата на:

тежка верига CDR1 домен, която има аминокиселинна последователност на SEQ ID NO:20 или модифицирана последователност на SEQ ID NO:20, чрез най-малко едно аминокиселинно заместване;

тежка верига CDR2 домен, която има аминокиселинна последователност на SEQ ID NO:21 или модифицирана последователност на SEQ ID NO:21, чрез най-малко едно аминокиселинно заместване;

тежка верига CDR3 домен, която има аминокиселинна последователност на SEQ ID NO:22 или модифицирана последователност на SEQ ID NO:22, чрез най-малко едно аминокиселинно заместване;

33. Изолираното анти тяло, или антиген-свързваща негова част, съгласно претенция 32, където споменатият вариабилен район включва CDR домен, избран от групата на:

тежка верига CDR1 домен, модифицирана от SEQ ID NO:20, чрез най-малко едно аминокиселинно заместване в позиция H 30, H31, H32, H33 или H35;

тежка верига CDR2 домен, модифицирана от SEQ ID NO:21, чрез най-малко едно аминокиселинно заместване в позиция H50, H51, H 52, H52a, H53, H54, H56 или H58; и

тежка верига CDR3 домен, модифицирана от SEQ ID NO:22, чрез най-малко едно аминокиселинно заместване в позиция H 96, H96, H97, H98, H99, H100, H100a, H101 или H102.

34. Изолираното анти тяло или антиген-свързваща негова част, съгласно претенция 32, където споменатия вариабилен район включва CDR домен, избран от групата на:

лека верига CDR1 домен, която има аминокиселинна последователност на SEQ ID NO:23 или модифицирана последователност на SEQ ID NO:23, чрез най-малко едно аминокиселинно заместване;

лека верига CDR2 домен, която има аминокиселинна последователност на SEQ ID NO:24 или модифицирана

последователност на SEQ ID NO:24, чрез най-малко едно аминокиселинно заместване;

лека верига CDR3 домен, която има аминокиселинна последователност на SEQ ID NO:25 или модифицирана последователност на SEQ ID NO:25, чрез най-малко едно аминокиселинно заместване;

35. Изолираното антитяло, или антиген-свързваща негова част, съгласно претенция 34, където споменатият вариабилен район включва CDR домен, избран от групата на:

лека верига CDR1 домен, модифицирана от SEQ ID NO:23, чрез най-малко едно аминокиселинно заместване в позиция L 30, L31, L32 или H34;

лека верига CDR2 домен, модифицирана от SEQ ID NO:24, чрез най-малко едно аминокиселинно заместване в позиция L 50, L52, L53 или L55; и

лека верига CDR3 домен, модифицирана от SEQ ID NO:25, чрез най-малко едно аминокиселинно заместване в позиция L 89, L90, L91, L92, L 93, L94, L95, L 95a, L95b, L96 или L97.

36. Изолирано антитяло или антиген-свързваща негова част, с вариабилен район, включващ аминокиселина, избрана от групата на SEQ ID NO: 26, 27 и 29.

37. Изолирано антитяло или антиген-свързваща негова част, с вариабилен район на леката верига (LCVR), включващ аминокиселинна секвенция SEQ ID NO: 29 и вариабилен район на тежката верига (HCVR), включващ аминокиселинна секвенция на SEQ ID NO: 26.

38. Изолирано антитяло или антиген-свързваща негова част, с вариабилен район на леката верига (LCVR), включващ аминокиселинна секвенция SEQ ID NO: 29 и вариабилен район на

тежката верига (HCVR), включващ аминокиселинна секвенция на SEQ ID NO: 27.

39. Изолирана нуклеинова киселина, кодираща антитяло с CDR аминокиселинна последователност, съгласно която и да е от претенции 4-38.

40. Изолираната нуклеинова киселина, съгласно претенция 39, която е в рекомбинантен експресионен вектор.

41. Компетентна клетка, в която рекомбинантният експресионен вектор, съгласно претенция 40 е въведен.

42. Метод за синтез на антитяло, което се свързва с човешки IL-18, характеризиращ се с това, че включва култивирана компетентна клетка, съгласно претенция 41, в културална среда, докато антитяло, което се свързва с човешки IL-18 се синтезира от клетката.

43. Метод, съгласно претенция 42, характеризиращ се с това, че споменатото антитяло е човешко.

44. Фармацевтичен състав, характеризиращ се с това, че включва антитяло или антиген-свързваща негова част, съгласно която и да е от претенции 4-38 и фармацевтично приемлив носител.

45. Фармацевтичен състав, съгласно претенция 44, характеризиращ се с това, че по-нататък включва най-малко едно допълнително терапевтично средство за лечение на нарушение, при което активността на IL-18 е вредна.

46. Фармацевтичен състав, съгласно претенция 45, характеризиращ се с това, че споменатото допълнително вещество е избрано от групата, включваща антитяло или негов фрагмент, способно да се свързва с човешки IL-12, метотрексат анти-TNF, кортикостероиди, циклоспорин, рапамицин, FK506 и не-стероидни противовъзпалителни вещества.

47. Метод за получаване на антитяло, което се свързва с човешки интерлевкин-18 (IL-18), характеризиращ се с това, че включва:

излагане на репертоар от антитела на антиген, включващ епитоп на човешки IL-18 или негова част; и

избор от репертоара от антителата, на антитяло, което се свързва с епитопа на човешкия IL-18, или с негова част

48. Метод, съгласно претенция 47, характеризиращ се с това, че репертоара от антителата е *in vivo* репертоар в животно и методът се характеризира с това че включва имунизирание на животно с антиген, включващ епитоп на човешки IL-18 или негова част.

49. Методът, съгласно претенция 46 или 47, характеризиращ се с това, че споменатият епитоп включва аминокиселинната последователност, избрана от групата, включваща SEQ ID NO:3 и 33

50. Методът, съгласно претенция 47, характеризиращ се с това, че споменатият *in vivo* репертоар е пълен репертоар на човешки имуноглобулини, въведени в генома на животно.

51. Методът, съгласно претенция 47, характеризиращ се с това, че репертоарът от антитела е рекомбинантна библиотека от антитела и методът се характеризира с това, че включва скриниране на библиотеката с антиген, включващ епитоп на човешки IL-18 или негова част.

52. Методът, съгласно претенция 47, характеризиращ се с това, че библиотеката е библиотека от човешки антитела.

53. Метод за инхибиране на активността на човешки IL-18, характеризиращ се с това, че включва осъществяване на контакт на човешки IL-18 със съединение, съгласно претенция 1, така че тази активност на човешкият IL-18 се инхибира.

54. Метод за инхибиране на активността на човешки IL-18, характеризиращ се с това, че включва осъществяване на контакт на

човешкият IL-18 с анти тялото или с антиген-свързваща негова част, съгласно която и да е от претенции 4-38, така че активността на човешкият IL-18 се инхибира.

55. Метод за инхибиране на активността на човешки IL-18, в обект-човек страдащ от нарушение, при което активността на IL-18 е вредна, характеризиращ се с това че включва въвеждане в обекта-човек на съединението, съгласно претенция 1, така, че активността на IL-18 в обекта-човек се инхибира.

56. Метод за инхибиране на активността на човешки IL-18 в обект-човек, страдащ от нарушение, при което активността на IL-18 е вредна, характеризиращ се с това, че включва въвеждане в обекта-човек на човешко анти тяло или на антиген-свързваща негова част, съгласно която и да е от претенции 4-38, така че активността на човешкият IL-18 в обекта-човек се инхибира.

57. Метод за лечение на обект-човек, страдащ от нарушение при което активността на IL-18 е вредна, характеризиращ се с въвеждане на съединение, съгласно претенция 1, така че се постига лечение.

58. Метод за лечение на обект-човек, страдащ от нарушение при което активността на IL-18 е вредна, характеризиращ се с въвеждане на анти тяло, съгласно която и да е претенция 4-38, така че се постига лечение.

59. Метод, съгласно претенция 57 или 58, характеризиращ се с това, че споменатото заболяване е избрано от групата на ревматоиден артрит, остеоартрит, младежки хроничен артрит, артрит на Lyme, псориазисен артрит, реактивен артрит, спондилоартропатия, системен лупус еритрематозус, болест на Crohn, язвен колит, чревна възпалително заболяване, инсулин зависим диабет, милетус, тироидит, астма, алергични заболявания, псориазис, дерматитна склеродерма, заболяване свързано с отхвърляне на трансплантат,

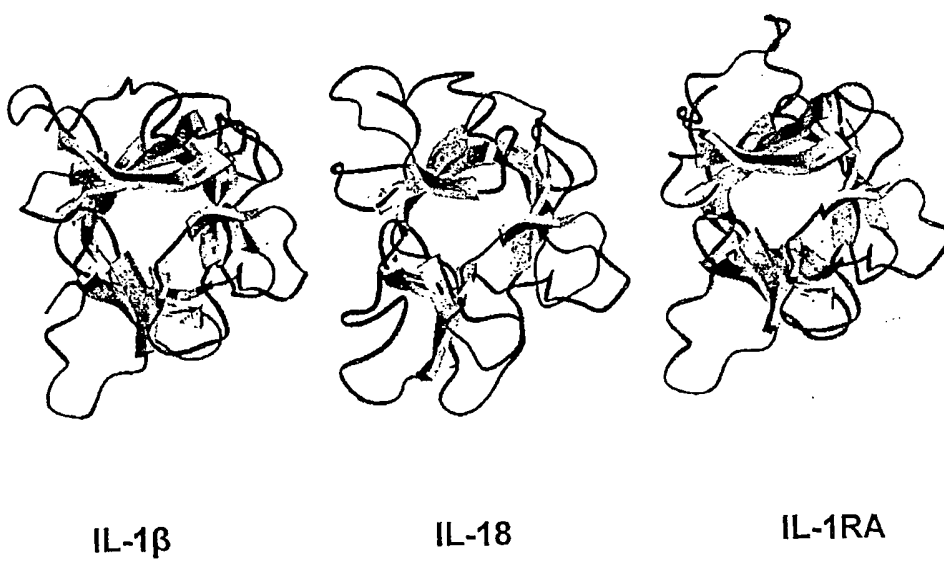
отхвърляне на трансплантирани органи, остро и хронично имунно заболяване, свързано с трансплантиране на органи, саркоидоза, атеросклероза, разпространяваща се интраваскуларна коагутинация, болест на Kawasaki, болест на Grave, нефротичен синдром, синдром на хронична умора, грануломатозис на Wegner, Henoch-Schoenlin пурпура, микроскопичен васкулит на бъбреците, хроничен активен хепатит, увеит, септичен шок, синдром на токсичен шок, сепсис синдром, кахексия, инфекциозни заболявания, паразитни заболявания, придобит имунодефицитен синдром, остър трансверзен миелит, хореа на Huntington, паркинсонова болест, болест на Алцхаймер, удар, първична жлъчна цироза, хемолитична анемия, малигнени образувания, сърдечни нарушения, инфаркт на миокарда, болест на Addison, спорадична болест, полигландуларен дефицит тип I и полигландуларен дефицит тип II, синдром на Schmidt, остър респираторен дистрес синдром при възрастните, алопеция, алопеция ареата, серонегативна артепатия, артропатия, болест на Reiter, псориатозна артропатия, артропатия свързана с язвен колит, ентеропатичен синовит, артропатии свързани с *chlamydia*, *yersinia* и *salmonella*, спондилоартропатия, атероматозна болест/атериосклерозис, atopична алергия, автоимунно булос заболяване, pemphigus vulgaris, pemphigus foliaceus, пемфигоид, линейна IgA болест, автоимунна хемолитична анемия, Combs позитивна хемолитична анемия, придобита перникозна анемия, младежка перникозна анемия, миалгичен енцефалит/Royal Free Disease, хронична мукокутанеусена кандидоза, артерит на големите клетки, първичен склерозен хепатит, криптогенен имунен хепатит, синдром на придобитата имунна недостатъчност, заболявания, свързани със синдрома на придобитата имунна недостатъчност, хепатит C, обикновени вариации на имунодефицит (обикновени вариации на хипогамаглобулинемия), късна кардиомиопатия, женски стерилитет, овариално нарушение,

нарушение в овариалното зреење, фиброзно белодробно заболяване, криогенен фиброзен алвеолит, пост-възпалително интерстициално белодробно заболяване, интерстициални пневмонити, болест на съединителната тъкан, свързана с интерстициални белодробни заболявания, смесена болест на съединителната тъкан, свързана с белодробни заболявания, системна склероза, свързана с интерстициални белодробни заболявания, ревматоиден артрит свързан с вътрешни белодробни заболявания, системен лупус еритроматозис, свързан с интерстициални белодробни заболявания, дерматомиозит/полимиозит, свързан с интерстициални белодробни заболявания, болест на Sjorgen, свързана с белодробни заболявания, анкилозен спондилит, свързан с белодробни заболявания, васкулитична дифузна белодробна болест, хемосидероза, свързана с белодробни заболявания, индуцирано от лекарствени препарати интерстициално белодробно заболяване, фиброза в резултат от радиация, бронхиолит облитеранс, хронична еозинофилна пневмония, белодробно заболяване, свързано с инфилтриране на лимфоци, слединфекционно интерстициално белодробно заболяване, артрит от подагра, автоимунен хепатит, тип-1 автоимунен хепатит (класически автоимунен или лупоиден хепатит), тип-2 автоимунен хепатит (хепатит с анти-LKM антитела), автоимунно медирана хипогликемия, тип В инсулин резистентност с acanthosis nigricans, хипопаратироидизъм, остро имунно заболяване, свързано с органна трансплантация, хронично имунно заболяване, свързано с органна трансплантация, остеоартроза, първичен склерозен холангит, псориазис тип 1, псориазис тип 2, идиопатична левкопения, автоимунна неутропения, бъбречно заболяване NOS, гломерулонефрит, микроскопски вазулит на бъбреците, болест на Lyme, дискоиден лупус еритематозус, мъжки стерилитет идиопатичен или NOS, спермален автоимунитет, множествена склероза (всички

подтипове), симпатикусова офталмия, повишено белодробно налягане, вторично заболяване-следствие от болест на съединителната тъкан, синдром на Goodpasture, белодробна проява на полиартеритис нодоза, остри ревматични гадения, ревматоиден спондилит, болест на Still, системна склероза, синдром на Sjorgen, болест на Takayasu/артерит, автоимунна тромбоцитопения, идиопатична тромбоцитопения, автоимунна тироидна болест, хипетироидизъм, гушев автоимунен хипотироидизъм (болест на Hashimoto), атрофия с автоимунен хипотироидизъм, първична миксодема, факогенен увент, първичен васкулит, витилго, остро чернодробно заболяване, хронични чернодробни заболявания, алергия и астма, умствени нарушения (напр. депресия и шизофрения), Th2- и Th1- тип медираны заболявания.

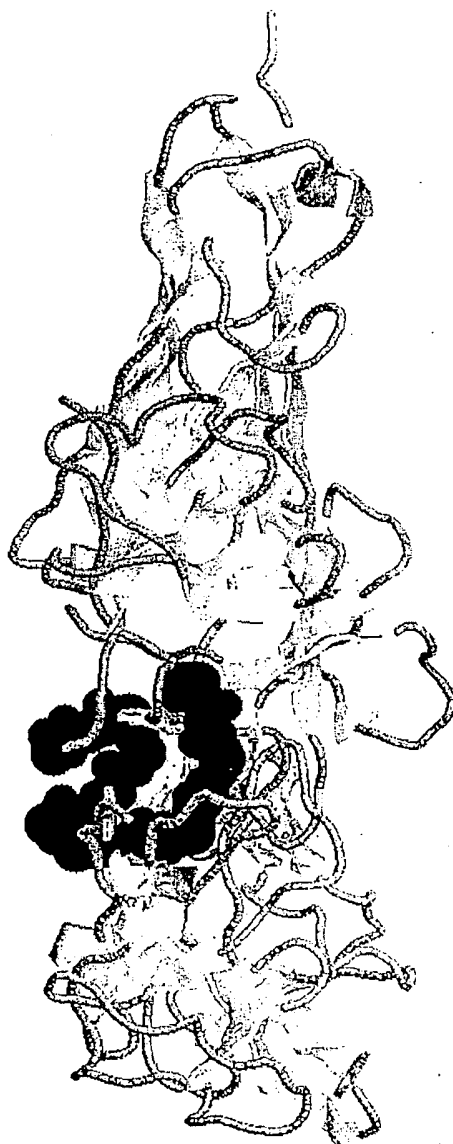
60. Метод за лечение на пациент страдащ от нарушение, при което активността на IL-18 е вредна, характеризиращ се с това, че включва етапа на въвеждане на анти-IL-18 антитяло, преди, паралелно със или след въвеждането на второ вещество, където второто вещество е избрано от групата на анти-IL-12 антитяло или антиген-свързващ негов фрагмент, метотрексат, анти-TNF антитяло или антиген свързващ негов фрагмент, кортикостероиди, циклоспорин, рапамицин, FK506 и не-стероидни противо-възпалителни вещества.

Фиг. 1



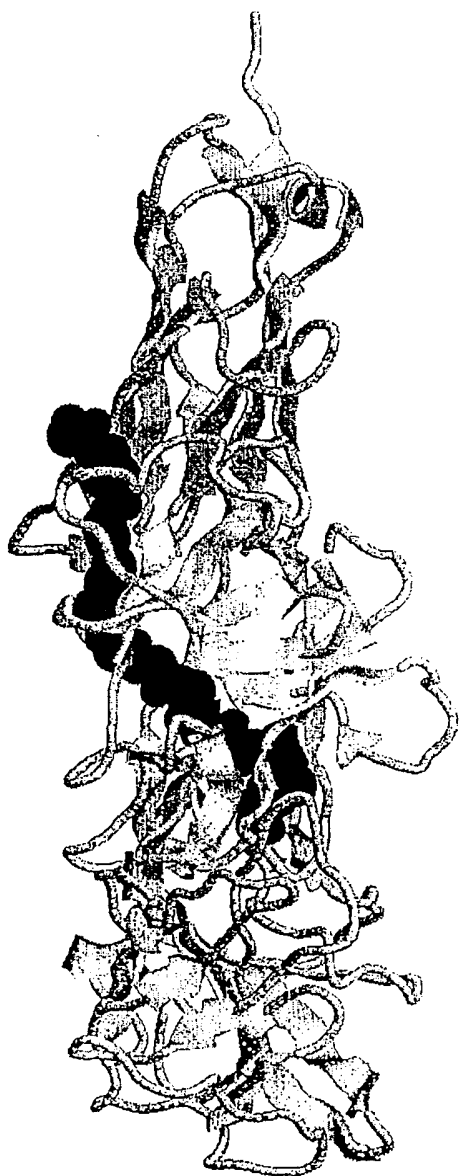
2/5

Фиг. 2



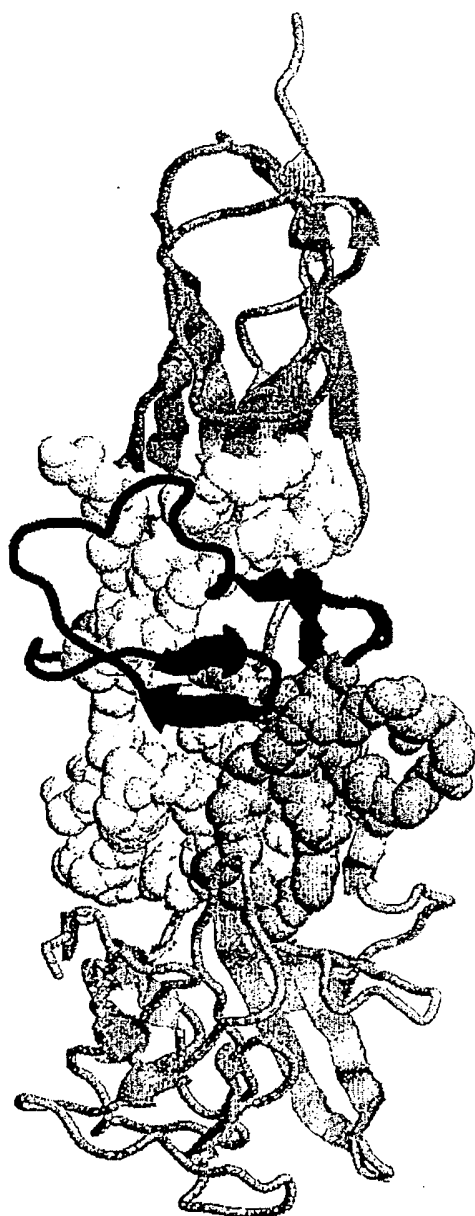
3/5

Фиг. 3

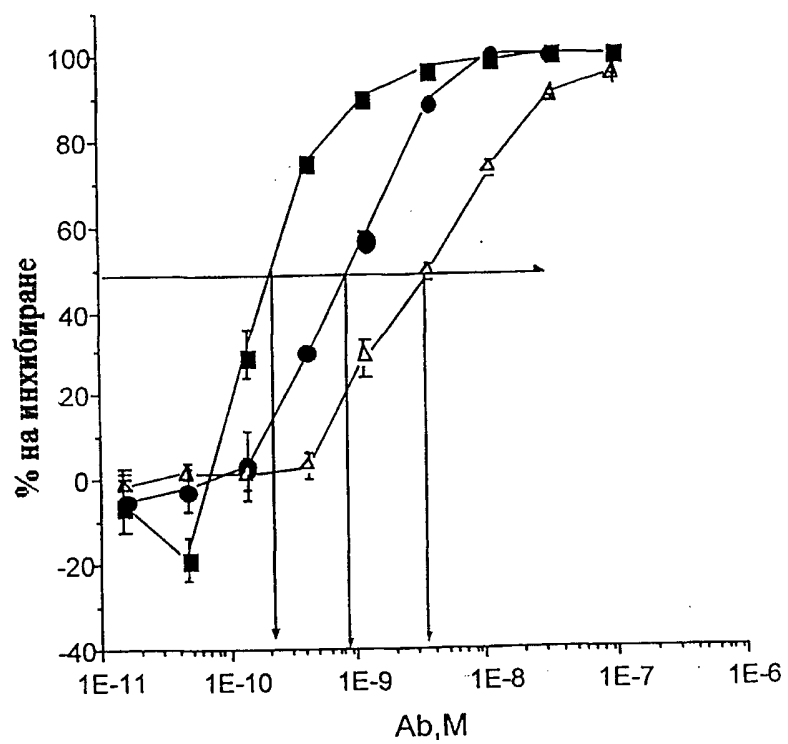


4/5

Фиг. 4



Фиг. 5



СПИСЪК НА СЕКВЕНЦИИТЕ

<110> Ghayur, Tarig et al.

<120> **АНТИТЕЛА, КОИТО СЕ СВЪРЗВАТ С ЧОВЕШКИ ИНТЕРЛЕУКИН-18 И МЕТОДИ ЗА ТЯНОТО ПОЛУЧАВАНЕ И ИЗПОЛЗВАНЕ**

<130> BBI-149

<140>

<141>

<150> 60/181,608

<151> 2000-02-10

<160> 71

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Pro	Leu	Phe	Glu	Asp	Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Arg	Asp	Asn	Ala
1				5					10					15

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Cys	Pro	Leu	Phe	Glu	Asp	Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Arg	Asp	Asn	Ala
1				5					10					15	

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Pro	Leu	Phe	Glu	Asp	Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Arg
1				5					10		

<210> 4

<211> 157

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Glu	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Ile	Arg	Asn	Leu	Asn
1				5					10					15	

Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	Asp	Gln	Gly	Asn	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Asp
			20					25						30	

Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile
35 40 45

Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile
50 55 60

Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile
65 70 75 80

Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys
85 90 95

Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys
100 105 110

Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu
115 120 125

Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu
130 135 140

Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp
145 150 155

<210> 5

<211> 153

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ala Pro Val Arg Ser Leu Asn Cys Thr Leu Arg Asp Ser Gln Gln Lys
1 5 10 15

Ser Leu Val Met Ser Gly Pro Tyr Glu Leu Lys Ala Leu His Leu Gln
20 25 30

Gly Gln Asp Met Glu Gln Gln Val Val Phe Ser Met Ser Phe Val Gln
35 40 45

Gly Glu Glu Ser Asn Asp Lys Ile Pro Val Ala Leu Gly Leu Lys Glu
50 55 60

Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Leu Lys Asp Asp Lys Pro Thr Leu
65 70 75 80

Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys Lys Lys Met Glu
85 90 95

Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Ile Asn Asn Lys Leu Glu Phe
100 105 110

Glu Ser Ala Gln Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser Gln Ala Glu
115 120 125

Asn Met Pro Val Phe Leu Gly Gly Thr Lys Gly Gly Gln Asp Ile Thr
130 135 140

Asp Phe Thr Met Gln Phe Val Ser Ser
145 150

<210> 6
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Ser Ser Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr
 1 5 10 15
 Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro
 20 25 30
 Asn Val Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val Val Pro Ile Glu Pro His
 35 40 45
 Ala Leu Phe Leu Gly Ile His Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys Val
 50 55 60
 Lys Ser Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr
 65 70 75 80
 Asp Leu Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg
 85 90 95
 Ser Asp Ser Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly
 100 105 110
 Trp Phe Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr
 115 120 125
 Asn Met Pro Asp Glu Gly Val Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu
 130 135 140
 Asp
 145

<210> 7
 <211> 297
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 Cys Thr Ser Arg Pro His Ile Thr Val Val Glu Gly Glu Pro Phe Tyr
 1 5 10 15
 Leu Lys His Cys Ser Cys Ser Leu Ala His Glu Ile Glu Thr Thr Thr
 20 25 30
 Lys Ser Trp Tyr Lys Ser Ser Gly Ser Gln Glu His Val Glu Leu Asn
 35 40 45
 Pro Arg Ser Ser Ser Arg Ile Ala Leu His Asp Cys Val Leu Glu Phe
 50 55 60
 Trp Pro Val Glu Leu Asn Asp Thr Gly Ser Tyr Phe Phe Gln Met Lys
 65 70 75 80
 Asn Tyr Thr Gln Lys Trp Lys Leu Asn Val Ile Arg Arg Asn Lys His

	85	4	90	95
Ser Cys Phe Thr Glu Arg Gln Val Thr Ser Lys Ile Val Glu Val Lys	100	105	110	
Lys Phe Phe Gln Ile Thr Cys Glu Asn Ser Tyr Tyr Gln Thr Leu Val	115	120	125	
Asn Ser Thr Ser Leu Tyr Lys Asn Cys Lys Lys Leu Leu Leu Glu Asn	130	135	140	
Asn Lys Asn Pro Thr Ile Lys Lys Asn Ala Glu Phe Glu Asp Gln Gly	145	150	155	160
Tyr Tyr Ser Cys Val His Phe Leu His His Asn Gly Lys Leu Phe Asn	165	170	175	
Ile Thr Lys Thr Phe Asn Ile Thr Ile Val Glu Asp Arg Ser Asn Ile	180	185	190	
Val Pro Val Leu Leu Gly Pro Lys Leu Asn His Val Ala Val Glu Leu	195	200	205	
Gly Lys Asn Val Arg Leu Asn Cys Ser Ala Leu Leu Asn Glu Glu Asp	210	215	220	
Val Ile Tyr Trp Met Phe Gly Glu Glu Asn Gly Ser Asp Pro Asn Ile	225	230	235	240
His Glu Glu Lys Glu Met Arg Ile Met Thr Pro Glu Gly Lys Trp His	245	250	255	
Ala Ser Lys Val Leu Arg Ile Glu Asn Ile Gly Glu Ser Asn Leu Asn	260	265	270	
Val Leu Tyr Asn Cys Thr Val Ala Ser Thr Gly Gly Thr Asp Thr Lys	275	280	285	
Ser Phe Ile Leu Val Arg Lys Ala Asp	290	295		

<210> 8
 <211> 310
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 Cys Lys Glu Arg Glu Glu Lys Ile Ile Leu Val Ser Ser Ala Asn Glu
 1 5 10 15
 Ile Asp Val Arg Pro Cys Pro Leu Asn Pro Asn Glu His Lys Gly Thr
 20 25 30
 Ile Thr Trp Tyr Lys Asp Asp Ser Lys Thr Pro Val Ser Thr Glu Gln
 35 40 45
 Ala Ser Arg Ile His Gln His Lys Glu Lys Leu Trp Phe Val Pro Ala
 50 55 60
 Lys Val Glu Asp Ser Gly His Tyr Tyr Cys Val Val Arg Asn Ser Ser

```
<210> 9
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9
Thr Gly Tyr Tyr Ile His
  1                               5
```

<213> Homo sapiens

<400> 10

Gly Arg Leu Asn Pro Thr Thr Gly Asp Ala Asn Phe Ala Glu Lys Phe
 1 5 10 15

Gln

<210> 11

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Lys Glu Gly Ala
 1

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Gln Gly Asp Ser Leu Arg His Phe Tyr Pro Asn
 1 5 10

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser
 1 5

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Gly Ser Arg Asp Ser Ser Gly Ile His Val Val
 1 5 10

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Gln Gly Asp Ser Leu Arg His Phe Tyr Ser Asn
 1 5 10

<210> 16

<211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Gly Arg Leu Asn Pro Arg Thr Gly Asp Ala Asn Phe Ala Glu Lys Phe
 1 5 10 15
 Gln

<210> 17
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 Gly Arg Leu Asn Pro Arg Thr Gly Asp Ala Gln Phe Ala Glu Lys Phe
 1 5 10 15
 Gln

<210> 18
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Met Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala His Gly Gln Gly Phe Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Leu Asn Pro Thr Thr Gly Asp Ala Asn Phe Ala Glu Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Ala Leu Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Asp Ser Leu Lys Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Gly Lys Glu Gly Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser

<210> 19
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

8

<400> 19

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

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg His Phe Tyr Pro
20 25 30

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

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Asn Thr Gly Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ser Arg Asp Ser Ser Gly Ile His
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
100 105

<210> 20

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Ser Tyr Ala Met
1

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

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

Gly

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Asp Asp Asp Asp Tyr Asp Phe Asp Tyr
1 5

<210> 23

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ile Asn Ala Val Asn
1 5 10

<210> 24

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Gly Asn Asp Gln Arg Pro
1 5

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Pro Val
1 5 10

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

<400> 26
Ala Ile Ser Gly Ser Gln Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 27

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

<400> 27
Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 28

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

<400> 28
Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
1 5 10 15

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

10

20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr
 35 40 45

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 50 55 60

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 65 70 75 80

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Asp Asp Tyr Asp Phe Asp
 85 90 95

Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 100 105

<210> 29
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 29
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ile Asn
 20 25 30

Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Asn Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

Ser Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 30
 <211> 235
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30
 Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 1 5 10 15

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr
 35 40 45

11

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
50 55 60

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
65 70 75 80

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Asp Asp Asp Tyr Asp Phe Asp
85 90 95

Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
100 105 110

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Gln Ser Val Leu
115 120 125

Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile
130 135 140

Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ile Asn Ala Val Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn
165 170 175

Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser
180 185 190

Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu
195 200 205

Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Pro Val
210 215 220

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
225 230 235

<210> 31
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31
Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn
1 5 10

<210> 32
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32
Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val
1 5 10

<210> 33
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

Val	Ile	Arg	Asn	Leu	Asn	Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	Asp	Gln
1				5					10				

<210> 34

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Asn	Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	Asp	Gln	Gly	Asn	Arg	Pro	Leu
1				5					10				

<210> 35

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Phe	Ile	Asp	Gln	Gly	Asn	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Asp	Met	Thr
1				5					10				

<210> 36

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Asn	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Asp	Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Arg
1				5					10				

<210> 37

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Glu	Asp	Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Arg	Asp	Asn	Ala	Pro	Arg
1				5					10				

<210> 38

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Ser	Asp	Cys	Arg	Asp	Asn	Ala	Pro	Arg	Thr	Ile	Phe	Ile	Ile
1				5					10				

<210> 39

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

13

<400> 39

Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr Lys Asp
1 5 10

<210> 40

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly
1 5 10

<210> 41

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile
1 5 10

<210> 42

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys Glu
1 5 10

<210> 43

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu
1 5 10

<210> 44

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys
1 5 10

<210> 45

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys
1 5 10 14

<210> 46
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46
Cys Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro
1 5 10

<210> 47
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 47
Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp
1 5 10

<210> 48
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48
Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile
1 5 10

<210> 49
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49
Asn Ile Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg
1 5 10

<210> 50
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50
Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His
1 5 10

<210> 51
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 51
Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys Met Gln
1 5 10

<210> 52
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 52
 Val Pro Gly His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser
 1 5 10

<210> 53
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 54
 Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe
 1 5 10

<210> 54
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 54
 Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu Lys
 1 5 10

<210> 55
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 55
 Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe
 1 5 10

<210> 56
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 56
 Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys
 1 5 10

<210> 57
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 57
 Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu
 1 5 10

```
<210> 58
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

```
<400> 58
Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile
  1             5             10
```

```
<210> 59
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 59
Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln
1 5 10

```
<210> 60
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 60
Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp
1 5 10

```
<210> 61
<211> 157
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 61
Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn
1 5 10 15

Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp
20 25 30

Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile
35 40 45

Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile
50 55 60

Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile
65 70 75 80

Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys
85 90 95

Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys
100 105 110

Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu
115 120 125

17

Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu
130 135 140

Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp
145 150 155

<210> 62

<211> 341

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(339)

<400> 62

cag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg gcc 48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

tcg atg aaa gtc tcc tgt aag act tct gga tac acc ttc acc ggc tat 96
Ser Met Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

tat atc cac tgg gtg cga cag gcc cct gga cag gga ttc gag tgg ata 144
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Phe Glu Trp Ile
35 40 45

gga cgg ctc aac ccc acc act ggt gac gca aat ttt gca gaa aag ttt 192
Gly Arg Leu Asn Pro Thr Thr Gly Asp Ala Asn Phe Ala Glu Lys Phe
50 55 60

cag ggc agg gtc gcc ctg acc aga gac acg tcc atc agc aca gcc tat 240
Gln Gly Arg Val Ala Leu Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

tta caa cta gac agc ctc aaa tct gac gac acg gcc gta tat tat tgt 288
Leu Gln Leu Asp Ser Leu Lys Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcg gga aaa gag ggt gcc tgg ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtc tcg 336
Ala Gly Lys Glu Gly Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

agt gg 341
Ser

<210> 63

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Met Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

18

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

<210> 64
 <211> 327
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(327)

<400> 64
 tct tct gag ctg act cag gac cct gct gtg tct gtg gcc ttg gga cag 48
 Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 aca gtc agg atc aca tgc caa gga gac agc ctc aga cac ttt tat cca 96
 Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg His Phe Tyr Pro
 20 25 30
 aac tgg tac cag cag aag cca gga cag gcc cct gta ctt gtc atc tat 144
 Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 ggt aaa aac aat cgg ccc tca ggg atc cca gac cga ttc tct ggc tcc 192
 Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 ggc tca gga aac aca ggt tcc ttg acc atc act ggg gcc cag gcg gaa 240
 Gly Ser Gly Asn Thr Gly Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 gat gag gct gac tat tac tgt ggc tcc cgg gac agc agt ggt atc cat 288
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ser Arg Asp Ser Ser Gly Ile His
 85 90 95
 gtg gta ttc ggc gga ggg acc aag gtc acc gtc cta ggt 327
 Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 100 105

<210> 65
 <211> 109
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

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

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg His Phe Tyr Pro
 20 25 30

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

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Asn Thr Gly Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ser Arg Asp Ser Ser Gly Ile His
 85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 100 105

<210> 66

<211> 354

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(354)

<400> 66

gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt agc agc tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

gcc atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

tca gct att agt ggt agt ggt ggt agc aca tac tac gca gac tcc gtg 192
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcg aga gat gac gat gac tac gac ttt gac tac tgg ggc cgg ggg aca 336
 Ala Arg Asp Asp Asp Asp Tyr Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr

100 20 110
 atg gtc acc gtc tcg agt 354
 Met Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 67
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 67
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Asp Asp Tyr Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr
 100 105 110
 Met Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 68
 <211> 334
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(333)
 <400> 68
 cag tct gtg ttg acg cag ccg ccc tca gcg tct ggg gcc ccc ggt cag 48
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 agg gtc acc atc tct tgt tct gga agc agc tcc aac atc gga att aat 96
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Asn Ile Gly Ile Asn
 20 25 30
 gct gta aac tgg tac cag cag ctc cca gga acg gcc ccc aaa ctc ctc 144
 Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 atc tat ggt aat gat cag cgg ccc tca ggg gtc cct gac cga ttc tct 192
 Ile Tyr Gly Asn Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

```
<210> 69
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

```
<210> 70
<211> 66
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

```

<400> 70
Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn
  1                      5                      10                      15

Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp
      20                      25                      30

Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile
      35                      40                      45

Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile
  50                      55                      60

```

Ser Val
65

<210> 71
<211> 34
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 71
Phe Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys
1 5 10 15

Lys Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn
20 25 30

Glu Asp