

PŘÍHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **28.06.2001**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **29.06.2000**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/215379**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.05.2003**
(Věstník č. 5/2003)

(86) PCT číslo: **PCT/US01/20755**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO02/002773**

(21) Číslo dokumentu:

2003 - 291

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/13

C 07 K 16/24

G 01 N 33/68

G 01 N 33/577

A 61 K 51/10

A 61 K 39/395

A 61 P 37/06

C 12 N 15/63

/(C 07 K 14/545, A 01 K 67/027)

(71) Přihlašovatel:

ABBOTT LABORATORIES, Abbott Park, IL, US;

(72) Původce:

Collinson Albert, Marlborough, MA, US;

Ghayur Tariq, Holliston, MA, US;

Avgerinos George, Sudbury, MA, US;

Dixon Richard, North Grafton, MA, US;

Kaymakcalan Zehra, Westborough, MA, US;

(74) Zástupce:

Jirotková Ivana Ing., Nad Štolou 12, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Duálně specifické protilátky a způsoby jejich
výroby a použití**

(57) Anotace:

Jsou poskytnuty protilátky, které mají specifitu pro dva různé, ale strukturně příbuzné antigeny. Těmito protilátkami mohou být například protilátky zcela lidského původu, rekombinantní protilátky nebo monoklonální protilátky. Výhodné protilátky mají duální specifitu vůči IL-1 α a IL-1 β a neutralizují aktivitu IL-1 α a IL-1 β in vivo i in vitro. Protilátkou podle tohoto vynálezu může být protilátka o celé délce nebo její antigen vázící část. Jsou také poskytnuty způsoby výroby a použití protilátek podle tohoto vynálezu. Protilátky podle tohoto vynálezu nebo jejich části jsou použitelné pro detekci dvou různých, ale strukturně příbuzných antigenů (např. IL-1 α a IL-1 β) a pro inhibici aktivity těchto antigenů, např. v lidských subjektech, trpících chorobou, na které se aktivita IL-1 α nebo IL-1 β škodlivě podílí.

29.01.03

PV 2003-291

4549

Duálně specifické protilátky a způsoby jejich výroby a použití

Oblast techniky

Savčí imunitní systém obsahuje B lymfocyty, které vylučují komplexní soubor protilátek, složený ze stovek miliard různých specifických protilátek. Normální imunitní odpověď na určitý antigen obsahuje výběr jedné nebo více protilátek z tohoto souboru, které se specificky váží na tento antigen, přičemž úspěch imunitní odpovědi je podmíněn, alespoň z části, na schopnosti těchto protilátek specificky rozpoznat a s konečnou platností eliminovat stimulující antigen a „ignorovat“ jiné molekuly v okolí protilátek.

Současný stav techniky

Použitelnost protilátek, které specificky rozpoznávají jeden konkrétní cílový antigen, vedla k vývoji monoklonálních protilátek. Standardní hybridomové technologie nyní umožňují přípravu protilátek, které mají jednoduchou specifitu vůči zájmovému antigenu. Později byly vyvinuty způsoby rekombinantních protilátek, jako například skřínink *in vitro* protilátkových knihoven. Tyto způsoby rovněž umožňují výrobu protilátek s jednoduchou specifitou vůči zájmovému antigenu.

Protilátky, které jsou specifické vůči jednomu cílovému antigenu, mohou, alespoň za určitých okolností, vykazovat nežádoucí křížovou reaktivitu nebo vazbu jejich pozadí vůči jiným antigenům. Tato křížová reaktivita a vazba pozadí jsou však většinou nepředpověditelné (tj. není možné předpovědět, který antigen bude křížově reagovat s protilátkou). Tento jev je navíc obvykle neodlišitelný od specifické vazby k antigenu, protože obvykle představuje pouze velmi malou část vazebné kapacity protilátky (např. 1 % nebo ještě méně z celkové vazby protilátky) a je pozorován většinou pouze při vysokých koncentracích protilátky (např. při 1000násobně nebo ještě vyšší koncentraci, než jaká je třeba pro zpozorování specifické vazby protilátky). I když je několik antigenů, které mohou patřit do strukturálně příbuzné skupiny proteinů, je protilátková odpověď vůči jednotlivému členu této rodiny vysoce specifická. Kromě toho, že existuje několik příkladů členů proteinové rodiny (např. členové IL-1 a TNF rodin), které se váží ke stejnému receptoru, složce receptoru nebo strukturně příbuznému receptoru, monoklonální protilátky, vypěstované proti jednomu členu rodiny, nevykazují vysokou křížovou reaktivitu vůči ostatním členům rodiny. Pro tento nedostatek křížové reaktivity monoklonálních protilátek vůči ostatním členům rodiny mohou existovat dva důvody.

Za prvé, při standardní výrobě hybridomu se hledá pouze několik protilátek s vysokou specifitou/afinitou vůči cílovému antigenu a teprve potom se u těchto několika vybraných protilátek kontroluje křížová reaktivita nebo vazebná schopnost pozadí. Za druhé, i když jsou proteiny v rodině strukturně příbuzné, mohou obsahovat výlučné, nepřekrývající se imunodominantní epitopy. Monoklonální protilátky vypěstované použitím úplné délky proteinu, nemohou tedy křížově reagovat s jinými strukturně příbuznými proteiny.

Existují také příklady monoklonálních protilátek, vypěstovaných proti antigenu jednoho biologického druhu, které se specificky váží ke stejnému funkčnímu antigenu u jiných druhů. Například protilátka vůči myššímu antigenu X může snadno vázat antigen X člověka. To je způsobeno tím, že obsahují průkazné sekvence a strukturní podobnosti, i když nejsou identické. Takovéto druhově křížově reagující protilátky tvoří protilátky s „duální specifitou“, protože mají specifitu pro stejný antigen, pouze z různých druhů.

Monoklonální protilátky, které mají předpověditelnou duální nebo násobnou specifitu, tj. protilátky, které mají skutečnou specifitu vůči dvěma nebo více různým antigenům, jsou stále třeba.

Podstata vynálezu

Tento vynález poskytuje způsoby pro přípravu protilátek, které mají duální specifitu vůči nejméně dvěma strukturně příbuzným, ale přitom různým antigenům. Tento způsob obecně zahrnuje poskytnutí antigenu, který zahrnuje společnou strukturní vlastnost dvou různých, ale strukturně příbuzných molekul; vystavení souboru protilátek tomuto antigenu a selekci tohoto souboru na protilátku, která se specificky váže na dvě různé, ale strukturně příbuzné molekuly, čímž se získá duálně specifická protilátka. V klinickém provedení mohou různé členové jedné rodiny proteinů zodpovídat za různé příznaky chorobného procesu. Použití duálně specifické protilátky podle tohoto vynálezu, která váže členy stejné rodiny proteinů, pro blokování funkcí více než jednoho členu proteinové rodiny může být užitečné pro zmírnění příznaků choroby nebo pro přerušení samotného chorobného procesu. Kromě toho jsou takovéto duálně specifické protilátky podle tohoto vynálezu použitelné pro detekci strukturně příbuzných antigenů, pro purifikaci strukturně příbuzných antigenů a v diagnostických testech obsahujících strukturně příbuzné antigeny.

Ve výhodném provedení je antigen sestrojen na principu styčné topologické oblasti identity mezi dvěma různými, ale strukturně příbuznými molekulami. Těmito dvěma různými, ale strukturně příbuznými molekulami mohou být například proteiny a antigen může být

peptidem, obsahujícím aminokyselinovou sekvenci styčné topologické oblasti identity mezi těmito dvěma proteiny.

V jiném provedení je antigen sestrojen na principu smyčky napodobující společné prostorové uspořádání dvou různých, ale strukturně příbuzných molekul. Takovým antigenem může být například cyklický peptid, který strukturně napodobuje smyčku společného prostorového uspořádání dvou různých, ale strukturně příbuzných proteinů.

V ještě jiném provedení je antigen sestrojen na principu spojení společných alternujících a/nebo překrývajících se částí dvou různých, ale strukturně příbuzných molekul, za vzniku hybridní molekuly. Antigenem může být například hybridní peptid, vzniklý spojením společných alternujících a/nebo překrývajících se aminokyselinových sekvencí dvou různých, ale strukturně příbuzných proteinů.

V ještě dalším provedení, může antigen obsahovat jednu nebo dvě různé, ale strukturně příbuzné molekuly a tento způsob potom obsahuje selekci protilátek, které specificky rozpoznávají obě příbuzné molekuly.

Způsobem podle tohoto vynálezu může být soubor protilátek vystaven působení požadovaného antigenu buď *in vivo* nebo *in vitro*. V jednom provedení vystavení souboru antigenu například obsahuje imunizaci živočicha *in vivo* antigenem. Tento *in vivo* přístup může dále obsahovat přípravu kompletu hybridomů z lymfocytů tohoto živočicha a výběr hybridomu, který vylučuje protilátku, která se specificky váže ke dvěma různým, ale strukturně příbuzným molekulám. Imunizovaným živočichem může být například myš, krysa, králík nebo koza a nebo transgenní verze kteréhokoliv z předcházejících živočichů, takže myš, která je transgenní pro lidské imunoglobulinové geny, při stimulaci antigenem produkuje lidské protilátky. Jiné typy živočichů, kteří mohou být imunizováni, zahrnují myši, s několika kombinovanými imunodeficiencemi (SCID), které mohou být rekonstituovány lidskými periferními krevními mononukleárními buňkami (hu-PBMC-SCID chimerní myši) nebo lymfatickými buňkami nebo jejich prekurzory a myši, které byly ovlivněny letálním ozářením celého těla, následovaným ochranou proti ozáření buňkami kostní dřeně myši s několika kombinovanými deficiencemi (SCID), následovanou implantací funkčních lidských lymfocytů (systém Trimer). Ještě dalším typem živočicha, které může být imunizováno, je živočich (např. myš), jehož genom byl přebudován („knocked out“ KO, např. homologní rekombinací) endogenním genem (geny), kódujícími zájmový antigen (antigeny), přičemž před imunizací zájmovým antigenem (antigeny) uvedený KO živočich rozpoznává tento antigen (antigeny) jako cizí.

V jiném uspořádání je soubor protilátek vystaven účinku antigenu *in vitro* při skříníkní knihovny rekombinantních protilátek antigenem. Tato knihovna rekombinantních

protilátek může být například exprimována na povrchu bakteriofága nebo na povrchu kvasničných buněk nebo na povrchu bakteriálních buněk. V různých provedeních je knihovna rekombinantních protilátek například scFv knihovnou nebo Fab knihovnou. V ještě jiném provedení jsou knihovny protilátek vyjádřeny jako fúze RNA s proteinem.

Jiný způsob přípravy duálně specifických protilátek zahrnuje kombinaci přístupů *in vivo* a *in vitro*, jako je vystavení souboru protilátek antigenu imunizací zvířete antigenem *in vivo*, následovanou *in vitro* skrínkem knihovny rekombinantních protilátek, připravené z lymfatických buněk živočicha, antigenem. Další způsob zahrnuje vystavení knihovny protilátek antigenu *in vivo* imunizací živočicha tímto antigenem, následovanou *in vitro* afinitním zráním knihovny rekombinantních protilátek, připravené z lymfatických buněk tohoto živočicha. Ještě další způsob obsahuje vystavení knihovny protilátek antigenu *in vivo* imunizací živočicha tímto antigenem, následovanou selekcí buněk vylučujících zájmové protilátky, rekonstrukci variabilních oblastí těžkého a lehkého řetězce cDNA z těchto selektovaných buněk (např. pomocí PCR) a expresi těchto variabilních oblastí těžkého a lehkého řetězce v savčích hostitelských buňkách *in vitro* (označovanou zde jako způsob selektovaných lymfocytárních protilátek, „selected lymphocyte antibody method“ neboli SLAM), čímž je umožněna další selekce a ovlivňování sekvencí genů selektovaných protilátek. Monoklonální protilátky mohou být kromě toho selektovány při expresi klonováním exprimujících genů protilátek těžkého a lehkého řetězce v savčích buňkách a selekcí savčích buněk, které vylučují protilátku s potřebnou vazebnou specifitou.

Způsoby podle tohoto vynálezu umožňují přípravu mnoha různých typů duálně specifických protilátek, včetně zcela lidských protilátek, chimerních protilátek a CDR implantovaných protilátek a jejich antigen vážících částí. Rovněž jsou poskytnuty duálně specifické protilátky připravené způsobem podle tohoto vynálezu. Výhodnou duálně specifickou protilátkou podle tohoto vynálezu je protilátka, která specificky váže interleukin-1 α a interleukin-1 β . Takováto duálně specifická protilátka může být použita při detekci IL-1 α nebo IL-1 β , která obsahuje kontakt IL-1 α nebo IL-1 β s duálně specifickou protilátkou nebo její antigen vážící částí, čímž jsou IL-1 α nebo IL-1 β detekovány. Při inhibicích aktivity IL-1 α nebo IL-1 β , které zahrnují kontakt IL-1 α nebo IL-1 β s duálně specifickou protilátkou nebo její antigen vážící částí, vedoucí k inhibici IL-1 α nebo IL-1 β , může být rovněž použita neutralizující duálně specifická protilátka. Takováto duálně specifická protilátka může být také použita při léčbě chorob, spojených s interleukinem-1, zahrnující podávání duálně specifické protilátky nebo její antigen vážící části subjektu, který trpí chorobou spojenou s interleukinem-1.

V jiném provedení poskytuje tento vynález způsob výroby knihovny protilátky nebo její antigen vážící části realizací následujících kroků: a) získání knihovny A rekombinantního těžkého řetězce nebo jeho antigen vážící části ze souboru protilátek, vzniklých z vystavení prvnímu antigenu; b) získání knihovny B rekombinantního lehkého řetězce nebo jeho antigen vážící části ze souboru protilátek, vzniklých z vystavení prvnímu antigenu; c) získání knihovny C rekombinantního těžkého řetězce nebo jeho antigen vážící části ze souboru protilátek, vzniklých z vystavení druhému antigenu; d) získání knihovny D rekombinantního lehkého řetězce nebo jeho antigen vážící části ze souboru protilátek, vzniklých z vystavení druhému antigenu a e) spojení knihovny A rekombinantního těžkého řetězce nebo jeho antigen vážící části s knihovnou D rekombinantního lehkého řetězce nebo jeho antigen vážící části, aby byla získána knihovna X a/nebo spojení knihovny C rekombinantního těžkého řetězce nebo jeho antigen vážící části s knihovnou B rekombinantního lehkého řetězce nebo jeho antigen vážící části, aby byla získána knihovna Y protilátky nebo její antigen vážící části.

V jiném provedení předkládaného vynálezu může bezprostředně předcházející způsob podle tohoto vynálezu obsahovat dále krok, který spojuje knihovnu X protilátky nebo její antigen vážící části s knihovnou Y, čímž je získána knihovna Z protilátky nebo její antigen vážící části.

V dalším provedení je předkládaný vynález směřován na knihovny X, Y nebo Z protilátky nebo její antigen vážící části.

V jiném provedení umožňuje způsob podle předkládaného vynálezu identifikaci duálně specifické protilátky nebo její antigen vážící části selekcí knihoven X, Y a/nebo Z na protilátku nebo její antigen vážící část, které se váží buď na první nebo na druhý antigen.

V dalším provedení je předkládaný vynález směřován na duálně specifickou protilátku, která je připravena a/nebo vybrána libovolným způsobem podle předkládaného vynálezu.

V jiném provedení je tento vynález také směřován na nukleotidovou sekvenci, kódující každý člen knihovny X, Y a Z protilátky nebo její antigen vážící části, duálně specifickou protilátku nebo její antigen vážící část, vektor obsahující shora uvedené nukleotidové sekvence a hostitelskou buňku, transfektovanou shora uvedeným vektorem.

Ve výhodném provedení je první a druhý antigen nezávisle vybrán ze skupiny, skládající se z proteinů, polypeptidů a peptidů, za předpokladu, že tyto první a druhé antigeny nejsou totožné. V dalším provedení jsou těmito proteiny, polypeptidy a peptidy sekretované proteiny nebo receptory a tento sekretovaný protein je vybrán ze skupiny skládající se z IFN, TNF, interleukinu, IP-10, PF-4, GRO, 9E3, EMAP-II, CSF, FGF a PDGF. V jiném výhodném provedení je prvním antigenem IL-1 α a druhým antigenem je IL-1 β .

Tento vynález se týká konstrukce a použití antigenů pro tvorbu duálně specifických protilátek, tj. protilátek, které mají specifitu vůči nejméně dvěma různým, ale strukturně příbuzným molekulám, rovněž jako se týká selekce, přípravy a použití takovýchto duálně specifických protilátek. Strukturní příbuznost antigenů podle tohoto vynálezu se může týkat celého antigenu (tj. proteinu) nebo pouze určitých strukturně příbuzných oblastí. Tento vynález poskytuje způsob pro získání duálně specifické protilátky, která se specificky váže ke dvěma různým, ale strukturně příbuzným molekulám, přičemž tento způsob zahrnuje:

poskytnutí antigenu, který obsahuje společný strukturní prvek dvou různých, ale strukturně příbuzných molekul;

vystavení souboru protilátek tomuto antigenu

a selekci tohoto souboru na protilátku, která specificky váže ke dvěma různým, ale strukturně příbuzným molekulám, čímž se získá duálně specifická protilátka.

Je třeba poznamenat, že zatímco tento vynález je zde popsán na základě rozpoznávání dvou různých, ale příbuzných antigenů, měl by být chápán tak, že termín „duálně specifická protilátka“ je zamýšlen tak, aby zahrnoval protilátky, které specificky rozpoznají ještě více než dva různé, ale příbuzné antigeny, tedy protilátky, které rozpoznají tři, čtyři, pět nebo více strukturně příbuzných, ale odlišných antigenů. Kromě toho, termín „různé, ale strukturně příbuzné antigeny“ je myšlen tak, aby zahrnoval antigeny (např. proteiny), jejichž celková struktura je příbuzná rovněž s antigeny, (např. proteiny), které obsahují jednu nebo více strukturně příbuzných oblastí, ale jinak nejsou příbuzné. „Různými, ale strukturně příbuznými“ antigeny, mohou být tudíž například dva proteiny, které jsou členy stejné rodiny proteinů se společnou celkovou strukturou nebo jimi mohou být například dva proteiny, jejichž celková struktura není podobná (není příbuzná), ale přitom oba obsahují strukturně příbuznou doménu.

Pro vyvolání vzniku protilátek podle tohoto vynálezu mohou být použity různé typy antigenů a pro získání duálně specifických protilátek podle tohoto vynálezu mohou být použity různé způsoby výroby, tak jak je diskutováno dále v následujících podkapitolách.

I. Duálně specifické antigeny

Pro přípravu duálně specifické protilátky podle tohoto vynálezu jsou vypěstovány protilátky proti antigenu, který je schopen vyvolat duálně specifické protilátky. Takový typ antigenů je zde obecně nazýván duálně specifickými antigeny. V tomto vynálezu mohou být použity různé typy odlišných antigenů a sestrojení různých typů duálně specifických antigenů je popsáno dále v následujících podkapitolách.

A. Styčné topologické oblasti

V jednom provedení obsahuje duálně specifický antigen podle tohoto vynálezu styčnou topologickou oblast identity a/nebo podobnosti mezi dvěma různými, ale strukturně příbuznými molekulami, vůči kterým je třeba vypěstovat duálně specifické protilátky. Je výhodné, když antigen obsahuje tu největší (tj. nejdelší) styčnou topologickou oblast identity a/nebo podobnosti mezi dvěma odlišnými, ale strukturně příbuznými molekulami. Je výhodné, když těmito dvěma různými, ale strukturně příbuznými molekulami jsou proteiny a tento duálně specifický antigen obsahuje lineární peptid, odpovídající největší (tj. nejdelší) styčné topologické oblasti identity a/nebo podobnosti mezi těmito dvěma proteiny. Tato vybraná vhodná oblast identity/podobnosti je výhodně receptorovou nebo ligandovou vazebnou oblastí, i když lze použít i jiné oblasti identity/podobnosti.

Pro určení styčných topologických oblastí identity mezi dvěma molekulami (např. proteiny) jsou tyto dvě molekuly (např. proteiny) srovnávány (např. modelování homologie, strukturní informace nebo podobné) a tak jsou určeny identické nebo podobné oblasti. Pro proteiny lze pro dosažení optimálního porovnání a identifikaci největší (např. nejdelší) styčné topologické oblasti identity a/nebo podobnosti mezi těmito dvěma proteiny použít srovnávací algoritmus. Výhodným, neomezuujícím příkladem matematického algoritmu, použitého pro srovnání dvou sekvencí, je algoritmus podle Karlin a Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264 až 68, modifikovaný podle Karlin a Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873 až 77. Takovýto algoritmus je zabudován do programů NBLAST nebo XBLAST podle Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403 až 10. Pro získání porovnání mezer pro účely srovnání může být využito Gapped BLAST, jak popisuje Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Research* 25(17):3389 až 3402. Použijeme-li programy BLAST a Gapped BLAST, můžeme použít standardní parametry příslušných programů (např. VBLAST nebo NBLAST). Viz <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Alternativní matematický algoritmus, který může být použit, je ten, který se používá v programu ALIGN, popsáném Myersem a Millerem (1988) *Comput. Appl. Biosci.* 4:11 až 17.

Máme-li vybranou vhodnou oblast identity/podobnosti, můžeme chemicky syntetizovat duálně specifický antigen, odpovídající této oblasti. Například, pro peptidové antigeny, může být peptidový antigen syntetizován standardními způsoby syntézy peptidů. V jednom provedení obsahuje peptidový antigen L-aminokyseliny. V jiných provedeních může být peptidový antigen tvořen částečně nebo úplně D-aminokyselinami. Příklad takového provedení duálně specifického antigenu, založeného na styčné topologické oblasti identity/podobnosti mezi dvěma různými, ale strukturně podobnými proteiny, je detailně popsán v příkladu 1.

B. Cyklické peptidy, napodobující strukturní smyčku

V jiném provedení obsahuje duálně specifický antigen podle tohoto vynálezu cyklickou molekulu, výhodně cyklický peptid, který strukturně napodobuje hlavní smyčku společného prostorového uspořádání dvou rozdílných, ale strukturně příbuzných molekul (např. proteinů), vůči kterým mají být vypěstovány duálně specifické protilátky. Pro přípravu tohoto typu antigenu jsou porovnávány dvě příbuzné molekuly a je identifikována smyčka společného prostorového uspořádání, nalezená v těchto dvou molekulách. Pro identifikaci těchto smyček a prostorového uspořádání lze použít standardní molekulární modelování a krystalografickou analýzu. Identické a podobné oblasti (např. aminokyselinové sekvence mezi dvěma proteiny) jsou identifikovány a souhlasná sekvence může být použita pro sestrojení podobných, ale neidentických oblastí. Na základě těchto podobných a identických oblastí je sestrojena lineární molekula, např. lineární peptid, která může být cyklizována známými chemickými způsoby, aby byl vytvořen antigen, který napodobuje klíčovou smyčku. Například na konec lineárního peptidu může být přidán prolin a glycin, aby byla umožněna cyklizace tohoto peptidu. Příklad takového sestrojení duálně specifického antigenu, založeného na cyklickém peptidu, napodobujícím strukturní smyčku, obsaženou ve dvou různých, ale strukturně příbuzných proteinech, je popsán v příkladu 2.

C. Hybridní molekuly

V jiném provedení obsahuje duálně specifický antigen podle tohoto vynálezu hybridní molekulu, výhodně hybridní peptid, který obsahuje střídající se a/nebo překrývající se oblasti dvou různých, ale strukturně příbuzných molekul (např. proteinů), vůči kterým je třeba připravit duálně specifické protilátky. Pro přípravu tohoto typu antigenu jsou srovnávány struktury dvou molekul a jsou identifikovány překrývající se oblasti (tj. oblasti identity), rovněž jako neidentické oblasti mezi těmito dvěma molekulami. Připraví se hybridní molekula (např. hybridní peptid, pokud těmito dvěma příbuznými molekulami jsou proteiny), která výhodně obsahuje alternující oblasti (např. sekvence aminokyselin) od každé z těchto dvou molekul, rovněž jako překrývající se oblast, která je společná k oběma molekulám. Takovýto hybrid může být schematicky popsán jako: X-Y-Z, kde Y představuje oblast identity nebo velké podobnosti mezi těmito dvěma příbuznými molekulami (tj. překrývající se oblast), X představuje oblast z jedné z příbuzných molekul a Z představuje oblast z druhé z příbuzných molekul. Příklad sestrojení duálně specifického antigenu, založeného na hybridním peptidu, složeném ze sekvencí dvou různých, ale strukturně příbuzných proteinů, je detailně popsán v příkladu 3.

Jiným typem hybridní molekuly je ten, ve kterém byl peptid introdukován do celé délky proteinu (označovaný jako „cílový“ protein). Peptidy jsou vybrány tak, aby představovaly funkční oblasti dvou různých, ale strukturně příbuzných proteinů, například, oblasti interagující s receptorem. Funkční peptid z jednoho ze dvou příbuzných proteinů se zavede do celé délky jednoho z příbuzných proteinů nebo alternativně do nepříbuzného proteinu. Například, peptid IL-1 α , odpovídající receptoru interagující oblasti IL-1 α je identifikován a tento funkční peptid je zaveden do celé délky IL-1 β proteinu, čímž vznikne hybridní molekula IIL-1 α /IL-1 β . Podobně je identifikován peptid IL-1 β , odpovídající receptoru interagující oblasti IL-1 β a tento funkční peptid je zaveden do celé délky proteinu IL-1 α , za vzniku hybridní molekuly IL-1 α /IL-1 β . Takovéto zavedení funkčního peptidu do celé délky příbuzného proteinu ukončuje funkční peptid na jeho obou koncích a tím udržuje nativní strukturu funkčního peptidu.

V případě hybridu IL-1 α /IL-1 β je tento funkční peptid s výhodou inzerován (nahrazuje původní aminokyseliny) v cílové oblasti, reprezentující společné nativní struktury IL-1 α a IL-1 β . Takovéto oblasti lze nalézt v celé délce proteinu (např. v N-koncové oblasti, ve střední části proteinu, v C-koncové oblasti). Kromě toho mohou být funkční peptidy, reprezentující společné IL-1 α /IL-1 β nativní struktury, také inzerovány do irelevantního proteinu, jako je albumin nebo některé jiné, přirozeně se vyskytující proteiny. S ohledem na to je výhodným místem pro inzerci taková oblast, která umožní, aby byla zachována požadovaná nativní struktura. Inzerční místa mohou tedy být v N-koncové oblasti, ve střední oblasti nebo v C-koncové oblasti. Umístění tohoto peptidu v libovolném, přirozeně se vyskytujícím cílovém proteinu je vybráno tak, aby bylo podobné strukturnímu okolí peptidu v nativním proteinu, ze kterého je odvozen. Zatímco funkční peptid může být jednoduše inzerován do cílového proteinu tak, že se přidají aminokyseliny funkčního peptidu do cílového proteinu, je výhodné, když aminokyseliny funkčního peptidu nahradí část cílového peptidu, do kterého je vkládán.

Jako neomezující příklad je konstruována hybridní molekula pro použití jako duálně specifický antigen pro vyvolání tvorby duálně specifických protilátek vůči IL-1 α a IL-1 β , přičemž tento funkční peptid, odpovídající specifickému strukturnímu prvku buď IL-1 α nebo IL-1 β je zaveden do celé délky IL-1 β nebo IL-1 α v ekvivalentní strukturní pozici. Vybraná hybridní molekula nahrazuje zbytky 160 až 176 v IL-1 β zbytky 168 až 184 z IL-1 α . Výsledná molekula má následující aminokyselinovou sekvenci, ve které jsou substituované IL-1 α sekvence (zbytky 168 až 184) podtrženy:

APVRS LNCTLRDSQQKSLVMSGPYELKALHLQGQDMEQQVVF**SMGAYKSSKD**
DAKITVILGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKKNYPKKKMEFRFVFNKIEI

NNKLLEFESAQFPNWIYSTSQAENMPVFLGGTKGGQDITDFTMQVFVSS

(SEQ ID NO: 4)

Tato molekula může být připravena použitím standardních způsobů molekulární biologie (např. klonování, polymerázová řetězová reakce), pomocí literárně dostupných IL-1 α a IL-1 β cDNA sekvencí a pomocí způsobů exprese rekombinantních proteinů. Může být připravena hybridní cDNA, zavedena do vhodného expresního vektoru a polypeptid může být exprimován zavedením tohoto expresního vektoru do vhodné hostitelské buňky.

D. Peptidy založené na principu hydrofobnosti

V jiném provedení je duálně specifický antigen podle tohoto vynálezu vybrán na základě hydrofobního principu tak, aby byly vybrány peptidy, které byly předpovězeny jako silně antigenní. Antigenní index peptidů může být například vypočten pomocí počítačového software, který je popsán v Jameson a Wolf (CABIOS, 4(1), 181 až 186 (1988)). Oblasti zajímavé pro vazbu protilátky mohou být vybrány tak, aby byla maximalizována pravděpodobnost antigenicity.

E. Imunizace buňkami s transfektovaným antigenem.

V jiném provedení je duálně specifická protilátka podle tohoto vynálezu připravena imunizací buňkami s transfektovaným antigenem (tj. duálně specifické antigeny podle tohoto vynálezu mohou být buňkami s transfektovaným antigenem). Lze vytvořit buněčné linie, které stabilně vylučují tyto dva odlišné, ale strukturně příbuzné antigeny nebo jejich hybridní molekuly. Mohou být například vytvořeny buněčné linie, které stabilně exprimují IL-1 α nebo IL-1 β nebo hybridní molekuly IL-1 α /IL-1 β (např. SEQ ID NO: 4). Tyto zájmové molekuly mohou být vylučovány z buněk (v případě rozpustných proteinů) nebo mohou být vylučovány na povrchu buněk (v případě receptorů a enzymů). Přenos genů do hostitelských buněk, který má umožnit expresi těchto antigenů hostitelskou buňkou, může být proveden mnoha konvenčními způsoby, včetně, ale bez omezení, transfekcí, elektroporací, buněčnou fúzí, lipofekcí, bombardováním částicemi, mikroinjekcí nebo virální infekcí. Buněčné linie, exprimující tyto zájmové antigeny, mohou být potom transplantovány jednou nebo více různými cestami (intraperitoneální, subkutánní, intramuskulární a podobně) do příslušného zvířete, aby byly produkovány protilátky. Tyto buňky potom slouží jako zdroj zájmového antigenu. Tyto buňky výhodně exprimují úplné délky proteinu. Fragmenty antigenu mohou být však také exprimovány. V případě rozpustných proteinů jsou proteiny výhodně exprimovány buňkami. Aby byla vytvořena duálně specifická protilátka vůči extracelulární doméně dvou blízké příbuzných receptorů, jsou tyto receptory s výhodou exprimovány na buněčném povrchu.

F. Imunizace jednou ze strukturně příbuzných molekul

V jiném provedení je duálně specifický antigen jednoduše jednou ze dvou různých, ale strukturně příbuzných molekul, vůči kterým má být duálně specifická protilátka vypěstována. Jedna z těchto příbuzných molekul je použita jako imunizační činidlo a výsledný soubor protilátek je potom skrínován na protilátky, které váží a výhodněji neutralizují obě ze dvou různých, ale strukturně příbuzných molekul. Můžeme například imunizovat buď IL-1 α nebo IL-1 β a potom skrínovat protilátky vázící $\alpha\beta$ nebo ještě výhodněji neutralizující $\alpha\beta$. Tak jak je použit v tomto provedení, je termín "imunizace", zamýšlen tak, aby obsahoval široké pojetí ovlivnění souboru protilátek antigenem, jako je IL-1 α nebo IL-1 β , buď *in vivo* nebo *in vitro*. Toto provedení tedy obsahuje imunizaci zvířete buď IL-1 α nebo IL-1 β a skrínink výsledných vzniklých protilátek, při kterém se vyberou ty protilátky, které váží IL-1 α i IL-1 β , rovněž jako skrínink knihovny rekombinantních protilátek *in vitro* buď IL-1 α nebo IL-1 β a potom výběr rekombinantních protilátek, které váží jak IL-1 α , tak i IL-1 β .

II. Způsoby přípravy duálně specifických protilátek

Abychom připravili duálně specifickou protilátku podle tohoto vynálezu, je třeba vystavit soubor protilátek (buď *in vivo* nebo *in vitro*) duálně specifickému antigenu, připravenému, jak je popsáno v předcházejícím oddíle a příslušná, duálně specifická protilátka se vybere z tohoto souboru. Dvěma základními složkami rozpoznání antigenu protilátkou jsou strukturní rozpoznání a afinitní zralost, založené na specifických molekulárních interakcích. V průběhu přirozené imunitní odpovědi jsou snadněji vyvíjeny protilátky s nízkou afinitou, které rozpoznávají strukturní motivy (například, rozpoznání antigenu určitými druhy rozpoznávacích receptorů). V přirozené imunitní odpovědi je toto brzy následováno somatickými mutacemi, které zvyšují afinitu některých klonů. Byly vyvinuty různé způsoby *in vivo* i *in vitro*, které napodobují tento přirozený jev. Duálně specifické protilátky s nízkou afinitou mohou být vytvořeny kterýmkoliv ze zde popsaných způsobů *in vivo* i *in vitro* a duálně specifické monoklonální protilátky s vyšší afinitou mohou být připraveny způsoby somatické mutagenese, popsané na tomto místě. Pro optimalizaci duálně specifických monoklonálních protilátek s vysokou afinitou mohou být kromě toho připraveny stejně (izomorfně) krystalizující struktury monoklonálních protilátek s nízkou afinitou s požadovanými antigeny. Tyto získané strukturní informace mohou vést k dalšímu zesílení afinity alterací (mutací) specifických kontaktních zbytků na monoklonálních protilátkách, aby byly zesíleny zde popsané specifické molekulární interakce.

V následujících podkapitolách jsou detailně popsány způsoby přípravy duálně specifických protilátek, používajících způsoby *in vivo*, způsoby *in vitro* nebo jejich kombinaci.

A. Způsoby *in vivo*

□ □ Standardním způsobem přípravy protilátek *in vivo* je imunizace vhodného zvířecího subjektu antigenem, kterému je vystaven soubor protilátek *in vivo*, následovaná získáním požadované protilátky nebo protilátek ze zvířete. Takovýto způsob může být použit pro přípravu duálně specifických protilátek použitím duálně specifického antigenu a výběrem takových protilátek, které specificky rozpoznají dvě strukturně příbuzné zájmové molekuly. Duálně specifické protilátky mohou být připraveny imunizací vhodného subjektu (například, králík, koza, myš nebo jiní savci, včetně transgenních knock-out verzí těchto savců) imunogenním preparátem duálně specifického antigenu. Vhodný imunogenní preparát může obsahovat například chemicky syntetizovaný nebo rekombinantně exprimovaný duálně specifický antigen. Tento preparát může dále obsahovat adjuvans, jako Freundovo úplné nebo neúplné adjuvans nebo podobnou imunostimulační sloučeninu. Pokud je použit pro vyvolání tvorby protilátek, hlavně imunizací *in vivo*, může být kromě toho duálně specifický antigen podle tohoto vynálezu použit sám nebo výhodněji jako konjugát s nosným proteinem. Takovýto způsob zesílení protilátkové odpovědi je v této oblasti techniky dobře znám. Příklady vhodných nosných proteinů, ke kterým může být duálně specifický antigen konjugován, obsahují hemokyanin mořských plžů (keyhole limpet hemocyanin -KLH) a albumin.

Buňky, produkující protilátky, mohou být získány ze subjektu a použity pro přípravu monoklonálních protilátek standardním způsobem jako je způsob hybridomu, původně popsáný v Kohler a Milstein (1975, *Nature* 256:495 až 497) (viz také v Brown et al. (1981) *J. Immunol* 127:539 až 46; Brown et al. (1980) *J Biol Chem* 255:4980 až 83; Yeh et al. (1976) *PNAS* 76:2927 až 31 a Yeh et al. (1982) *Int. J. Cancer* 29:269 až 75). Způsob výroby hybridomů monoklonální protilátky je velmi dobře znám (viz obecně R.H. Kenneth v *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp., New York (1980); E.A. Lerner (1981) *Yale J. Biol.Med.*, 54:387 až 402; M.L. Gefret et al. (1977) *Somatic Cell Genet.*, 3:231 až 36). Stručně řečeno, usmrcená buněčná linie (většinou myelom) se fúzuje s lymfocytem (většinou se slezinnými buňkami nebo buňkami lymfatických uzlin nebo periferními krevními lymfocyty) ze savce, imunizovaného duálně specifickým imunogenem, jak je popsáno níže a supernatanty kultur výsledných hybridomových buněk se skrínují na hybridom, který produkuje monoklonální protilátku s duální specifitou pro dvě různé, ale strukturně příbuzné zájmové molekuly. Pro přípravu duálně specifických monoklonálních protilátek může být použit kterýkoliv z dobře známých způsobů, použitých pro fúzování lymfocytů a usmrcených buněčných linií (viz například G. Galfre et al. (1977) *Nature* 266:550 až 52; Geftter et al. *Somatic Cell Genet.*, citováno shora; Lerner, *Yale J. Biol. Med.*,

citováno shora; Kenneth, *Monoclonal Antibodies*, citováno shora). Odborník v této oblasti techniky kromě toho jistě brzy zjistí, že v těchto způsobech existuje mnoho změn, které by také mohly být použitelné. Většinou jsou usmrcené buněčné linie (například myelomové buněčné linie) odvozeny od stejných savčích druhů, jako pocházejí lymfocyty. Například, myši hybridom může být sestaven fúzí lymfocytů z myši, imunizované imunogenním preparátem podle předkládaného vynálezu, s usmrcenou buněčnou myši linií. Výhodnými usmrcenými myšimi liniemi jsou buněčné linie myšního myelomu, které jsou citlivé na kultivační medium, obsahující hypoxantin, aminopterin a thymidin („HAT“ medium). Jako partner pro fúzi podle standardního způsobu může být použita kterákoliv z myších myelomových linií například myelomové linie P3-NS1/1-Ag4-1, P3-X63-Ag8,653 nebo Sp2/O-Ag14. Tyto myelomové linie lze získat ve sbírce amerických typových kultur (American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Md.). HAT senzitivní buňky myšního myelomu jsou většinou fúzovány s myšími slezinnými buňkami, použitím polyethylenglykolu (PEG). Hybridomové buňky, které jsou výsledkem fúze, jsou potom selektovány použitím HAT media, které zabíjí nefúzované a neproduktivně fúzované buňky myelomu (nefúzované slezinné buňky uhynou po několika dnech, protože nejsou transformované). Hybridomové buňky, produkující monoklonální protilátky, které specificky rozpoznávají dvě strukturně příbuzné zájmové molekuly, jsou identifikovány při skríninku supernatantů kultur hybridomů na tyto protilátky například, použitím standardního ELISA testu, pro selekci těch protilátek, které specificky váží dvě příbuzné molekuly.

Pro imunizaci *in vivo* mohou být v závislosti na typu požadované protilátky použiti různí živočišní hostitelé. Může být použit hostitel, který sám exprimuje endogenní verzi tohoto antigenu (antigenů) nebo, alternativně může být použit hostitel, u kterého byla prokázána deficeience v endogenní verzi zájmového antigenu (antigenů). Bylo například ukázáno, že u myši, vykazujících deficienci v určitém endogenním proteinu cestou homologní rekombinace v odpovídajícím homologním genu (tj. „knockoutované“ myši), dochází k humorální odpovědi na tento protein, pokud jsou jím imunizovány a lze je tedy použít pro přípravu monoklonálních protilátek s vysokou afinitou k tomuto proteinu (viz, např. Roes, J. et al. (1995) *J. Immunol. Methods* **183**:231 až 237; Lunn, M.P. et al. (2000) *J. Neurochem.* **75**:404 až 412).

Pro výrobu jiných než lidských protilátek (např. proti lidskému duálně specifickému antigenu) jsou pro výrobu protilátek vhodné jiní savci než člověk, včetně, ale bez omezení, myši, krysy, králíků a koz (a jejich knockoutovaných verzí). I když pro výrobu hybridomu jsou výhodné myši. Kromě toho může být pro výrobu zcela lidských protilátek proti duálně specifickému antigenu použit jiný než lidský hostitelský živočich, který exprimuje soubor

lidských protilátek. Takovýmito živočichy jinými než člověk jsou transgenní živočichové (např. myši), nesoucí lidské transgeny imunoglobulinů, hu-PBMC-SCID myši a radiační chiméry člověk/myš, o nichž všech bude pojednáno podrobně níže.

V jednom provedení tedy živočich, který je imunizován duálně specifickým antigenem, savec, jiný než člověk, výhodně myš, který je transgenní vzhledem k lidským imunoglobulinovým genům, vytváří po antigenní stimulaci lidské protilátky. U takovýchto živočichů jsou obvykle transgeny těžkých a lehkých řetězců imunoglobulinových transgenů s konfigurací lidské zárodečné linie zavedeny do živočichů, kteří byli geneticky upraveni tak, že jejich endogenní lokusy těžkých a lehkých řetězců jsou neaktivní. Po antigenní stimulaci těchto živočichů (např. lidským antigenem) jsou produkovány protilátky, odvozené od sekvencí lidských imunoglobulinů (tj. lidské protilátky) a z lymfocytů těchto živočichů mohou být připraveny lidské monoklonální protilátky pomocí standardní hybridomové technologie. Další popis myši transgenních vůči lidským imunoglobulinům a jejich použití ve výrobě lidských protilátek je například v US patentech č. 5 939 598, zveřejnění PCT č. WO 96/33 735, zveřejnění PCT č. WO 96/34 096, zveřejnění PCT č. WO 98/24 893 a zveřejnění PCT č. WO 99/53 049 od Abgenic Inc. a US Patenty č. 5 545 806, 5 569 825, 5 625 126, 5 633 425, 5 661 016, 5 770 429, 5 814 318, 5 877 397 a zveřejnění PCT č. WO 99/45 962 od GenPharm Inc. Viz také MacQuitty, J.J. a Kay, R.M. (1992) *Science* 257:1188; Taylor, D. et al. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:6287 až 6295; Lonberg, N. et al. (1994) *Nature* 368:856 až 859; Lonberg, N. a Huszar, D. (1995) *Int. Rev. Immunol.* 13:65 až 93; Harding, F.A. a Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536 až 546; Fishwild, D.M. et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:845 až 851; Mendez, M.J. et al. (1997) *Nature Genetics* 15:146 až 156; Green, L.L. a Jakobovits, A. (1998) *J. Exp. Med.* 188:483 až 495; Green, L.L. (1999) *J. Immunol. Methods* 231:11 až 23; Yang, X.D. et al. (1999) *J. Leukoc. Biol.* 66:401 až 410; Gallo, M.L. et al. (2000) *Eur. J. Immunol.* 30:534 až 540.

V jiném provedení je živočichem, imunizovaným duálně specifickým antigenem, myš s několika imunodeficiencemi (SCID), která byla rekonstituována lidskými periferními krevními monocyty nebo lymfatickými buňkami nebo jejich prekurzory. U takovýchto myši, nazývaných hu-PBMC-SCID chimerické myši, bylo zjištěno, že jako odpověď na antigenní stimulaci produkují lidské imunoglobuliny. Další popis těchto myši a jejich použití při tvorbě protilátek je například v Leader, K. A. et al. (1992) *Immunology* 76:229 až 234; Bombil, F. et al. (1996) *Immunobiol.* 195:360 až 375; Murphy, W. J. et al. (1996) *Semin. Immunol.* 8:233 až 241; Herz, U. et al. (1997) *Int. Arch. Allergy Immunol.* 113:150 až 152; Albert, S. E. et al. (1997) *J. Immunol.* 159:1393 až 1403; Nguyen, H. et al. (1997)

Microbiol. Immunol. 41: 901 až 907; Arai, K. et al. (1998) *J. Immunol. Methods* 217: 79 až 85; Yoshinari, K. a Arai, K. (1998) *Hybridoma* 17: 41 až 45 ; Hutchins, W. A. et al. (1999) *Hybridoma* 18: 121 až 129; Murphy, W. J. et al. (1999) *Clin. Immunol.* 90: 22 až 27; Smithson, S. L. et al. (1999) *Mol. Immunol.* 36: 113 až 124 ; Chamat, S. et al. (1999) *J. Infect. Diseases* 180: 268 až 277, a Heard, C. et al. (1999) *Molec. Med.* 5: 35 až 45.

V jiném provedení je živočichem, který je imunizován duálně specifickým antigenem, myš, která byla ozářena letální dávkou, následovanou ochranou proti ozáření buňkami kostní dřeně několika spojených imunodeficientních (SCID) myši a již byly implantovány funkční lidské lymfocyty. Tento typ chiméry, označovaný jako systém Trimera, byl použit pro výrobu lidských monoklonálních protilátek imunizací myši zájmovým antigenem, následovanou přípravou monoklonálních protilátek pomocí standardního hybridomu. Pro další detailní popis těchto myši a jejich použití ve výrobě protilátek viz například Eren, R. Et al. (1998) *Immunology* 93:154 až 161; Reisner, Y. A Dagan, S. (1998) *Trends Biotechnol.* 16:242 až 246; Ilan, E. Et al. (1999) *Hepatology* 29:553 až 562 a Bocher, W.O. et al. (1999) *Immunology* 96:634 až 641.

B. Přístupy *in vitro*

Alternativou k přípravě duálně specifických protilátek imunizací *in vivo* a selekci je identifikace a izolace duálně specifických protilátek podle tohoto vynálezu skříninkem rekombinační kombinační knihovny imunoglobulinů (např. zobrazovací knihovna řádkových protilátek, antibody phage display library) duálně specifickým antigenem, čímž jsou izolovány členy knihovny imunoglobulinů, které se váží specificky ke dvěma strukturně příbuzným, ale odlišným zájmovým molekulám. Kity pro tvorbu a skřínink řádkových zobrazovacích knihoven jsou komerčně dostupné (např. Pharmacia *Recombinant Phage Antibody System*, č. kat. 27-9400-01 a Stratagene *SurfZAPTM Phage Display Kit*, kat. č. 240 612). V některých provedeních je řádkovou zobrazovací knihovnou scFV knihovna nebo Fab knihovna. Způsob zobrazení řádku pro skřínink knihoven rekombinantních protilátek byl v této oblasti techniky rozsáhle popsán. Příklady způsobů a sloučenin obzvláště vhodných pro použití v tvorbě a při skříninku zobrazovací knihovny protilátek můžeme nalézt například v McCafferty et al., mezinárodní zveřejnění č. WO 92/01 047, US patent č. 5 969 108 a EP 589 877 (popisující hlavně zobrazení scFV), Ladner et al. US patent č. 5 223 409, č. 5 403 484, č. 5 571 698, č. 5 837 500 a EP 436 597 (popisující například pIII fúzi); Dover et al., mezinárodní zveřejnění č. WO 91/17 271, US patent č. 5 427 908, US patent č. 5 580 717 a EP 527 839 (popisující hlavně zobrazení Fab); Winter et al., mezinárodní zveřejnění č. WO 92/20 709 a EP 368 684 (popisující hlavně klonování sekvencí variabilních domén imunoglobulinů); Griffiths et al.

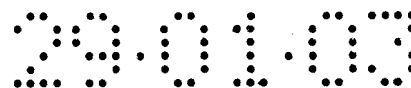
US patent č. 5 885 793 a EP 589 877 (popisující hlavně izolaci lidských protilátek vůči lidským antigenům pomocí rekombinantních knihoven); Garrard et al., mezinárodní zveřejnění č. WO 92/09 690 (popisující hlavně fágové expresní způsoby); Knappik et al., mezinárodní zveřejnění č. WO 97/08 320 (popisující knihovnu HuCal lidských rekombinantních protilátek); Salfeld et al., mezinárodní zveřejnění č. WO 97/29 131, popisující přípravu rekombinantní lidské protilátky vůči lidskému antigenu (faktor alfa lidského nekrosního tumoru), rovněž jako *in vitro* afinitní zrání rekombinantní protilátky) a Salfeld et al., předběžná přihláška č. 60/126 603, popisující rovněž přípravu rekombinantní lidské protilátky vůči lidskému antigenu (lidský interleukin-12), rovněž jako *in vitro* afinitní zrání rekombinantní protilátky).

Další popisy skříninků knihoven rekombinantních protilátek můžeme také nalézt ve vědeckých publikacích, jako například Fuchs et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1370 až 1372; Hay et al. (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81 až 85; Huse et al. (1989) *Science* 246:1275 až 1281; Griffiths et al. (1993) *EMBO J* 12:725 až 734; Hawkins et al. (1992) *J Mol Biol* 226:889 až 896; Clarkson et al. (1991) *Nature* 352:624 až 628; Gram et al. (1992) *PNAS* 89:3576 až 3580; Garrad et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1373 až 1377; Hoogenboom et al. (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133 až 4137; Barbas et al. (1991) *PNAS* 88:7978 až 7952; McCafferty et al. *Nature* (1990) 348:552 až 554 a Knappik et al. (2000) *J. Mol. Biol.* 296:57 až 86.

Jako alternativa k fágovým zobrazovacím systémům mohou být knihovny rekombinantních protilátek exprimovány na povrchu kvasničných buněk nebo bakteriálních buněk. Způsoby přípravy a skříninku knihoven exprimovaných na povrchu kvasničných buněk jsou dále popsány v PCT publikaci WO 99/36 569. Způsoby přípravy a skříninku knihoven exprimovaných na povrchu bakteriálních buněk jsou dále popsány v PCT publikaci WO 98/49 286.

Jakmile je zájmová protilátka identifikována z kombinační knihovny, jsou potom nukleové kyseliny (DNA), kódující lehké a těžké řetězce této protilátky, izolovány standardními způsoby molekulární biologie, jako je zesílení DNA pomocí PCR ze zobrazeného souboru (např. fágu), izolovaného při skříninku knihovny. Nukleotidové sekvence genů lehkých a těžkých řetězců protilátek, z nichž mohou být připraveny PCR primery, jsou v této oblasti techniky známé. Například mnoho takových sekvencí je uveřejněno v Kabat, E.A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, US Department of Health and Human Services, NIH publikace č. 91-3242 a v databázi "Vbase" sekvencí lidských zárodečných linií.

Protilátka nebo část protilátky podle tohoto vynálezu mohou být připraveny expresní rekombinací genů imunoglobulinových lehkých a těžkých řetězců v hostitelské buňce.



Aby byla protilátka rekombinantně exprimována, je hostitelská buňka transfektována jedním nebo více rekombinantními expresními vektory, nesoucími fragmenty DNA, kódujícími lehké a těžké řetězce imunoglobulinu protilátky, tak, že v hostitelské buňce jsou exprimovány lehké i těžké řetězce a výhodně vylučovány do media, ve kterém jsou hostitelské buňky kultivovány, a z kterého mohou být tyto protilátky získány. Pro získání genů těžkých a lehkých řetězců protilátek jsou použity standardní způsoby rekombinantní DNA, inkorporující tyto geny do expresních vektorů a zavádějící tyto vektory do hostitelských buněk, tak, jak je popsáno v Sambrook, Fritsch a Maniatis (editoři), *Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Ausubel, F.M. et al. (editoři) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, (1989) a v US Patentu č. 4 816 97 podle Boss et al.

Jakmile jsou získány fragmenty DNA kódující segmenty VH a LV zájmové protilátky, mohou být dále upravovány způsoby standardní rekombinantní DNA, aby byly například geny variabilní oblasti konvertovány na geny řetězců úplné délky protilátky, na geny Fab fragmentů nebo na geny scFv. Při těchto úpravách je fragment DNA, kódující VL nebo VH operativně připojen k jinému DNA fragmentu, kódujícímu jiný protein, jako konstantní oblast protilátky nebo ohebný můstek. Termín "operativně vázaný", tak jak je používán v tomto kontextu, značí, že tyto dva fragmenty DNA jsou spojeny tak, že aminokyselinové sekvence, kódované těmito dvěma DNA fragmenty zůstávají v rámci.

Izolovaná DNA, která kóduje VH oblast, může být přeměněna na gen úplné délky těžkého řetězce operativním navázáním DNA, kódující VH, k jiné molekule DNA, kódující konstantní oblasti těžkého řetězce (CH1, CH2 a CH3). Tyto sekvence genů konstantních oblastí lidského těžkého řetězce jsou v této oblasti techniky dobře známy (viz, např. Kabat, E.A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) a DNA fragmenty, obklopující tyto oblasti mohou být získány standardním PCR zesílením. Konstantní oblastí těžkého řetězce může být konstantní oblast IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM nebo IgD, ale nejvýhodnější je konstantní oblast IgG1 nebo IgG4. Pro gen Fab fragmentu těžkého řetězce může být DNA, kódující VH, operativně vázána k jiné molekule DNA, kódující pouze CH1 konstantní oblast těžkého řetězce.

Izolovaná DNA, kódující VL oblast, může být přeměněna na gen úplné délky lehkého řetězce (rovněž jako gen Fab lehkého řetězce) operativním navázáním DNA, kódující VL na jinou molekulu DNA, kódující konstantní oblast, CL, lehkého řetězce. Tyto sekvence genů konstantní oblasti lidského lehkého řetězce jsou v této oblasti techniky dobře známy

(viz, např. Kabat, E.A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) a fragmenty DNA, obklopující tyto oblasti lze získat standardním PCR zesílením. Konstantní oblastí lehkého řetězce může být konstantní oblast kappa nebo lambda, ale nejvýhodnější je konstantní oblast kappa.

Pro vytvoření genu scFv jsou DNA fragmenty, kódující VH a VL operativně napojeny na jiné fragmenty, kódující ohebný můstek, např. kódující aminokyselinovou sekvenci (Gly₄-Ser)₃, tak že VH a VL sekvence mohou být exprimovány jako souvislý jednořetězcový protein, s VL a VH oblastí spojenou ohebným můstkem (viz například Bird et al. (1988) *Science* 242:423 až 426; Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879 až 5883; McCafferty et al., *Nature* (1990) 348:552 až 554).

Pro expresi rekombinantních protilátek nebo částí protilátek podle tohoto vynálezu mohou být DNA, kódující částečné nebo úplné délky lehkých a těžkých řetězců, získané podle popisu shora, inzerovány do expresních vektorů, takže tyto geny jsou operativně navázány na sekvence kontroly transkripce a translace. V tomto kontextu termín „operativně vázaný“ znamená, že gen protilátky je vázán do vektoru, takže transkripční a translační kontrolní sekvence v rámci vektoru vykonávají jejich zamýšlenou funkci v regulaci transkripce a translace genu protilátky. Expresní vektor a sekvence kontroly exprese jsou vybrány tak, aby byly kompatibilní s použitou expresní hostitelskou buňkou. Gen lehkého řetězce protilátky a gen těžkého řetězce protilátky mohou být inzerovány do různých vektorů, ale většinou jsou inzerovány do jednoho expresního vektoru. Tyto protilátkové geny jsou inzerovány do expresního vektoru standardními způsoby (např. ligací komplementárních restričních míst na fragmenty protilátkových genů a vektory nebo ligací na tupé konce, pokud nejsou přítomna žádná restriční místa). Před inzercí sekvencí lehkého a těžkého řetězce mohou již expresní vektory nést sekvence konstantní oblasti protilátky. Například, jedním možným způsobem přeměny sekvencí VH a VL na sekvence úplné délky protilátkových genů je jejich inserce do expresních vektorů, které již kódují konstantní oblasti lehkého řetězce, případně konstantní oblasti těžkého řetězce, takže segment VH je operativně vázán k CH segmentu (segmentům) uvnitř vektoru a VL segment je operativně vázán na CL segment uvnitř vektoru. Kromě toho nebo alternativně může rekombinantní expresní vektor kódovat signální peptid, který usnadňuje vylučování protilátkového řetězce z hostitelské buňky. Gen tohoto protilátkového řetězce může být klonován ve vektoru, takže je tento signální peptid vázán v rámci amino konce genu protilátkového řetězce. Tímto signálním peptidem může být imunoglobulinový signální peptid nebo heterologní signální peptid (t.j., signální peptid z neimunoglobulinového proteinu).

Kromě těchto genů protilátkových řetězců nesou expresní rekombinantní vektory podle tohoto vynálezu také regulační sekvence, které kontrolují expresi genů protilátkových řetězců v hostitelské buňce. Pod termínem „regulační sekvence“ je třeba si myslet promotory, zesilovače a jiné kontrolní prvky exprese (např. polyadenylační signály), které kontrolují transkripci a translaci genů protilátkových řetězců. Tyto regulační sekvence jsou popsány například v Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Odborníci v této oblasti techniky jistě uznají, že sestavení expresního vektoru bude jistě záviset na takových faktorech, jako je výběr hostitelské buňky, která má být transformována, hladina požadované exprese proteinu atd.. Výhodné regulační sekvence pro expresi v savčích hostitelských buňkách obsahují virové prvky, které řídí vysoké hladiny exprese proteinu v savčích buňkách, jako jsou promotory a/nebo zesilovače, odvozené od megaloviru (CMV) (jako je CMV promotor/zesilovač), simian viru (SV40) (jako je SV40 promotor/zesilovač), adenoviru (např. pozdní promotor adenoviru (AdMLP)) a polyomu. Pro další popis těchto virových regulačních prvků a jejich částí viz například US patent č. 5 168 062 od Stinski, US patent č. 4 510 245 od Bell et al. a US patent č. 4 968 615 od Schaffner et al.

Kromě genů protilátkových řetězců a regulačních sekvencí mohou rekombinantní expresní vektory podle tohoto vynálezu nést doplňkové sekvence, jako jsou sekvence, které regulují replikaci vektoru v hostitelské buňce (např. počátky replikace) a geny selekčních markerů. Tyto selekční markery usnadňují selekci hostitelských buněk, do kterých byl zaveden vektor (viz, např. US patenty č. 4 399 216, 4 634 665 a 5 179 017, všechny od Axel et al.). Tyto selekční markery většinou vnášejí rezistenci vůči určitým látkám, jako je G418, hygromycin nebo methotrexát, do hostitelské buňky, do které byl vektor introdukován. Výhodné selekční markerové geny obsahují gen dihydrofolátreduktázy (DHFR, pro použití v dhfr⁻ hostitelských buňkách se selekcí/zesílením methotrexátu) a gen *neo* (pro selekci G418).

Pro expresi těžkých a lehkých řetězců je expresní vektor (vektory), kódující lehké a těžké řetězce, standardním způsobem transfektován do hostitelské buňky. Různé formy termínu “transfekce” jsou myšleny tak, aby pokrývaly široké spektrum obecně používaných postupů pro introdukci exogenní DNA do prokaryontních nebo eukaryontních hostitelských buněk, např. elektroporaci, precipitaci fosforečnanem vápenatým, transfekci DEAE-dextranem a jim podobné. I když je teoreticky možné exprimovat protilátky podle tohoto vynálezu buď v prokaryontní nebo v eukaryontní buňce, je exprese v eukaryontní buňce, nejvýhodněji savčí hostitelské buňce, nejvýhodnější, protože takové eukaryontní buňky, hlavně savčí buňky, jsou vhodnější než prokaryontní buňky pro tvorbu a vylučování patřičných nativních a imunologicky aktivních protilátek. Bylo zjištěno, že exprese protilátkových genů prokaryonty je

neefektivní z hlediska dosažení vysokých výtěžků aktivní protilátky (Boss, M.A. a Wood, C.R. (1985) *Immunology Today* 6:12 až 13.

Mezi výhodné savčí buňky pro expresi rekombinantních protilátek podle tohoto vynálezu patří vaječnickové buňky čínského křečka (Chinese Hamster ovary cells, CHO buňky) (včetně dhfr⁻ CHO buněk, popsanych Urlaub a Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 až 4220, použité, např. se selekčním markerem DHFR, popsaným R.J. Kaufman a P.A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601 až 621), NSO myelomové buňky, COS buňky a SP2 buňky. Pokud jsou do savčích hostitelských buněk introdukovány rekombinantní expresní vektory, kódující protilátkové geny, jsou protilátky produkovány kultivací buněk po dobu dostatečnou pro umožnění exprese protilátky v hostitelských buňkách nebo, výhodněji, pro vylučování protilátky do kultivačního media, ve kterém jsou hostitelské buňky pěstovány. Protilátky lze z kultivačního media získat standardními způsoby purifikace proteinů.

Hostitelské buňky mohou být také použity pro výrobu částí intaktních protilátek, jako jsou Fab fragmenty nebo scFv molekuly. Je třeba si uvědomit, že změny ve shora uvedeném postupu jsou rovněž v záměru předkládaného vynálezu. Například, může být žádoucí transfektovat hostitelskou buňku s DNA, kódující buď těžký nebo lehký řetězec (ale ne oba) protilátky podle tohoto vynálezu. Může být také použita rekombinantní DNA pro odstranění některé nebo veškeré DNA, kódující buď lehký nebo těžký řetězec nebo oba, které nejsou potřeba pro vazbu zájmových antigenů. Molekuly exprimované takto okleštěnými molekulami DNA patří také mezi protilátky podle tohoto vynálezu. Kromě toho lze produkovat bifunkční protilátky, ve kterých je jeden těžký a jeden lehký řetězec z protilátky podle tohoto vynálezu a další těžký a lehký řetězec jsou specifické pro antigen, jiný než zájmové antigeny, příčnou vazbou protilátky podle tohoto vynálezu na druhou protilátku standardními postupy chemického příčného síťování.

Ve výhodném systému rekombinantní exprese protilátky nebo její antigen vážící části podle tohoto vynálezu je rekombinantní expresní vektor, kódující lehký i těžký protilátkový řetězec, zaveden do dhfr⁻ CHO buněk transfekcí zprostředkovanou fosforečnanem vápenatým. Uvnitř rekombinantního expresního vektoru jsou geny těžkého a lehkého řetězce protilátky operativně vázány k CMV zesilovacím/AdMLP promotorovým regulačním prvkům, aby řídily vysoké hladiny transkripce těchto genů. Tento rekombinantní expresní vektor rovněž nese DHFR gen, který umožňuje selekci CHO buněk, které byly transfektovány vektorem, používajícím selekci/ampflifikaci methotrexátu. Selektované transformantní buňky jsou kultivovány, aby byla umožněna exprese těžkých a lehkých řetězců protilátky. Intaktní protilátka je získána z kultivačního media. Pro přípravu rekombinantního expresního vektoru,

transfekci hostitelské buňky, selekci transformantů, kultivaci hostitelských buněk a získání protilátky z kultivačního media jsou použity standardní způsoby molekulární biologie. Vynález kromě toho poskytuje způsob syntézy rekombinantní protilátky podle tohoto vynálezu kultivací hostitelské buňky podle tohoto vynálezu ve vhodném kultivačním mediu, pokud je rekombinantní protilátka podle tohoto vynálezu syntetizována.

Alternativou ke skříninku knihoven rekombinantních protilátek zobrazením fága, mohou být další způsoby, známé na tomto poli techniky pro skřínink velkých kombinačních knihoven, použité pro identifikaci duálně specifických protilátek podle tohoto vynálezu. Jedním typem alternativního expresního systému je systém, ve kterém je knihovna rekombinantních protilátek exprimována jako RNA-proteinová fúze, popsána v PCT publikaci č. WO 98/31 700 od Szostak a Roberts a v Roberts, R.W. a Szostak, J.W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12 297 až 12 302. V tomto systému je vytvořena kovalentní fúze mezi mRNA a jí kódovaným peptidem nebo proteinem, translací *in vitro* syntetických mRNA, které na svém 3' konci nesou puromycin, peptidový akceptor antibiotik. Určitá mRNA může být tedy obohacena ze složité směsi mRNA (např. kombinační knihovna) na základě vlastností kódovaného peptidu nebo proteinu, např. protilátky nebo její části, jako je vazba protilátky nebo její části k duálně specifickému antigenu. Sekvence nukleové kyseliny, kódující protilátky nebo jejich části, získané skříninkem těchto knihoven, mohou být exprimovány rekombinantním způsobem, jak je popsáno shora (např. v savčích hostitelských buňkách) a kromě toho mohou být předmětem dalšího afinitního zrání buď dalšími cykly skříninku fúzí mRNA-peptid, ve kterých byly zavedeny mutace do původně vybrané sekvence (sekvencí) nebo jiným způsobem afinitního zrání rekombinantních protilátek *in vitro*, jak je popsáno shora.

C. Kombinační přístupy

Duálně specifické protilátky podle tohoto vynálezu mohou být také připraveny použitím kombinačních přístupů *in vivo* nebo *in vitro*, takovými způsoby, ve kterých je duálně specifický antigen původně vystaven protilátkovému souboru *in vivo* v hostitelském živočichovi, aby byla stimulována produkce protilátek, které váží duálně specifický antigen, ale v němž je provedena další selekce protilátek a/nebo zrání (t.j., zlepšení) pomocí jedné nebo více *in vitro* technik.

V jednom provedení tento kombinační přístup obsahuje nejprve imunizaci živočicha, jiného než člověka (např. myš, krysa, králík, koza nebo jejich transgenní verze nebo chimerní myš), duálně specifickým antigenem pro stimulaci protilátkové odpovědi vůči antigenu, následovanou přípravou a skříninkem fágové zobrazovací protilátkové knihovny pomocí imunoglobulinových sekvencí z lymfocytů, stimulovaných *in vivo* expozicí vůči duálně

specifickému antigenu. První krok tohoto kombinačního postupu může být proveden jak je popsáno v oddíle IIA, zatímco druhý krok tohoto postupu může být proveden, jak je popsáno v oddíle IIB shora. Výhodné postupy hyperimunizace živočichů, jiných než člověk, následované skřínkem *in vitro* fágových zobrazovacích knihoven, připravených ze stimulovaných lymfocytů, obsahují postupy, popsané u BioSite Inc., viz např. PCT publikace WO 98/47 343, PCT publikace WO 91/17 271, US patent č. 5 427 908 a US patent č. 5 580 717.

V jiném provedení je v kombinačním postupu obsažena nejprve imunizace jiného než lidského živočicha (např. myš, krysa, králík, koza nebo jejich knockoutovaná a/nebo transgenní verze nebo chimerní myš) s duálně specifickým antigenem pro stimulaci protilátkové odpovědi na antigen a selekce lymfocytů, které produkují protilátky s požadovanou duální specifitou (např. skřínkem hybridomů, připravených z imunizovaných zvířat). Přestavěné protilátkové geny z vybraných klonů se potom izolují (standardními způsoby klonování, jako je reverzní transkriptáza – polymerázová řetězová reakce) a jsou předmětem afinitního zrání *in vitro*, čímž jsou zesíleny vazebné vlastnosti vybrané protilátky nebo protilátek. První krok tohoto postupu může být proveden podle popisu v odstavci IIA shora, zatímco druhý krok tohoto postupu může být proveden, jak je popsáno v odstavci IIB shora, hlavně použitím *in vitro* způsobů zrání, které jsou popsány v PCT publikaci WO 97/29 131 a PCT publikaci WO 00/56 772.

V ještě jiném kombinačním způsobu jsou rekombinantní protilátky generovány z jednotlivých, izolovaných lymfocytů, použitím postupu, označovaného v této oblasti techniky jako způsob vybraných lymfocytárních protilátek (selected lymphocyte antibody method, SLAM), popsáný v US patentu č. 5 627 052, PCT publikaci WO 92/02 551 a v Babcock, J.S. et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **93**:7843 až 7848. V tomto způsobu, aplikovaném na duálně specifické protilátky podle tohoto vynálezu, je nejprve jiný než lidský živočich (např. myš, krysa, králík, koza nebo jejich transgenní verze nebo chimerní myš) imunizován *in vivo* duálně specifickým antigenem pro stimulaci protilátkové odpovědi proti tomuto antigenu a potom se jednotlivé buňky, vylučující zájmové protilátky, např. specifické vůči duálně specifickému antigenu, selektují pomocí antigen-specifického hemolytického plakového testu (např. duálně specifický antigen sám nebo strukturně příbuzné zájmové molekuly jsou připojeny k ovčím červeným krvinkám pomocí můstku, jako je biotin, čímž je umožněna identifikace jednotlivých buněk, které vylučují protilátky s vhodnou specifitou, pomocí testu hemolytických plaků). Po identifikaci buněk, vylučujících zájmové protilátky, jsou těžké a lehké řetězce variabilních oblastí cDNA uvolněny z buněk reverzní transkriptázou a PCR a tyto variabilní oblasti mohou být potom exprimovány v kontextu příslušných imunoglobulinových konstantních oblastí (např. lidské konstantní oblasti), v savčích

hostitelských buňkách, jako jsou COS nebo CHO buňky. Tyto hostitelské buňky, transfektované zesílenými imunoglobulinovými sekvencemi, odvozenými od *in vivo* vybraných lymfocytů, mohou být poté dále analyzovány a selektovány *in vitro* například kontrolou transfektovaných buněk, aby byly izolovány buňky, exprimující protilátky s požadovanou duální specifitou. Tyto zesílené imunoglobulinové sekvence mohou být dále ovlivňovány *in vitro*, jako třeba *in vitro* afinitním zráním, jak je popsáno shora.

V jiném provedení obsahuje kombinační způsob následující kroky, aby byly produkovány duálně specifické protilátky. Nejprve je jiný než lidský živočich imunizován prvním antigenem a druhý, jiný než lidský živočich je imunizován druhým, odlišným antigenem, přičemž druhý antigen je výhodně strukturně podobný prvnímu antigenu, aby byla stimulována protilátková odpověď *in vivo*. Z protilátkových genů je sestrojena knihovna rekombinantních těžkých řetězců a knihovna rekombinantních lehkých řetězců, odvozených od prvního živočicha, jiného než člověk, případně druhého živočicha, jiného než člověk, jak je popsáno v oddíle IIB. Knihovna těžkého řetězce z živočicha, imunizovaného prvním antigenem je spojena s knihovnou lehkého řetězce živočicha, imunizovaného druhým antigenem, aby vznikla knihovna protilátek X. Podobně, knihovna těžkého řetězce z živočicha, imunizovaného druhým antigenem je spojena s knihovnou lehkého řetězce z živočicha, imunizovaného prvním antigenem, aby byla vytvořena knihovna protilátek Y. Mimoto mohou knihovny X a Y spojeny za vzniku knihovny XY. Duálně specifické protilátky, které váží první i druhý antigen, mohou být identifikovány a izolovány z knihoven X, Y a/nebo XY knihoven.

III. Charakteristiky duálně specifických protilátek

Tento vynález poskytuje duálně specifické protilátky, rovněž jako části těchto protilátek, které mohou být připraveny způsobem podle tohoto vynálezu. Těmito protilátkami, případně jejich částmi, jsou výhodně izolované protilátky. Těmito protilátkami, případně jejich částmi, jsou výhodně neutralizující protilátky. Protilátkami podle tohoto vynálezu jsou také monoklonální a rekombinantní protilátky, případně jejich části. V různých provedeních mohou protilátky nebo jejich části obsahovat sekvence aminokyselin odvozené zcela od jednotlivých živočišných druhů, jako jsou protilátky nebo jejich části zcela lidského nebo zcela myšího původu. V jiných provedeních mohou být těmito protilátkami nebo jejich částmi chimerní protilátky, protilátky s implantovanou CDR nebo jiné formy lidských protilátek.

Termín "protilátka", jak je zde používán, označuje imunoglobulinové molekuly, složené ze čtyř polypeptidových řetězců, dvou těžkých (H) řetězců a dvou lehkých (L) řetězců, vzájemně spojených disulfidickými vazbami. Každý těžký řetězec je složen z variabilní oblasti těžkého řetězce (zkracované zde jako HCVR nebo VH) a konstantní oblasti těžkého řetězce.

Tato konstantní oblast těžkého řetězce je složena ze tří domén, CH1, CH2 a CH3. Každý lehký řetězec je složen z variabilní oblasti lehkého řetězce (zde označované jako LCVR nebo LV) a konstantní oblasti lehkého řetězce. Konstantní oblast lehkého řetězce je tvořena jednou doménou, CL. Oblasti VH a LH mohou být dále děleny na oblasti hypervariability, které jsou nazývány oblastmi určujícími komplementaritu (complementarity determining regions, CDR), které jsou odděleny oblastmi, které jsou více konzervativnější a jsou nazývané rámcové oblasti (framework regions - FR). Každá VH a VL je složena ze tří CDR a čtyř FR, uspořádaných od N-konců k C-koncům v následujícím pořadí: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Termín "antigen vážící část" protilátky (nebo jednoduše "část protilátky"), jak je zde užíván, označuje jeden nebo více fragmentů duálně specifické protilátky, které si uchovávají schopnost se specificky vázat na dva různé, ale strukturně příbuzné antigeny. Bylo zjištěno, že antigen vážící funkce protilátky může být představována fragmentem o délce celé protilátky. Příklady vážících se fragmentů, obsažených v rámci termínu "antigen vážící část" protilátky, obsahují (i) Fab fragment, což je monovalentní fragment, zahrnující VL, VH, CL a CH1 domény; (ii) F(ab')₂ fragment, což je bivalentní fragment, obsahující dva Fab fragmenty, vázané disulfidickým můstkem v oblasti čepu; (iii) Fd fragment, zahrnující VH a CH1 domény; (iv) FV fragment, zahrnující VL a VH domény jednoho ramene protilátky; (v) dAB fragment (Ward et al., (1989) *Nature* 341:544 až 546), který zahrnuje VH doménu a vi) izolovanou oblast, určující komplementaritu (CDR). Kromě toho, i když dvě domény Fv fragmentu, VH a VL, jsou kódovány oddělenými geny, mohou být použitím rekombinantních způsobů spojeny syntetickým můstkem, který umožňuje, aby byly produkovány ve formě jednoho proteinového řetězce, ve kterém VL a VH oblasti tvoří monovalentní molekuly (známé jako jednoduché řetězce Fv (scFv); viz např. Bird et al. (1988) *Science* 242:423 až 426 a Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879 až 5883). Tyto jednořetězcové protilátky jsou také chápány pod termínem „antigen vážící části“ protilátky. Jiné formy řetězcových protilátek, jako diaprotilátky, jsou také obsaženy v tomto termínu. Diaprotilátky jsou bivalentní, bispecifické protilátky, jejichž VH a VL domény jsou exprimovány v jednom polypeptidovém řetězci, ale důsledkem můstku, který je příliš krátký, aby dovolil párování mezi těmito dvěma doménami v rámci jednoho řetězce, se tyto domény párují s komplementárními doménami jiných řetězců a tvoří tak dvě antigen vážící místa (viz např. Holliger, P. et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444 až 6448; Poljak, R.J., et al. (1994) *Structure* 2:1121 až 1123).

Protilátka nebo její antigen vážící část mohou být částí větších imunoadhezivních molekul, vzniklých kovalentní nebo nekovalentní asociací protilátky nebo její části s jedním nebo více jinými proteiny nebo peptidy. Příklady takových imunoadhezivních molekul obsahují

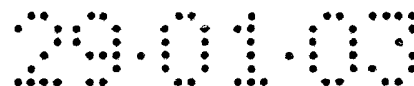
použití jaderné oblasti streptavidinu pro tvorbu tetramerní scFv molekuly (Kyprianov, S.M., et al. (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93 až 101) a použití cysteinového zbytku, markerového peptidu a C-koncového polyhistidinového tagu pro tvorbu bivalentních a biotinylovaných scFv molekul (Kyprianov, S.M. et al. (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047 až 1058). Části protilátky, jako Fab a F(ab')₂ fragmenty, mohou být připraveny z celých protilátek konvenčním způsobem, jako je papainová nebo pepsinová digesce celých protilátek. Kromě toho mohou být protilátky, části protilátek a imunoadezivní molekuly získány standardními rekombinantními postupy.

Termín “izolovaná duálně specifická protilátka”, jak je zde používán, označuje duálně specifickou protilátku, která v podstatě neobsahuje žádné jiné protilátky, které mají odlišné antigenní specifity (např. izolovaná protilátka, která specificky váže dva rozdílné, ale strukturně příbuzné antigeny, ale je v podstatě prostá protilátek, které specificky váží jiné nepřibuzné antigeny). Kromě toho může být izolovaná duálně specifická protilátka v podstatě prostá jiného buněčného materiálu a/nebo jiných chemikálií.

Termín “neutralizující protilátka”, jak je zde použit, označuje protilátku, jejíž vazba k příslušnému antigenu má za výsledek inhibici biologické aktivity tohoto antigenu. Tato inhibice biologické aktivity antigenu může být odhadnuta měřením jednoho nebo více ukazatelů biologické aktivity tohoto antigenu pomocí vhodného *in vitro* nebo *in vivo* testu.

Termín “monoklonální protilátka”, jak je zde používán, označuje protilátku odvozenou od hybridomu (např. protilátku vylučovanou hybridomem, připraveným hybridomovou technologií, jako je standardní hybridomová technologie podle Kohler a Milstein). Duálně specifická protilátka podle tohoto vynálezu, odvozená od hybridomu, je tedy stále označována jako monoklonální protilátka, i když má antigenní specifitu proti více než jednomu jednotlivému antigenu.

Fráze “rekombinantní protilátka” označuje protilátky, které jsou připraveny, exprimovány, vytvořeny nebo izolovány rekombinantním způsobem, tak jako protilátky, exprimované použitím rekombinantního expresního vektoru, transfektovaného do hostitelské buňky, protilátky, izolované z knihovny rekombinantních kombinačních protilátek, izolované ze živočicha (např. myši), který je transgenní vůči lidským imunoglobulinovým genům (viz, např. Taylor, L.D., et al. (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287 až 6295) nebo protilátka, které jsou připravené, exprimované, vytvořené nebo izolované jiným způsobem, který obsahuje napojení příslušných imunoglobulinových genových sekvencí (jako jsou sekvence lidských imunoglobulinových genů) k jiným DNA sekvencím. Příklady rekombinantních protilátek obsahují chimerní, CDR implantované a humanizované protilátky.



Termín “lidská protilátka” označuje protilátky, které mají variabilní a konstantní oblasti odpovídající nebo odvozené od imunoglobulinových lidských zárodečných sekvencí, jak je popsáno, např. v Kabat et al. (viz Kabat, et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, US Department of Health and Human Services, NIH Publication č. 91-3242). V některých provedeních jsou však takové rekombinantní lidské protilátky předmětem mutagenese *in vitro* nebo, pokud je použit živočich transgenní pro lidské Ig sekvence, *in vivo* somatické mutagenese, a aminokyselinové sekvence VH a LH oblastí rekombinantních protilátek jsou sekvencemi, které, jsou-li odvozeny a příbuzné od lidských zárodečných VH a VL sekvencí, nemohou existovat v rámci přirozeného souboru zárodečných lidských protilátek *in vivo*. V určitých provedeních jsou však tyto rekombinantní protilátky výsledkem selektivní mutagenese, zpětné mutace nebo obojí.

Termín “zpětná mutace” označuje proces, ve kterém jsou některé nebo všechny somaticky mutované aminokyseliny nahrazeny odpovídajícími zbytky zárodečné linie z homologních sekvencí zárodečných protilátkových sekvencí. Sekvence řetězců těžkého a lehkého řetězce lidské protilátky podle tohoto vynálezu jsou odděleně srovnány se sekvencemi zárodečné linie VBASE databáze, aby byly identifikovány sekvence s nejvyšší homologií. Rozdíly v lidské protilátce podle tohoto vynálezu jsou opraveny podle sekvencí zárodečné linie mutováním definovaných nukleotidových pozic, kódujících tyto různé aminokyseliny. Úloha každé aminokyseliny, identifikované jako kandidát pro zpětnou mutaci by měla být vyzkoušena na její přímou nebo nepřímou úlohu ve vazbě antigenu a jakákoliv aminokyselina, která by po mutaci měnila požadované charakteristiky lidské protilátky, by neměla být obsažena ve výsledné lidské protilátce, aby byl minimalizován počet aminokyselin, které jsou předmětem zpětné mutace těch aminokyselinových pozic, které byly nalezeny jako odlišné od nejbližší sekvence zárodečné linie, ale identické s odpovídající aminokyselinou v druhé zárodečné linii, a které mohou zůstat, za předpokladu, že tato druhá sekvence zárodečné linie je identická a kolineární se sekvencí lidské protilátky podle tohoto vynálezu v nejméně 10, výhodně v 12 aminokyselinách na obou stranách dotyčné aminokyseliny. Zpětné mutace se mohou vyskytovat ve kterémkoliv stadiu optimalizace protilátky.

Termín “chimerní protilátka” označuje protilátky, které obsahují sekvence variabilní oblasti těžkého a lehkého řetězce jednoho živočišného druhu a sekvence konstantní oblasti od jiného živočišného druhu, právě tak jako protilátky, které mají myši variabilní oblasti těžkého a lehkého řetězce, vázané na lidské konstantní oblasti.

Termín “protilátka s implantovanou CDR” označuje protilátky, které obsahují sekvence variabilních oblastí těžkého a lehkého řetězce jednoho živočišného druhu, ve kterých

jsou ale sekvence jedné nebo více CDR oblastí VH a/nebo VL nahrazeny CDR sekvencemi od jiných druhů, jako v případě protilátek, které mají myší variabilní oblasti těžkých a lehkých řetězců, ve který je jedna nebo více myších CDR (např. CDR3), nahrazena lidskou CDR sekvencí.

Termín “humanizovaná protilátka” označuje protilátky, které obsahují sekvence variabilních oblastí těžkého a lehkého řetězce druhů, jiných než lidských (např. myších), ve kterých je ale nejméně část VH a/nebo VL sekvence změněna na více “lidskou”, t.j., více podobnou variabilním sekvencím lidské zárodečné linie. Jedním typem humanizované protilátky je protilátka s implantovanou CDR, ve které jsou lidské CDR sekvence zavedeny do jiných než lidských VH a VL sekvencí, aby nahradily odpovídající jiné než lidské CDR sekvence.

Jednou cestou měření kinetiky vazby protilátky je povrchová plasmonová rezonance. Termín “povrchová plazmonová rezonance”, jak je zde používán, označuje optický fenomén, který umožňuje analýzu biospecifických interakcí v reálném čase detekcí změn v koncentraci proteinu v matrici biosenzoru například použitím systému BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, NY). Další popis, viz Jönsson, U. Et al. (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19 až 26; Jönsson, U. Et al. (1991) *Biotechniques* 11:620 až 627; Johnsson, B., et al. (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125 až 131 a Johnson, B., et al. (1991) *Anal. Biochem.* 198:268 až 277.

Termín “ K_{off} ”, jak je zde použit, označuje rozpadovou rychlostní konstantu disociace protilátky z komplexu protilátka/antigen.

Termín “ K_d ”, jak je zde použit, označuje disociační konstantu jednotlivé interakce protilátka-antigen.

Duálně specifické protilátky podle tohoto vynálezu se připravují pomocí různých způsobů přípravy protilátek, které jsou popsány v odstavci II shora. Duálně specifické protilátky podle tohoto vynález mohou být směřovány proti zásadně libovolným strukturálně příbuzným antigenům, i když výhodné duálně specifické protilátky podle tohoto vynálezu jsou ty, které specificky váží IL-1 α a IL-1 β , které mohou být připraveny pomocí duálně specifických antigenů, jako jsou antigeny, popsané v příkladech 1 až 4. Jinými strukturně příbuznými antigeny, které mohou být použity v předkládaném vynálezu jsou, ale bez omezení na ně, členy rodiny caspázy, rodiny cytokinů, jako jsou členy rodiny IL-1 (např. IL-1/IL-18), členy rodiny TNF (např. TNF α /TNF β), členy rodiny IL-6, interferony, členy rodiny TGF β , členy rodiny EGF, členy rodiny FGF, členy rodiny PDGF, členy rodiny VEGF, členy rodiny angiopoetinu, kostní morfogenní proteiny, vylučované proteázy (metalo-proteinázy) a

rodiny receptorů cytokinu, jako jsou členy rodiny receptorů IIL-1, členy rodiny TNF receptorů, členy rodiny TGF β receptorů, členy rodiny EGF receptorů, členové rodiny receptorů FGF, členy rodiny PDGF receptorů, členy rodiny VEGF receptorů a členy rodiny receptorů angiopoetinu.

Duálně specifické protilátky podle tohoto vynálezu mohou vykazovat stejnou vazebnou aktivitu proti dvěma různým, ale strukturně příbuzným antigenům, ke kterým se váží nebo se může duálně specifická protilátka alternativně vázat přednostněji k jednomu ze dvou antigenů, ale nicméně stále má specifitu proti dvěma příbuzným antigenům ve srovnání s nepříbuznými antigeny. Vazebná aktivita duálně specifické protilátky proti strukturně příbuzným antigenům, rovněž jako proti nepříbuzným antigenům, může být odhadnuta pomocí standardních *in vitro* testů, jako jsou ELISA nebo BIAcore analýzy. Je výhodné, když poměr K_d protilátky proti strukturně nepříbuzným antigenům ke K_d protilátky proti strukturně příbuzným antigenům je nejméně 3, výhodnější, když je tento poměr nejméně 5 nebo když ještě výhodněji je tento poměr nejméně 10 nebo když ještě výhodněji je tento poměr nejméně 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 nebo 1000.

V kvantitativním vyjádření je jednou z měr rozdíl mezi vazbou pozadí a duální specifitou. Například, vazba pozadí je na nízké úrovni, např. méně než 5 %, výhodněji méně než 3 % a nejvýhodněji 0,1 až 1 %, zatímco specifická křížová reaktivita nebo duálně specifická vazba je na vyšší úrovni, např. vyšší než 1 %, výhodněji vyšší než 3 %, ještě výhodněji vyšší než 5 % a ještě výhodněji vyšší než 10 %. Kromě toho je IC_{50} duálně specifické protilátky vůči cílovému antigenu blízké hodnotě ED_{50} antigenů v daném biotestu.

Duálně specifická protilátka nebo její antigen vážící část podle tohoto vynálezu se výhodně vybere tak, aby měla požadovanou kinetiku vazby (např. vysokou afinitu, nízkou disociaci, pomalou rychlost rozpadu, silnou neutralizační aktivitu) vůči jednomu, výhodně vůči oběma antigenům, ke kterým se specificky váže. Například, duálně specifická protilátka nebo její část, může vázat jeden nebo výhodně oba strukturálně příbuzné antigeny s rychlostní konstantou k_{off} 0,1 s⁻¹ nebo méně, výhodněji 1 x 10⁻² s⁻¹ nebo méně, výhodněji 1 x 10⁻³ s⁻¹ nebo méně, ještě výhodněji 1 x 10⁻⁴ s⁻¹ nebo méně, ještě výhodněji 1 x 10⁻⁵ s⁻¹ nebo méně, jak je určeno povrchovou plazmonovou rezonancí. Kromě toho nebo jinak, může duálně specifická protilátka nebo její část inhibovat aktivitu jednoho, výhodně obou strukturně příbuzných antigenů s hodnotou IC_{50} 1 x 10⁻⁶ M nebo méně, ještě výhodněji s hodnotou IC_{50} 1 x 10⁻⁷ M nebo méně, ještě výhodněji s hodnotou IC_{50} 1 x 10⁻⁸ M nebo méně, ještě výhodněji s hodnotou IC_{50} 1 x 10⁻⁹ M nebo méně, ještě výhodněji s hodnotou IC_{50} 1 x 10⁻¹⁰ M nebo méně, ještě výhodněji s hodnotou IC_{50} 1 x 10⁻¹¹ M nebo méně. Je výhodné, když je IC_{50} měřeno pomocí

citlivého biotestu, ve kterém by hodnoty IC_{50} měly být těsné k hodnotě ED_{50} antigenu v tomto testu.

Tento vynález rovněž poskytuje farmaceutické prostředky, obsahující duálně specifickou protilátku nebo její antigen vážící část podle tohoto vynálezu a farmaceuticky přijatelný nosič. Farmaceutický prostředek podle tohoto vynálezu může dále obsahovat nejméně jedno doplňkové terapeutické činidlo, např. jedno nebo více doplňkových terapeutických činidel pro léčbu choroby, při které je použití duálně specifické protilátky užitečné pro zlepšení choroby. Například, pokud duálně specifická protilátka specificky váže $IL-1\alpha$ a $IL-1\beta$, může farmaceutický prostředek dále obsahovat jedno nebo více terapeutických činidel pro léčbu chorob, na nichž se aktivita $IL-1$ škodlivě podílí.

Protilátky a jejich části podle tohoto vynálezu mohou být začleněny do farmaceutických prostředků, vhodných pro podání subjektu. Tyto farmaceutické prostředky většinou obsahují protilátku nebo její část podle tohoto vynálezu a farmaceuticky přijatelný nosič. Termín "farmaceuticky přijatelný nosič" jak je zde používán, obsahuje libovolná a všechna rozpouštědla, disperzní media, povlaky, antibakteriální a antifungální činidla, izotonická čidla a činidla zpomalující absorpci a jim podobná, pokud jsou fyziologicky přijatelná. Příklady farmaceuticky přijatelných nosičů obsahují jednu nebo více látek jako, voda, fyziologický roztok, fosfátový fyziologický roztok, glukózu, glycerol, ethanol a jim podobné, rovněž jako jejich kombinace. V mnoha případech je výhodné, aby obsahovaly izotonická činidla například cukry, polyalkoholy, jako je mannitol, sorbitol nebo chlorid sodný. Farmaceuticky přijatelné nosiče mohou dále obsahovat menší množství pomocných substancí, jako jsou smáčecí nebo emulgační činidla, konzervace pufrů, které zvyšují poločas života účinnosti protilátky nebo části protilátky.

Protilátky a části protilátek podle tohoto vynálezu mohou být zabudovány do farmaceutických prostředků, vhodných pro parenterální podání. Je výhodné, když je protilátka nebo části protilátky připravena jako injekční roztok, obsahující 0,1 až 250 mg/ml protilátky. Tento injekční roztok může obsahovat buď kapalnou nebo lyofilizovanou lékovou formu v lékovkách z křemenného nebo hnědého skla, ampulích nebo předplněných injekčních stříkačkách. Pufr může být L-histidin (1 až 50 mM), optimálně 5 až 50 mM, při pH 5,0 až 7,0 (optimálně pH 6,0). Jiné vhodné pufrы obsahují, ale bez omezení, natrium-sukcinát, natrium-citrát, natrium-fosfát nebo kalium-fosfát. Chlorid sodný může být použit pro změnu toxicity roztoku při koncentraci 0 až 300 mM (optimálně 150 mM pro kapalnou lékovou formu). Při lyofilizované lékové formě mohou být obsaženy kryoprotektanty, hlavně 0 až 10 % sacharózy (optimálně 0,5 až 1,0 %). Jinými vhodnými kryoprotektanty jsou trehalóza a laktóza.

V lyofilizované lékové formě mohou být obsažena plnidla, hlavně 1 až 10 % mannitolu (optimálně 2 až 4 %). V kapalné i v lyofilizované lékové formě mohou být stabilizátory, hlavně 1 až 50 mM L-methioninu (optimálně 5–10 mM). Jinými vhodnými plnidly jsou glycin, arginin, v množství 0 až 0,05 % může být obsažen polysorbát-80 (optimálně 0,005 až 0,01 %).

Doplňkovými povrchově aktivními látkami mohou být, ale bez omezení, polysorbát 20 a BRIJ.

Prostředky podle tohoto vynálezu mohou být v různých formách. Těmito formami jsou například kapalné, polotuhé a tuhé lékové formy, jako jsou kapalné roztoky (např. injekční a infúzní roztoky), disperze nebo suspenze, tablety, pilulky, prášky, lipozomy a čípky.

Výhodná léková forma závisí na zamýšleném způsobu podání a terapeutické aplikaci. Typické výhodné prostředky jsou ve formě injekčních nebo infúzních roztoků, jako jsou prostředky podobné těm, které jsou použity při pasivní imunizaci člověka jinými protilátkami. Výhodným způsobem podání je parenterální (např. intravenózní, subkutánní, intraperitoneální, intramuskulární). Ve výhodném provedení je protilátka podána intravenózní injekcí nebo infúzí. V jiném výhodném provedení je protilátka podána intramuskulární nebo subkutánní injekcí.

Terapeutické prostředky musí být sterilní a stabilní za podmínek výroby a skladování. Prostředek musí být formulován jako roztok, mikroemulze, disperze, liposom nebo jiný požadovaná struktura, vhodná pro vysokou koncentraci léčiva. Sterilní injekční roztoky mohou být připraveny zabudováním aktivní sloučeniny (tj. protilátky nebo části protilátky) v potřebném množství ve vhodném rozpouštědle s jednou nebo dle potřeby s více shora uvedenými složkami, následovaným sterilní filtrací. Disperze jsou obecně připraveny začleněním aktivní sloučeniny do sterilního rozpouštědla, které obsahuje základní disperzní medium a jiné potřebné složky, patřící do shora uvedených. V případě sterilních, lyofilizovaných prášků pro přípravu sterilních injekčních roztoků jsou výhodnými způsoby přípravy vakuové sušení a sušení rozprachem, které poskytují prášek aktivní substance a libovolnou doplňkovou požadovanou složku z jejich předběžně sterilně filtrovaných roztoků. Vlastní fluidita roztoku může být udržena například použitím povlaků, jako je lecitin, udržením potřebné velikosti části v případě disperze a při použití smáčedel. Prolongovaná absorpce injektovatelných prostředků může být dosažena začleněním takového činidla do prostředku, které zpomaluje absorpci, například soli monostearátu a želatina.

Protilátky a části protilátek podle předkládaného vynálezu mohou být podávány různými způsoby, známými v této oblasti techniky, i když pro mnohé terapeutické aplikace je výhodnou cestou/způsobem podání subkutánní injekce, intravenózní injekce nebo infúze. Odborník na tomto poli techniky snadno pochopí, že cesta a/nebo způsob podání se budou měnit v závislosti na požadovaných výsledcích. V určitých provedeních může být

aktivní sloučenina připravena s nosičem, který chrání tuto sloučeninu před rychlým uvolněním, jako tomu je v případě formulace pro kontrolované uvolňování, včetně implantů, transdermálních náplastí a způsobu dodávky systémy mikrozapouzdření. Mohou být použity biologicky odbouratelné a kompatibilní polymery, jako je ethylen(vinyl)acetát, polyanhydridy, polyglykolová kyselina, kolagen, polyorthoestery a kyselina polymléčná. Mnohé způsoby pro přípravu těchto formulací jsou patentovány a nebo obecně známy odborníkům v této oblasti techniky. Viz, např. *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Fobilnson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

V určitých provedeních mohou být protilátky nebo jejich části podány orálně například s inertním rozpouštědlem nebo asimilovatelným jedlým nosičem. Sloučenina (a jiné složky, pokud jsou třeba) mohou být také obsaženy v tvrdé nebo měkké želatinové kapsli, lisovány do tablet nebo začleněny přímo do diety subjektu. Pro orální terapeutické podání může být sloučenina obsažena v plnidlu a použita ve formě tablet, nasálních tablet, pastilek, kapslí, elixírů, suspenzí, sirupů, oplatek a jim podobných. Pro podání sloučeniny podle tohoto vynálezu jiným než parenterálním podáním může být nutné sloučeninu povléci nebo podávat s materiálem, který zabrání inaktivaci sloučeniny.

Do prostředků mohou být také začleněny doplňkové aktivní sloučeniny.

V určitých provedeních může být protilátka podle tohoto vynálezu nebo její část formulována společně a/nebo podávána s jedním nebo více doplňkovými terapeutickými činidly, která jsou použitelná pro léčbu chorob, v nichž se aktivita IL-1 negativně účastní. Například duálně specifické protilátky proti IL-1 α /IL-1 β nebo jejich části mohou být společně formulovány a/nebo podávány s jednou nebo více protilátkami, které se váží na jiné cíle (např. protilátky, které váží jiné cytokiny, nebo které váží molekuly na buněčném povrchu). Kromě toho může být jedna nebo více protilátek podle tohoto vynálezu použita v kombinaci s jedním nebo více předcházejícími terapeutickými činidly. Takovéto kombinační terapie mohou s výhodou využívat nízké dávky podávaných terapeutických činidel a tedy odstraňovat nežádoucí možné toxicity nebo komplikace, spojené s různými monoterapiemi.

IV. Použití duálně specifických protilátek

Vzhledem k jejich schopnosti vázat se na dvě různé, ale strukturně příbuzné antigeny, jsou duálně specifické protilátky podle tohoto vynálezu nebo jejich části použity pro detekci buď jednoho nebo obou antigenů (např. v biologických vzorcích, jako je sérum nebo plasma), použitím konvenčního imunologického testu, jako je ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), RIA (radioimmunoassay) nebo tkáňová imunohistochemie. Tento

vynález poskytuje způsob detekce antigenu v biologickém vzorku, který obsahuje kontakt tohoto biologického vzorku s duálně specifickou protilátkou podle tohoto vynálezu nebo její částí, která specificky rozpoznává antigen a detekuje buď protilátku (nebo protilátkovou část) vázanou na antigen nebo nenávanou protilátku (nebo její část), čímž je detekován antigen v biologickém vzorku. Protilátka je přímo nebo nepřímo označena detekovatelnou substancí, aby byla usnadněna detekce vázané nebo nevázané protilátky. Vhodnými detekovatelnými látkami jsou různé enzymy, prostetické skupiny, fluorescenční materiály, luminiscenční materiály a radioaktivní materiály. Příklady vhodných enzymů obsahují křenovou peroxidázu, alkalickou fosfatázu, β -galaktozidázu nebo acetylcholinesterázu; příklady vhodných komplexů prostetických skupin obsahují streptavidin/biotin a avidin/biotin; příklady vhodných fluorescenčních materiálů obsahují umbelliferon, fluorescein isothiokyanát, rhodamin, dichlorotriazinylaminfluorescein, dansylchlorid nebo fykoerythrin; příkladem luminiscenčního materiálu může být luminol a příklady vhodných radioaktivních materiálů jsou ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S nebo ^3H .

Alternativně ke značení protilátky může být antigen (antigeny) testován v biologických tekutinách pomocí kompetice radioimunního testu, který používá antigenní standardy značené detekovatelnou látkou a neznačenou duálně specifickou protilátku, specifickou vůči tomuto antigenu (antigenům). V tomto testu se smísí biologický vzorek, značené antigenní standardy a duálně specifická protilátka a určuje se množství značeného antigenního standardu, které je navázáno na neznačenou protilátku. Toto množství antigenu v biologickém vzorku je nepřímo úměrné množství značeného antigenního standardu, vázané na neznačenou protilátku.

Ve výhodném provedení rozpoznává duálně specifická protilátka IL-1 α a IL-1 β a předcházející detekční způsoby jsou použity pro detekci IL-1 α a/nebo IL-1 β . V souhlase s tím poskytuje předkládaný vynález způsob detekce IL-1 α nebo IL-1 β v biologickém vzorku nebo tkáni, který obsahuje kontakt biologického vzorku nebo tkáně, u kterých očekáváme obsah IL-1 α nebo IL-1 β , s duálně specifickou protilátkou podle tohoto vynálezu nebo její částí a detekci IL-1 α nebo IL-1 β v biologické tkáni nebo vzorku. Tímto biologickým vzorkem může být například vzorek *in vitro*, jako jsou vzorky buněk, tkání nebo tělní tekutiny (např. krev, plasma, moč, mok, atd.). kromě toho mohou být detekovány tkáně, které jsou umístěny *in vivo* v subjektu, např. tkáně vizualizované *in vivo* zobrazením tkáně (např. použitím značené protilátky).

Duálně specifické protilátky podle tohoto vynálezu mohou být také použity pro diagnostické účely. V jednom provedení je protilátka podle tohoto vynálezu použita

v diagnostickém testu *in vitro*, jako v laboratorním testu detekce zájmového antigenu (antigenů) nebo v případě potřeby testu detekce zájmového antigenu (antigenů). Příklady dobře zavedených *in vitro* testů obsahují ELISA, RIA, Westernův přenos a jim podobné. V jiném provedení je protilátka podle tohoto vynálezu použita v laboratorním testu *in vivo*, jako je *in vivo* zobrazovací test. Například, může být protilátka označena detekovatelnou látkou, schopnou detekce *in vivo*, značená protilátka může být podána subjektu a tato značená protilátka může být detekována *in vivo*, čímž je umožněno zobrazení *in vivo*.

Duálně specifické protilátky podle tohoto vynálezu, které specificky rozpoznávají IL-1 α a IL-1 β , mohou být použity v diagnostických testech pro detekci IL-1 α a IL-1 β pro diagnostické účely například při různých zánětlivých chorobách a poruchách, rovněž jako při spontánní resorpci plodů. S ohledem na specifické typy nemocí a poruch mohou být duálně specifické IL-1 α a IL-1 β protilátky podle tohoto vynálezu použity pro diagnostické účely v kterékoliv ze zde popsanych nemocí/poruch s ohledem na terapeutická použití těchto protilátek (viz níže), jako jsou poruchy, ve kterých je aktivita IL-1 škodlivá, jak je diskutováno níže.

Duálně specifické protilátky podle tohoto vynálezu a jejich části jsou s výhodou schopny neutralizace, jak *in vivo*, tak *in vitro*, aktivity antigenu, ke kterému se váží. Protilátky podle tohoto vynálezu a jejich části mohou být v souladu s tím použity pro inhibici aktivity antigenů, např. v buněčných kulturách, obsahujících antigeny nebo v lidských subjektech nebo v jiných savčích objektech, které mají antigeny, se kterými duálně specifická protilátka podle tohoto vynálezu reaguje. V jednom provedení poskytuje vynález způsob inhibice aktivity antigenu, který zahrnuje kontakt tohoto antigenu s duálně specifickou protilátkou podle tohoto vynálezu nebo její částí, takže je aktivita antigenu inhibována. Ve výhodném provedení váže duálně specifická protilátka IL-1 α a IL-1 β a tento způsob je způsobem inhibice aktivity IL-1 α a/nebo IL-1 β kontaktováním IL-1 α a/nebo IL-1 β s duálně specifickou protilátkou nebo s její částí. Aktivita IL-1 α a/nebo IL-1 β může být inhibována například *in vitro*. Například, v případě buněčných kultur, které obsahují nebo u kterých je očekávána přítomnost IL-1 α a/nebo IL-1 β , může být protilátka podle tohoto vynálezu nebo její část přidána do kultivačního media, aby byla inhibována aktivita IL-1 α a/nebo IL-1 β v kultuře. Aktivita IL-1 α a/nebo aktivita IL-1 β může být inhibována *in vivo* v subjektu.

V jiném provedení poskytuje tento vynález způsob inhibice aktivity antigenu v subjektu, který trpí chorobou, ve které se škodlivě účastní aktivita antigenu. Vynález poskytuje způsoby pro inhibování aktivity antigenu v subjektu, trpícím takovou chorobou a tento způsob obsahuje podávání duálně specifické protilátky podle tohoto vynálezu nebo její části

subjektu, takže je aktivita antigenu v tomto subjektu inhibována. Je výhodné, když tímto antigenem je lidský antigen a subjektem je lidský subjekt. Protilátka podle tohoto vynálezu může být podána lidskému subjektu pro terapeutické účely. Kromě toho může být protilátka podle tohoto vynálezu podána jinému než lidskému savci, exprimujícímu antigen, se kterým se tato protilátka váže, pro veterinární účely nebo jako živočišnému modelu lidské choroby. S ohledem na posledně uvedené skutečnosti mohou být takové živočišné modely použitelné pro vyhodnocení terapeutické účinnosti protilátek podle tohoto vynálezu (např. testování dávek a časový průběh podávání).

Je výhodné, když duálně specifická protilátka váže IL-1 α a IL-1 β a způsob inhibice aktivity antigenu v subjektu je způsobem inhibice aktivity IL-1 v subjektu, například v subjektu, trpícím chorobou, na níž aktivita IL-1 škodlivě působí. Jak je zde používán, označuje termín "choroba, v níž je aktivita IL-1 škodlivá" choroby a jiné poruchy, ve kterých je přítomnost IL-1 (která obsahuje IL-1 α i IL-1 β) v subjektu, trpícím touto chorobou, nalezena jako odpovědná nebo jako podezřelá z odpovědnosti za pathofyziologii této choroby nebo faktor, který přispívá ke zhoršení této choroby. V souhlase s tím je choroba, ve které je aktivita IL-1 škodlivá, chorobou, u které je očekáváno, že inhibice aktivity IL-1 (t.j., buď jedné nebo obou IL-1 α i IL-1 β) zmírní příznaky a/nebo vývoj choroby. Důkazem těchto chorob je například zvýšení koncentrace IL-1 v biologické tekutině subjektu, trpícího touto chorobou (např. zvýšení koncentrace IL-1 v séru, plasmě, synoviální tekutině, atd. subjektu), které může být detekováno, např. použitím anti-IL-1 protilátky, jak je popsáno shora.

Interleukin 1 se rozhodujícím způsobem účastní pathologie mnoha chorob, spojených s imunitními a zánětlivými prvky. Těmito chorobami jsou, ale bez omezení na ně, rheumatoidní artritida, osteoartritida, juvenilní chronická artritida, lymská artritida, psoriatická artritida, reaktivní artritida, spondyloarthropathie, systemický lupus erythematosus, Crohnova choroba, ulcerativní kolitida, zánětlivá střevní choroba, insulin dependentní diabetes mellitus, thyroiditis, asthma, alergické choroby, psoriasis, dermatitis skleroderma, reakce hostitel transplantát, odmítnutí transplantovaných orgánů, akutní chronická imunitní choroba spojená s orgánovou transplantací, sarcoidosis, atherosclerosis, rozesetá intravaskulární koagulace, Kawasakiho choroba, Gravesova choroba, nefrotický syndrom, chronický únavový syndrom, Wegenerova granulomatosis, Henoch-Schoenleinova purpura, mikroskopická vasculitida ledvin, chronická aktivní hepatitida, uveitis, septický šok, toxický šokový syndrom, septický syndrom, kachexie, infekční choroby, parazitické choroby, AIDS, akutní transversní myelitis, Huntingtonova chorea, Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba, mrtvice, primární biliární cirrhosa, hemolytická anémie, zhoubné choroby, srdeční



selhání, infarkt myokardu, Addisonova choroba, sporadická, polyglandulární deficiencie typu I a polyglandulární deficiencie typu II, Schmidtův syndrom, adultní (akutní) respirační bolestivý syndrom, alopecie, alopecia areata, seronegativní arthropathie, arthropathie, Reiterova choroba, psoriatická arthropathie, ulcerativní kolitivní arthropathie, enteropathická synovitis, arthropathie spojená s chlamydia, yersinia a salmonella, spondyloarthropathie, atheromatosní choroba/arteriosclerosis, atopické alergie, autoimunitní bullosní choroba, pemphigus vulgaris, pemphigus foliaceus, pemphigoid, lineární IgA choroba, autoimunitní haemolytická anaemie, Coombsova pozitivní haemolytická anaemie, získaná perniciosní anaemie, juvenilní perniciosní anaemie, myalgická encephalitis/Royal Free choroba, chronická mukokutánní candidiasis, artritida obříků, primární sklerotizující hepatitis, kryptogenní autoimunitní hepatitis, AIDS, AIDS příbuzné choroby, hepatitis C, obecná variabilní imunodeficiencie (obecná variabilní hypogammaglobulinaemie), dilatovaná kardiomyopathie, ženská neplodnost, poruchy vaječníků, předčasné poruchy vaječníků, fibrotická plicní choroba, kryptogenní fibrosní alveolitis, pozánětlivá vmezeřená plicní choroba, intersticiální pneumonitida, choroba pojivových tkání spojená s vmezeřenou plicní chorobou, smíšená choroba pojivových tkání spojená s vmezeřenou plicní chorobou, systemická sklerosis spojená s plicní chorobou, rheumatoidní artritida spojená s plicní chorobou, systemický lupus erythematosus spojený s vmezeřenou spojený s plicní chorobou, dermatomyositis/polymyositis spojený s plicní chorobou, Sjögrenova choroba spojený s plicní chorobou, ankylosní spondylitida spojená s plicní chorobou, vasculitidní difúzní plicní choroba, haemosiderosis spojená s plicní chorobou, léčivě indukovaná intersticiální plicní choroba, radiační fibrosis, bronchiolitis obliterans, chronická eosinofilní pneumonie, lymphocytární infiltrační plicní choroba, postinfekční intersticiální plicní choroba, dnová artritida, autoimunitní hepatitis, typu-1 autoimunitní hepatitis (klasická autoimunitní nebo lupoid hepatitis), typu-2 autoimunitní hepatitis (anti-LKM protilátková hepatitis), autoimunitně zprostředkovaná hypoglykémie, typu B insulin resistance s acanthosis nigricans, hypoparathyroidismus, akutní imunní choroba spojená s orgánovou transplantací, osteoarthritis, primární sklerotizující cholangitis, psoriasis typu 1, psoriasis typu 2, idiopathická leukopaenie, autoimunitní neutropaenie, ledvinové choroby NOS, glomerulonephritida, mikroskopická vaskulitida ledvin, lymská choroba, diskoidní lupus erythematosus, mužská idiopathická neplodnost nebo NOS, spermální autoimunita, sklerosis multiplex (všechny podtypy), sympatetická ophthalmie, pulmonární hypertenze sekundární k chorobě vazivových tkání, Goodpastureův syndrom, pulmonární manifestace polyarteritis nodosa, akutní rheumatická horečka, rheumatoid spondylitis, Stillova choroba, systemická sklerosis, Sjorgrenův syndrom, Takayasuova choroba/arteritis, autoimunitní

thrombocytopaenie, idiopathická thrombocytopaenie, autoimunitní thyrooidní choroba, hyperthyroidism, dnový autoimunitní hypothyroidismus (Hashimotova choroba), atrofický autoimunitní hypothyroidismus, primární myxoedem, phacogenní uveitis, primární vasculitis, vitiligo, choroby centrálního nervového systému (např. deprese, schizofrenie, Alzheimer, Parkinson, atd.), akutní a chronická bolest a lipidová nerovnováha. Lidské protilátky podle tohoto vynálezu a jejich části mohou být použity pro léčbu lidí, trpících nemocemi autoimunity, hlavně těmi, které jsou spojeny se zánětem, včetně reumatoidní spondylitis, alergie, autoimunitního diabetu, a autoimunitní uveitidy.

IL-1 α /IL-1 β duálně specifické protilátky podle tohoto vynálezu nebo jejich antigen vážící části jsou s výhodou použity pro léčbu reumatické artritidy, Crohnovy choroby, sklerosy multiplex, na inzulinu závislého diabetu a psoriázy.

IL-1 α /IL-1 β duálně specifická protilátka podle tohoto vynálezu nebo její část mohou být také podány s jedním nebo více doplňkovými terapeutickými činidly, použitelnými v léčbě autoimunitních a zánětlivých chorob.

Protilátky podle tohoto vynálezu nebo jejich antigen vážící části mohou být použity samy nebo v kombinaci pro léčbu těchto chorob. Je třeba si uvědomit, že protilátky podle tohoto vynálezu nebo jejich antigen vážící části mohou být použity samy nebo v kombinaci s doplňkovým činidlem, např. terapeutickým činidlem, když uvedené doplňkové činidlo je vybráno vyškoleným odborníkem podle zamýšleného použití. Toto doplňkové činidlo může být například terapeutické činidlo odborně určené jako užitečné pro léčbu choroby nebo stavu, který je léčen protilátkou podle předkládaného vynálezu. Tímto doplňkovým činidlem může být také činidlo, které propůjčuje terapeutickému prostředku prospěšné vlastnosti, např. činidlo, které ovlivňuje viskozitu prostředku.

Rovněž je třeba si uvědomit, že ty kombinace, které jsou obsaženy v tomto vynálezu, jsou kombinacemi použitelnými pro jejich zamýšlené použití. Dále uvedená činidla jsou myšlena jako ilustrativní a nejsou myšlena jako omezení. Kombinacemi, které jsou tohoto vynálezu, mohou být protilátky podle předkládaného vynálezu a nejméně jedno dodatečné činidlo, např. dvě nebo tři doplňková činidla, jestliže tato kombinace v takto vzniklém prostředku může splnit zamýšlený účel.

Výhodnými kombinacemi jsou nesteroidní protizánětlivá léčiva (léčivo), také označovaná jako NSAID (non-steroidal anti-inflammatory drug(s)), mezi které patří léčiva podobná ibuprofenu, a COX-2 inhibitory. Jinými výhodnými kombinacemi jsou kortikosteroidy, včetně prednisolonu; dobře známé vedlejší účinky použití steroidů mohou být redukovány nebo zcela vyloučeny snížením dávky steroidů, potřebné pro léčbu pacienta, v

kombinaci s protilátkami anti-IL-1 podle tohoto vynálezu. Neomezuující příklady terapeutických činidel proti reumatické artritidě, se kterými může být protilátka podle tohoto vynálezu nebo její část kombinována, jsou následující: cytokin supresivní protizánětlivé léčivo (léčiva) (CSAID; protilátky nebo antagonisté proti lidským cytokinům nebo růstovým faktorům, např. TNF, LT, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF a PGDF. Protilátky podle tohoto vynálezu nebo jejich antigen vážící části mohou být kombinovány s protilátkami proti molekulám buněčného povrchu, jako jsou CD2, CD3, CD4, D8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7,1), CD86 (B7,2), CD90 nebo jejich ligandy, včetně CD154 (gp39 nebo CD40L).

Výhodné kombinace terapeutických činidel mohou interferovat na různých místech autoimunitní a následně zánětlivé kaskády; výhodnými příklady jsou včetně antagonistů TNF, jako jsou chimerické, humanizované nebo humánní TNF protilátky, D2E7, (PCT publikace č. WO 97/29 131), CA2 (RemicadeTM), CDP 571, CDP 870, Thalimid a rozpustné p55 nebo p75 TNF receptory, jejich deriváty, (p75TNFRgG (EnbrelTM) nebo p55TNFR1gG (Lenercept) a také inhibitory TNF α konvertujícího enzymu (TACE); podobně IL-1 inhibitory (inhibitory interleukin-1-konvertujícího enzymu, IL-1RA atd.), mohou být účinné ze stejného důvodu. Jiné výhodné kombinace obsahují interleukin 11. Dalšími důležitými účastníky autoimunitní odpovědi, kteří mohou paralelně účinkovat, jsou další výhodné kombinace, závislé na nebo ve shodě s funkcí IL-1; zvláště výhodnými jsou antagonisté IL-12 a/nebo IL-18, včetně protilátek IL-12 a/nebo IL-18 nebo rozpustné receptory IL-121 a/nebo IL-18 nebo proteiny vážící IL-12 a/nebo IL-18. Bylo zjištěno, že IL-12 a IL-18 mají překrývající se, ale odlišné funkce a kombinace jejich antagonistů může být neúčinnější. Ještě další výhodnou kombinací jsou nevyčerpané anti-VD4 inhibitory. Ještě dalšími výhodnými inhibitory jsou antagonisté kostimulační dráhy (B7,1) nebo CD86 (B7,2), včetně protilátek, rozpustných receptorů nebo antagonických ligandů.

Protilátky podle tohoto vynálezu nebo jejich antigen vážící části mohou být rovněž kombinovány s činidly jako je methotrexát, 6-MP, azathioprin sulfasalazin, mesalazin, olsalazin chlorochinin/hydroxychlorochin, penicillamin, aurothiomalát (intramuskulárně nebo orálně), azathioprin, kochicin, kortikosteroidy (orálně, inhalačně a lokální injekcí), agonisté β -2 adrenoreceptoru (salbutamol, terbutalin, salmeteral), xanthiny (theofyllin, aminofyllin), kromoglykát, nedokromil, ketofinen, ipratriopium a oxitropium, cyklosporin, FK506, rapamycin, mykofenolát mofetil, leflunomid, NSAID například ibuprofen, kortikosteroidy, jako prednisolon, inhibitory fosfodiesterázy, agonisté adenosinu, antitrombotická činidla, inhibitory komplementu, adrenergní činidla, činidla, která interferují se signalizací prozánětlivými

cytokiny, tak jako TNF α nebo IL-1 (např. IRAK, NIK, IKK, p38n nebo inhibitory MAP kinázy), inhibitory IL-1 β konvertujícího enzymu, inhibitory TNF α konvertujícího enzymu (TACE), inhibitory signalizace T-buněk, jako jsou inhibitory kinázy, inhibitory metaloproteinázy, sulsalazin, azathioprin, 6-merkaptopuriny, inhibitory angiotensin konvertujícího enzymu, rozpustné receptory cytokinu a jejich deriváty (např. rozpustné receptory p55 nebo p75 TNF a deriváty p75TNFRIGG (EnbrelTM) a p55TNFRIGG (Lenercept)), sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R) a protizánětlivé cytokiny (např. IL-4, IL-10, IIL-11, IL-13 a TGF β). Výhodné kombinace obsahují methotrexát nebo leflunomid a při mírných nebo úporných případech reumatické artritidy cyklosporin.

Neomezujícími příklady terapeutických činidel pro střevní zánětlivou chorobu, se kterou může být protilátka podle tohoto vynálezu nebo její část kombinována, jsou následující: budenosid; epidermální růstový faktor; kortikosteroidy; cyklosporin, sulfalazin; aminosalicyláty; 6-merkaptopurin; azathioprin; metronidazol; inhibitory lipoxygenázy; mesalamin; olsalazin; balsalazid; antioxidanty; inhibitory tromboxanu; antagonisté IL-1 receptoru; monoklonální protilátky anti-IL-1 β ; monoklonální protilátky anti-IL-6; růstové faktory; inhibitory elastázy; pyridinyl-imidazolové sloučeniny; protilátky nebo antagonisté proti jiným lidským cytokinům nebo růstovým faktorům; například, TNF, LT, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-15, IL-16, IIL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF a PGDF. Protilátky podle tohoto vynálezu mohou být kombinovány s protilátkami vůči molekulám buněčného povrchu, jako jsou CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 nebo jejich ligandům. Protilátky podle tohoto vynálezu nebo jejich antigen vážící části mohou být rovněž kombinovány s činidly, jako methotrexát, cyklosporin, FK506, rapamycin, mykofenolát mofetil, leflunomid, NSAID, například ibuprofen, kortikosteroidy, jako prednisolon, inhibitory fosfodiesterázy, agonisté adensoninu, antitrombotická činidla, inhibitory komplementu, adrenergní činidla, činidla, která interferují se signalizací prozánětlivými cytokiny, tak jako TNF α nebo IL-1 (např. IRAK, NIK, IKK, p38n nebo inhibitory MAP kinázy), inhibitory IL-1 β konvertujícího enzymu, inhibitory TNF α konvertujícího enzymu (TACE), inhibitory signalizace T-buněk, jako jsou inhibitory kinázy, inhibitory metaloproteinázy, sulsalazin, azathioprin, 6-merkaptopuriny, inhibitory angiotensin konvertujícího enzymu, rozpustné receptory cytokinu a jejich deriváty (např. rozpustné receptory p55 nebo p75 TNF a deriváty p75TNFRIGG (EnbrelTM) a p55TNFRIGG (Lenercept)), sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R) a protizánětlivé cytokiny (např. IL-4, IL-10, IIL-11, IL-13 a TGF β).

Výhodné příklady terapeutických činidel proti Crohnově chorobě, ve kterých může být protilátka nebo její antigen vážící část kombinována, jsou včetně následujících: TNF

antagonisté například anti-TNF protilátky, D2E7 (PCT publikace č. WO 97/29 131), CA2 (RemicadeTM), CDP 571, TNFR-Ig konstrukty, (p75NFRIG (EnbrelTM) a p55TNFRIG (Lenercept)) inhibitory a inhibitory PDE4. Protilátky podle tohoto vynálezu nebo jejich antigen vážící části mohou být kombinovány s kortikosteroidy například budenosidem a dexamethasonem. Protilátky podle tohoto vynálezu nebo jejich antigen vážící části mohou být také kombinovány s činidly, jako je sulfalasin, kyselina 5-aminosalicylová a olsalasin a činidla, která interferují se syntézou nebo účinkem prozánětlivých cytokinů, jako jsou IL-1 například inhibitory konvertující IL-1 β a IL-1ra. Protilátky podle tohoto vynálezu nebo jejich antigen vážící část mohou být také použity s inhibitory signalizace T-buňkami například 6-merkaptopuriny, inhibitory tyrosin kinázy. Protilátky podle tohoto vynálezu nebo jejich antigen vážící části mohou být kombinovány s IL-11.

Neomezující příklady terapeutických činidel proti sclerosis multiplex, která mohou být kombinována, obsahují následující: kortikosteroidy; prednisolon; methylprednisolon; azathioprin; cyklofosfamid; cyklosporin; methotrexát; 4-aminopyridin; tizanidin; interferon- β 1a (Avonex; Biogen); interferon- β 1b (Betaseron; Chiron/Berlex); Kopolymer 1 (Cop-1; Copaxone; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); hyperbarický kyslík; intravenózní imunoglobulin; klabrinin; protilátky nebo antagonisté jiných lidských cytokinů nebo růstových faktorů například TNF, LT, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF a PGDF. Protilátky podle tohoto vynálezu nebo jejich antigen vážící části mohou být kombinovány s protilátkami proti molekulám buněčného povrchu, jako jsou CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 nebo jejich ligandy. Protilátky nebo jejich antigen vážící části mohou být kombinovány s činidly, jako je methotrexát, cyklosporin, FK506, rapamycin, mykofenolát mofetil, leflunomid, NSAID například ibuprofen, kortikosteroidy, jako prednisolon, inhibitory fosfodiesterázy, agonisté adensoninu, antitrombotická činidla, inhibitory komplementu, adrenergní činidla, činidla, která interferují se signalizací prozánětlivými cytokiny, tak jako TNF α nebo IL-1 (např. IRAK, NIK, IKK, p38n nebo inhibitory MAP kinázy), inhibitory IL-1 β konvertujícího enzymu, inhibitory TNF α konvertujícího enzymu (TACE), inhibitory signalizace T-buněk, jako jsou inhibitory kinázy, inhibitory metaloproteinázy, salsalazin, azathioprin, 6-merkaptopuriny, inhibitory angiotensin konvertujícího enzymu, rozpustné receptory cytokinu a jejich deriváty (např. rozpustné receptory p55 nebo p75 TNF a deriváty p75TNFRIG (EnbrelTM) a p55TNFRIG (Lenercept)), sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R) a protizánětlivé cytokiny (např. IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 a TGF β).

Výhodné příklady terapeutických činidel proti sclerosis multiplex, ve kterých může být kombinována protilátka nebo její antigen vázící část, obsahují interferon- β například IFN β 1b a IFN β 1a; copaxon; kortikosteroidy; inhibitory IL-1, inhibitory TNF a protilátky proti ligandům CD40 a CD80.

Farmaceutické prostředky podle tohoto vynálezu mohou obsahovat „terapeuticky účinné množství“ nebo „profylakticky účinné množství“ protilátky podle tohoto vynálezu nebo její části. „Terapeuticky účinné množství“ označuje množství, které je účinné v dávkách a časové periodě, nezbytné pro dosažení požadovaného terapeutického výsledku. Terapeutické účinné množství protilátky nebo její části se může měnit v závislosti na faktorech, jako je stav choroby, věk, pohlaví a hmotnost individua a schopnost protilátky nebo její části vyvolat požadovanou odpověď v jedinci. Terapeuticky účinné množství je také množství, ve kterém jsou škodlivé nebo toxické účinky protilátky nebo její části vyváženy terapeuticky prospěšnými účinky. „Profylakticky účinné množství“ označuje množství, účinné v dávkách a časových periodách, které je nezbytné pro dosažení požadovaného profylaktického účinku. Protože profylaktická dávka je používána v subjektech před nebo časnějších stadiích nemoci, je obvykle profylaktické účinné množství menší než terapeutické účinné množství.

Dávkové režimy mají být nastaveny tak, aby bylo dosaženo optimální požadované odpovědi (např. terapeutické nebo profylaktické odpovědi). Může být například podána jednoduchá dávka, několik oddělených dávek v průběhu času nebo může být dávka úměrně snížena nebo zvýšena, jak se jeví potřeba terapeutické situace. Pro snadnost podání a uniformitu dávek je obzvláště výhodné formulovat parenterální prostředky ve formě dávkových jednotek. Dávkovou jednotkou jsou zde myšleny diskrétní jednotky, vhodné jako jednotková množství pro savčí subjekty, které mají být léčeny; každá jednotka obsahuje předem určené množství aktivní sloučeniny, vypočítané tak, aby bylo dosaženo požadovaného terapeutického účinku ve spojení s potřebným terapeutickým nosičem. Specifikace pro formy dávkových jednotek podle tohoto vynálezu jsou diktovány a přímo závislé na jedinečných charakteristikách aktivní sloučeniny a hlavním terapeutickým nebo profylaktickým účinku, který má být dosažen a na omezeních obsažených v technice použití takovéto aktivní sloučeniny pro léčbu senzitivity v jedincích.

Exemplární, neomezuující rozsah terapeuticky nebo profylakticky účinného množství protilátky podle tohoto vynálezu nebo její části je 0,1 až 20 mg/kg, výhodněji 1 až 10 mg/kg. Je třeba poznamenat, že hodnoty dávek se mohou měnit s typem a s úporností stavu, který má být zlepšen. Je třeba také dále rozumět, že pro kterýkoliv jednotlivý subjekt je třeba dávkový režim nastavit na dobu podle individuální potřeby a profesionálního posouzení osoby,

která podává nebo dohlíží na podávání prostředků, a že zde uvedené dávkové režimy jsou pouze příkladem a nejsou zamýšleny jako jakákoliv omezení rozsahu nebo použití patentově nárokových prostředků.

Předkládaný vynález je dále ilustrován na následujících příkladech, které nejsou myšleny jako jakékoliv omezení. Obsahy všech citovaných referencí, včetně literárních referencí, publikovaných patentů a publikovaných patentových přihlášek, citovaných v této přihlášce, jsou tímto výslovně začleněny citací.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Sestrojení duálně specifického antigenu, založené na styčné topologické oblasti identity

V tomto příkladu byla největší styčná topologická oblast identity mezi dvěma různými, ale strukturně příbuznými proteiny, IL-1 α a IL-1 β , určena jako základ pro sestrojení duálně specifického antigenu pro vypěstování duálně specifických protilátek vůči IL-1 α a IL-1 β . Byl použit BLAST algoritmus pro srovnání těchto dvou proteinů, který umožnil změřit tendenci jednoho zbytku nahrazovat jiný zbytek ve strukturně nebo funkčně podobných oblastech. Tato analýza umožnila identifikaci největší styčné topologické oblasti identity mezi IL-1 α a IL-1 β a rozšíření této oblasti s libovolným rozsahem podobnosti pro vytvoření lineárního peptidu, který slouží jako duálně specifický antigen. Tento peptid, který nejlépe odpovídá daným kritériím, má následující aminokyselinovou sekvenci:

NEAQNITDF (SEQ ID NO: 1)

* ****

Hvězdička (*) označuje identické zbytky v obou proteinech. Ostatní zbytky jsou velmi podobné, podle BLAST algoritmu. Například lysin bude často nahrazovat v homologických proteinech arginin, ale ne fenylalanin. Peptid podle SEQ ID NO: 1 je hybridem, vzniklým ze dvou různých úseků struktury, které probíhají v opačném směru, takže odpovídajícím zobrazením tohoto epitopu je:

dNdEdAdQNITDF ,

(kde předpona „d“ oznamuje, že daný aminokyselinový zbytek je zbytkem D aminokyseliny). Aminokyselinová L forma tohoto peptidu i jeho verze, která je částečně substituována D

aminokyselinovými zbytky, jsou syntetizovány standardními chemickými způsoby. Tento peptid je potom konjugován s proteinovým nosičem (např. KLH nebo albumin) a konjugovaný peptid je použit pro selekci protilátek způsoby *in vitro* nebo *in vivo*.

Příklad 2: Sestrojení duálně specifického antigenu, založené na cyklickém peptidu, který napodobuje smyčku společné nativní struktury

V tomto příkladu byl cyklický peptid, který strukturálně napodobuje hlavní smyčku společné nativní struktury u dvou různých, ale strukturně příbuzných proteinů. IL-1 α a IL-1 β , konstruován pro použití jako duálně specifický antigen pro vypěstování duálně specifických protilátek proti IL-1 α a IL-1 β . Tato vybraná smyčka reprezentuje zbytky 168 až 184 od IL-1 α a zbytky 160 až 176 od IL-1 β . Dohodnutá sekvence je:

Cyklo-MAFLRANQNNGKISVAL (PG)

(SEQ ID NO: 2)

*cbcccccccc*c*b*

Hvězdička (*) označuje identické zbytky mezi IL-1 α a IL-1 β , c označuje dohodnuté zbytky, tj. zbytky, podobné IL-1 α a IL-1 β , které ale ve skutečnosti nejsou v této poloze přítomny ani v jednom proteinu, a b označuje, že zde není žádný dohodnutý zbytek, pokud byla zachována sekvenční identita IL-1 β . Tento lineární peptid je syntetizován standardními chemickými způsoby. Pro cyklizaci peptidu jsou přidány prolinové a glycinové zbytky. Tento cyklický peptid může být syntetizován použitím standardních podmínek syntézy za vysokého ředění v N,N-(dimethyl)formamidu (1 mg/ml). Prototypové reakce probíhají při teplotě místnosti za použití nadbytku spojovacího činidla, jako je benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-fosfonium-hexafluorofosfát (PyBOP; 2 moly) a hydrouhličitán sodný (10 molů). Tento peptid je konjugován k proteinovému nosiči (např. KLH nebo albumin) a konjugovaný peptid je použit pro selekci protilátek způsoby *in vitro* nebo *in vivo*.

Příklad 3: Sestrojení duálně specifické protilátky založené na hybridním peptidu

V tomto příkladu byl pro použití jako duálně specifický antigen pro vypěstování duálně specifických protilátek proti IL-1 α a IL-1 β sestrojen hybridní peptid, který obsahuje alternující nebo překrývající se sekvence dvou různých, ale strukturně příbuzných proteinů, IL-1 α a IL-1 β . Aby vznikl tento hybridní peptid, byly identifikovány a spojeny alternující a překrývající se sekvence IL-1 α a IL-1 β , čímž byl vytvořen následující peptid:

TKGGQDITDFQILENQ

(SEQ ID NO:3)

bbbbbbbbbbb

aaaaaaaaaaa

Písmena a a b označují, který protein je zdrojem daného zbytku (a = IL-1 α ; b = IL-1 β). Motiv TIDF, společný oběma proteinům, byl obsažen v hybridním proteinu. Kromě toho je tento hybridní peptid zaměřen na sekvence od C-konce obou proteinů, které jsou rovněž v obou proteinech známy svou antigenitou vůči neutralizujícím protilátkám. Tento hybridní peptid je syntetizován standardními chemickými syntetickými způsoby. Tento peptid je potom konjugován na proteinový nosič (např. KLH nebo albumin) a konjugovaný peptid je použit pro selekci protilátek způsoby *in vitro* nebo *in vivo*.

Příklad 4: Tvorba duálně specifických protilátek proti IL-1 α a IL-1 β

NEAQNITDF (SEQ ID NO:1)

Cyklo-MAFLEANQNNGKISVAL(PG) (SEQ ID NO:2)

TKGGQDITDFQILENQ (SEQ ID NO:3)

Peptidy podle SEQ ID NO: 1, 2 a 3 byly konjugovány s KLH a byli imunizováni jednotliví králíci. Antisérum imunizovaných králíků proti každému z těchto tří peptidů vykazovalo dobrou protilátkovou odpověď proti peptidu, použitému jako antigen. Pouze antisérum z králíka, imunizovaného peptidem podle SEQ ID NO:3, bylo však schopno se vázat na IL-1 α i IL-1 β protein.

Peptidem podle SEQ ID NO:3, konjugovaným s KLH a Freundovým nekompletním adjuvantem (FIA) bylo imunizováno pět myši (BA119 až BA123), jedenkrát za tři týdny, celkem třikrát, následováno dvěma provokačními intravenózními dávkami peptidem podle SEQ ID NO:3, konjugovaným s KLH. Každé myši byla odebrána krev vždy 10 dní po každé imunizaci a titr protilátek byl stanoven pomocí ELISA. Slezinné buňky od myši BA119, případně BA123, byly fúzovány s buněčnou linií myelomu P3X36Ag8,653, jak je popsáno v odstavci IIA a výsledné fúzované buňky byly očkovány po jedné do jamek v několika 96jamkových deskách použitím omezeného ředění. Ty hybridomové klony, které rostly, byly nejprve testovány na produkci IgG a IgM standardní ELISA, aby byly identifikovány klony,

které produkují protilátku. Bylo izolováno celkem 945 klonů z fúze #BA123. U 335 testovaných klonů vykazovaly supernatanty při ELISA antigenní vazebnou aktivitu vůči IL-1 α , IL-1 β nebo vůči oběma.

klon	antigenní specifita (proti celé délce IL-1 α a/nebo IL-1 β)	Izotyp
249	Pouze IL-1 α	IgG
19	Pouze IL-1 α	IgM
15	Pouze IL-1 β	IgG
2	Pouze IL-1 β	IgM
57	IL-1 α a β	IgG
13	IL-1 α a β	IgM

Odborníkům v této oblasti techniky bude jasné, že i při použití rutinních experimentů existují mnohé ekvivalenty ke specifickým provedením předkládaného vynálezu. Je záměrem, aby tyto ekvivalenty byly zahrnuty v následujících patentových nárocích.

PATENTOVÉ NÁROKY

759

1. Duálně specifická protilátka nebo její antigen vážící část, která specificky váže interleukin-1 α a interleukin-1 β .
2. Duálně specifická protilátka podle nároku 1 nebo její antigen vážící část, která váže interleukin -1 α s rozpadovou K_{off} rychlostní konstantou o hodnotě 0,1 s⁻¹ nebo menší, stanoveno povrchovou plazmonovou rezonancí, nebo která inhibuje aktivitu interleukinu-1 α s IC₅₀ o hodnotě 1 x 10⁻⁵ M nebo menší.
3. Duálně specifická protilátka podle nároku 1 nebo její antigen vážící část, která váže interleukin -1 β s rozpadovou K_{off} rychlostní konstantou o hodnotě 0,1 s⁻¹ nebo menší, stanoveno povrchovou plazmonovou rezonancí, nebo která inhibuje aktivitu interleukinu-1 β s IC₅₀ o hodnotě 1 x 10⁻⁵ M nebo menší.
4. Způsob získání duálně specifické protilátky, která specificky váže interleukin-1 α a interleukin-1 β , v y z n a č u j í c í s e t í m , že se:
poskytne antigen, který obsahuje společný strukturní prvek IL-1 α i IL-1 β ;
tomuto antigenu se vystaví soubor protilátek a
tento soubor se selektuje na protilátku, která specificky váže IL-1 α a IL-1 β ,
čímž se získá duálně specifická protilátka.
5. Způsob podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m , že tento antigen se sestojí na základě styčné topologické oblasti identity mezi IL-1 α a IL-1 β .
6. Způsob podle nároku 5, v y z n a č u j í c í s e t í m , že tento antigen obsahuje aminokyselinovou sekvenci NEAQITDF (SEQ ID NO:1) nebo dNdEdAdQNITDF.
7. Způsob podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m , že tento antigen se sestojí na základě strukturního napodobování smyčky nativního stavu IL-1 α a IL-1 β .
8. Způsob podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m , že tímto antigenem je cyklický peptid, obsahující aminokyselinovou sekvenci cyklo-MAFLRANQNNGKISVAL-(PG) (SEQ ID NO:2).
9. Způsob podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m , že tento antigen se sestojí na základě vzájemného spojení překrývajících se částí IL-1 α a IL-1 β , čímž se vytvoří hybridní molekula.
10. Způsob podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m , že tento antigen obsahuje aminokyselinovou sekvenci TKGGQDITDFQILENQ (SEQ ID NO:3).

11. Způsob podle nároku 4, vyznačující se tím, že tento antigen obsahuje aminokyselinovou sekvenci
 APVRSLNCTLRDSQQKSLVMSGPYELKALHLQGQDMEQQVVF**SMGAYKSSKD**
DAKITVILGLKENLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIEI
 NNKLEFESAQFPNWIYSTSQAENMPVFLGGTKGGQDITDFTMQFVSS (SEQ ID NO:4).
12. Způsob podle nároku 4, vyznačující se tím, že soubor protilátek se vystaví antigenu *in vivo* imunizací živočicha antigenem.
13. Způsob podle nároku 12, vyznačující se tím, že se dále připraví soubor hybridomů z lymfocytů uvedeného živočicha a vybere se hybridom, který vylučuje protilátku, která specificky váže IL-1 α a IL-1 β .
14. Způsob podle nároku 12, vyznačující se tím, že uvedený živočich se vybere ze skupiny složené z myší, krys, králíků a koz.
15. Způsob podle nároku 12, vyznačující se tím, že tímto živočichem je knockoutovaná myš, deficientní na IL-1 α , IL-1 β nebo na IL-1 α i IL-1 β .
16. Způsob podle nároku 12, vyznačující se tím, že tímto živočichem je myš, která je transgenní vůči lidským imunoglobulinovým genům, takže tato myš po antigenní stimulaci vytváří lidské protilátky.
17. Způsob podle nároku 12, vyznačující se tím, že tímto živočichem je myš s těžkou kombinovanou imunodeficiencí (SCID), která byla rekonstituována s lidskými periferními krevními mononukleárními buňkami nebo lymfatickými buňkami nebo jejich prekurzory.
18. Způsob podle nároku 12, vyznačující se tím, že tímto živočichem je myš, ošetřena letálním ozářením celého těla, následovaným ochranou proti ozáření pomocí buněk kostní dřeně z SCID myši s těžkou kombinovanou imunodeficiencí, následovanou implantací funkčních lidských lymfocytů nebo jejich prekurzorů.
19. Způsob podle nároku 4, vyznačující se tím, že uvedený soubor protilátek se vystaví antigenu *in vitro* při skříninku knihovny rekombinantních protilátek tímto antigenem.
20. Způsob podle nároku 19, vyznačující se tím, že tato knihovna rekombinantních protilátek je exprimována na povrchu bakteriofága.
21. Způsob podle nároku 19, vyznačující se tím, že tato knihovna rekombinantních protilátek je exprimována na povrchu kvasničných buněk.

22. Způsob podle nároku 19, v y z n a č u j í c í s e t í m , že tato knihovna rekombinantních protilátek je exprimována na povrchu bakteriálních buněk.
23. Způsob podle nároku 19, v y z n a č u j í c í s e t í m , že tato knihovna rekombinantních protilátek je exprimována jako fúze RNA-protein.
24. Způsob podle nároku 19, v y z n a č u j í c í s e t í m , že touto rekombinantní knihovnou je scFv knihovna nebo Fab knihovna.
25. Způsob podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedený soubor protilátek se vystaví antigenu imunizací živočicha antigenem *in vivo*, následovanou *in vitro* skříninkem knihovny rekombinantních protilátek, připravené z lymfatických buněk tohoto živočicha s antigenem.
26. Způsob podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedený soubor protilátek se vystaví antigenu imunizací živočicha antigenem *in vivo*, následovanou afinitním zráním *in vitro* knihovny rekombinantních protilátek, připravené z lymfatických buněk tohoto živočicha.
27. Způsob podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedený protilátkový soubor se vystaví antigenu imunizací živočicha antigenem *in vivo*, následovanou výběrem jednotlivých buněk vylučujících protilátky, které váží antigen, a získáním těžkého a lehkého řetězce variabilní oblasti cDNA z jednotlivých buněk.
28. Způsob podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedená duálně specifická protilátka je zcela lidského původu.
29. Způsob podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedenou duálně specifickou protilátkou je chimerní protilátka.
30. Způsob podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedenou duálně specifickou protilátkou je protilátka s implantovanou CDR.
31. Duálně specifická protilátka nebo její antigen vážící fragment, která specificky váže interleukin-1 α a interleukin-1 β , získatelná způsobem podle nároku 4.
32. Způsob získání duálně specifické protilátky, která specificky váže dvě různé, ale strukturálně příbuzné molekuly, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se
poskytne antigen, který obsahuje společný strukturní prvek od dvou různých, ale strukturně příbuzných molekul;
vystaví se soubor protilátek tomuto antigenu a
uvedený soubor protilátek se selektuje na protilátku, která specificky váže tyto dvě různé, ale strukturně příbuzné molekuly, čímž se získá duálně specifická protilátka.

33. Způsob podle nároku 32, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedený antigen se sestrojí na základě styčné oblasti identity mezi dvěma různými, ale strukturně příbuznými molekulami.
34. Způsob podle nároku 33, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedenými dvěma různými, ale strukturně příbuznými molekulami jsou proteiny a antigen je peptidem, obsahujícím aminokyselinovou sekvenci styčné topologické oblasti identity mezi těmito dvěma proteiny.
35. Způsob podle nároku 32, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedený antigen se sestrojí na základě strukturního napodobení smyčky společné nativní struktury dvou různých, ale strukturně příbuzných molekul.
36. Způsob podle nároku 35, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedenými dvěma různými, ale strukturně příbuznými molekulami jsou proteiny a antigen je cyklickým peptidem, který strukturně napodobuje smyčku společné nativní struktury těchto dvou proteinů.
37. Způsob podle nároku 32, v y z n a č u j í c í s e t í m , že antigen se sestrojí na základě spojení překrývajících se částí dvou různých, ale strukturně příbuzných molekul, za vzniku hybridní molekuly.
38. Způsob podle nároku 37, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedenými dvěma různými, ale strukturně příbuznými molekulami jsou proteiny a antigenem je hybridní peptid získaný spojením překrývajících se aminokyselinových sekvencí těchto dvou proteinů.
39. Způsob podle nároku 32, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedený antigen je jednou ze dvou různých, ale strukturně příbuzných molekul.
40. Způsob podle nároku 32, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se soubor protilátek vystaví antigenu *in vivo* imunizací živočicha tímto antigenem.
41. Způsob podle nároku 40, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se navíc připraví panel hybridomů z lymfocytů živočicha a selektuje se hybridom, který vylučuje protilátku, která se specificky váže ke dvěma různým, ale strukturně příbuzným molekulám.
42. Způsob podle nároku 40, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedený živočich se vybere ze skupiny, skládající se z myší, krys, králíků a koz.
43. Způsob podle nároku 40, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedeným živočichem je knockoutovaná myš, deficientní na endogenní verzi uvedeného antigenu.
44. Způsob podle nároku 40, v y z n a č u j í c í s e t í m , že tímto živočichem je myš, která je transgenní na lidské imunoglobulinové geny, takže tato myš po stimulaci antigenem vytváří lidské protilátky.

45. Způsob podle nároku 40, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedeným živočichem je myš s těžkou kombinovanou imunodeficiencí, SCID, která byla obnovena lidskými periferními mononukleárními buňkami nebo lymfatickými buňkami nebo jejich prekursorzy.
46. Způsob podle nároku 40, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedeným živočichem je myš, která byla ošetřena letálním ozářením celého těla, následovaným ochranou proti ozáření ve formě buněk kostní dřeně z myši s těžkou kombinovanou imunodeficiencí, SCID, následovanou implantací funkčních lidských lymfocytů.
47. Způsob podle nároku 32, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedený soubor protilátek se vystaví antigenu *in vitro* skříninkem knihovny rekombinantních protilátek uvedeným antigenem.
48. Způsob podle nároku 47, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedená knihovna rekombinantních protilátek je exprimována na povrchu bakteriofágu.
49. Způsob podle nároku 47, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedená knihovna rekombinantních protilátek je exprimována na povrchu kvasničných buněk.
50. Způsob podle nároku 47, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedená knihovna rekombinantních protilátek je exprimována na povrchu bakteriálních buněk.
51. Způsob podle nároku 47, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedená knihovna rekombinantních protilátek je exprimována ve formě fúzí RNA-protein.
52. Způsob podle nároku 47, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedenou knihovnou rekombinantních protilátek je scFv knihovna nebo Fab knihovna.
53. Způsob podle nároku 32, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se uvedený soubor protilátek vystaví antigenu imunizací živočicha antigenem *in vivo*, následovanou *in vitro* skříninkem knihovny rekombinantních protilátek připravené z lymfatických buněk živočicha, pomocí antigenu.
54. Způsob podle nároku 32, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se uvedený soubor protilátek vystaví antigenu *in vivo* imunizací živočicha tímto antigenem, následovanou *in vitro* afinitním zráním knihovny rekombinantních protilátek, připravené z lymfatických buněk tohoto živočicha.
55. Způsob podle nároku 32, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se uvedený soubor protilátek vystaví antigenu imunizací živočicha antigenem *in vivo*, následovanou selekcí jednotlivých buněk, vylučujících protilátky, které váží antigen a získáním těžkých a lehkých řetězců variabilní oblasti cDNA z jednotlivých buněk.

56. Způsob podle nároku 32, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedenou duálně specifickou protilátkou je zcela lidská protilátka.
57. Způsob podle nároku 32, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedenou duálně specifickou protilátkou je chimerická protilátka.
58. Způsob podle nároku 32, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedenou duálně specifickou protilátkou je protilátka s implantovanou CDR.
59. Duálně specifická protilátka nebo její antigen vážící část, získatelná způsobem podle nároku 32.
60. Způsob detekce IL-1 α nebo IL-1 β v biologickém vzorku nebo v tkáni, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se biologický vzorek nebo tkáň, s předpokládaným obsahem IL-1 α nebo IL-1 β , uvede do kontaktu s duálně specifickou protilátkou nebo s její antigen vážící částí podle nároku 1 a v biologickém vzorku nebo v tkáni se detekuje IL-1 α nebo IL-1 β .
61. Způsob podle nároku 60, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se IL-1 α nebo IL-1 β detekuje pro diagnostické účely.
62. Způsob podle nároku 60, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedeným biologickým vzorkem je *in vitro* vzorek.
63. Způsob podle nároku 60, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedená tkáň je lokalizována *in vivo* v subjektu a uvedený způsob zahrnuje *in vivo* zobrazení této tkáně.
64. Způsob inhibice aktivity IL-1 α nebo IL-1 β , v y z n a č u j í c í s e t í m , že se IL-1 α nebo IL-1 β uvedou do kontaktu s duálně specifickou protilátkou nebo její antigen vážící částí podle nároku 1, takže se aktivita IL-1 α nebo IL-1 β inhibuje.
65. Způsob podle nároku 64, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se aktivita IL-1 α nebo IL-1 β inhibuje *in vitro*.
66. Způsob léčby choroby, která je spojená s interleukinem-1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se subjektu, trpícímu chorobou, která je spojená s interleukinem-1, podává duálně specifická protilátka nebo její antigen vážící část podle nároku 1, takže se tento subjekt léčí na chorobu spojenou s interleukinem-1.
67. Způsob podle nároku 66, v y z n a č u j í c í s e t í m , že touto chorobou, která je spojena s interleukinem-1, je zánětlivá choroba.
68. Způsob podle nároku 66, v y z n a č u j í c í s e t í m , že touto chorobou, která je spojena s interleukinem-1, je autoimunitní choroba.

69. Způsob podle nároku 66, v y z n a č u j í c í s e t í m , že choroba, která je spojena s interleukinem-1, se vybere ze skupiny, která se skládá z reumatoidní artritidy, Crohnovy choroby, mnohočetné sklerosy, na inzulinu závislého diabetu a psoriázy.
70. Způsob přípravy knihovny protilátky nebo její antigen vážící části, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje kroky:
- a) získání knihovny A rekombinantního těžkého řetězce nebo jeho antigen vážící části ze souboru protilátek, které vznikly po expozici prvnímu antigenu;
 - b) získání knihovny B rekombinantního lehkého řetězce nebo jeho antigen vážící části ze souboru protilátek, které vznikly po expozici prvnímu antigenu;
 - c) získání knihovny C rekombinantního těžkého řetězce nebo jeho antigen vážící části ze souboru protilátek, které vznikly po expozici druhému antigenu;
 - d) získání knihovny D rekombinantního lehkého řetězce nebo jeho antigen vážící části ze souboru protilátek, které vznikly po expozici druhému antigenu;
 - e) kombinování knihovny A rekombinantního těžkého řetězce nebo jeho antigen vážící části s knihovnou D rekombinantního lehkého řetězce nebo jeho antigen vážící části, aby se získala knihovna X protilátky nebo její antigen vážící části a/nebo kombinování knihovny C rekombinantního těžkého řetězce nebo jeho antigen vážící části s knihovnou B rekombinantního lehkého řetězce nebo jeho antigen vážící části, aby se získala knihovna Y protilátky nebo její antigen vážící části.
71. Způsob přípravy knihovny protilátky nebo její antigen vážící části podle nároku 70, v y z n a č u j í c í s e t í m , že dále zahrnuje kroky kombinování knihovny X protilátky nebo její antigen vážící části s knihovnou Y protilátky nebo její antigen vážící části, aby se získala knihovna Z protilátky nebo její antigen vážící části.
72. Knihovna X protilátky nebo její antigen vážící části, získaná způsobem podle nároku 70.
73. Knihovna Y protilátky nebo její antigen vážící části, získaná způsobem podle nároku 70.
74. Knihovna Z protilátky nebo její antigen vážící části, získaná způsobem podle nároku 71.
75. Způsob výroby duálně specifické protilátky nebo její antigen vážící části, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje kroky:
- a) získání knihovny A rekombinantního těžkého řetězce nebo jeho antigen vážící části ze souboru protilátek, vzniklých expozicí prvnímu antigenu;
 - b) získání knihovny B rekombinantního lehkého řetězce nebo jeho antigen vážící části ze souboru protilátek vzniklých expozicí prvnímu antigenu;

- c) získání knihovny C rekombinantního těžkého řetězce nebo jeho antigen vážící části ze souboru protilátek vzniklých expozicí druhému antigenu;
 - d) získání knihovny D rekombinantního lehkého řetězce nebo jeho antigen vážící části ze souboru protilátek vzniklých expozicí druhému antigenu;
 - e) kombinování knihovny A rekombinantního těžkého řetězce nebo jeho antigen vážící části s knihovnou D rekombinantního lehkého řetězce nebo jeho antigen vážící části, aby se získala knihovna X protilátky nebo její antigen vážící části a/nebo kombinování knihovny C rekombinantního těžkého řetězce nebo jeho antigen vážící části s knihovnou B rekombinantního lehkého řetězce nebo jeho antigen vážící části, aby se získala knihovna Y protilátky nebo její antigen vážící části a
 - f) selektování knihovny X protilátky nebo její antigen vážící části a/nebo knihovny Y protilátky nebo její antigen vážící části na protilátku nebo její antigen vážící část, která váže jak první, tak i druhý antigen.
76. Duálně specifická protilátka, získaná způsobem podle nároku 75.
77. Způsob výroby duálně specifické protilátky nebo její antigen vážící části, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje kroky:
- a) získání knihovny A rekombinantního těžkého řetězce nebo jeho antigen vážící části ze souboru protilátek, vzniklých expozicí prvnímu antigenu;
 - b) získání knihovny B rekombinantního lehkého řetězce nebo jeho antigen vážící části ze souboru protilátek vzniklých expozicí prvnímu antigenu;
 - c) získání knihovny C rekombinantního těžkého řetězce nebo jeho antigen vážící části ze souboru protilátek vzniklých expozicí druhému antigenu;
 - d) získání knihovny D rekombinantního lehkého řetězce nebo jeho antigen vážící části ze souboru protilátek vzniklých expozicí druhému antigenu;
 - e) kombinování knihovny A rekombinantního těžkého řetězce nebo jeho antigen vážící části s knihovnou D rekombinantního lehkého řetězce nebo její antigen vážící části, aby se získala knihovna X protilátky nebo její antigen vážící části a/nebo kombinování knihovny C rekombinantního těžkého řetězce nebo jeho antigen vážící části s knihovnou B rekombinantního lehkého řetězce nebo jeho antigen vážící části, aby se získala knihovna Y protilátky nebo její antigen vážící části a

- f) kombinování knihovny X protilátky nebo její antigen vážící části s knihovnou Y protilátky nebo její antigen vážící části, aby se získala knihovna Z protilátky nebo její antigen vážící části a
- g) selektování knihovny Z protilátky nebo její antigen vážící části na protilátku nebo její antigen vážící část, která váže jak první, tak i druhý antigen.
78. Duálně specifická protilátka nebo její antigen vážící část, získaná způsobem podle nároku 77.
79. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 70, 75 a 77, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se uvedený první a druhý antigen nezávisle vybere ze skupiny, která se skládá z proteinů, polypeptidů a peptidů, za předpokladu, že tento první a druhý antigen nejsou stejné.
80. Způsob podle nároku 79, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedenými proteiny, polypeptidy a peptidy jsou vylučované proteiny nebo povrchové receptory.
81. Způsob podle nároku 80, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se vylučovaný protein vybere ze skupiny, která se skládá z IFN, TNF, interleukinu, IL-10, PF4, GRO, 9E3, EMAP-II, CSF, FGF a PDGF.
82. Způsob podle nároku 81, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedeným prvním antigenem je IL-1 α a druhým antigenem je IL-1 β .
83. Nukleotidová sekvence, kódující každý člen knihovny nebo knihoven protilátky nebo její antigen vážící části podle kteréhokoliv z nároků 72, 73 nebo 74.
84. Nukleotidová sekvence kódující duálně specifickou protilátku nebo její antigen vážící část podle kteréhokoliv z nároků 76 nebo 78.
85. Vektor, zahrnující nukleotidovou sekvenci, kódující člen knihovny nebo knihoven protilátky nebo její antigen vážící části podle kteréhokoliv z nároků 72, 73 nebo 74.
86. Vektor, zahrnující nukleotidovou sekvenci kódující duálně specifickou protilátku nebo její antigen vážící část podle kteréhokoliv z nároků 76 nebo 78.
87. Hostitelská buňka, transfektovaná vektorem podle nároku 85.
88. Hostitelská buňka, transfektovaná vektorem podle nároku 86.

14- 29.01.03
65

PV203-291

454

Seznam sekvenci

NEAQNITDF

(SEQ ID NO:1)

Cyklo-MAFLRANQNNGKISVAL(PG)

(SEQ ID NO:2)

TKGGQDITDFQILENQ

(SEQ ID NO:3)

APVRSLNCTLRDSQQKSLVMMSGPYELKALHLQGQDMEQQVVFMSGAYKSSKD

DAKITVILGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKRFFVNKIEIN

NKLEFESAQFPNWIYSTSQAENMPVFLGGTKGGQDITDFTMQFVSS

(SEQ ID NO:4)