

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) **BG**

(11) **66209 B1**

(51) Int.Cl.

ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

C 12 N 15/13 (2006.01)

C 07 K 16/24 (2006.01)

A 61 P 37/06 (2006.01)

A 61 K 39/395 (2006.01)

A 61 K 51/10 (2006.01)

G 01 N 33/577 (2006.01)

G 01 N 33/68 (2006.01)

- (21) Заявителски № 107483
(22) Заявено на 21.01.2003
(24) Начало на действие
на патента от: 28.06.2001

Приоритетни данни

- (31) 215379 (32) 29.06.2000 (33) US

- (41) Публикувана заявка в
бюлетин № 9 на 30.09.2003
(45) Отпечатано на 02.05.2012
(46) Публикувано в бюлетин № 4
на 02.05.2012
(56) Информационни източници:

- (62) Разделена заявка от рег. №

- (73) Патентоприитежател(и):
ABBOTT LABORATORIES, IL 60064
ABBOTT PARK, A-377 AP6D, 100 ABBOTT
PARK ROAD ILLINOIS (US)

- (72) Изобретател(и):
Albert Collinson, MA 01752 Marlborough;
Tariq Ghayur, 01746 Holliston;
George Avgerinos, MA 10776 Sudbury;
Richard Woodward Dixon,
01536 North Graton;
Zehra Kaymakcalan, 01581 Westborough
Massachusetts (US)

- (74) Представител по индустриална
собственост:
Георги Цветанов Перев, 1124 София,
ул. "Леонардо да Винчи" 3

- (86) № и дата на РСТ заявка:
PCT/US01/20755, 28.06.2001

- (87) № и дата на РСТ публикация:
02/02773, 10.01.2002

(54) МЕТОДИ ЗА ПОЛУЧАВАНЕ НА АНТИТЕЛА С ДВОЙНА СПЕЦИФИЧНОСТ

(57) Предоставят се методи за получаване на антитела с двойна специфичност съгласно изобретението. Антителата или участъците на антитела съгласно изобретението се използват за откриване на два различни, но структурно свързани антигена (например IL-1α и IL-1β) и за инхибиране на активността на антигените (например при субект човек, страдащ от нарушение, при което се определя IL-1α и/или IL-1β активността).

66 претенции

BG 66209 B1

(54) МЕТОДИ ЗА ПОЛУЧАВАНЕ НА АНТИТЕЛА С ДВОЙНА СПЕЦИФИЧНОСТ

Предшестващо състояние на техниката

Имунната система на бозайниците включва В лимфоцити, които, в своята цялост, експресират разнообразие от антитела, които включват стотици милиарди различни специфичности на антитела. Нормалният имунен отговор на определен антиген включва избор от това разнообразие на едно, или повече антитела, които специфично свързват антигена, и успехът на имунния отговор се базира, поне отчасти, на способността на тези антитела специфично да разпознават (и изцяло да елиминират) стимулиращия антиген и “да игнорират” други молекули от заобикалящата среда на антителата.

Използването на антитела, които специфично разпознават точно определен антиген, води до развитието на технология на моноклонално антитяло. Стандартната хибридомна технология позволява сега получаването на антитела, притежаващи единична специфичност за представляващия интерес антиген. В последно време се развиха техники за рекомбинантно антитяло, като скрининг на библиотеки на *in vitro* антитела. Тези техники позволяват, също така, продуциране на антитела с единична специфичност за представляващия интерес антиген.

Антитела, притежаващи специфичност за единичен антиген мишена, поне при известни обстоятелства, проявяват нежелана кръстосана реактивност, или фоново свързване с други антигени. Тази кръстосана реактивност, или фоново свързване са непредсказуеми (т.е., не е възможно да се предскаже с кой антиген ще влезе в кръстосана реакция антитялото). Освен това, обикновено се отличава от свързването на специфичен антиген, тъй като характерно представлява само една малка част от способността за свързване на антитялото (например, 1%, или по-малко от общото свързване на антитялото) и характерно се наблюдава единствено при високи концентрации на антитяло (например, 1000 пъти, или повече, концентрации, които изискват наблюдение на специфичното свързване на антигена). Въпреки че съществуват антигени, които могат да принадлежат на структурно свър-

зани семейства протеини, отговорът на антитялото към определен член на семейството е високо специфичен. В допълнение, съществуват примери на членове на семейства протеини (например, членове на IL-1 и TNF семейства), които се свързват към същия рецептор, към съставна част на рецептора, или към структурно свързани рецептори, при което моноклонални антитела срещу един член на семейството не проявяват висока кръстосана реактивност към други членове на семейството. Би могло да съществуват две причини за тази липса на кръстосана реактивност на MAbs спрямо различни членове на семейството. Първо, при стандартното получаване на хибридоми се търсят единствено някои антитела с висока специфичност/афинитет за антигена-цел, след което се проверява за кръстосана реактивност, или фоново свързване на няколкото избрани антитела. Второ, въпреки че протеините в семейството са структурно свързани, те могат да имат изключителни, неприпокриващи се имунодоминантни епитопи. Следователно, MAbs получени чрез използване на протеин с пълна дължина могат да не влизат в кръстосана реакция с други структурно свързани протеини.

Съществуват също така, примери за моноклонални антитела, получени срещу антиген от един вид, които специфично биха се свързали към същия функционален антиген в други видове. Например, антимише X антитяло лесно свързва човешки антиген X. Това се дължи на факта, че споделят значителна сходност на последователности и структурна сходност, въпреки че не са идентични. Въпреки това, такива антитела, влизащи в междувидова кръстосана реакция не съставят антителата с “двойна специфичност”, тъй като притежават специфичност за същия антиген от различни видове.

Следователно са необходими моноклонални антитела, притежаващи предсказуема двойна, или множествена специфичност, което представлява антитела, притежаващи предсказуема двойна, или същинска специфичност за два, или повече различни антигена.

Техническа същност на изобретението

Настоящото изобретение предоставя методи за получаване на антитела, притежаващи двойна специфичност за най-малко два струк-

турно свързани, но въпреки това различни антигена. Методът обикновено се състои в осигуряване на анти тяло, което включва обща структурна характеристика на двете различни, но структурно свързани молекули; представяне на разнообразието от анти тела на антигена; и избор от разнообразието на анти тяло, което специфично свързва двете различни, но структурно свързани молекули към така полученото анти тяло с двойна специфичност. При клиничните установ ки някои членове от същото семейство протеини могат да допринесат за различните симптоми на протичането на едно заболяване. Следователно, използването на анти тяло с двойна специфичност съгласно изобретението, което свързва членове на едно и също семейство протеини, за блокиране на функциите на повече от един член от семейството протеини, може да бъде благотворно за облекчаване на болестните симптоми, или за прекъсване самия процес на заболяване. Освен това, такива анти тела с двойна специфичност съгласно изобретението се използват за откриване на структурно свързани антигени, за пречистване на структурно свързани антигени, и при диагностичните изследвания, включващи структурно свързани антигени.

При един предпочитан вариант за изпълнение на изобретението, антигена се проектира на основата на съседен топологичен участък на идентичност между двете различни, но структурно свързани молекули. Например, двете различни, но структурно свързани молекули могат да бъдат протеини, и антигенът може да бъде пептид, включващ аминокиселинна последователност от съседния топологичен участък на идентичност между двата протеина.

При един друг вариант за изпълнение на изобретението, антигена се проектира на основата на структурно имитираща бримка на обичайно срещано нагъване на двете различни структурно свързани молекули. Например, антигенът може да бъде цикличен пептид, който структурно имитира бримка на обичайно срещано нагъване на двата различни структурно свързани протеина.

При един друг вариант за изпълнение на изобретението, антигена се проектира на основата на слепване заедно на редуващи се и/или припокриващи се участъци на двете различни, но структурно свързани молекули, за създава-

не на хибридна молекула. Например, антигенът може да е хибриден пептид, получен чрез слепване заедно на редуващи се и/или припокриващи се аминокиселинни последователности на два различни, но структурно свързани протеина.

В един друг вариант за изпълнение на изобретението, антигенът може да включва една, или повече различни, но структурно свързани молекули и методът обхваща избиране на анти тела, които специфично разпознават и двете свързани молекули.

В метода на изобретението разнообразието на анти телата може да бъде предоставено на действието на антигена, представляващ интерес *in vivo* или *in vitro*. Например, при един вариант за изпълнение, предоставянето на разнообразието на анти телата на действието на антигена включва имунизиране на животно *in vivo* с антигена. Този *in vivo* подход може освен това да включва приготвянето на панел от хибридоми от лимфоцити на животното, и избиране на хибридома, която секретира анти тяло, което специфично свързва двете различни, но структурно свързани молекули. Имунизираното животно може да бъде, например, мишка, плъх, заек, или коза, или трансгенна версия на което и да е от горепосочените животни, като мишка, която е трансгенна за човешки гени на имуноглобулин, така че мишката да произвежда човешките анти тела при антигенно стимулиране. Друг вид животни, които могат да бъдат имунизирани, включват мишки с тежка комбинирана имунна недостатъчност (SCID), които могат да бъдат възстановени с моноядрени клетки от човешка периферна кръв (hu-PBMC-SCID химерна мишка), или лимфоидни клетки, или техни предшественици, и мишки, които са лекувани с летално общо телесно облъчване, последвано от защита срещу радиация с клетки от костен мозък на тежка комбинирана имунна недостатъчност (SCID) мишка, следвано от присаждане на функционални човешки лимфоцити (Trimega система). Друг вид животно, което може да бъде имунизирано, е животно (например, мишка), чийто геном "нокаутиран" (например, чрез хомоложна рекомбинация) за ендегенен(ни) ген(и), кодиращ(и) антигена(и), представляващ(и) интерес, където при имунизиране с антигена(ите), представляващ(и) интерес, "нокаутираното" животно разпознава антигена(ите) като чужд(и).

При друг вариант за изпълнение на изобретението, разнообразието на антителата може да бъде предоставено на действието на антигена *in vitro*, чрез скриниране на библиотека на рекомбинантни антитела с антигена. Библиотеката на рекомбинантни антитела може, например, да се експресира на повърхността на бактериофаг, или на повърхността на дрождеви клетки, или на повърхността на бактериални клетки. При различни варианти за изпълнение библиотеката на рекомбинантни антитела е, например, scFv библиотека, или Fab библиотека. При друг вариант за изпълнение на изобретението, библиотеки на антитела се експресират като РНК-протеин сливания.

Друг подход за получаване на антитела с двойна специфичност включва комбиниране на *in vivo* и *in vitro* подходи, като разнообразието на антителата може да бъде предоставено на действието на антигена чрез *in vivo* имунизирание на животно с антигена, следвано от *in vitro* скриниране на библиотека на рекомбинантни антитела, получена от лимфоидни клетки на животното с антигена. Друг подход включва предоставяне на разнообразието на антитела на действието на антигена чрез *in vivo* имунизирание на животно с антигена, следвано от *in vitro* афинитетно узряване на библиотека на рекомбинантни антитела, получена от лимфоидни клетки на животното. Друг подход включва предоставяне на разнообразието на антитела на действието на антигена чрез *in vivo* имунизирание на животно с антигена, следвано от селекция на единично антитяло, продуциращо клетки, които секретират представляващо интерес антитяло, възстановяване на тежката и леката верига на вариабилната област на сДНК-и от тези избрани клетки (например, чрез PCR) и експресирание на тежката и леката верига на вариабилните области у клетки гостоприемници от бозайник *in vitro* (посочен като метод на избрано лимфоцитно антитяло, или SLAM), като по този начин се дава възможност за по-нататъшна селекция и обработване на селектираните последователности на гена на антитялото. Освен това, моноклонални антитела могат да бъдат селектирани чрез експресионно клониране чрез експресирание на гените на тежката и леката верига на антитялото у клетки на бозайник, и селектиране на клетки на бозайник, които секретират антитяло, притежаващо необходимата

специфичност на свързване.

Методите на изобретението позволяват получаването на различни видове антитела с двойна специфичност, включително напълно човешки антитела, химерни антитела, и CDR-присадени антитела и техни антиген свързващи участъци. Предоставят се, също така, антителата с двойна специфичност, получени съгласно метода на изобретението. Предпочитано антитяло с двойна специфичност, съгласно изобретението е такова, което специфично свързва интерлевкин-1 α и интерлевкин-1 β . Такова антитяло с двойна специфичност може да се използва при методи за откриване на IL-1 α , или IL-1 β , включващи довеждането в контакт на IL-1 α , или IL-1 β с антитялото с двойна специфичност, или негов антиген свързващ участък, така че да бъде открит и IL-1 α , или IL-1 β . Неутрализиращо антитяло с двойна специфичност също може да се използва при методи за инхибиране на IL-1 α , или IL-1 β активност, включващи довеждането в контакт на IL-1 α , или IL-1 β с антитялото с двойна специфичност, или негов антиген свързващ участък, така че активността на IL-1 α , или IL-1 β да се инхибира. Такива антитела с двойна специфичност могат да се използват също при методи за лечение на интерлевкин-1-свързано нарушение, включващи прилагане върху субекта, страдащ от интерлевкин-1-свързано нарушение, на антитяло с двойна специфичност, или негов антиген свързващ участък.

При един друг вариант за изпълнение, изобретението предоставя метод за получаване на библиотека на антитяло, или антиген свързващ негов участък, чрез осъществяване на следните етапи: а) получава се библиотека А на рекомбинантна тежка верига, или на антиген свързващ негов участък, от разнообразието на антитела, получена от предоставянето на първия антиген; б) получава се библиотека В на рекомбинантна лека верига, или на антиген свързващ негов участък, от разнообразието на антитела, получена от предоставянето на първия антиген; в) получава се библиотека С на рекомбинантна тежка верига, или на антиген свързващ негов участък, от разнообразието на антитела, получена от предоставянето на втория антиген; д) получава се библиотека D на рекомбинантна лека верига, или на антиген свързващ негов участък,

от разнообразието на антитела, получена от предоставянето на втория антиген; и е) комбиниране на библиотека А на рекомбинантна тежка верига, или на антиген свързващ негов участък, с библиотека D на рекомбинантна лека верига, или на антиген свързващ негов участък, до получаването на библиотека X на антитель, или антиген свързващ негов участък, и/или комбиниране на библиотека C на рекомбинантна тежка верига, или на антиген свързващ негов участък, с библиотека B на рекомбинантна лека верига, или на антиген свързващ негов участък, до получаването на библиотека Y на антитель, или на антиген свързващ негов участък.

При един друг вариант за изпълнение на настоящото изобретение, непосредствено предхождащия метод на изобретението може, освен това, да включва етапа на комбиниране на библиотека X на антитель, или на антиген свързващ негов участък с библиотека Y на антитель, или на антиген свързващ негов участък до получаването на библиотека Z на антитель, или на антиген свързващ негов участък.

При един друг вариант за изпълнение, настоящото изобретение е насочено към библиотеки X, Y и Z на антитель, или на антиген свързващ негов участък.

При един друг вариант за изпълнение, методът съгласно настоящото изобретение позволява идентифицирането на антитель с двойна специфичност, на антиген свързващ негов участък чрез селектиране от библиотеки X, Y и/или Z на антитель, или на антиген свързващ негов участък, който свързва както първия, така и втория антиген.

При един друг вариант за изпълнение, настоящото изобретение е насочено към антителя с двойна специфичност, получено, или селектирано по който и да е от методите на настоящото изобретение.

При един друг вариант за изпълнение, настоящото изобретение е насочено също така към нуклеотидната последователност, кодираща всеки член от библиотеки X, Y и Z на антитель, или на антиген свързващ негов участък; както и до антитель с двойна специфичност, или до негов антиген свързващ участък, до вектор включващ горепосочените нуклеотидни последователности, и до клетки трансфектирани с горепосочения вектор.

Съгласно предпочитан вариант за изпълнение на настоящото изобретение, първият и вторият антиген, се избират независимо от група, състояща се от протеини, полипептиди и пептиди, при условие, че първият и вторият антиген не са един и същ. При един друг вариант за изпълнение на настоящото изобретение, протеините, полипептидите и пептидите са секретирани протеини, или повърхностни рецептори, а секретирания протеин се избира от група, състояща се от IFN, TNF и интерлевкин, IP-10, PF4, GRO, 9E3, EMAP-II, CSF, FGF и PDGF. При друг предпочитан вариант за изпълнение на настоящото изобретение, първият антиген е IL-1α, а вторият антиген е IL-1β.

Подробно описание на изобретението

Изобретението се отнася до проектирането и използването на антигени за генериране на антитела с двойна специфичност, т.е. антитела, притежаващи специфичност за най-малко две различни, но структурно свързани молекули, така както и до селекцията, получаването и използването на такива антитела с двойна специфичност. Структурната връзка на антигените от изобретението може да е през целия антиген (например, протеин), или само в някои структурно свързани области. Изобретението предоставя метод за получаване на антитель с двойна специфичност, което специфично свързва две различни, но структурно свързани молекули, при което методът включва:

предоставяне на антиген, който включва обща структурна характеристика;

предоставяне на многообразието на антитель на антигена; и

избор от многообразието на антитель, което свързва две различни, но структурно свързани молекули, за да се получи по този начин антитель с двойна специфичност.

Трябва да се отбележи, че, докато настоящото изобретение се описва като разпознаване на два различни, но свързани антигена, трябва да се разбира че терминът "антитель с двойна специфичност" включва антитела, които специфично разпознават даже повече от два различни, но свързани антигена, такива като антитела, които разпознават три, четири, пет, или повече структурно свързани, но различни, антигени.

Освен това терминът “различни, но структурно свързани антигени” се счита, че включва антигени (например, протеини), чиито общи структури са свързани, така както антигени (например, протеини), които делят една, или повече структурно свързани области, но иначе са несвързани. Следователно “различни, но структурно свързани” антигени могат да бъдат, например, два протеина, които са членове на едно и също семейство протеини, притежаващи обща цялостна структура, или могат да бъдат, например, два протеина, чиято цялостна структура е различна (несвързани), но всеки от тях включва структурно свързан домен.

Могат да се използват различни видове антигени, за да се предизвика антители на изобретението и могат да се приложат различни методи за получаване на антитела за получаване на антитялото с двойна специфичност на изобретението, както се разглежда подробно по-долу в следващите раздели.

I. Антигени с двойна специфичност

За да се получи антитялото с двойна специфичност от изобретението, антители се добиват антитела срещу антиген, способен да предизвика антитела с двойна специфичност. В изобретението могат да се използват множество различни видове антигени с двойна специфичност, и в следващите подраздели се описва проектирането на различни видове антигени с двойна специфичност.

A. Съседни топологични области

При един вариант за изпълнение, антигена с двойна специфичност съгласно изобретението включва съседна топологична област на идентичност, и/или подобност между две различни, но структурно свързани молекули, към които трябва да се добие антитяло с двойна специфичност. За предпочитане, антигенът съдържа най-голямата (например, най-дългата) съседна топологична област на идентичност, и/или подобност между две различни, но структурно свързани молекули. За предпочитане, двете различни, но структурно свързани молекули са протеини, и антигенът с двойна специфичност включва линеен пептид, съответстващ на най-голямата (например, най-дългата) съседна топологична област на идентичност, и/или подобност между двата протеина. Подходящата област на идентичност/подобност, която се избира, е за

предпочитане област, свързваща рецептор, или лиганд, въпреки че могат да се използват и други области на идентичност/подобност.

За да се определят съседни топологични области на идентичност между две молекули (например, протеини), двете молекули (например, протеини) се сравняват (например, хомоложно моделиране, структурна информация, или подреждане) и се идентифицират идентични, или подобни области. За протеините може да се използва алгоритъм на подреждане, за да се създаде оптимално подреждане, и да се идентифицира най-голямата (например, най-дългата) съседна топологична област на идентичност, и/или подобност между двата протеина. Предпочитан, неограничаващ пример за математичен алгоритъм, използван за сравняване на две последователности е алгоритъмът на Karlin and Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-68, модифициран както в Karlin and Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-77. Един такъв алгоритъм се включва в NBLAST и XBLAST програмите на Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. За да се получи подреждане с дупки за сравнителни цели, може да се използва Gapped BLAST, както е описано от Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Research* 25(17):3389-3402. При използване на BLAST и Gapped BLAST програмите, могат да се използват параметрите по подразбиране на съответните програми (например, XBLAST и NBLAST). Виж <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Алтернативен математически алгоритъм, който може да бъде използван, е този, използван в ALIGN програмата, описана от Myers and Miller (1988) *Comput. Appl. Biosci.* 4:11-17.

Когато се избере подходяща област на идентичност/подобност, антигенът с двойна специфичност, съответстващ на областта, може да се синтезира химически. Например, за пептидните антигени, пептида може да се синтезира чрез стандартни методи на пептиден синтез. При един вариант на изпълнение, пептидният антиген включва L аминокиселини. При други варианти на изпълнение, пептидният антиген може частично, или изцяло да бъде съставен от D аминокиселини. Пример за проектиране на антигена с двойна специфичност на базата на съседна топологична област на идентичност, и/или подобност между два различни, но структурно

свързани протеина се описва подробно в пример 1.

В. Циклични пептиди, имитиращи структурна бримка

При един друг вариант на изпълнение, антигенът с двойна специфичност съгласно изобретението включва циклична молекула, за предпочитане цикличен пептид, която структурно имитира бримка на обичайно срещано нагъване на двете различни структурно свързани молекули (например, протеини), към които антителата с двойна специфичност са добити. За получаването на такъв вид антиген, се сравняват структурите на двете свързани молекули и се идентифицира бримка на обичайно срещано нагъване на двете молекули. Може да се използва стандартен молекулярен анализ на моделиране и кристалографски анализ, за да се добави идентифициране на такива бримки на обичайно срещано прегъване. Идентифицират се идентични и подобни области (например, аминокиселинни последователности между два протеина) и може да се проектира консенсус последователност за подобни, но неидентични области. Линейна молекула, например, линеен пептид, се проектира на основата на тези подобни и идентични области, и тази линейна молекула може след това да бъде циклизирана чрез известни химични начини, за да се създаде антиген, имитиращ бримката. Например, може да се добави пролин и глицин към края на линейния пептид, за да се позволи циклизирането на пептида. Пример за проектиране на антигена с двойна специфичност на базата на цикличен пептид, имитиращ структурна бримка поделена от два различни, но структурно свързани протеина, се описва подробно в пример 2.

С. Хибридни молекули

При един друг вариант за изпълнение на настоящото изобретение, антигенът с двойна специфичност съгласно изобретението включва хибридна молекула, за предпочитане хибриден пептид, който включва редуващи се и/или припокриващи се участъци на двете различни, но структурно свързани молекули (протеини), към които са добити антителата с двойна специфичност. За да се получи такъв вид антиген, се сравняват структурите на двете молекули, и се идентифицират припокриващите се участъци (т.е., области на идентичност), така както и не-

идентичните области между двете молекули. Получава се хибридна молекула (например, хибриден пептид, когато двете свързани молекули са протеини), която за предпочитане да включва редуващи се участъци (например, аминокиселинни последователности) от всяка една от двете молекули, така както и припокриваща се област, която е обща за двете молекули. Една такава молекула може да се опише схематично като: X-Y-Z, където Y представлява област на идентичност, или на строга подобност между двете свързани молекули (т.е., припокриваща се област), X представлява област от една от свързаните молекули, и Z представлява област от другата от свързаните молекули. Пример за проектиране на антигена с двойна специфичност на базата на хибриден пептид, съставен от последователности на два различни, но структурно свързани протеина, се описва подробно в пример 3.

Друг вид хибридна молекула е такава, в която е бил въведен пептид в протеин с цяла дължина (отбелязван като протеин "мишена"). Избират се пептиди, които представляват функционални области на два различни, но структурно свързани протеина, например, области за взаимодействие на рецептора. Такива пептиди са предпочитани в настоящото като функционални пептиди. След това се въвежда функционален пептид на един от свързаните протеини в протеин с цяла дължина на другия свързан протеин, или алтернативно несвързан протеин. Идентифицира се, например, пептид от IL-1 алфа, съответстващ на област за взаимодействие на рецептора от IL-1 алфа, и този функционален пептид от IL-1 алфа се въвежда в IL-1 бета протеин с цяла дължина, за да бъде създадена хибридна IL-1 алфа/IL-1 бета молекула. Подобно, идентифицира се пептид от IL-1 бета, съответстващ на област за взаимодействие на рецептора от IL-1 бета, и този функционален пептид от IL-1 бета, се въвежда в IL-1 алфа протеин с цяла дължина, за да бъде създадена хибридна IL-1 алфа/IL-1 бета молекула. Това въвеждане на функционалния пептид в свързания протеин с цяла дължина ограничава функционалния пептид в двата края, и поддържа нагънатата структура на пептида.

В случай на IL-1 алфа/IL-1 бета хибрид, функционалният пептид за предпочитане се инсертира (замества естествените аминокиселини) в област мишена, представляваща обичайно на-

гънатите структури на IL-1α и IL-1β. Такива области могат да бъдат открити по цялата дължина на протеина (например, в N-терминалната област, в средата на протеина, в C-терминалната област). Освен това, функционални пептиди, представляваща обичайно нагънатите IL-1α/IL-1β структури могат също така да бъдат инсерирани в ирелевантен протеин, като албумин, или някой друг естествено срещан в природата протеин. В този случай предпочитаният сайт за инсериране за пептида е област, която позволява пептида да поддържа желаната нагъната структура. Следователно, инсерционните сайтове могат да бъдат или при N-края, или в средата на протеина, или при C-края на протеина. Позиционирането на пептида, в който и да е естествено срещан в природата протеин се избира така, че да имитира структурните ограничения, поставени над него от нативния протеин, от който той произлиза. Докато функционалният пептид може просто да бъде инсериран в протеина мишена, така че аминокиселините на функционалния пептид да се добавят към протеина мишена, за предпочитане аминокиселините на функционалния пептид заместват участък от протеина мишена, в който той е инсериран.

Като неограничаващ пример се конструира хибридна молекула за използване като антиген с двойна специфичност за добиване на антитела с двойна специфичност за IL-1α и IL-1β, при което функционален пептид, съответстващ на специфичен структурен елемент или на IL-1α, или на IL-1β, се въвежда в IL-1β, или IL-1α в цяла дължина в еквивалентната структурна позиция. Избраната хибридна молекула замества остатъци 160-176 на IL-1β с остатъци 168-184 на IL-1α. Получената молекула притежава следната аминокиселинна последователност, в която заместените IL-1α последователности (остатъци 168-184) са подчертани:

APVRSLNCTLRDSQQKSLVMAGPY
ELKALHLQGQDMEQQWFS **MGAYKSSKDDA**
KITVILGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPK
NYPKKKMEKRFVFNKIEINNKLFESEAQFP
NWIYSTSQAENMPVFL GGTGGGQDIT
DFTMQFVSS (SEQ ID NO: 4)

Тази молекула може да се получи при използване на стандартни техники от молекулярната биология (например клониране, полимеразна

верижна реакция), при използване на обществено достъпните сДНК последователности на IL-1α и IL-1β, и техники на експресиране на рекомбинантен протеин. Хибридна сДНК може да се получи, да се въведе в подходящ експресионен вектор, и полипептида може да се експресира чрез въвеждане на експресионен вектор в подходяща клетка гостоприемник.

D. Пептиди на базата на участъци на хидрофобност

При друг вариант за изпълнение, антигена с двойна специфичност съгласно изобретението се избира на основата на участъци на хидрофобност, за да се изберат очакваните пептиди, така че да са високо антигенни. Например, антигени индекси на пептиди могат да се изчислят при използване на компютърен софтуер, както е описано от Wolf (CABIOS 4(1), 181-186 (1988)). Представляващи интерес области за свързване на антитяло могат да се изберат, за да се увеличи до максимум вероятността за антигенност.

E. Имунизирание с клетки трансфектирани с антиген

При друг вариант за изпълнение, антитяло с двойна специфичност съгласно изобретението, се получава чрез имунизирание с клетки трансфектирани с антиген (т.е., антигените с двойна специфичност съгласно изобретението могат да бъдат клетки трансфектирани с антиген). Могат да се генерират клетъчни линии, които стабилно да експресират двата различни, но структурно свързани антигена, или техни хибридни молекула. Могат да се генерират, например, клетъчни линии, които стабилно да експресират IL-1α, или IL-1β, или IL-1α/IL-1β хибридна молекула (например SEQ ID NO: 4). Представляващите интерес молекули могат да бъдат секретирани от клетките (в случай на разтворими протеини), или могат да се експресират на повърхността на клетките (в случай на рецептори, ензими). Доставка на гени в клетката гостоприемник, което да позволи експресията на антигените от клетките гостоприемник може да се осъществи чрез голям брой конвенционални начини, включително, но без да се ограничава до, трансфекция, електропорация, клетъчно сливане, липофекция, бомбардиране с частици, микроинжектиране, или вирусно инфектиране. Клетъчните линии, които

експресират антигените, представляващи интерес, могат да се трансплантират по един или друг начин (интраперитонеално, подкожно, интрамускулно, и други подобни) в животно, представляващо интерес, за получаване на антитела. За предпочитане клетките експресират протеини с цяла дължина. Възможно е, също така, да се експресират и антигенни фрагменти. За разтворими протеини, протеините за предпочитане се секретират от клетките. За генериране на антитяло с двойна специфичност за извънклетъчния домен на два близко свързани рецептора, рецепторите за предпочитане се експресират върху клетъчната повърхност.

F. Имунизирание с една от структурно свързаните молекули

При друг вариант за изпълнение антигенът с двойна специфичност е просто един от двете различни, но структурно свързани молекули, към които трябва да се добият антитела с двойна специфичност. Една от двете свързани молекули се използва като средство за имунизирание, след което полученото множество антитела се скринира за антитела, които свързват, и по-предпочитано неутрализират, и двете от двете различни, но структурно свързани молекули. Например, някой може да имунизира или с IL-1α, или с IL-1β, след което да скринира за алфа/бета байндери, и по-предпочитано неутрализатори. Както се използва в този вариант за изпълнение, терминът "имунизира" се счита, че широко обхваща предоставянето на множеството антитела на антигена, като IL-α, или IL-1β, както *in vivo*, така и *in vitro*. Следователно, този вариант за изпълнение обхваща имунизирание на животно или с IL-α, или IL-1β, и скриниране на получените антитела, добити за селекция на тези антитела, които свързват и IL-α, и IL-1β, така както и за скриниране на библиотека на рекомбинантно антитяло *in vitro* или с IL-α, или IL-1β, с последваща селекция на рекомбинантни антитела, които свързват и IL-α, и IL-1β.

II. Методи за получаване на антитела с двойна специфичност

За получаване на антитяло с двойна специфичност съгласно изобретението, множество антитела (както *in vivo*, така и *in vitro*) се добива за антиген с двойна специфичност, получен както е описано в предходния раздел, и от множест-

вото се избира подходящо антитяло с двойна специфичност. Двата елемента на разпознаване на антитяло от антиген са структурни елементи на разпознаване и са на основата на афинитет на узряване при специфични молекулярни взаимодействия. По време на естествения имунен отговор лесно се развиват антитела с нисък афинитет, които разпознават структурни мотиви (например разпознаването на един антиген от някои модели на рецептори за разпознаване), и в по-ранната фаза на имунния отговор това се следва от соматични мутации за увеличаване на афинитета на няколко клона. Развити са различни *in vivo* и *in vitro* методи за имитиране на този естествен феномен. Антитела с двойна специфичност с нисък афинитет могат да бъдат генерирани чрез който и да е от *in vivo* и *in vitro* методите, описани в настоящото, а Mabs с двойна специфичност с висок афинитет могат да бъдат получени чрез методи на соматичен мутагенез, описани в настоящото. Освен това, за да се оптимизира Mabs с двойна специфичност с висок афинитет, могат да се получат ко-кристални структури на Mabs с нисък афинитет с желаните антигени. Получената структурна информация може да насочва и друго усилване на афинитета чрез изменение (мутиране) специфичните контактни остатъци на Mabs, за да се засилят специфичните молекулярни взаимодействия, както е описано в настоящото.

Методи за получаване на антитела с двойна специфичност, които използват *in vivo* подходи, *in vitro* подходи, или тяхна комбинация, са описани подробно в следващите подраздели.

A. *in vivo* подходи

Стандартен *in vivo* подход за получаване на антитела е чрез имунизирание на подходящ животински субект с антиген, като по този начин се предоставя *in vivo* множеството антитела на антиген, последвано от възстановяване на представляващо интерес антитяло, или представляващи интерес антитела от животното. Такъв подход може да се приспособи към получаването на антитела с двойна специфичност, чрез използване на антиген с двойна специфичност, и селектиране за антитела, които специфично разпознават двете структурно свързани молекули, представляващи интерес. Антитела с двойна специфичност могат да се получат чрез имунизирание на подходящ субект (например,

заек, коза, мишка, или друг бозайник, включително трансгенни и knockout версии на такива бозайници) с имуногенен състав на антиген с двойна специфичност. Един подходящ имуногенен състав може да съдържа, например, химически синтезиран, или рекомбинантно експесиран антиген с двойна специфичност. Съставът може, също така, да включва добавка, такава като Freund's цялостна, или нецялостна добавка, или подобно имуностимулиращо съединение. Освен това, когато се използва за добиване на антитела, по-специално *in vivo* имунизация, антиген с двойна специфичност съгласно изобретението може да се използва самостоятелно, или по-предпочитано се използва като конюгат с носител протеин. Такъв подход за засилване отговорите на антитяло е добре известен в областта на техниката. Примерите за подходящи протеини носители, към които антиген с двойна специфичност може да се конюгира, включват keyhole limpet хемоцианин (KLH) и албумин.

Антитела-продуциращи клетки могат да се получат от субекта и да се използват за получаване на моноклонални антитела чрез стандартни техники, такива като техниката хибридома, оригинално описана от Kohler and Milstein (1975), Nature 256: 495-497) (виж, също така, Brown et al. (1981) J. Immunol. 127:539-46; Brown et al. (1980) J. Biol. Chem. 255:4980-83; Yeh et al. (1976) PNAS 76:2927-31; и Yeh et al. (1982) Int. J. Cancer 19:269-75). Технологията за получаване на хибридоми на моноклонално антитяло е добре известна (виж R. H. Kenneth, in Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., New York (1980); E. A. Lerner (1981) Yale J. Biol. Med., 54:387-402; M. L. Gefter et al. (1977) Somatic Cell Genet., 3:231-36). Накратко, една имортализирана клетъчна линия (характерно миелома) се слива към лимфоцити (характерно спленоцити, или клетки от лимфен възел, или лимфоцити от периферна кръв) от бозайник, имунизиран с имуноген с двойна специфичност, както е описано по-горе, и супернатантата на културата от получените хибридома клетки се скринират, за да се идентифицира хибридома, продуцираща моноклонално антитяло с двойна специфичност за двете различни, но структурно свързани молекули, представляващи интерес. Който и да е от много добре известните протоколи, използвани за сли-

ване на лимфоцити и имортализирани клетъчни линии може да се приложи за целите на генериране на моноклонални антитела с двойна специфичност (виж, например, G. Galfre et al. (1977) Nature 266:550-52; Gefter et al. Somatic Cell Genet., цитирано по-горе; Lerner, Yale J. Biol. Med., цитирано по-горе; Uenneth, Monoclonal Antibodies, цитирано по-горе). Освен това, всеки специалист в областта на техниката ще прецени, че съществуват много вариации на такива методи, които също могат да се използват. Характерно, имортализирана клетъчна линия (например, клетъчна линия миелома) е производна от същите видове бозайници както лимфоцитите. Например, миши хибридоми могат да се получат чрез сливане на лимфоцити от мишки, имунизирани с имуногенен състав съгласно изобретението с имортализирана миша клетъчна линия. Предпочитани имортализирани клетъчни линии са миши миелома клетъчни линии, които са чувствителни към културална среда, съдържаща хипоксантин, аминоптерин и тимидин ("НАТ среда"). Който и да са от много то миеломни клетъчни линии могат да се използват като партньор за сливане съгласно стандартни техники, например, P3-NS/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8,653, или Sp2/O-Ag14 миеломни линии. Тези миеломни линии са достъпни чрез American Type Culture Collection *ATCC), Rockville, Md. Характерно, НАТ-чувствителни миши миеломни клетки се сливат към миши спленоцити, използвайки полиетилен гликол ("PEG"). Хибридома клетки, получени от сливането след това се селектират, използвайки НАТ среда, която убива несляти и непродуктивно сляти миеломни клетки (несляти спленоцити се оцветяват след няколко дни, понеже те не са трансформирани). Хибридома клетки, продуциращи моноклонални антитела, които специфично разпознават двете структурно свързани молекули, представляващи интерес, се идентифицират чрез скриниране на супернатантите на хибридома културата за такива антитела, например, като се използва стандартно изследване ELISA, за да се изберат тези антитела, които специфично могат да свързват двете свързани молекули.

В зависимост от вида на желаното антитяло, различни животни гостоприемници могат да се използват за *in vivo* имунизация. Може

да се използва гостоприемник, който самият експресира ендогенна версия на антигена(ите), представляващ(и) интерес, или, алтернативно, може да се използва гостоприемник, който е направен с недостатъчност в ендогенна версия на антигена(ите) представляващ(и) интерес. Например, показано е, че мишки, направени с недостатъчност за посочен ендогенен протеин чрез хомоложно рекомбиниране на съответния ендогенен ген (т.е., "Knockout" мишки) извличат хуморален отговор към протеина, когато са имунизирани с него, и по този начин могат да бъдат използвани за продуцирането на моноклонални антитела с висок афинитет към протеина (виж, например, Roes, J. et al. (1995) *J. Immunol. Methods* 183:231-237; Lunn, M. P. et al. (2000) *J. Neurochem.* 75:404-412).

За получаване на нечовешки антитела (например, срещу човешки антиген с двойна специфичност), различни бозайници, различни от човек, са подходящи като гостоприемници за продуциране на антитела, включително, но без да се ограничава от, мишки, плъхове, зайци и кози (и техни knockout версии), въпреки че мишките са предпочитани за продуциране на хибридоми. Освен това, за продуциране на изцяло човешки антитела срещу човешки антиген с двойна специфичност, могат да се използват гостоприемници животни различни от човек, които експресират множество човешки антитела. Такива животни различни от човек включват трансгенни животни (например, мишки), носещи трансгени на човешки имуноглобулин, hu-PBMC-SCID химерни мишки, и човек/мишка радиационни химери, всеки един от които се дискутира по-долу.

Така, съгласно един вариант за изпълнение на изобретението, животното, което се имунизира с антиген с двойна специфичност е бозайник, различен от човек, за предпочитане мишка, която е трансгенна за трансгени на човешки имуноглобулин, такива, които бозайника, различен от човек (например, мишка) превръща в човешки антитела след антигенно стимулиране. При такива животни, характерно, се внася конфигурация на трансгени на тежка и лека верига на имуноглобулин от човешка зародишна линия в животни, които са били проектирани така, че техните ендогенни локоси на тежка и лека верига са инактивирани. При антигенно

стимулиране на такива животни (например, с човешки антиген), се продуцират антитела, производни на човешки имуноглобулинни последователности (т.е., човешки антитела), и човешки моноклонални антитела могат да се получат от лимфоцити на такива животни чрез стандартни хибридома технологии. За допълнително описание на трансгени мишки с човешки имуноглобулин и на тяхното използване при продуцирането на човешки антитела, виж, например, US Patent No. 5,939,598, PCT Publication No. WO 1996/033735, PCT Publication No. WO 1996/034096, PCT Publication No. WO 1998/024893 и PCT Publication No. WO 1999/053049 to Abgenix Inc., и US Patent No. 5,545,806, No. 5,625,126, No. 5,633,425, No. 5,661,016, No. 5,770,429, No. 5,814,318, No. 5,877,397, и PCT Publication No. WO 1999/045962 to Genpharm Inc. Виж, също така, MacQuitty, J. J. and Kay, R. M. (1992) *Science* 257:1188; Taylor, L. D. et al. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:6287-6295; Lonberg, N. et al. (1994) *Nature* 368:856-859; Lonberg, N. et Huszar, D. (1995) *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93; Hurdling, F. A. and Lonberg N. (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764:536-546; Fiahild, D. M. et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851; Mendez, M. J. et al. (1997) *Nature Genetics* 15:146-156; Green, L. L. and Jakobovits, A. (1998) *J. Exp. Med.* 188:483-495; Green, L. L. (1999) *J. Immunol. Methods* 231:11-23; Yang, X. D. et al. (1999) *J. Leukoc. Biol.* 66:401-410; Gallo, M. L. et al. (2000) *Eur. J. Immunol.* 30:534-540.

Съгласно друг вариант за изпълнение на изобретението, животното, което се имунизира с антиген с двойна специфичност е мишка с тежка комбинирана имунонедостатъчност (SDID), която е пресъздадена с мононуклеарни клетки от човешка периферна кръв, или лимфоидни клетки, или техни прекурсори. За такива мишки, които се отнасят като hu-PBMC-ACID химерни мишки, е показано, че при антигенно стимулиране продуцират човешки имуноглобулин отговори. За допълнително описание на тези мишки и на тяхното използване в генерирането на антитела, виж, например, Leader, K. A. et al. (1992) *Immunology* 76:229-234; Bombil, F. et al. (1996) *Immunobiol.* 195:360-375; Murphy, W. J. et al. (1996) *Semin. Immunol.* 8:233-241; Herz, U. et al. (1997) *Int. Arch. Allergy Immunol.* 113:150-152; Albert, S. E. et al. (1997) *J. Immunol.*

159:1393-1403; Nguyen, H. et al. (1997) Microbiol. Immunol. 41:901-907; Arai, K. et al. (1998) J. Immunol. Methods 217:79-85; Yoshinari, K. and Arai, K. (1998) Hybridoma 17:41-45; Hutchians, W. A. et al. (1999) Hybridoma 18:121-129; Murphu, W. J. et al. (1999) Clin. Immunol. 90:22-27; Smithson, S. L. et al. (1999) Mol. Immunol. 36:113-124; Chamat, et al. (1999) J. Infect. Diseases 180:268-277; и Heard, C. et al. (1999) Molec. Med. 5:35-45.

Съгласно друг вариант за изпълнение на изобретението, животното, което се имунизира с антиген с двойна специфичност е мишка, на която е приложена летална доза радиоактивно облъчване върху цялото тяло, последвано от защита срещу радиоактивно облъчване с клетки от костен мозък от мишка с тежка комбинирана имунонедостатъчност (SDID), последвано от присаждаване на функционални човешки лимфоцити. Този вид химери, смятани за система Trimer, са използвани за продуциране на човешки моноклонални антитела чрез имунизация на мишки с антиген представляващи интерес, последвано от получаване на моноклонални антитела, използвайки стандартна хибридомна технология. За допълнително описание на тези мишки и на тяхното използване в генерирането на антитела, виж, например, Eren, R. et al. (1998) Immunology 93:154-161; Reisner, Y. and Dagan, S. (1998) Trends Biotechnol. 16:242-246; Ilan, E. et al. (1999) Hepatology 29:553-562; и Bocher, W. O. et al. (1999) Immunology 96:634-641.

B. in vitro подходи

Алтернативно на получаването на антитяло с двойна специфичност чрез *in vivo* имунизация и селекция, антитяло с двойна специфичност съгласно изобретението може да се идентифицира и да се изолира чрез скриниране на библиотека на рекомбинантен комбинаторен имуноглобулин (например, антитяло на библиотека изобразяваща фаг) с антиген с двойна специфичност, като чрез това да се изолират членове на имуноглобулинова библиотека, които се свързват специфично към двете структурно свързани, но различни молекули, представляващи интерес. Набори за генериране и скриниране на библиотеки изобразяващи фаг са достъпни посредством търговската мрежа (например, the Pharmacia Recombinant Phage System, Catalog No. 27-9400-01; и the Stratagene SurfZAP™ Phage Display kit, 50

Catalog No. 240612). Съгласно различни варианти за изпълнение, библиотеката изобразяваща фаг е scFv библиотека, или Fab библиотека. Изобразяващата фаг техника за скриниране на библиотеки на рекомбинантни антитела е описана обстойно в областта на техниката. Примери за методи и съединения, особено отзивчиви за използване при генериране и скриниране на библиотека изобразяваща антитяло може да се намерят в, например, McCafferty et al. International Publication No. WO 1992/001047, US Patent No. 5,969,108 и EP 589,877 (описващ по-специално изобразяване на scFv), Ladner et al. US Patent No. 5,223,409, No. 5,403,484, No. 5,571,698, No. 5,837,500, и EP 436,597 (описващ, например, pIII сливане); Dower et al. International Publication No. WO 1991/017271, US Patent No. 5,427,908, US Patent No. 5,580,717, и EP 527,839 (описващ по-специално изобразяване на Fab); Winter et al. International Publication No. WO 1992/020791, и EP 368,684 (описващ по-специално клониране на последователностите на вариабилния домен на имуноглобулина); Griffiths et al. US Patent No. 5,885,793, и EP 589,877 (описващ по-специално изолиране на човешки антигени, използвайки рекомбинантни библиотеки); Garrard et al. International Publication No. WO 1992/009690 (описващ по-специално техники на експресиране на фаг); Knappik et al. International Publication No. WO 1997/008320 (описващ по-специално библиотеката на човешко рекомбинантно антитяло HuCal); Salfeld et al. International Publication No. WO 1997/029131 (описващ получаването на човешко рекомбинантно антитяло към човешки антиген (човешки тумор некрозис фактор алфа), така както и *in vitro* афинитетно узряване на рекомбинантно антитяло) и Salfeld et al. US Provisional Application No. 60/126,603, също така описващ получаването на човешко рекомбинантно антитяло към човешки антиген (човешки интерлевкин 12), така както *in vitro* афинитетно узряване на рекомбинантно антитяло).

Други описания за скриниране на библиотека на рекомбинантно антитяло е намерено в научни публикации, такива като Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay et al. (1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81-85; Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281; Griffiths et al. (1993) EMBO J 12:725-734; Hawkins et al.

(1991) *J. Mol. Biol.* 226:889-896; Clarkson et al. (1991) *Nature* 352:624-628; Gram et al. (1991) *PNAS* 89:3576-3580; Garrad et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137; Barbas et al. (1991) *PNAS* 88:7978-7982; McCafferty et al. *Nature* (1990) 348:552-554; и Knappik et al. (2000) *J. Mol. Biol.* 296:57-86.

Алтернативно на използването на системи изобразяващи бактериофаги, библиотеки на рекомбинантно анти тяло могат да бъдат експресирани върху повърхността на дрождеви клетки, или бактериални клетки. Методи за получаване и скриниране и скриниране на библиотеки, експресирани върху повърхността на дрождеви клетки се описват също така в PCT Publication No. WO 1999/036569. Методи за получаване и скриниране и скриниране на библиотеки, експресирани върху повърхността на бактериални клетки се описват също така в PCT Publication No. WO 1998/049286.

След като анти тяло, представляващо интерес, се идентифицира от комбинаторна библиотека, ДНКи, кодиращи леките и тежките вериги на анти тялото се изолират чрез стандартни техники на молекулярната биология, такива като PCR амплифициране на ДНК от изобразяващия пакет (например, фаг), изолиран по време на метода на скриниране на библиотеката. Известни са от областта на техниката нуклеотидни последователности от гени на лека и тежка верига на анти тяло, от които могат да се получат PCR праймери. Например, много такива последователности са описани в Fabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, и в "Vbase" данни за човешка последователност на зародишна линия.

Анти тяло или участък от анти тяло, съгласно изобретението, може да се получи чрез рекомбинантно експесиране на гените на леката и тежката верига на имуноглобулина в клетка гостоприемник. За да се експесира едно анти тяло рекомбинантно, клетка гостоприемник се трансфектира с един, или с няколко рекомбинантни експесионни вектори, носещи ДНК фрагменти кодиращи лека и тежка верига на имуноглобулина на анти тялото, така че леката и тежката верига се експесират в клетката гостоприемник,

и, за предпочитане, се секретират в средата, в която се култивират клетките гостоприемници, от която среда могат да се извлекат антителата. Използват се стандартни методологии за рекомбинантна ДНК, за да се получат гени на лека и тежка верига на анти тялото, да се инкорпорират тези гени в рекомбинантни експесионни вектори, и да се въведат векторите в клетки гостоприемници, такива като тези, описани в Sambrook, Fritsh and Maniatis (eds), *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor, N. Y., (1989), Ausubel, F. M. et al. (eds), *Current Protocols on Molecular Biology*, Green Publishing Associates, (1989) и в US Patent No. 4,816,397, от Boss et al.

След като вече се получат ДНК фрагменти кодиращи VH и VL сегментите на анти тялото, представляващи интерес, тези ДНК фрагменти могат след това да се обработят чрез стандартни техники за рекомбинантна ДНК, например, да се конвертират гените на вариабилната област до гени на анти тяло с пълна дължина на веригата, до гени на Fab фрагмент, или до scFv ген. При тези обработвания, ДНК фрагмент кодиращ VL, или VH се свързва операционно към друг ДНК фрагмент, кодиращ друг протеин, такъв като константна област на анти тяло, или гъвкав линкер. Терминът "операционно свързан", така както се използва в този контекст, означава, че двата ДНК фрагмента са свързани по такъв начин, че аминокиселинната последователност, кодирана от двата ДНК фрагмента остава в рамка.

Изолираната ДНК, кодираща VH областта може да бъде конвертирана в ген на тежка верига в цяла дължина чрез операционно свързване на VH-кодиращата ДНК към друга ДНК молекула, кодираща константни области на тежка верига (CH, CH2 и CH3). Последователностите на човешки гени от константна област на тежка верига са известни в областта на техниката (виж, например, 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) и ДНК фрагменти, обхващащи тези области, могат да се получат чрез стандартно PCR усилване. Константната област на тежката верига може да бъде IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM, IgD константна област, но най-предпочитано е IgG1, или IgG4 константна област. За гена на Fab фрагмента на

тежка верига, VH-кодиращата ДНК може операционно да бъде свързана към друга ДНК молекула, кодираща само константната област CH1 на тежката верига.

Изолираната ДНК, кодираща VL областта може да бъде конвертирана в ген на лека верига с цяла дължина (така както и гена на Fab на лека верига) чрез операционно свързване на VL-кодиращата ДНК към друга ДНК молекула, кодираща константна област на леката верига, CL. Последователностите на човешки гени от константна област на лека верига са известни в областта на техниката (виж, например, Kabat E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) и ДНК фрагменти, обхващащи тези области, могат да се получат чрез стандартно PCR усилване. Константна област на леката верига може да бъде капа, или ламбда константна област, но най-предпочитано е капа константна област.

За създаване на scFv ген, VH- и VL-кодиращите ДНК фрагменти са операционно свързани към друг фрагмент, кодиращ гъвкав линкер, например, кодиращ аминокиселинната последователност (Gly₄-Ser)_n, такъв, че VH и VL последователностите могат да бъдат експресирани като съседен протеин с единична верига, с VL и VH областите присъединени към гъвкавия линкер (виж, например, Bird et al. (1988) *Science* 242:243-426; Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty et al., *Nature* (1990) 348:552-554).

За експесиране на рекомбинантни антители, или на участъци от антитела съгласно изобретението, ДНКи кодиращи частични, или с цяла дължина леки и тежки вериги, получени както се описва по-горе, могат да се инсерират в експресионни вектори, по такъв начин, че гените да са операционно свързани към транскрипционни и транслационни контролни последователности. В този контекст, терминът “операционно свързан” означава, че ген на анти- 45 тияло е лигиран във вектор, така че транскрипционни и транслационни контролни последователности във вектора изпълняват тяхната предназначена функция за регулиране на транскрибирането и на транслирането на гена на анти- 50 тиялото. Експресионният вектор и експресионните конт-

ролни последователности се избират така, че да са съвместими с експресирането на използваната клетка. Генът на леката верига на анти- тиялото и генът на тежката верига на анти- тиялото могат да се инсерират в отделни вектори, или, по- характерно, двата гена се инсерират в един и същи експресионен вектор. Гените на анти- тиялото се инсерират в експресионния вектор чрез стандартни методи (например, свързване на комплементарни рестрикционни сайтове във фрагмент от гена и вектор на анти- тиялото, или свързване на тъп край, ако не присъстват рестрикционни сайтове). Преди инсерирането на последователностите на леката и тежката верига, експресионният вектор може вече да носи последователности на константна област на анти- тиялото. Например, един подход за конвертиране на VH и VL последователностите в гени на анти- тияло с пълна дължина, е те да бъдат инсерирани в експресионни вектори вече кодиращи константни области на тежката верига и константни области на леката верига, съответно, така че VH сегментът е свързан операционно към CH сегмента(ите) във вектора, и VL сегментът е свързан операционно към CL сегмента във вектора. Освен това, или алтернативно, рекомбинантният експресионен вектор може да кодира сигнален пептид, който улеснява секретирането на веригата на анти- тиялото от клетка гостоприемник. Генът на веригата на анти- тиялото може да бъде клониран във вектора, така че сигналният пептид да се свърже в рамка към аминокиселинния терминал на гена на веригата на анти- тиялото. Сигналният пептид може да е имуноглобулинов сигнален пептид, или хетероложен сигнален пептид (т.е., сигнален пептид от не-имуноглобулинов протеин).

Освен това, към гените на веригата на анти- тиялото, рекомбинантните експресионни вектори съгласно изобретението носят регулаторни последователности, които контролират експресирането на гените на веригата на анти- тиялото в клетка гостоприемник. Терминът “регулаторна последователност” включва промотори, енхансери и други елементи за контролиране на експресията (например, сигнали за полиаденилиране), които контролират транскрипцията, или транслирането на гените на веригата на анти- тиялото. Такива регулаторни последователности са описани, например, в

Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Специалистите в областта на техниката ще преценят, че проектирането на експресионния вектор, включително изборът на регулаторни последователности, може да зависи от такива фактори, като изборът на клетката гостоприемник, която да се трансформира, от нивото на експресиране на желанния протеин, и т. н. Предпочитани регулаторни последователности за експресията на клетка гостоприемник на бозайник включват жизнеспособни елементи, които водят до високи нива на експресиране на протеин в клетки на бозайник, такива като промотори и/или усилватели, произлизащи от цитомегаловирус (CMV) (такива като CMV промотор/усилвател), Simian Virus 40 (SV40) (такива като SV40 промотор/усилвател), аденовирус, (например, главният късен промотор на аденовирус (AdMLP)) и полиома. За повече подробности за вирусни регулаторни елементи, и техни последователности, виж, например, US Patent No. 5,168,062 от Stinski, US Patent No. 4,510,245 от Bell et al. и US Patent No. 4,968,615 от Schaffner et al.

В допълнение към гените на веригата на анти тялото и регулаторните последователности, рекомбинантният експресионен вектор съгласно изобретението може да носи допълнителни последователности, такива като последователности, които регулират репликацията на вектора в клетки гостоприемници (например, начала на репликация) и избираеми маркерни гени. Избираемите маркерни гени улесняват селекцията на клетки гостоприемници, в които е въведен вектора (виж, например, US Patent Nos. 4,399,216, 4,634,665 и 5,179,017, всичките от Axel et al.). Например, характерно избираемият маркерен ген придава резистентност към лекарства, такива като G418, хигромицин, или метотрексат, на клетка гостоприемник, в която векторът е въведен. Предпочитани избираеми маркерни гени включват гена на дихидрофолат редуктаза (DHFR) (за използване в dhfr клетки гостоприемници с метотрексат селекция/усилване) и нео гена (за G418 селекция).

За експресия на леката и тежката верига, експресионният(те) вектор(и) кодиращ(и) тежката и леката верига се трансфектират в клетка гостоприемник чрез стандартни техники.

Различните форми на термина "трансфектиране" са предназначени да обхващат голямо разнообразие от техники, обичайно използвани за въвеждане на екзогенна ДНК в прокариотна, или еукариотна клетка гостоприемник, например, електропорация, калций-фосфорно утаяване, DEAE-декстран трансфектиране и други подобни. Въпреки че теоретично е възможно да се експресират антителата съгласно изобретението или в прокариотни, или в еукариотни клетки гостоприемници, експресиране на антитела в еукариотни клетки, и най-за предпочитане клетки гостоприемници от бозайник, е най-предпочитаното, понеже такива еукариотни клетки, и по-специално клетки от бозайник, са по-подходящи, отколкото прокариотни клетки да се събират и да секретират правилно нагънато и имунологично активно анти тяло. За прокариотно експресиране на гени на анти тяло е докладвано, че е неефективно за продуциране на високи добиви на активно анти тяло (Boss, M. A. and Wood, C. R. (1985) Immunology Today 6:12-13).

Предпочитани клетки гостоприемници от бозайници за експресиране на рекомбинантните антитела съгласно изобретението включват Chinese Hamster Ovary (CHO клетки) (включително dhfr-CHO клетки, описани в Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, използвани с DHFR избираем маркер, например, както се описва в R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), NSO миелома клетки и SP2 клетки. Когато рекомбинантни експресионни вектори, кодиращи гени на анти тяло се въвеждат в клетки гостоприемници на бозайник, антителата се продуцират чрез култивиране на клетките гостоприемници в продължение на достатъчно дълъг период от време, за да се даде възможност за експресиране на анти тялото на клетките гостоприемници, или, по-предпочитано, за секретирание на анти тялото в културалната среда, в която са прораснали клетките гостоприемници. Антитела могат да се възстановят из културалната среда, използвайки стандартни методи за пречистване на протеин.

Клетки гостоприемници могат също така да се използват за продуциране на участъци от интактни антитела, такива като Fab фрагменти, или scFv молекули. Трябва да се разбере, че ва-

риациите на горната процедура влизат в обхвата на настоящото изобретение. Например, може да е желателно да се трансфектира клетка гостоприемник с ДНК, кодираща или леката верига, или тежката верига (но не и двете) на антителио съгласно това изобретение. Технология за рекомбинантна ДНК може също така да се използва, за да се отнеме малко от, или цялата ДНК кодираща която и да е от двете, било леката, било тежката вериги, която не е необходимо да се свързва към антигените, представляващи интерес. Молекулите, експресирани от такива окастрени ДНК молекули също така се обхващат от антителата съгласно изобретението. Освен това, могат да бъдат продуцирани бифункционални антитела, в които една тежка и една лека верига са антителио съгласно изобретението, а другата тежка и лека верига са специфични за антиген, различен от антигените, представляващи интерес, чрез кръстосано свързване на антителио съгласно изобретението към второ антителио чрез стандартни химични методи за кръстосано свързване.

Съгласно предпочитана система за рекомбинантно експесиране на антителио, или антиген-свързващ негов участък, съгласно изобретението, рекомбинантен експесионен вектор, кодиращ както тежката верига на антителиото, така и леката верига на антителиото, се въвежда в dhfr-CHO клетки чрез калций фосфор-медирано трансфектиране. В рекомбинантния експесионен вектор, всяка една от тежката и леката верига на гените на антителиото са операционно свързани към CMV усилвател/AdMLP промотор регулаторни елементи, за довеждане до високи нива на транскрибиране на гените. Рекомбинантният експесионен вектор също така носи DHFR ген, който позволява селекцията на CHO клетки, които са били трансфектирани с вектора, използвайки метотрексат селекция/амплификация. Избраните трансформирани клетки гостоприемници се култивират, за да се даде възможност за експресията на тежката и леката верига на антителиото, и се извлича интактно антителио от културалната среда. Стандартни молекулярни биологични техники се използват за получаването на рекомбинантния експесионен вектор, за да се трансфектират клетките гостоприемници, за да се изберат трансформанти, за да се култивират клетките гостоприемници, и да се възстанови антителиото от културалната среда. Освен това, изобретението

предоставя метод за синтезиране на рекомбинантно антителио съгласно изобретението чрез култивиране на клетка гостоприемник съгласно изобретението в подходяща културална среда, докато се синтезира рекомбинантно антителио съгласно изобретението. Методът може, също така, да съдържа изолиране на рекомбинантното антителио от културалната среда.

Алтернативно на скриниране на библиотеки на рекомбинантно антителио чрез изобразяване на фаг, могат да се приложат други методики, известни в областта на техниката за скриниране големи комбинаторни библиотеки, за идентифицирането на антитела с двойна специфичност съгласно изобретението. Един вид на алтернативна експесионна система е такава, в която библиотека на рекомбинантно антителио се експресира със сливания на РНК-протеин, както се описва в PCT Publication No. WO 1998/031700 от Szostak and Roberts, и в Roberts, R. W. and Szostak, J. W. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:12297-12302. В тази система, се създава ковалентно сливане между mРНК и пептида, или протеина, който той кодира чрез *in vitro* трансляция на синтетични mРНК, които носят пуромидин, пептидил акцептор антибиотик, на неговия 3' край. Така, специфична mРНК може да бъде обогатена от комплексна смес от mРНКи (например, комбинаторна библиотека), на базата на свойствата на кодиращия пептид, или протеин, например, антителио, или негов участък, такава като свързваща антителиото, или негов участък, към антиген с двойна специфичност. Последователности от нуклеинова киселина кодиращи антитела, или техни участъци, възстановени от скриниране на такива библиотеки, могат да бъдат експесирани чрез рекомбинантни начини, както е описано по-горе (например, в клетки гостоприемници на бозайник), и, освен това, могат да бъдат подложени на следващо афинитетно узряване чрез допълнителни кръгове на скриниране на mРНК-пептид сливания, при които са въведени мутации в оригинално избрана(и) последователност(и), или чрез други методи за афинитетно узряване *in vitro* на рекомбинантни антитела, както се описва по-горе.

С. Комбинирани подходи

Антитела с двойна специфичност съгласно изобретението могат, също така, да се получат, използвайки комбинирането на *in vivo*

и *in vitro* подходи, такива като методи, при които антиген с двойна специфичност се предоставя оригинално на множество антителя *in vivo* в гостоприемник животно, за да стимулира продуцирането на антителя, които свързват антигена с двойна специфичност, но където следваща селекция и/или узряване на антитяло (т.е., подобрене), се осъществява, използвайки една, или повече *in vitro* техники.

Съгласно един вариант за изпълнение на изобретението, такъв комбиниран метод обхваща първо имунизирание на животно, различно от човек (например, мишка, плъх, заек, коза, или тяхна трансгенна версия, или химерна мишка) с антиген с двойна специфичност, за да се стимулира отговор на антитяло срещу антигена, последвано от получаване и скриниране на библиотека на антитяло изобразяваща фаг, използвайки имуноглобулинови последователности от лимфоцити, стимулирани *in vivo* чрез излагане на действието на антигена с двойна специфичност. Първият етап на тази комбинирана процедура може да се проведе както е описано в подсекция IIА по-горе, докато вторият етап на тази процедура може да се проведе както е описано в подсекция IIВ по-горе. Предпочитани методики за хиперимунизирание на животни различни от човек, последвано от *in vitro* скриниране на библиотеки изобразяващи фаг, получени от стимулиране на лимфоцити включват тези, описани от BioSite Inc., виж, например, PCT Publication WO 1998/047343, PCT Publication WO 1991/017271, US Patent No. 5,427,908 и ; US Patent No. 5,580,717.

Съгласно друг вариант за изпълнение на изобретението, комбинираният метод обхваща първо имунизирание на животно, различно от човек (например, мишка, плъх, заек, коза, или негова *knockout* и/или трансгенна версия, или химерна мишка) с антиген с двойна специфичност, за да се стимулира антитяло отговор срещу антигена, и селекция на лимфоцити, които са продуциращи антителя, имащи желаната двойна специфичност (например, чрез скриниране хибриди, получени от имунизирания животни). Пренаредените гени на антитялото от избраните клоно след това се изолират (чрез стандартни методи за клониране, такива като верижна реакция на обратна транскриптаза-полимераза), и се подлагат на *in vitro* афинитет-

но узряване, като по този начин се улесняват свойствата за свързване на избраното антитяло, или антителя. Първият етап на тази процедура може да се проведе както е описано в подсекция IIА по-горе, докато вторият етап на тази процедура може да се проведе както е описано в подсекция IIВ по-горе, по-специално използвайки PCT Publication WO 1997/029131, и PCT Publication WO 2000/056772.

Съгласно друг един комбиниран метод, рекомбинантни антители се генерират от единични, изолирани лимфоцити, използвайки процедура, известна в областта на техниката като метода на избраното лимфоцитно антитяло (SLAM), както се описва в US Patent No. 5,627,052, PCT Publication WO 1992/002551 и Babcock, J. S. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848. Съгласно този метод, както се прилага върху антитялото с двойна специфичност съгласно изобретението, животно, различно от човек (например, мишка, плъх, заек, коза, или негова трансгенна версия, или химерна мишка) първо се имунизират *in vivo* с антиген с двойна специфичност, за да се стимулира антитяло отговор срещу антигена, и след това се селектират единични клетки, секретиращи антителя, представляващи интерес, например, специфични за антигена с двойна специфичност, използвайки изследване на специфична за антиген хемолитична плака (например, самият антиген с двойна специфичност, или структурно свързаните молекули, представляващи интерес, се присъединяват, като овчи червени кръвни клетки, използвайки линкер, такъв като биотин, като чрез това се дава възможност за идентифициране на единични клетки, които секретират антителя с подходяща специфичност, използвайки изследването на хемолитична плака). След идентифициране на секретиращите антители клетки, представляващи интерес, сДНКи на вариабилна област на тежка и лека верига се освобождават от клетките чрез обратна транскриптаза-PCR, и тези вариабилни области могат след това да се експресират, в контекста на подходящи имуноглобулин константни области (например, човешки константни области), в клетки гостоприемници на бозайник, такива като COS, или CHO клетки. Клетките гостоприемници, трансфектирани с усилен имуноглобулинови последователности, произлизащи от *in vivo* селектирани

лимфоцити, могат след това да претърпят следващ анализ и селектиране *in vitro*, например, чрез получаване на трансфектираните клетки, за да се изолират клетки, експресиращи антитела, имащи желаната двойна специфичност. Усилените имуноглобулинови последователности след това могат да се обработят *in vitro*, като например *in vitro* афинитетно узряване, както се описва по-горе.

Съгласно друг вариант за изпълнение на изобретението, комбинираният метод за продуциране на антитяло с двойна специфичност обхваща следните етапи. Първо животно, различно от човек се имунизира с първи антиген, и второ животно, различно от човек се имунизира с втори различен антиген, където за предпочитане вторият антиген структурно е подобен на първия антиген, за да се стимулира антитяло отговор *in vivo*. Конструират се рекомбинантна библиотека на тежка верига и рекомбинантна библиотека на лека верига от гени на антитяло, производни на първото животно, различно от човек, и на второто животно, различно от човек, съответно, както се описва в секция II B. Библиотеката на тежка верига от животното, имунизирано с първия антиген се комбинира с библиотеката на лека верига от животното, имунизирано с втория антиген животното, за да се генерира библиотека X. Similarly на антитяло, библиотеката на тежка верига от животното, имунизирано с втория антиген се комбинира с библиотеката на лека верига от животното, имунизирано с първия антиген животното, за да се генерира библиотека Y. Additionally на антитяло, библиотеки X и Y могат да се комбинират, за да се генерира библиотека XY. Антитела с двойна специфичност, които свързват и първия, и втория антиген, могат да се идентифицират, и да се изолират от X, Y и/или XY библиотеки.

III. Характеристики на антитела с двойна специфичност

Изобретението предоставя антитела с двойна специфичност, така както и участъци от такива антитела, които могат да се получат съгласно методите на изобретението. За предпочитане, антителата, или участъците от тях, са изолирани антитела. За предпочитане, антителата, или участъците от тях, са неутрализиращи антитела. Антителата съгласно изобретението включват моноклонални и рекомбинантни антитела, и участъ-

ци от тях. Съгласно различни варианти за изпълнение на изобретението, антитялото, или неговия участък, може да съдържа аминокиселинна последователност, произлизаща изцяло от единични видове, такива като изцяло човешки, или изцяло мише антитяло, или неговия участък. Съгласно други варианти за изпълнение на изобретението, антитялото, или неговия участък, може да бъде химерно антитяло, или CDR-присадено антитяло, или друго от хуманизирано антитяло.

Терминът "антитяло", така както се използва тук, се отнася до молекули имуноглобулин, които се съдържат в четири полипептидни вериги, две тежки (H) вериги и две леки (L) вериги, взаимно съединени чрез дисулфидни връзки. Всяка тежка верига се състои от вариабилна област на тежка верига (съкратено тук като HCVR, или VH) и константна област на тежка верига. Константната област на тежката верига се състои от три домена, CH1, CH2 и CH3. Всяка лека верига се състои от вариабилна област на лека верига (съкратено тук като LCVR или VL) и константна област на лека верига. Константната област на леката верига се състои от един домен, CL. Областите VH и VL могат след това да подразделят на области с хипервариабилност, наречени с термина области определящи комплементарността (CDR), с разпръснати между тях области, които са посъхранени, наречени с термина области на рамката (FR). Всяка една от VH и VL се състои от три CDR и от четири FR, подредени от аминокс терминала към карбокситерминала в следния ред: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Терминът "антиген-свързващ участък" на антитяло (или просто "участък от антитяло"), както се използва тук, се отнася до един, или повече фрагменти на антитяло с двойна специфичност, които запазват способността да свързват специфично два различни, но структурно свързани антигена. Беше показано, че антиген-свързващата функция на едно антитяло може да се осъществи посредством фрагменти на антитяло с пълна дължина. Примери за свързващи фрагменти, които се обхващат от термина "антиген-свързващ участък" на антитяло включват (i) Fab фрагмент, моновалентен фрагмент, състоящ се от VL, VH, CL и CH1 домени; (ii) F(ab')₂ фрагмент, бивалентен фрагмент, съдържащ два

Fab фрагмента, свързани с дисулфиден мост при hinge областта; (iii) Fd фрагмент, състоящ се от VH и CH1 домени; (vi) Fv фрагмент, състоящ се от VL и VH домени на единично рамо на антицяло, (v) dAb фрагмент (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), който се състои от VH домен; и (vi) изолирана област, определяща комплементарност (CDR). Освен това, въпреки че двата домена на Fv фрагмента, VL и VH, са кодирани от различни гени, те могат да се съединят, използвайки рекомбинантни методи, посредством синтетичен линкер, който дава възможност те да бъдат получени като единична протеинова верига, в която VL и VH областите се сдвояват, като образуват моновалентни молекули (известни като Fv (scFv) с единична верига; виж, например, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; и Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883. Такива антицела с единична верига също се обхващат от термина "антиген-свързващ участък" на антицяло. Други форми на антицела с единична верига, такива като диантицела също се обхващат. Диантицелата са двувалентни, двойно специфични антицела, в които VH и VL домените се експресират на единична полипептидна верига, но използвайки линкер, който е достатъчно къс, за да позволи сдвояването между двата домена на същата верига, като по този начин домените се заставят да се сдвояват с комплементарни домени от друга верига, и да се създадат два антиген свързващи сайта (виж, например, Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-123644802, Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123).

Също така, антицяло, или антиген-свързващ негов участък може да бъде участък от големи имуноадхезионни молекули, образувани чрез ковалентно, или нековалентно асоцииране на антицялото, или участъците от антицялото, с един, или повече други протеини, или пептиди. Примерите за такива имуноадхезионни молекули включват използване на област със сърцевина стрептавидин, за да се получи тетрамерна scFv молекула (Kipriyanov, S. M., et al. (1995) Hum Antibodies and Hybridomas 6:93-101), и използване на цистеинов остатък, на пептиден маркер и на С-терминална полихистидинова опашка, за да се образуват бивалентни и биотинилирани scFv молекули (Kipriyanov, S. M., et al. (1994) Mol. Immunobiol. 31:1047-1058). Участъци от

антицяло, такива като Fab и F(ab')₂ фрагменти, могат да се получат от цяло антицяло, използвайки конвенционални техники, такива като папаиново, или пепсиново, усвояване съответно, на цяло антицяло. Освен това, антицела, участъци от антицела и имуноадхезионни молекули могат да се получат, използвайки стандартни рекомбинантни ДНК техники.

"Изолирано антицяло с двойна специфичност", както се използва тук, се отнася до антицяло с двойна специфичност, което по същество свободно от други антицела, имащи различни антигенни специфичности (например, изолирано антицяло, което специфично свързва два различни, но структурно свързани антигена, или структурно свързани области на иначе несвързани антигени). Освен това, изолирано антицяло с двойна специфичност може да бъде по същество свободно от други клетъчни продукти и/или вещества.

"Неутрализиращо антицяло", както се използва, се отнася до антицяло, чието свързване към специален антиген води до инхибиране на биологичната активност на антигена. Това инхибиране на биологичната активност на антигена може да се оцени чрез измерване на един, или на повече индикатори за биологичната активност на антигена, използвайки подходящо *in vitro*, или *in vivo* изследване.

"Моноклонално антицяло", както се използва тук, се отнася до произлизащо от хибридома антицяло (например, антицяло, секретирано от хибридома, получена чрез хибридомна технология, такава като стандартната хибридомна методика на Kohler and Milstein). Така, произлизащо от хибридома антицяло с двойна специфичност съгласно изобретението се отнася също и като моноклонално антицяло, въпреки че то има антигенна специфичност за повече от единичен антиген.

Изразът "рекомбинантно антицяло" се отнася до антицела, които се получават, експресират, и се създават, или се изолират посредством рекомбинантни начини, такива като антицела експресирани, използвайки рекомбинантен експресионен вектор, трансфектиран в клетка гостоприемник, антицела изолирани от рекомбинантна, комбинативна библиотека на антицяло, антицела изолирани от животно (например, мишка), което е трансгенно за гени на човешки

имуноглобулин, (виж, например, Taylor, L. D., et al. (1992) Nucl. Acida Res. 20:6287-6295), или антителя, получени, експресирани, създадени, или изолирани посредством едни или други начини, които включват снаждане на определени последователности на имуноглобулиновия ген (такива като човешки последователности на имуноглобулиновия ген) към други ДНК последователности. Примерите за рекомбинантни антители включват химерни, CDR-присадени и хуманизирани антители.

Терминът “човешко антитяло” се отнася до антителя, имащи вариабилни и константни области, съответстващи на, или произлизащи от, имуноглобулинови последователности на човешка зародишна линия, както се описва, например, от Kabat et al. (виж Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S. Departement of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Човешките антители съгласно изобретението, обаче, могат да включват аминокиселинни остатъци, некодирани от имуноглобулинови последователности на човешка зародишна линия (например, мутации, въведени посредством случайни, или сайт-специфични мутагенези *in vitro*, или посредством соматична мутация *in vivo*), например в CDRs и по-специално в CDR3.

Рекомбинантните човешки антители съгласно изобретението имат вариабилни области, и могат също така да включват константни области, произлизащи от имуноглобулинови последователности на човешка зародишна линия (виж Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S. Departement of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Съгласно някои варианти за изпълнение на изобретението, обаче, такива рекомбинантни човешки антители се подлагат на *in vitro* мутагенеза (или, когато се използва животно, трансгенно за човешки Ig последователности, на *in vivo* соматична мутагенеза) и така аминокиселинните последователности на VH и VL областите на рекомбинантните антители са последователности, които, когато са производни от, и са свързани с последователности на VH и VL на човешка зародишна линия, може да не съществува естествено в природата в човешка зародишна линия на множество антители *in vivo*. Съгласно някои варианти за

изпълнение на изобретението, обаче, такива рекомбинантни човешки антители се получават в резултат на селективна мутагенеза, или обратна мутация, или и двете.

Терминът “обратна мутация” се отнася до метод, при който някои, или всичките соматично мутирали аминокиселини на човешко антитяло се заместват със съответните остатъци от зародишна линия на хомоложна последователност на антитяло на зародишна линия. Последователности на тежката и леката верига на човешко антитяло съгласно изобретението се подреждат отделно от последователностите зародишна линия в VBASE база данни, за да се идентифицират последователностите с най-висока хомоложност. Различията в човешко антитяло съгласно изобретението са връщането към последователност на зародишната линия чрез мутиране на определени нуклеотидни позиции, кодиращи такава аминокиселина. Ролята на всяка една от аминокиселините така идентифицирани като кандидати за обратна мутация трябва да се изследва за директна, или индиректна роля в свързването на антиген, и която и да е аминокиселина, намерена след мутиране да влияе върху която и да е характеристика на човешко антитяло, не би трябвало да се включва в крайното човешко антитяло. За да се сведе до минимум броят на аминокиселините, подложени на обратна мутация, онези аминокиселинни позиции, за които е установено, че са различни от най-близката последователност на зародишна линия, но идентична на съответната аминокиселина във втора последователност на зародишна линия може да остане, при условие че втората последователност на зародишна линия е идентична и колинеарна на последователността на човешкото антитяло съгласно изобретението за най-малко 10, за предпочитане 12 аминокиселини, от двете страни на аминокиселината, за която става въпрос. Обратна мутация може да се появи във всеки етап на оптимизиране на антитяло.

Терминът “химерно антитяло” се отнася до антителя, които съдържат последователности на вариабилна област на тежка и лека верига от едни видове, и последователности на константна област от други видове, такива като антителя, имащи миши тежка и лека верига на вариабилни области, свързани към човешки кон-

стантни области.

Терминът "CDR-присадено антитяло" се отнася до антитела, които съдържат последователности с тежка и лека верига на вариабилна област от едни видове, но в които последователностите на един, или повече от CDR областите на V_H и/или V_L са заместени с CDR последователности на други видове, такива като антитела, имащи миши тежка и лека верига на вариабилни области, в които един, или повече от мишите CDRs (например, CDR3) са били заместени с човешки CDR последователности.

Терминът "хуманизирано антитяло" се отнася до антитела, които съдържат последователности с тежка и лека верига на вариабилна област от видове различни от човек (например, мишка), но в които най-малко участък от V_H и/или V_L последователностите са изменени, да са повече "човекоподобни", т.е., по-подобни на вариабилни последователности на зародишна човешка линия *germline*. Един вид хуманизирано антитяло е CDR-присадено антитяло, в което човешки CDR последователности са въведени в различни от човешки V_H и V_L последователности, за да заместят съответните CDR последователности, различни от човешките.

Един начин за измерване кинетиката на свързване на антитяло чрез повърхностен плазмен резонанс. Терминът "повърхностен плазмен резонанс", както се използва тук, се отнася до оптически феномен, който дава възможност да се анализира реалното време на биоспецифични взаимодействия чрез откриване на изменения в концентрациите на протеин в биосензорна матрица, например, използвайки система с BIA сърцевина Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, NJ). За допълнителни описания, виж Jonsson, U., et al. (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jonsson, U., et al. (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Jonsson, B., et al. (1995) *Mol. Recognit.* 8:125-131; и Jonsson, B., et al. (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277.

Терминът " K_{off} ", както се използва тук, се отнася до *off* скоростната константа за дисоцииране на антитяло от антитяло/антиген комплекса.

Терминът " K_d ", както се използва тук, се отнася до дисоциационната константа на определено взаимодействие антитяло-антиген.

Антителата с двойна специфичност съгласно изобретението се получават, използвайки

който и да е от различните методи за получаване на антитела, описан в подраздел II по-горе. Антителата с двойна специфичност съгласно изобретението могат да се насочат срещу по същество които и да са структурно свързани антигени, въпреки че предпочитани антитела с двойна специфичност съгласно изобретението са тези, които специфично свързват IL-1 α и IL-1 β , които могат да се получат, използвайки антиген с двойна специфичност като тези, описани в примери 1-4. Други структурно свързани антигени, които могат да се приложат към настоящото изобретение включват, но не се ограничават до членове на семейството на каспазите, до семейството на цитокините, такива като членове на семейство IL-1 (например, IL-1/IL-18), до членове на семейството TNF (например, TNF α /TNF β), членове на семейство IL-6, интерферони, членове на семейство TGF β , членове на семейство EGF, членове на семейство FGF, членове на семейство PDGF, членове на семейство VEGF, членове на семейство ангиопротеини, костни морфогенни протеини, секретирани протеинази (металопротеинази), и на семейства на цитокин рецептори, такива като членове на семейство IL-1-рецептор, членове на семейство TNF-рецептори, членове на семейство TGF β рецептор, членове на семейство EGF рецептор, членове на семейство FGF рецептор, членове на семейство PDGF рецептор, VEGF рецептор, и членове на семейство на ангиопро-теин рецептор.

Антитялото с двойна специфичност съгласно изобретението може да прояви също така, активност на свързване по отношение на двата различни, но структурно свързани антигена, към които те се свързват, или, алтернативно, антителата с двойна специфичност могат да се свързват по-предпочитано към един от двата антигена, като въпреки това имат специфичност спрямо двата свързани антигена, в сравнение с несвързани антигени. Свързващата активност на антителата с двойна специфичност спрямо структурно свързаните антигени, така както и спрямо несвързани антигени, може да се оцени, използвайки стандартни *in vitro* имуноизследвания, такива като ELISA, или BIAcore анализи. За предпочитане, съотношението K_d на антитяло спрямо структурно несвързани антигени към K_d на антитяло спрямо структурно свързани

антигени, би трябвало да е най-малко 3, даже по-предпочитано, съотношението би трябвало да е най-малко 5, даже по-предпочитано, съотношението би трябвало да е най-малко 10, и даже по-предпочитано, съотношението би трябвало да е най-малко 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000.

Количествено, разликата между фона на свързване и антителата с двойна специфичност е ниво, или степен. Например, фона на свързване е на ниско ниво, например, по-малко от 5%, по-предпочитано по-малко от 3%, и най-предпочитано, приблизително 0,1 - 1%, докато специфична кръстосана реактивност, или свързване с двойна специфичност е на по-високо ниво, например, по-голямо от 1%, по-предпочитано по-голямо от 3%, даже по-предпочитано по-голямо от 5%, и по-предпочитано по-голямо от 10%. Освен това, за предпочитане IC_{50} на антитяло с двойна специфичност за антигени мишени, е близко до ED_{50} на антигените за дадено биоизследване.

Антитяло с двойна специфичност, или негов антиген-свързващ участък, съгласно изобретението, за предпочитане се избира така, че да има желаните кинетики на свързване (например, висок афинитет, ниска дисоциация, малка off-скорост, силна неутрализираща активност) за един, а по-предпочитано за двата, от антигените, към които се свързва специфично. Например, антитялото с двойна специфичност, или негов участък, може да свързва един, а по-предпочитано двата от структурно свързаните антигена с K_{off} скоростна константа $0,1\text{ s}^{-1}$, или по-малка, по-предпочитано K_{off} скоростна константа $1 \times 10^{-2}\text{ s}^{-1}$, или по-малка, даже по-предпочитано K_{off} скоростна константа $1 \times 10^{-3}\text{ s}^{-1}$, или по-малка, даже по-предпочитано K_{off} скоростна константа $1 \times 10^{-4}\text{ s}^{-1}$, или по-малка, или още по-предпочитано K_{off} скоростна константа $1 \times 10^{-5}\text{ s}^{-1}$, или по-малка, както се определя чрез повърхностен плазмен резонанс. Алтернативно, или допълнително, антитялото с двойна специфичност, или негов участък, може да инхибира активността на един, а по-предпочитано двата структурно свързани антигена с IC_{50} от порядъка на $1 \times 10^{-6}\text{ M}$, или по-малка, даже по-предпочитано с IC_{50} от порядъка на $1 \times 10^{-7}\text{ M}$, или по-малка, даже по-предпочитано с IC_{50} от порядъка на $1 \times 10^{-8}\text{ M}$, или по-малка, даже по-предпочитано с IC_{50} от порядъка

на $1 \times 10^{-9}\text{ M}$, или по-малка, даже по-предпочитано с IC_{50} от порядъка на $1 \times 10^{-10}\text{ M}$, или по-малка, или още по-предпочитано с IC_{50} от порядъка на $1 \times 10^{-11}\text{ M}$, или по-малка. За предпочитане, IC_{50} трябва да се измери, използвайки чувствително биоизследване, където IC_{50} стойностите са близко до ED_{50} стойността на антигена за изследването.

Изобретението също така предоставя фармацевтични състави, съдържащи антитяло с двойна специфичност, или негов антиген-свързващ участък, съгласно изобретението, и фармацевтично приемлив носител. Фармацевтичният състав съгласно изобретението може, също така, да съдържа най-малко едно допълнително терапевтично средство, например, едно, или повече терапевтични средства за лечение на смущения, при които използването на антитяло с двойна специфичност е благоприятно за подобряване на смущението. Например, когато антитялото с двойна специфичност специфично свързва IL-1 α и IL-1 β , фармацевтичният състав може също така да включва едно, или повече терапевтични средства за лечение на смущения, при които IL-1 активност е определяща.

Антителата и участъците от антитела съгласно изобретението могат да бъдат включени във фармацевтични състави, подходящи за приложение върху субект. Характерно, фармацевтичният състав съдържа антитяло, или участък от антитяло съгласно изобретението, и фармацевтично приемлив носител. Както се използва тук, "фармацевтично приемлив носител" включва които и да са, и всички разтворители, дисперсни среди, покрития, антибактериални и противогъбични средства, изотонични и елиминират абсорбирането средства, и други подобни, които са физиологично съвместими. Примерите за фармацевтично приемливи носители включват един, или повече като, вода, физиологичен разтвор, фосфатно буфериран физиологичен разтвор, декстроза, глицерол, етанол и други подобни, така както и техни комбинации. В много случаи, за предпочитане е в състава да се включват изотонични средства, например, захари, полиалкохоли, такива като манитол, сорбитол или натриев хлорид. Фармацевтично приемливи носители могат, освен това, да съдържат минимални количества спомагателни вещества, такива като омокрящи, или емулгиращи средства,

консерванти, или буфери, които улесняват живота на обвивката, или ефикасността на анти тялото, или участъкът от анти тялото.

Антителата и участъците от анти теля съгласно изобретението могат да бъдат включени във фармацевтичен състав, подходящи за парентерално приложение. Характерно, анти тялото или участъците от анти тялото трябва да се получат под формата на разтвор за инжектиране, съдържащ 0,1 - 250 mg/ml анти тяло. Разтворът за инжектиране може да се състои или от течна, или от лиофилизирана форма за еднократно дозиране във флакон от флинтново стъкло, или в кехлибарен флакон, ампула, или предварително запечатана спринцовка. Буферът може да бъде L-хистидин (1 - 50 mM), оптимално 5-10 mM, при pH 5,0 до 7,0 (оптимално pH 6,0). Други подходящи буфери включват, но без да се ограничават до, натриев сукцинат, натриев цитрат, натриев фосфат, или калиев фосфат. Натриев хлорид може да се използва за модифициране токсичността на разтвора при концентрация от 0 - 300 mM (оптимално 150 mM за течна форма за еднократно дозиране). Криозащитни средства могат също така да се включат за лиофилизирана форма за еднократно дозиране, по принцип от 0 - 10 % захароза (оптимално 0,5 - 1,0 %). Други подходящи криозащитни средства включват трехалоза и лактоза. Могат да се включат средства придаващи обем за лиофилизирана форма за еднократно дозиране, по принцип от 1 - 10 % манитол (оптимално 2 - 4 %). Стабилизатори могат да се използват и в двете, както в течната, така и в лиофилизирана форма за еднократно дозиране, по принцип от 1-150 mM L-метионин (оптимално 5-10 mM). Други подходящи средства придаващи обем включват глицин, аргинин, могат да бъдат включени като 0 - 0,05 % полисорбат-80 (оптимално 0,005 - 0,01 %). Допълнително повърхностно активни вещества включват, но без да се ограничават до, полисорбат 20 и BRIJ повърхностно активни вещества.

Съставите съгласно това изобретение могат да бъдат в многообразие от форми. Те включват, например, течни, полутвърди и твърди форми за еднократно дозиране, такива като течни разтвори (например, инжекционни и инфузионни разтвори), дисперсни системи, или суспензии, таблетки, пилули, прахове, липозоми и супозитории. Предпочитаната форма зави-

си от начина на прилагане и от терапевтичното приложение. Характерно предпочитани състави са под формата на инжекционни, или инфузионни разтвори, такива като състави, подобни на тези, използвани при пасивно имунизирание на хора с други анти теля. Предпочитан начин на приложение е парентерален (например, интравенозно, подкожно, интраперитонеално, интрамускулно). Съгласно предпочитан вариант за изпълнение на изобретението, анти тялото се прилага чрез интравенозна инфузия, или инжектиране. Съгласно друг предпочитан вариант за изпълнение на изобретението, анти тялото се прилага чрез интрамускулно или подкожно инжектиране.

Терапевтичните състави характерно трябва да бъдат стерилни и стабилни в условията на получаване и на съхраняване на склад. Съставите могат да бъдат под формата на лекарствени форми като разтвори, микроемулсии, дисперсни системи, липозоми, или други структури, подходящи за лекарство с висока концентрация. Стерилни инжекционни разтвори могат да се получат, като се инкорпорира активното съединение (т.е., анти тяло, или участък от анти тяло) в необходимото количество, в подходящ разтворител, с един, или с комбинация от съставни части, изброени по-горе, както се изисква, последвано от стерилизиране чрез филтруване. Обикновено, дисперсионни системи се получават, като се инкорпорира активното съединение в стерилен вехикулум, който съдържа основна дисперсна среда, и другите необходими съставни части от тези, изброени по-горе. Когато се касае до стерилни, лиофилизиращи прахове за получаването на стерилни инжекционни разтвори, предпочитаните методи за получаване са вакуум сушене и спрей-сушене, при което се получава прах от активната съставна част, плюс която и да е допълнителна желана съставна част от предварително стерилно-филтруван разтвор. Собствената текливост на разтвор може да се поддържа, например, чрез използването на покриващи средства, такива като лецитин, чрез поддържане на необходимата големина на частичките, в случай на дисперсия, и чрез използване на повърхностно активни вещества. Продължително абсорбиране на инжектируеми състави може да се преустанови, чрез включване в състава на средство, което елиминира

абсорбирането, например, моностеаратни соли и желатин.

Антителата и участъците на антитела съгласно настоящото изобретение, могат да се прилагат чрез различни методи, известни в областта на техниката, въпреки че за много терапевтични приложения, предпочитаният начин/начин на приложение е подкожно инжектиране, интравенозно инжектиране, или инфузия. Както ще се отбележи от специалистите в областта на техниката, начинът/или начин на приложение, зависи от желаните резултати. Съгласно някои варианти за изпълнение на изобретението, активното съединение може да се получи с носител, който ще защитава съединението срещу бързо освобождаване, такива като лекарствена форма с контролирано освобождаване, включващо импланти, трансдермални пластири, и микрокапсулирани системи за доставяне. Могат да се използват биоразграждащи се, биосъвместими полимери, такива като етилен винил ацетат, полианхидриди, полигликолова киселина, колаген, полиортоестери, и полимлечна киселина. Много методи за получаването на такива лекарствени форми са патентовани или обикновено са известни на специалистите в областта на техниката. Виж, например, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Съгласно някои варианти за изпълнение на изобретението, антитяло, или участък от антитяло съгласно изобретението може да се прилага орално, например, с инертен разредител, или с асимилируем носител, който може да се яде. Съединението (и други съставни части, при желание) може също така да се затвори в желатинова капсула с твърда или с мека обвивка, пресована във вид на таблетка, или инкорпорирана директно в диетата на субекта. За орално приложение, съединенията могат да бъдат инкорпорирани с инертни пълнители, и използвани под формата на таблетки за поглъщане, на таблетки за устата, до пастили, до капсули, до еликсири, до суспензии, до сиропи, до вафли, и други подобни. За да се приложи съединение съгласно изобретението приложение, различно от парентералното, може да е необходимо да се покрие съединението със, или да се съприлага съединението с, продукт, който да предотвратява не-

говото инактивиране.

Допълнително активни съединения могат също така да се инкорпорират в съставите. Съгласно някои варианти за изпълнение на изобретението, антитяло, или участък от антитяло съгласно изобретението се получава под формата на лекарствена форма заедно с, и/или се прилага заедно с, едно, или повече добавъчни терапевтични средства, които са полезни за лечение на заболявания, при които IL-1 активността е вредна. Например, анти-IL-1 алфа/IL-1 бета антитела с двойна специфичност, или участъци от антитяло, съгласно изобретението, могат да се приготвят в лекарствена форма заедно с, и/или се прилага заедно с, едно, или повече добавъчни антитела, които свързват други мишенни (например, антитела, които свързват други цитокини, или които свързват молекули от клетъчната повърхност). Освен това, едно, или повече антитела съгласно изобретението могат да се използват в комбинация с две, или повече от горепосочените терапевтични средства. Такива комбинирани терапии могат благоприятно да използват ниски дози от прилаганите терапевтични средства, като по този начин се избягват възможните токсичности, или усложнения, свързани с различните монотерапии.

IV. Използвания на антитела с двойна специфичност

Като се има предвид тяхната способност да се свързват към различни структурно свързани антигени, антителата с двойна специфичност, или техни участъци, съгласно изобретението, могат да се използват за откриване на единия, или на двата от тези антигени (например, биологична проба като серум, или плазма), при използване на конвенционално имуно изследване, като ензим свързани имуносорбентни изследвания (ELISA), радиоимуноизследване (RIA), или тъканна имунохистохимия. Изобретението предоставя метод за откриване на антитяло в биологична проба, който включва привеждане в контакт на биологична проба с антитяло с двойна специфичност, или участък от антитяло съгласно изобретението, което специфично разпознава антигена, и се открива или антитялото (или участък от антитяло), свързано с антигена, или несвързано антитяло (или участък от антитяло), за да се открие по този начин антигена в биологичната проба. Антитялото е директно, или ин-

директно маркирано с вещество за откриване, за да се улесни откриването на свързаното, или несвързаното антителило. Подходящи вещества за откриване включват различни ензими, простетични групи, флуоресцентни продукти, луминесцентни продукти и радиоактивни продукти. Примери за подходящи ензим и антителило с двойна специфичност участък от антителило съгласно изобретението, свързано с антигена, или несвързано антителило вещества за откриване включват пероксидаза от хрян, алкална фосфатаза, бета-галактозидаза, или ацетилхолинестераза; примери за подходящи комплекси на простетични групи включват стрептавидин/биотин и авидин/биотин; примери за подходящи флуоресцентни продукти, включително умбелиферон, флуоресцеин, флуоресцеин изотиоцианат, родамин, дихлоротриазиниламин флуоресцеин, дансил хлорид, или фикоеритрин; примери за луминесцентни продукти включват луминол; и примери за подходящи радиоактивни продукти включват ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S или ^3H .

Алтернативно на белязаното антителило, антигена(и) могат да се изследват в биологични течности чрез конкурентно радиоимунно изследване, при използване на антигенни стандартни образци, белязани с вещество за откриване и небелязано антителило с двойна специфичност, специфично за антигена(ите). При това изследване биологичната проба, белязаните антигенни стандартни образци, и антителилото с двойна специфичност се комбинират, и се определя количеството маркиран антиген стандартен образец, свързан към немаркираното антителило. Количеството на антигена в биологичната проба е обратно пропорционално на количеството маркиран антиген стандартен образец, свързан към немаркираното антителило.

При един предпочитан вариант за изпълнение, антителилото с двойна специфичност специфично разпознава IL-1 алфа и IL-1 бета, и се използват горните методи на определяне, за да се определят IL-1 алфа и/или IL-1 бета. В съответствие, изобретението предоставя освен това метод за определяне на IL-1 алфа или IL-1 бета в биологична проба или тъкан, който включва привеждане в контакт на биологична проба или тъкан, за които се предполага, че съдържат IL-1 алфа или IL-1 бета с антителило с двойна специфичност, или антиген-свързващ негов

участък, съгласно изобретението, и се определя IL-1 алфа или IL-1 бета, в биологична проба или тъкан. Биологичната проба може да е, например, *in vitro* проба, като клетъчна проба, тъканна, или телесна течност (например, кръв, плазма, урина, слюнка и други). Освен това, откритата тъкан може да е тъкан, която *in vivo* е локализирана в субект, например, тъкан, която е визуализирана чрез *in vivo* изображение на тъканта (например, използвайки белязано антителило).

Антителата с двойна специфичност съгласно изобретението също така могат да се използват за диагностични цели. Съгласно един вариант за изпълнение, антителило съгласно изобретението се използва в диагностично изследване *in vitro*, като при лабораторен тест за откриване на антиген(и) представляващ(и) интерес, или като тест за безопасност, за откриване на антиген(и) представляващ(и) интерес. Примери за вече установени *in vitro* изследвания, използващи антитела, включват ELISAs, RIAs, Western blots и други подобни. При един друг вариант за изпълнение, антителилото съгласно изобретението се използва за диагностично изследване *in vivo*, като *in vivo* тест за изображение. Например, антителилото може да бъде маркирано с вещество за откриване, което може да бъде открито *in vivo*, маркираното антителило може да се приложи на субект, и белязаното антителило може да се открие *in vivo*, като по този начин се позволява *in vivo* изображение.

Антителата с двойна специфичност съгласно изобретението, които специфично разпознава IL-1 алфа и IL-1 бета, могат да се използват при диагностично изследване за откриване на IL-1 алфа и/или IL-1 бета, за диагностични цели, например, при голям брой инфекциозни заболявания и нарушения, така както и при спонтанна резорбция на зародиши. С оглед специфичните видове заболявания и нарушения, анти-IL-1 алфа/IL-1 бета антителата с двойна специфичност съгласно изобретението могат да се използват за диагностични цели в което и да е от тук описаните заболявания/нарушения с оглед терапевтичното използване на такива антитела (виж по-долу), като нарушения, при които се определя IL-1 активност, разисквано по-долу.

Антителата с двойна специфичност и участъци на антитела съгласно изобретението са способни да неутрализират, както *in vitro*, така и *in*

vivo, активността на антигените, към които се свързват. В съответствие такива антители и участъци на антитела съгласно изобретението могат да се използват за инхибиране на активността на антигените, например, в клетъчна култура, съдържаща антигени, или при хора, или при други бозайници, притежаващи антигени, с които реагира антитялото с двойна специфичност съгласно изобретението. При един вариант за изпълнение изобретението предоставя метод за инхибиране на антигенна активност, който включва привеждане в контакт на антигена с антитяло с двойна специфичност, или участъци на антитяло съгласно изобретението, така че да се инхибира антигенната активност. При един предпочитан вариант за изпълнение антитялото с двойна специфичност свързва IL-1алфа и IL-1бета, и методът е метод за инхибиране на IL-1алфа и/или IL-1бета активност чрез привеждане в контакт на IL-1алфа и/или IL-1бета с антитялото с двойна специфичност, или негови участъци. IL-1алфа и/или IL-1бета активността може да се инхибира, например, *in vitro*. Например, в клетъчна култура, съдържаща, или за която се подозира, че съдържа IL-1алфа и/или IL-1бета, антитяло, или участък от антитяло съгласно изобретението, може да се добави към културалната среда, за да инхибира IL-1алфа и/или IL-1бета активността на културата. Алтернативно, IL-1алфа и/или IL-1бета активността може да се инхибира *in vivo* при субект.

При един вариант за изпълнение изобретението предоставя метод за инхибиране на антигенна активност при субект, страдащ от нарушение, при което тази антигенна активност е вредна. Изобретението предоставя методи за инхибиране на антигенна активност при субект, страдащ от такова нарушение, който метод включва прилагане върху субекта на антитяло с двойна специфичност, или участък от антитяло съгласно изобретението, така че да се инхибира антигенната активност в субекта. За предпочитане антигенът е човешки антиген, а субектът е човек. Антитяло съгласно изобретението може да се приложи върху човек за терапевтични цели. Освен това, антитяло съгласно изобретението може да се приложи на бозайник, който не е човек, който експресира антиген, с който се свързва антитялото, за ветеринарни цели, или като животински модел на заболяване при хората. С оглед

последното, такива животински модели могат да се използват за оценяване на терапевтичната ефикасност на антителата съгласно изобретението (например, тестване на дози и време за провеждане на курс за лечение).

За предпочитане, антитялото с двойна специфичност свързва IL-1алфа и IL-1бета, и методът за инхибиране на антигенна активност в субект е метод за инхибиране на IL-1 активност в субект, например, в субект, страдащ от нарушение, при което IL-1 активността е вредна. Както се използва в настоящото терминът "нарушение, при което IL-1 активността е вредна" се счита, че включва заболявания и други нарушения, при които е показано, или се предполага, че присъствието на IL-1 (който включва както IL-1алфа, така и IL-1бета) в субект, страдащ от нарушението, е отговорно за патофизиологията на нарушението, или е фактор, който спомага за влошаването на нарушението. В съответствие, нарушение, при което IL-1 активността е вредна, е нарушение, при което инхибирането на IL-1 активността (едното, или и двете от IL-1алфа, и IL-1бета), се очаква да облекчи симптомите и/или прогресирането на нарушението. Такива нарушения могат да бъдат установени, например, чрез повишаване на концентрацията на IL-1 в биологична течност на субект, страдащ от нарушението (например, повишаване на концентрацията на IL-1 в серум, плазма, синовиална течност и т.н. на субекта), която може да се установи, например, при използване на анти-IL-1 антитяло, както е описано по-горе.

Интерлевкин 1 играе критична роля в патология, асоциирана с множество заболявания, обхващащи имунни и възпалителни елементи. Тези заболявания включват, но без да се ограничават до, ревматоиден артрит, остеоартрит, младежки хроничен артрит, артрит на Луме, псориазисен артрит, реактивен артрит, спондилоартропатия, системен еритоматозен лупус, болест на Крон, язвен колит, възпалително заболяване на червата, инсулин зависим диабет, тироидит, астма, алергични болести, псориазис, дерматит на склеродермата, болест *graft versus host*, отхвърляне на трансплантирани органи, остро, или хронично имунно заболяване, асоциирано с трансплантация на органи, саркоидоза, атеросклероза, дисеминирана вътресъдова

коагулация, болест на Kawasaki, болест на Grave, нефротичен синдром, синдром на хронична умора, грануломатоза на Wegener, Henoch-Schoenlein purpurea, микроскопични васкулити на бъбреците, хроничен активен хепатит, увеит, септичен шок, синдром на токсичен шок, синдром на сепсис, кахексия, инфекциозни заболявания, паразитни заболявания, синдром на придобита имунна недостатъчност, остър трансверсален миелит, хорея на Huntington, болест на Паркинсон, болест на Алцхаймер, удар, първична цироза на жлъчката, хемолитична анемия, злокачествени болести, слабо сърце, инфаркт на миокарда, болест на Addison, спорадично заболяване, полигландуларна недостатъчност от тип I и полигландуларна недостатъчност от тип II, синдром на Шмид, синдром на остро респираторно страдание (при възрастни), алоpecia, алоpecia ареата, серонегативна артопатия, артопатия, болест на Reiter, псориазисна артропатия, артропатия с язвен колит, ентеропатичен синовит, хламидия, артропатия асоциирана с иерсиния и салмонела, спондилоартропатия, атероматозно заболяване/артериосклероза, atopична алергия, автоимунно булозно (мехурчесто) заболяване, пемфигус вулгарис, пемфигоид, линейна IgA заболяване, автоимунна хемолитична анемия, позитивна хемолитична анемия на Coombs, придобита злокачествена анемия, младежка злокачествена анемия, миалгичен енцефалит/Royal Free Disease, кандидомикоза на кожата и слизестите ципи, артерит на гигантски клетки, първичен склерозиращ хепатит, криптогенен автоимунен хепатит, болест на синдром на придобита имунна недостатъчност, болести свързани с придобита имунна недостатъчност, хепатит C, обща изменена имунонедостатъчност (обща променлива хипогамаглобулинемия), разширена кардиомиопатия, безплодие у жените, отслабване на яйчниците, преждевременно отслабване на яйчниците, фиброзно заболяване на белите дробове, криптогенен фиброзираш алвеолит, следвъзпалително интерстициално заболяване на белите дробове, интерстициален пневмонит, заболяване на белите дробове асоциирано със заболяване на съединителната тъкан, заболяване на белите дробове асоциирано със заболяване на смесена съединителна тъкан, интерстициално заболяване на белите дробове асоциирано със системна склероза, интерстициално заболяване на белите дробове асоциирано с ревматоиден артрит, заболяване на белите дробове асоциирано със системен еритематозен лупус, заболяване на белите дробове асоциирано с анкилозиращ спондилит (болест на Бехтерев), дифузно васкуларно заболяване на белите дробове, заболяване на белите дробове асоциирано с хемосидероза, интерстициално заболяване на белите дробове индуцирано от лекарствени средства, радиационна фиброза, облитериращ бронхиолит, хронична еозинофилна пневмония, лимфоцитно инфилтрационно заболяване на белите дробове, постинфекционно интерстициално заболяване на белите дробове, подагричен артрит, автоимунен хепатит, тип-1 автоимунен хепатит (класически автоимунен, или лупоиден хепатит), тип-2 автоимунен хепатит (анти-LKM анти тяло хепатит), автоимунно медирана хипогликемия, тип В устойчивост на инсулин с папиларопигментна дистрофия на кожата, хипопаратироидизъм, остро имунно заболяване асоциирано с трансплантация на органи, хронично имунно заболяване асоциирано с трансплантация на органи, остеоартроза, първичен склерозиращ холангит, псориазис тип 1, псориазис тип 2, идиопатична левкопения, автоимунна неутропения, NOS бъбречно заболяване, гломерулонефритиди, бъбречен микроскопичен васкулит, лаймска болест, дискоиден еритематозен лупус, идиопатично, или NOS безплодие у мъжете, автоимунитет на спермата, мултипленна склероза (всички подвидове), симпатикова офталмия, пулмонарна хипертония вторична вследствие на заболяване на съединителна тъкан, синдром на Goodpasture, пулмонарна проява на нодозен полиартерит, остра ревматична треска, ревматоиден спондилит, болест на Still, системна склероза, синдром на Sjorgen, болест на Takayasu/артерит, автоимунна тромбоцитопения, идиопатична тромбоцитопения, автоимунно тироидно заболяване, хипертиреоидизъм, автоимунна хипотириоидна гуша (болест на Hashimoto), атрофична автоимунен хипертиреоидизъм, първична миксодема, факогенен увеит, първичен васкулит, витилиго, заболяване на централната нервна система (например, депресия, шизофрения, Алцхаймер, Паркинсон и т.н.), остра и хронична болка, и липиден дисбаланс. Човешките антитела и участъци на антитела съгласно изобретението, могат да се използват за

лечение на хора, страдащи от автоимунни заболявания, по-специално асоциираните с възпаление болести, включително ревматоиден спондилит, алергия, автоимунен диабет, автоимунен увеит.

За предпочитане, антителата с двойна специфичност IL-алфа/IL-1бета съгласно изобретението, или антиген-свързващи техни участъци, се използват за лечение на ревматоиден артрит, на болестта на Крон, на мултипла склероза, на инсулин зависим диабет, захарна болест и псориазис.

Антитяло с двойна специфичност IL-алфа/IL-1бета или участък от антитяло, съгласно изобретението, също така може да се прилага с едно, или повече терапевтични средства, използвани при лечението на автоимунни и възпалителни заболявания.

Антителата съгласно изобретението, или антиген-свързващи техни участъци, могат да се използват самостоятелно, или в комбинация, за лечение на такива заболявания. Трябва да се разбере, че антителата съгласно изобретението, или антиген-свързващи техни участъци могат да се използват самостоятелно, или в комбинация с допълнително средство, например, терапевтично средство, допълнително средство, което се избира от лекуващия лекар за постигане на определена цел. Например допълнително средство може да е терапевтично средство, признато в областта на техниката като такова, което е полезно при лечение на заболяванията, или състоянията, които се лекуват от антитялото съгласно изобретението. Допълнително средство може, също така, да е средство, което придава благоприятен атрибут на терапевтичния състав, например, средство, което влияе на вискозитета на състава.

Трябва също така да се разбере, че комбинациите, които трябва да се включат в това изобретение са тези комбинации, които са полезни за постигане на определените за тях цели. Средствата, посочени по-долу са илюстративни за целите, и не са предназначени да са ограничаващи. Комбинациите, които са част от това изобретение, могат да са антителата съгласно изобретението, и най-малко едно допълнително средство, избрано от изброените по-долу. Комбинацията може, също така, да включва повече от едно допълнително средство, например,

две, или три допълнителни средства, ако комбинацията е такава, че образуваният състав може да изпълни предназначения си функции.

Предпочитани комбинации е(са) нестероидно(и) и противовъзпалително(и) лекарство(а), също така наричани като NSAIDS, които включват лекарства като ибупрофен и COX-2 инхибитори. Други предпочитани комбинации са кортикостероиди, включващи преднизолон; добре известните странични ефекти при използване на стероид могат да се намалят, или даже да се елиминират чрез стесняване на необходимата стероидна доза, когато се лекуват пациенти в комбинация с анти-IL-1 антителата съгласно това изобретение. Неограничаващи примери на терапевтични средства за ревматоиден артрит, с които антитяло, или участък от антитяло съгласно изобретението, може да се комбинира, включват следните: цитокин супресиращо(и) и противовъзпалително(и) лекарство(а) (CSAIDs); антитела за, или антагонисти на други човешки цитокини, или растежни фактори, например, TNF, LT, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF и PDGF. Антителата съгласно изобретението, или антиген-свързващи техни участъци, могат да се комбинират с антитела на молекули от клетъчната повърхност, такива като CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90, или техни лиганди, включващи CD154 (dp39, или CD40L).

Предпочитани комбинации на терапевтични средства могат да интерферираят като различни точки в автоимунната и последващата възпалителна каскада; предпочитаните примери включват TNF антагонисти като химерни, хуманизирани, или човешки TNF антитела, D2E7, (PCT Publication WO 1997/029131), CA2 (Remicade™), CDP 571, CDP 870, Талидамид и разтворими p55, или p75 TNF рецептори, техни производни (p75TNFRlgG (Enbrel™), или p55TNFRlgG (Lenercept), и също така инхибитори на TNFалфа конвертиращ ензим (TACE); подобни на IL-1 инхибитори на (интерлевкин-1-конвертиращ ензим, IL-1RA и т.н.) могат да бъдат ефективни поради същата причина. Други предпочитани комбинации включват интерлевкин 11. И още една предпочитана комбинация е друг играещ ключова роля в автоимунния

отговор, който може да действа успоредно на, в зависимост от, или в съгласие с IL-1 функция; особено предпочитани са IL-12 и/или IL-18 антагонисти, включващи IL-12 и/или IL-18 антитела, или разтворими IL-12 и/или IL-18 рецептори, или IL-12 и/или IL-18 свързващи протеини. Показано е, че IL-12 и IL-18 имат припокриващи се, но различни функции, и комбинации на антагонисти с двата могат да бъдат най-ефективни. И още една предпочитана комбинация са неизчерпващи анти-CD4 инхибитори. И още една предпочитана комбинация включва антагонисти на ко-стимулаторния биосинтетичен път CD80 (B7.1), или CD86 (B7.2) включващи антитела, разтворими рецептори, или антагонистични лиганди.

Антителата съгласно изобретението, или антиген-свързващи техни участъци, могат също така да се комбинират със средства, такива като метотрексат, 6-MP, азатиоприн сулфасалазин, мезалазин, олсалазин, хлорохинин/хидрокси-хлорокин, пенициламин, ауротиомалат (интра-мускулно и орално), азатиоприн, кохицин, кортикостероиди (орално, инхалирани и локално инжектиране), бета-2-адренорецептор агонисти (салбуматол, тербуталин, салметерал), ксантини (теофилин, аминофиллин), хромогликат, недокромил, кетотифен, ипратропиум и окситропиум, циклоспорин, FK506, рапамицин, микофенолат мотетил, лефлуномид, NSAIDs, например, ибупрофен, кортикостероиди, такива като преднизолон, фосфодиестераза инхибитори, аденозин агонисти, антитромбоцитни средства, комплемент инхибитори, адренергични средства, средства, които интерферират, като сигнализируют чрез проинфламаторни цитокини, такива като TNF α , или IL-1 (например, IRAK, NIK, IKK, p38, или MAP киназа инхибитори), IL-1 β конвертиращ ензим инхибитори, TNF α конвертиращ ензим (TACE) инхибитори, Т-клетъчни сигнализиращи инхибитори, такива като киназа инхибитори, металопротеиназа инхибитори, сулфасалазин, азатиоприн, 6-меркаптопурины, ангиотенсин конвертиращ ензим инхибитори, рецептори на разтворим цитокин и негови производни (например, разтворим p55, или p75 TNF рецептори и производните p75TNFR1gG (Enbrel™ и p55TNFR1gG (Lenercept)), sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R) и противовъзпалителни цитокини (например, IL-4, IL-

10, IL-11, IL-13, и TGF β). Предпочитани комбинации включват метотрексат, или лефлуномид и в случаи на умерени, или тежки ревматоидни артрити, циклоспорин.

Неограничаващи примери на терапевтични средства за възпалителни заболявания на червата, с които антитяло, или участък от антитяло съгласно изобретението, може да се комбинира, включват следните: буденозид; епидермален растежен фактор; кортикостероиди; циклоспорин, сулфасалазин; аminosалицилати; 6-меркаптопурин; азатиоприн; метронидазол; липоксигеназа инхибитори; мезаламин; олсалазин; балсалазид; антиоксиданти; тромбосан инхибитори; антагонисти на IL-1 рецептор; анти-IL-1 β моноклонални антитела; анти-IL-6 моноклонални антитела; растежни фактори; инхибитори на еластаза; пиридинил-имидазолови съединения; антитела на, или антагонисти за други човешки цитокини, или растежни фактори, например, TNF, LT, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF и PDGF. Антитела съгласно изобретението, или антиген-свързващи техни участъци могат да се комбинират с антитела на молекули от клетъчната повърхност, такива като CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90, или техни лиганди. Антителата съгласно изобретението, или антиген-свързващите техни участъци, могат също така да се комбинират със средства, такива като метотрексат, циклоспорин, FK506, рапамицин, микофенолат мотетил, лефлуномид, NSAIDs, например, ибупрофен, кортикостероиди, такива като преднизолон, инхибитори на фосфодиестераза, агонисти на аденозин, антитромбоцитни средства, инхибитори на комплемента, адренергични средства, средства, които интерферират, като сигнализируют чрез проинфламаторни цитокини, такива като TNF α , или IL-1 (например, IRAK, NIK, IKK, p38 или MAP киназа инхибитори), инхибитори на IL-1 β конвертиращ ензим, инхибитори на TNF α конвертиращ ензим, инхибитори на сигнала на Т-клетките, такива като инхибитори на киназа, инхибитори на металопротеиназа, сулфасалазин, азатиоприн, 6-меркаптопурины, инхибитори на ангиотенсин конвертиращ ензим, рецептори на разтворим цитокин и негови производни (например, разтворим p55, или p75 TNF рецептори, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R) и проти-

вовъзпалителни цитокини (например, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 и TGFбета).

Предпочитани примери на терапевтични средства за болест на Крон, в които едно анти тяло, или антиген-свързваща участък от анти тяло може да се комбинира, включват следните: TNF антагонисти, например, анти-TNF анти тела, D2E7, (PCT Publication WO 1997/029131), CA2 (Remicade™), CDP 571, TNFR-Ig структури (p75TNFRIgG (Enbrel™), и p55TNFRIgG (Lenercept) инхибитори, и PDE4 инхибитори. Анти тела, или антиген-свързващи техни участъци съгласно изобретението, или антиген-свързващи техни участъци, могат да се комбинират с кортикостероиди, например, буденозид и дексаметазон. Анти тела съгласно изобретението, или антиген-свързващи техни участъци, могат също така да се комбинират със средства, такива като сулфасалазин, 5-аминосалицилова киселина и олсалазин, и със средства, които интерферират със синтеза, или с действие на проинфламаторни цитокини, такива като IL-1, например, инхибитори на IL-1бета конвертиращ ензим и IL-1га. Анти тела съгласно изобретението, или антиген-свързващи техни участъци, могат също така да се използват с инхибитори на сигнала на Т-клетките, например, 6-меркаптопурины като инхибитори на тирозинкиназа. Анти тела съгласно изобретението, или антиген-свързващи техни участъци, могат да се комбинират с IL-11.

Неограничаващи примери на терапевтични средства за мултиплена склероза, с които анти тяло, или участък от анти тяло съгласно изобретението, може да се комбинира, включват следните: преднизолон; метилпреднизолон; азатиоприн; циклофосфамид; циклоспорин; метотрексат; 4-аминопиридин; тизанидин; интерферон-бета1а (авонекс; биоген); интерферон-бета1b (бетасерон; хирон/берлекс); съполимер 1 (cop-1; копаксон; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); хипербарен кислород; интравенозен имуноглобулин; клабрибин; анти тела на, или антагонисти на други човешки цитокини, или растежни фактори, например, TNF, LT, IL-2, IL-6, IL-7, IL8, IL-12, IL15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF и PDGF. Анти тела съгласно изобретението, или антиген-свързващи техни участъци, могат да се комбинират с анти тела на молекули от клетъчната повърхност, такива като CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45,

CD45, CD69, CD86, CD90, или техни лиганди. Анти телата съгласно изобретението, или антиген-свързващите техни участъци могат също така да се комбинират със средства, такива като метотрексат, циклоспорин, FK506, рапамицин, микофенолат мофетил, лефлуномид, NSAIDs, например, ибупрофен, COX-2 инхибитори, кортикостероиди, такива като преднизолон, инхибитори на фосфодиестераза, агонисти на аденозин, анти тромбоцитни средства, инхибитори на комплемента, адренергични средства, средства, които интерферират, като сигнализируют чрез проинфламаторни цитокини, такива като TNFалфа, или IL-1 (например, IRAK, NIK, IKK, p38, или MAP киназа инхибитори), инхибитори на IL-1бета конвертиращ ензим, TACE инхибитори, инхибитори на сигнала Т-клетките, такива като инхибитори на киназа, инхибитори на металопротеиназа, сулфасалазин, азатиоприн, 6-меркапто-пурины, инхибитори на ангиотенсин конвертиращ ензим, рецептори на разтворим цитокин и техни производни (например, разтворим p55, или p75 TNF рецептори, sIL-1RI, sIL-1RII, sUL-6R) и противовъзпалителни цитокини (например, IL-4, IL-10, IL-13 и TGFбета).

Предпочитани примери на терапевтични средства за мултиплена склероза, в които анти тялото, или антиген-свързващия негов участък, могат да се комбинират така, че да включват интерферон-бета, например, IFNбета1а и IFNбета1b; копаксон, кортикостероиди, IL-1 инхибитори, TNF инхибитори, и анти тела към CD40 лиганда и CD80.

Фармацевтичните състави съгласно изобретението могат да включват “терапевтично ефективно количество”, или “профилактично ефективно количество” от анти тяло, или участък от анти тяло съгласно изобретението. “Терапевтично ефективно количество” се отнася до ефективно количество, при необходимости дозирания и периоди от време, за постигане на желания терапевтичен резултат. Терапевтично ефективно количество от анти тяло, или участък от анти тяло може да варира в зависимост от фактори, такива като състояние на заболяването, възраст, пол, и тегло на индивида, и способността на анти тялото, или на участъкът от анти тяло да извлича желан отговор в индивида. Терапевтично ефективно количество е също така това, при което каквато и да е токсичност,

или вредни ефекти на анти тялото, или на участъците от анти тяло се превишават от терапевтично благоприятните ефекти. "Профилактично ефективно количество" се отнася до ефективно количество, при необходими дозирания и периоди от време, за постигане на желания профилактичен резултат. Характерно, профилактична доза се използва при субект преди, или на поранен етап на заболяване, профилактично ефективното количество трябва да бъде по-малко от терапевтично ефективното количество.

Схемите на дозиране могат да се регулират така, че да се осигури оптималния желан отговор (например, терапевтичен, или профилактичен отговор). Например, може да се приложи единична голяма таблетка, могат да се приложат няколко отделни форми за единично дозиране за определено време, или дозата може пропорционално да се намали, или да се повиши, както се посочва от изискванията на терапевтичната ситуация. Особено благоприятно е да се приготвят парентерални състави в единични форми за еднократно дозиране за лесно приложение и еднообразие на дозирането. Единични форми за еднократно дозиране, както се използват тук, се отнасят до физически дискретни единици, подходящи като единни дози за субекти бозайници, които трябва да се лекуват; всяка една единица съдържа предварително определено количество от активно съединение, изчислено да продуцира желания терапевтичен ефект, заедно с необходимия фармацевтичен носител. Специфицирането за единичните форми за еднократно дозиране съгласно изобретението са продиктувани от, и директно зависят от (а) уникалните характеристики на активното съединение, и от специалния терапевтичен, или профилактичен ефект, който трябва да се постигне, и (б) от присъщото ограничение в областта на техниката при получаването на такова активно съединение за лечението на чувствителност у индивиди.

Един примерен, неограничаващ обхват на терапевтично, или профилактично ефективно количество от анти тяло, или участък от анти тяло съгласно изобретението е 0,1 - 20 mg/kg, по-предпочитано 1-10 mg/kg. Трябва да се отбележи, че стойностите на дозите могат да варират в зависимост от вида и от това колко тежко е състоянието, което трябва да се облекчи. Трябва да се отбележи, освен това, че за всеки един

специален субект, трябва да се регулират специфични схеми на дозиране за определено време, съгласно необходимостта на индивида, и от професионалната преценка на лицето, което прилага, или наблюдаващо прилагането на съставите, и че обхватите на дозиране, посочени тук са само примерни, и не са предназначени да ограничават обхвата, или практиката на защитения състав.

Настоящото изобретение също така се илюстрира посредством следващите примери, които не представляват ограничение по никакъв начин. Съдържанието на всички цитирани справки, включително литературни справки, издадени патенти, и публикувани патентни заявки, както се цитират в това описание, са специално включени за справка.

Примери за изпълнение на изобретението

Пример 1. Проектиране антиген с двойна специфичност на базата на съседна топологична област на идентичност

В този пример, най-голямата съседна топологична област на идентичност между два различни, но структурно свързани протеина, IL-1α и IL-1β, се определя като основа за проектиране на антиген с двойна специфичност, за добиване на антитела с двойна специфичност към IL-1α и IL-1β. Използва се BLAST алгоритъма, за сравняване на двата протеина, и се предоставя един за измерване на тенденцията на един остатък да замести друг, в подобна структурни, или функционални области. Този анализ дава възможност за идентифицирането на най-голямата съседна топологична област на идентичност между IL-1α и IL-1β, и да се изтегли тази област с които и да са разумни интервали на подобие, за да се създаде линеен пептид, който служи като антиген с двойна специфичност. Пептидът, който най-добре отговаря на тези критерии има аминокиселинна последователност, както следва:

NEAQNITDF (SEQ ID NO: 1)

* ****

Звездичката (*) посочва идентични остатъци в двата протеина, а другите остатъци са много подобни съгласно BLAST алгоритъма. Например, лизин често ще замества аргинин в хомоложни протеини, но не фенилаланин. Този пептид на SEQ ID NO: 1 е хибрид, взет от две

различни секции на структурите, които се пропускат в противоположни посоки, така друго разумно представяне на този епитоп е:

DNRdAdQNITDF

(където префиксът "d" показва, че аминокиселинният остатък е D аминокиселинен остатък). И двете, и версията на L аминокиселина на пептида, и версията на частично заместени D аминокиселинни остатъци се синтезират чрез стандартни химични методи. След това пептида се присъединява към протеин носител (например, KLH, или албумин), и присъединения пептид се използва за избор на антитела чрез *in vitro*, или *in vivo* методи.

Пример 2. Проектиране на антиген с двойна специфичност на базата на цикличен пептид, който подражава бримка на обичайно нагъване

В този пример, цикличен пептид, който структурно подражава ключова бримка на обичайно нагъване между два различни, но структурно свързани протеина, IL-1α и IL-1β, се конструира за използване като антиген с двойна специфичност, за добиване на антитела с двойна специфичност към IL-1α и IL-1β. Избраната бримка представлява остатъци 168-184 на IL-1α и остатъци 160-176 на IL-1β. Консенсус последователността е:

Цикло-MAFLRANQNNGKISVAL (PG) (SEQ ID NO: 2)

*cbccccccs**c*b*

Звездичката (*) посочва идентични остатъци между IL-1α и IL-1β, с посочва консенсусни остатъци, тоест, остатъци, подобни на IL-1α и IL-1β, но не присъстващи актуално на това местоположение в един от двата протеина, а b посочва, че няма ясен консенсусен остатък, така че се запазва идентичността на IL-1β последователност. Линейният пептид се синтезира чрез стандартни химични методи. За циклизирането на този пептид се прибавят пролинов и глицинов остатък. Цикличният пептид може да се синтезира, като се използват условия за присъединяване при голямо разреждане на N,N-диметилформамид (1 mg/ml). Протичат прототипни реакции при стайна температура, използвайки излишък от присъединяващ реактив, такъв като бензотриазол-1-ил-окси-трис-пиридино-фосфониев хексафлуоро фосфат (PyBOP; 2 eq) и натриев бикарбонат (10 eq). След това пептида се конюгира към носител протеин (например, KLH, 50

или албумин), и конюгирания пептид се използва, за да се изберат антитела чрез *in vitro* или *in vivo* методи.

Пример 3. Проектиране на антиген с двойна специфичност на базата на хибриден пептид.

В този пример хибриден пептид, който включва променливи, или припокриващи се последователности от два различни, но структурно свързани протеина, IL-1α и IL-1β, се конструира за използване като антиген с двойна специфичност, за добиване на антитела с двойна специфичност към IL-1α и IL-1β. За да се създаде хибридният пептид, променливи и припокриващи се аминокиселинни последователности на IL-1α и IL-1β се идентифицират, и се снаждат заедно, за да се генерира следния пептид:

TKGGQDITDFQILENQ (SEQ ID No: 3)

bbbbbbbbbb

aaaaaaaaa

a-тата и b-тата посочват кой протеин е източникът на остатъците (a = IL-1α; b = IL-1β). ITDF (SEQ ID No: 4) мотива, общ за двата протеина, се включва в хибридният пептид. Освен това, този хибриден пептид фокусира върху последователности от карбокси термини на двата протеина, за които е известно, че антигенни за неутрализиращи антитела в двата протеина. Хибридният пептид се синтезира посредством стандартни химически синтетични методи. След това пептидът се конюгира към носител протеин (например, KLH, или албумин), и конюгирания пептид се използва, за да се изберат антитела чрез *in vitro*, или *in vivo* методи.

Пример 4. Генериране на антитела с двойна специфичност към IL-1α и IL-1β.

NEAQNITDF (SEQ ID NO: 1)

Цикло-MAFLRANQNNGKISVAL (PG) (SEQ ID NO: 2)

TKGGQDITDFQILENQ (SEQ ID NO: 3)

Пептиди SEQ ID NO: 1, 2 и 3 се конюгира с KLH и се имунизират отделни зайци. Антисерум от зайци, имунизирани с всеки един от трите пептида, показва добър отговор на антиген срещу пептида, използван като антиген. Обаче, само антисерум от заек, имунизиран с пептид на SEQ ID NO: 3 е способен да свърже IL-1α и IL-1β протеин.

Пет мишки (BA119 - BA123) се имунизират подкожно с пептид на SEQ ID NO: 3, коню-

гиран с KLH плюс непълна добавка на Freund (FIA), веднъж на всеки три седмици общо три пъти, последвано от две интравенозни усилвания с пептид SEQ ID NO: 3, конюгиран с KLH. На всяка мишка се взима кръв 10 дни след всяка имунизация, и титъра на антителата се определя посредством ELISA. Клетки от далек на мишки BA119 и BA123 съответно, се сливат с клетъчна линия миелома P3X36Ag8.653, както се описва в раздел IIA, и получените слети клетки се посяват при една клетка на ямка, в някол-

ко 96-ямкови блюда, използвайки ограничаващо разреждане. Хибридомни клонове, които прерастват, първо се изследват за продуциране на IgG и IgM, чрез стандартно ELISA, за да се идентифицират антитела-продуциращи клона. Изолират се общо 945 клона от сливане на мишки #BA123. Супернатантата от 355 клони, изследвани с ELISA, показват антиген свързваща активност към IL-1 алфа, IL-1 бета, или и за двата IL-1 алфа и IL-1 бета.

# на клона	Специфичност на антиген (срещу IL-1 α и/или IL-1 β с цяла дължина)	Изотоп
249	само IL-1 α	IgG
19	само IL-1 α	IgM
15	само IL-1 β	IgG
2	само IL-1 β	IgM
57	IL-1 α и β	IgG
13	IL-1 α и β	IgM

Еквиваленти

Специалистите в областта на техниката познават, или са в състояние да установят, използвайки само рутинен експеримент, повече еквиваленти към специфичните варианти за изпълнение на изобретението, описани тук. Такива еквиваленти се обхващат от следващите патентни претенции.

Патентни претенции

1. Метод за получаване на двойно специфично анти тяло или негова антиген-свързваща част, което специфично свързва два различни, но структурно сродни белтъка, характеризиращ се с това, че включва: осигуряване на антиген, аранжиран на базата на специфичен сплайсинг на припокриващи се части от два различни, но структурно сродни белтъка, за създаване на хиб-

риден пептид, като въпросният пептид има структура X-Y-Z, където Y представлява регион на идентичност или силно подобие между два сродни белтъка, X представлява регион от единия от сродните белтъци и Z представлява регион от другия от сродните белтъци; експониране на пул от антитела на антигена; и подбор от пула на анти тяло, което специфично свързва два различни, но структурно сродни белтъка, за получаване на двойно специфичното анти тяло.

2. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че пулт от антитела се експонира на антигена *in vivo* чрез имунизирание на нехуманоидно животно с антигена.

3. Метод съгласно претенция 2, характеризиращ се с това, че се изготвя панел от хибриди от лимфоцити на животното и се подбира хибридома, която секретира анти тяло, което специфично свързва две различни, но структур-

но сродни молекули.

4. Метод съгласно претенция 2, характеризиращ се с това, че животното е избрано от група, състояща се от мишки, плъхове, зайци и кози.

5. Метод съгласно претенция 2, характеризиращ се с това, че животното е нокаут мишка, дефицитна по ендогенната версия на антигена.

6. Метод съгласно претенция 2, характеризиращ се с това, че животното е мишка, която е трансгенна по гените за човешки имуноглобулин, така че мишката синтезира човешки антитела при антигенна стимулация.

7. Метод съгласно претенция 2, характеризиращ се с това, че животното е мишка с остра комбинирана имунна недостатъчност (ОКИН), която се възстановява с помощта на човешки мононуклеарни клетки от периферна кръв или лимфоидни клетки или техни предшественици.

8. Метод съгласно претенция 2, характеризиращ се с това, че животното е мишка, която е третирана с летална като цяло за тялото радиация, последвано от радиозащита с клетки от костен мозък на мишка с остра комбинирана имунна недостатъчност (ОКИН), последвано от присаждане на функционални човешки лимфоцити.

9. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че пултът от антитела се експонира на антигена *in vitro* чрез скриниране на библиотека от рекомбинантни антитела с антигена.

10. Метод съгласно претенция 9, характеризиращ се с това, че библиотеката от рекомбинантни антитела се експресираща по повърхността на бактериофаг.

11. Метод съгласно претенция 9, характеризиращ се с това, че библиотеката от рекомбинантни антитела се експресираща по повърхността на дрождева клетка.

12. Метод съгласно претенция 9, характеризиращ се с това, че библиотеката от рекомбинантни антитела се експресираща по повърхността на бактериална клетка.

13. Метод съгласно претенция 9, характеризиращ се с това, че библиотеката от рекомбинантни антитела се експресираща като слети РНК-белтък.

14. Метод съгласно претенция 9, характеризиращ се с това, че библиотеката от рекомбинантни антитела е scFv библиотека или Fab

библиотека.

15. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че пултът от антитела се експонира на антигена чрез *in vivo* имунизирание на нехуманоидно животно с антигена, последвано от *in vitro* скрининг на библиотека от рекомбинантни антитела, изготвена от лимфоидни клетки на животното с антигена.

16. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че пултът от антитела се експонира на антигена чрез *in vivo* имунизирание на нехуманоидно животно с антигена, последвано от *in vitro* афинитетно зрееене на библиотеката от рекомбинантни антитела, изготвена от лимфоидни клетки на животното.

17. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че пултът от антитела се експонира на антигена чрез *in vivo* имунизирание на нехуманоидно животно с антигена, последвано от подбор на единични клетки, секретиращи антитела, които свързват антигена и получаване от единичните клетки на кДНК от тежко- и лековерижни вариабилни региони.

18. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че двойно-специфичното антитяло е изцяло човешко антитяло.

19. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че двойно-специфичното антитяло е химерно антитяло.

20. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че двойно-специфичното антитяло е CDR-присадено антитяло.

21. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че двата различни, но структурно сродни белтъка са интерлевкин-1 α и интерлевкин-1 β .

22. Метод съгласно претенция 21, характеризиращ се с това, че антигенът представлява аминокиселинна последователност TKGGQDITDFQILENQ (SEQ ID NO: 3).

23. Метод съгласно претенция 21, характеризиращ се с това, че пултът от антитела се експонира на антигена *in vivo* чрез имунизирание на нехуманоидно животно с антигена.

24. Метод съгласно претенция 23, характеризиращ се с това, че се изготвя панел от хибриди от лимфоцити на животното и се подбира хибридома, която секретира антитяло, което специфично свързва IL-1 α и IL-1 β .

25. Метод съгласно претенция 23, харак-

теризиращ се с това, че животното е избрано от група, състояща се от мишки, плъхове, зайци и кози.

26. Метод съгласно претенция 23, характеризиращ се с това, че животното е нокаут мишка, дефицитна по IL-1алфа, IL-1бета или едновременно по IL-1алфа и IL-1бета.

27. Метод съгласно претенция 23, характеризиращ се с това, че животното е мишка, която е трансгенна по гените за човешки имуноглобулин, така че мишката синтезира човешки антитела при антигенна стимулация.

28. Метод съгласно претенция 23, характеризиращ се с това, че животното е мишка с остра комбинирана имунна недостатъчност (ОКИН), която се възстановява с помощта на човешки моноклеарни клетки от периферна кръв или лимфоидни клетки или техни предшественици.

29. Метод съгласно претенция 23, характеризиращ се с това, че животното е мишка, която е третирана с летална като цяло за тялото радиация, последвано от радиозащита с клетки от костен мозък на мишка с остра комбинирана имунна недостатъчност (ОКИН), последвано от присаждане на функционални човешки лимфоцити или техни предшественици.

30. Метод съгласно претенция 21, характеризиращ се с това, че пулът от антитела се експонира на антигена *in vivo* чрез скриниране на библиотека от рекомбинантни антитела с антигена.

31. Метод съгласно претенция 30, характеризиращ се с това, че библиотеката от рекомбинантни антитела се експресира по повърхността на бактериофаг.

32. Метод съгласно претенция 30, характеризиращ се с това, че библиотеката от рекомбинантни антитела се експресира по повърхността на дрождева клетка.

33. Метод съгласно претенция 30, характеризиращ се с това, че библиотеката от рекомбинантни антитела се експресира по повърхността на бактериална клетка.

34. Метод съгласно претенция 30, характеризиращ се с това, че библиотеката от рекомбинантни антитела се експресира като слети РНК-белтък.

35. Метод съгласно претенция 30, характеризиращ се с това, че библиотеката от рекомбинантни антитела е scFv библиотека или Fab

библиотека.

36. Метод съгласно претенция 21, характеризиращ се с това, че пулът от антитела се експонира на антигена чрез *in vivo* имунизирание на животно с антигена, последвано от *in vitro* скрининг на библиотека от рекомбинантни антитела, изготвена от лимфоидни клетки на животното с антигена.

37. Метод съгласно претенция 21, характеризиращ се с това, че пулът от антитела се експонира на антигена чрез *in vivo* имунизирание на животно с антигена, последвано от *in vitro* афинитетно зреене на библиотеката от рекомбинантни антитела, изготвена от лимфоидни клетки на животното.

38. Метод съгласно претенция 21, характеризиращ се с това, че пулът от антитела се експонира на антигена чрез *in vivo* имунизирание на животно с антигена, последвано от подбор на единични клетки, секретирани антитела, които свързват антигена, и получаване от единичните клетки на кДНК от тежко- и лековерижни варианти региони.

39. Метод съгласно претенция 21, характеризиращ се с това, че двойно-специфичното антитяло е изцяло човешко антитяло.

40. Метод съгласно претенция 21, характеризиращ се с това, че двойно-специфичното антитяло е химерично антитяло.

41. Метод съгласно претенция 21, характеризиращ се с това, че двойно-специфичното антитяло е CDR-присадено антитяло.

42. Метод за получаване на двойно специфично антитяло, което специфично свързва интерлевкин-1алфа и интерлевкин-1бета, характеризиращ се с това, че включва: осигуряване на антиген с аминокиселинна последователност TKGGQDITDFQILENQ (SEQ ID NO: 3); експониране на пула от антитела на антигена; и подбор от пула на антитяло, което специфично свързва IL-1алфа и IL-1бета, за получаване на двойно специфичното антитяло, като въпросното двойно специфично антитяло не е изцяло мише антитяло.

43. Метод съгласно претенция 42, характеризиращ се с това, че антигенът е аранжиран на основата на непрекъсната топологична област на идентичност между IL-1алфа и IL-1бета.

44. Метод съгласно претенция 43, характеризиращ се с това, че антигенът е с аминокиселини

селинна последователност NEAQNITDF (SEQ ID NO: 1) или dNEdAdQNITDF.

45. Метод съгласно претенция 42, характеризира се с това, че антигенът е аранжиран на основата на структурна мимикрия на примката от общото за IL-1алфа и IL-1бета вгъване.

46. Метод съгласно претенция 45, характеризира се с това, че антигенът е цикличен пептид с аминокиселинна последователност Цикло-MAFLRANQNNGKISVAL(PG) (SEQ ID NO: 2).

47. Метод съгласно претенция 42, характеризира се с това, че антигенът е с аминокиселинна последователност

APVRSLNCTLRDSQKSLVMSGPY
E L K A L I I L Q G Q D M E Q Q V V F S M
G A Y K S S K D D A K I T V L L G L K
E K N L Y L S C V L K D D K P T L Q L E S V D P K N
Y P K K K M E K R F V F N K L E I N N K L E F E
S A Q F P N W Y I S T S Q A E N M P V F L G G T K G
G Q D I T D F T M Q F V S S (SEQ ID NO: 4).

48. Метод съгласно претенция 42, характеризира се с това, че пултът от антитела се експонира на антигена *in vivo* чрез имунизирание на животно с антигена.

49. Метод съгласно претенция 48, характеризира се с това, че се изготвя панел от хибридоми от лимфоцити на животното и се подбира хибридома, която секретира антитяло, което специфично свързва IL-1алфа и IL-1бета.

50. Метод съгласно претенция 48, характеризира се с това, че животното е избрано от група, състояща се от мишки, плъхове, зайци и кози.

51. Метод съгласно претенция 48, характеризира се с това, че животното е нокаут мишка, дефицитна по IL-1алфа, IL-1бета или едновременно по IL-1алфа и IL-1бета.

52. Метод съгласно претенция 48, характеризира се с това, че животното е мишка, която е трансгенна по гените за човешки имуноглобулин, така че мишката синтезира човешки антитела при антигенна стимулация.

53. Метод съгласно претенция 48, характеризира се с това, че животното е мишка с остра комбинирана имунна недостатъчност (ОКИН), която се възстановява с помощта на човешки моноклеарни клетки от периферна кръв или лимфоидни клетки или техни предшественици.

54. Метод съгласно претенция 48, характеризира се с това, че животното е мишка, която е третирана с летална за тялото като цяло радиация, последвано от радиозащита с клетки от костен мозък на мишка с остра комбинирана имунна недостатъчност (ОКИН), последвано от присаждане на функционални човешки лимфоцити или техни предшественици.

55. Метод съгласно претенция 42, характеризира се с това, че пултът от антитела се експонира на антигена *in vitro* чрез скриниране на библиотека от рекомбинантни антитела с антигена.

56. Метод съгласно претенция 55, характеризира се с това, че библиотеката от рекомбинантни антитела се експресира по повърхността на бактериофаг.

57. Метод съгласно претенция 55, характеризира се с това, че библиотеката от рекомбинантни антитела се експресира по повърхността на дрождева клетка.

58. Метод съгласно претенция 55, характеризира се с това, че библиотеката от рекомбинантни антитела се експресира по повърхността на бактериална клетка.

59. Метод съгласно претенция 55, характеризира се с това, че библиотеката от рекомбинантни антитела се експресира като слети РНК-белтък.

60. Метод съгласно претенция 55, характеризира се с това, че библиотеката от рекомбинантни антитела е scFv библиотека или Fab библиотека.

61. Метод съгласно претенция 42, характеризира се с това, че пултът от антитела се експонира на антигена чрез *in vivo* имунизирание на животно с антигена, последвано от *in vitro* скрининг на библиотека от рекомбинантни антитела, изготвена от лимфоидни клетки на животното с антигена.

62. Метод съгласно претенция 42, характеризира се с това, че пултът от антитела се експонира на антигена чрез *in vivo* имунизирание на животно с антигена, последвано от *in vitro* афинитетно зреење на библиотеката от рекомбинантни антитела, изготвена от лимфоидни клетки на животното.

63. Метод съгласно претенция 42, характеризира се с това, че пултът от антитела се експонира на антигена чрез *in vivo* имунизирание

66209 B1

на животно с антигена, последвано от подбор на единични клетки, секретирани антитела, които свързват антигена и получаване от единичните клетки на кДНК от тежко- и лековерижни варианти региони.

64. Метод съгласно претенция 42, характеризира се с това, че двойно-специфичното антитяло е изцяло човешко антитяло.

65. Метод съгласно претенция 42, характеризира се с това, че двойно-специфичното антитяло е химерно антитяло.

5 66. Метод съгласно претенция 42, характеризира се с това, че двойно-специфичното антитяло е CDR-присадено антитяло.

СПИСЪК НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТИ

NEAQNITDF (SEQ ID NO: 1)

Цикло-MAFLRANQNNGKISVAL (PG) (SEQ ID NO: 2)

TKGGQDITDFQILENQ (SEQ ID NO: 3)

APVRSLNCTLRDSQQKSLVMAGPYELKALHLQGQDMEQQVFS
MGAYKSSKDDAKITVILGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPK
NYPKKKMEKRFVFNKIEINNKLFESEAQFPNWIYSTSQAENMPVFL
GGTKGGQDITDFTMQFVSS (SEQ ID NO:4)

Издание на Патентното ведомство на Република България
1797 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: Г. Лъжовска