



(51) МПК  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61P 19/02* (2006.01)  
*A61P 29/00* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013141211/15, 08.02.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
 08.02.2012

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
 08.02.2011 US 61/440,853

(43) Дата публикации заявки: 20.03.2015 Бюл. № 8

(45) Опубликовано: 20.09.2015 Бюл. № 26

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 2004022718 A2, 18.03.2004. RU 2286388 C2, 27.10.2006. RU 2271825 C2, 20.03.2006. US2009226461 A1, 10.09.2009. EA 001792 B1, 27.08.2001. LEO A.V. JOOSTEN et al 'IL-1 alpha/beta blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced arthritis, whereas TNF-alpha blockade only ameliorates joint inflammation' J IMMUNOL. vol. 163, no. 9, 1999, pages 5049 - 5055.

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 09.09.2013

(86) Заявка РСТ:  
 US 2012/024356 (08.02.2012)

(87) Публикация заявки РСТ:  
 WO 2012/109373 (16.08.2012)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,  
 ООО "Юридическая фирма Городисский и  
 Партнеры"

(72) Автор(ы):

КАМАТХ Раджеш В. (US)

(73) Патентообладатель(и):

ЭББВИ ИНК. (US)

(54) ЛЕЧЕНИЕ ОСТЕОАРТРИТА И БОЛИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине и может быть использовано для лечения остеоартрита у индивидуума, страдающего остеоартритом. Лечение остеоартрита включает стадию введения индивидууму: иммуноглобулинового связывающего белка с двойным вариабельным доменом (DVD-Ig), связывающего и ИЛ-1 $\alpha$ , и ИЛ-

1 $\beta$ , с лечением, таким образом, остеоартрита у индивидуума. При использовании изобретения наблюдается синергетический эффект по снижению боли у пациентов, получавших иммуноглобулиновые белки. Изобретение обеспечивает DVD-Ig, которые связывают ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$ , по сравнению с пациентами, которые

подвергались лечению иммуноглобулинами  
только против ИЛ-1 $\alpha$  или только против ИЛ-1 $\beta$ .

14 з.п. ф-лы, 19 ил., 29 табл., 11 пр.

R U 2 5 6 3 8 3 0 C 2

R U 2 5 6 3 8 3 0 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61P 19/02* (2006.01)  
*A61P 29/00* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2013141211/15, 08.02.2012**

(24) Effective date for property rights:  
**08.02.2012**

Priority:  
(30) Convention priority:  
**08.02.2011 US 61/440,853**

(43) Application published: **20.03.2015** Bull. № 8

(45) Date of publication: **20.09.2015** Bull. № 26

(85) Commencement of national phase: **09.09.2013**

(86) PCT application:  
**US 2012/024356 (08.02.2012)**

(87) PCT publication:  
**WO 2012/109373 (16.08.2012)**

Mail address:  
**129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, stroenie 3,  
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):  
**KAMATKh Radzhesh V. (US)**

(73) Proprietor(s):  
**EhBBVI INK. (US)**

(54) **TREATING OSTEOARTHRITIS AND PAIN**

(57) Abstract:  
FIELD: medicine.  
SUBSTANCE: invention refers to medicine and can be used for treating osteoarthritis in an individual suffering from osteoarthritis. Treating osteoarthritis involves the stage of administering into the individual an immunoglobulin binding protein with a double variable domain (DVD-Ig) binding both IL-1 $\alpha$ , and IL-1 $\beta$ , and treating thereby osteoarthritis in the individual.

The using invention is accompanied by producing a synergetic effect aiming at relieving pain in the patients who have been taking immunoglobulin proteins.  
EFFECT: invention provides DVD-Ig, which bind IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , as compared to the patients who have been treated with anti-IL-1 $\alpha$  or anti-IL-1 $\beta$  immunoglobulins only.  
15 cl, 19 dwg, 29 tbl, 11 ex

RU 2 563 830 C2

RU 2 563 830 C2

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По этой заявке испрашивается приоритет временной заявки США № 61/440853, поданной 8 февраля 2011 года, полное содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки.

5 Область изобретения

Настоящее изобретение относится к лечению остеоартрита и боли и, более конкретно, к применению белков, связывающихся с ИЛ-1 $\alpha$  и/или ИЛ-1 $\beta$ , для лечения остеоартрита и боли.

Предпосылки изобретения

10 Суставной хрящ или "гиалиновый хрящ" здоровых позвоночных (включая человека и других млекопитающих) представляет собой полупрозрачную опалесцирующую соединительную ткань, отличающуюся цилиндрическим характером роста хондроцитов во внеклеточном матриксе (ЕСМ), преимущественно состоящем из протеогликанов, коллагена типа II и воды. Суставной хрящ обеспечивает эффективную опору для весовой  
15 нагрузки для предотвращения контакта между противоположными костями в суставе и, таким образом, является критичным для нормального функционирования сустава. Суставной хрящ не только восприимчив к повреждению при травме сустава, но также и к постепенному процессу эрозии. Исходно, такая эрозия может являться просто бессимптомным "поверхностным повреждением", при котором область уменьшенного  
20 гиалинового хряща не проникает полностью в субхондральную кость. Такие поверхностные повреждения, как правило, не являются болезненными, и, как правило, их определяют только при артроскопическом обследовании. Однако если процесс эрозии не подвергать лечению, основание поверхностного повреждения может продолжать стираться и диаметр повреждения может увеличиваться таким образом,  
25 что в конечном итоге повреждение прогрессирует до "глубокого повреждения", проникающего в подлежащую кость. Такие глубокие повреждения могут становиться достаточно большими, чтобы поверхности противоположных костей в суставе могли контактировать и начинать разрушать друг друга, приводя к воспалению, боли и другим дегенеративным изменениям, т.е. классическим симптомам остеоартрита (ОА). Таким  
30 образом, остеоартрит является дегенеративным, прогрессирующим и калечащим заболеванием, приводящим к деформации сустава, потере устойчивости, нарушениям и боли. В конечном итоге, хирургическое вмешательство по замене сустава может являться единственным практическим выходом для восстановления, по меньшей мере, частично, некоторого уровня подвижности индивидуума.

35 Суперсемейство ИЛ-1 состоит из медиаторов воспалительного процесса с широким диапазоном биологических и физиологических эффектов, включая лихорадку, синтез простагландинов (например, в фибробластах, мышечных клетках и эндотелиальных клетках), активацию Т-лимфоцитов и продукцию интерлейкина-2. Исходными членами суперсемейства ИЛ-1 являются ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  и антагонист рецептора ИЛ-1 (ИЛ-1Ra, ИЛ-1RA, ИЛ-1ra, ИЛ-1R $\alpha$ ). ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  являются провоспалительными цитокинами,  
40 участвующими в иммунной защите против инфекций. ИЛ-1R $\alpha$  конкурирует за связывание рецептора с ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$ , блокируя их действие в активации иммунитета. Другие члены суперсемейства ИЛ-1 включают ИЛ-18 (см. Dinarello (1994) FASEB J. 8(15): 1314-1325; Huising et al. (2004) Dev. Comp. Immunol. 28(5):395-413)) и шесть дополнительных  
45 генов со структурной гомологией с ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , или ИЛ-1RA, названных ИЛ1F5, ИЛ1F6, ИЛ1F7, ИЛ1F8, ИЛ1F9 и ИЛ1F10. Соответственно, ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-1RA переименовывали в ИЛ-1F1, ИЛ-1F2 и ИЛ-1F3, соответственно (см. Sims et al. (2001) Trends Immunol. 22(10): 536-537; Dunn et al. (2001) Trends Immunol. 22(10):533-536). Дополнительного описанного

предполагаемого члена семейства ИЛ-1 назвали ИЛ-33 или ИЛ-1F11, хотя это название не принято официально в базе данных номенклатуры названий семейств генов HGNC.

И ИЛ-1 $\alpha$ , и ИЛ-1 $\beta$  продуцируют макрофаги, моноциты и дендритные клетки. Они формируют важную часть воспалительного ответа организма на инфекцию. Эти цитокины повышают экспрессию факторов адгезии на эндотелиальных клетках, делая возможной трансмиграцию лейкоцитов в очаги инфекции и возвращение в исходное состояние терморегуляторного центра гипоталамуса, что приводит к повышению температуры тела, что проявляется в лихорадке. В связи с этим, ИЛ-1 называют эндогенным пирогеном. Повышенная температура тела помогает иммунной системе организма бороться с инфекцией. ИЛ-1 также важен в регуляции гемопоэза. Продукция ИЛ-1 $\beta$  в периферических тканях также связана с гипералгезией (повышенной чувствительности к боли), связанной с лихорадкой (Morgan et al. (2004) Brain Res. 1022 (1-2):96-100). ИЛ-1 регулирует повышением экспрессию циклооксигеназы-2 (COX-2), связанную с болью. Преимущественно, ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  связываются с одним и тем же клеточным рецептором. Этот рецептор состоит из двух родственных, но неидентичных субъединиц, передающих внутриклеточные сигналы через путь, являющийся, по большей части, общим с конкретными другими рецепторами. Они включают семейство Толл-подобных рецепторов и рецептор ИЛ-18. ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  также обладают схожими биологическими свойствами, включая стимуляцию лихорадки, медленного сна и нейтрофилии, активацию Т- и В-лимфоцитов, пролиферацию фибробластов, цитотоксичность для конкретных клеток, стимуляцию коллагеназ, синтез печеночных белков острой фазы и повышенную продукцию колониестимулирующих факторов и коллагена.

Выделяли и экспрессировали кДНК, кодирующие ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$ ; эти кДНК представляют два разных продукта генов, обозначаемых как ИЛ-1 $\alpha$  (Lomedico et al. (1984) Nature 312:458) и ИЛ-1 $\beta$  (Auron et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:7909). Восемь генов семейства интерлейкина-1 образуют кластер генов цитокинов на хромосоме 2. ИЛ-1 $\beta$  является преобладающей формой, продуцируемой моноцитами человека, на уровнях мРНК и белка. Две формы ИЛ-1 человека имеют только 26% гомологии аминокислот. Несмотря на их отличающиеся полипептидные последовательности, две формы ИЛ-1 обладают структурной схожестью (Auron et al. (1985) J. Mol. Cell Immunol. 2: 169) в том, что гомология аминокислот ограничивается отдельными областями молекулы ИЛ-1.

ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  продуцируются в виде пептидов-предшественников. Другими словами, они продуцируются в виде длинного белка, который затем процессируется для высвобождения более короткой активной молекулы, называемой зрелым белком. ИЛ-1 $\alpha$  продуцируется в виде про-ИЛ-1 $\alpha$ , протеолитически процессируемого кальпаином, и высвобождается посредством еще недостаточно изученного механизма. Например, зрелый ИЛ-1 $\beta$  высвобождается из про-ИЛ-1 $\beta$  после расщепления конкретным членом семейства белков каспаз, называемым каспаза-1 или интерлейкин-1-превращающий фермент (ICE). Трехмерная структура зрелых форм каждого члена суперсемейства ИЛ-1 человека состоит из 12-14  $\beta$ -складок, образующих бочкообразный белок.

Исходно ИЛ-1 $\alpha$  называли "катаболин" из-за его эффекта в повышении резорбции хряща, а также "моноцитарный клеточный фактор" (MCF) из-за его стимуляторного действия на коллагеназу и простагландин в синовиальных клетках, и "лейкоцитарный эндогенный фактор" (LEM), оказывающий стимуляторный эффект на реакции острой фазы. ИЛ-1 $\alpha$  обладает широким спектром биологической активности, т.к. ИЛ-1 $\alpha$  синтезируется многими различными клетками, такими как моноциты, макрофаги,

фибробласты, эндотелиальные клетки и лимфоциты, и многие клетки имеют специфичные рецепторы для ИЛ-1 $\alpha$ . ИЛ-1 $\alpha$  стимулирует пролиферацию тимоцитов посредством стимуляции высвобождения ИЛ-2, созревания и пролиферации В-клеток и активности фактора роста фибробластов. Белки ИЛ-1 $\alpha$  определяли как эндогенные пирогены и сообщали, что они стимулируют высвобождение простагландинов и коллагеназы из синовиальных клеток. Таким образом, ИЛ-1 $\alpha$  также занимает центральное положение в качестве триггера для различных нарушений и симптомов нарушений. Эти нарушения часто являются, главным образом, серьезными нарушениями, для которых почти не существует или не существует лечения. Предполагают, что полиморфизм этих генов ассоциирован с ревматоидным артритом и болезнью Альцгеймера. В основном, ИЛ-1 вовлечен во многие заболевания человека, включая артрит, легочный фиброз, заболевания центральной нервной системы, сахарный диабет и конкретные сердечно-сосудистые заболевания. Нежелательные эффекты ИЛ-1 $\alpha$  описывают, например, в Orpenheim et al. (1986) *Immunol. Today* 7:45-56, Durum et al. (1985) *Ann. Rev. Immunol.* 3: 263-287 и Symons et al. (1989) *Lymphokine Res.* 8:365-372.

Инициация, поддержание и прогрессирование ОА опосредованы сложным каскадом механических и биохимических путей, в которых ИЛ-1 играет ключевую роль. ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  продуцируют не только моноциты, макрофаги и нейтрофилы, но и клетки в тканях сустава, например, хондроциты, синовиальные фибробласты и остеокласты (см., например, Dinarello et al. (2009) *Ann. Rev. Immunol.* 27: 519-550). *In vitro* ИЛ-1 может стимулировать продукцию хондроцитами и синовиоцитами протеиназ, участвующих в разрушении хряща, приводящем к ОА (см., например, Dayer et al. (1977) *Science* 195: 181-183; Dayer et al. (1984) *Biochem. Pharmacol.* 33: 2893-2899; McGuire-Goldring et al. (1984) *Arthritis Rheum.* 27: 654-662), а также ингибирует синтез протеогликанов и коллагена типа II, основных компонентов внеклеточного матрикса (ЕСМ) нормального гиалинового хряща (см., например, Goldring et al. (1987) *J. Biol. Chem.* 262: 16724-16729; Goldring et al. (1988) *J. Clin. Investig.* 82: 2026-2037). С помощью доклинических и клинических исследований получали дополнительные доказательства участия ИЛ-1 в патогенезе ОА. Например, внутрисуставная (i.a.) инъекция ИЛ-1 в колени животного приводила к лейкоцитарной инфильтрации и потере хряща (Pettiphar et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8749-8753). Наоборот, инъекция i.a. антагониста ИЛ-1 приводила к значительному снижению прогрессирования экспериментального ОА (см., например, Pelletier et al. (1997) *Arthritis Rheum.* 40: 1012-1019; Caron et al. (1996) *Arthritis Rheum.* 39: 1535-1544); Fernandes et al. (1999) *Am. J. Pathol.* 154: 11590-11690); Zhang et al. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341: 202-208). Кроме того, обнаруживали, что нокаутные (КО) по ИЛ-1 мыши устойчивы к хирургически индуцированному повреждению хряща по сравнению с аналогичными мышами дикого типа (Glasson et al. (2009) *Osteoarthritis Cartilage*, 18: 572-580).

И ИЛ-1 $\alpha$ , и ИЛ-1 $\beta$  экспрессируются в синовиальных мембранах, хряще и синовиальной жидкости пациента-человека с ОА (см., например, Farahat et al. (1993) *Ann. Rheum. Dis.* 52: 870-875). Антагонист ИЛ-1 анакинра, являющийся антагонистом рецептора ИЛ-1, и AMG-108, являющийся моноклональным антителом к рецептору ИЛ-1, демонстрировали некоторую эффективность в исследованиях ОА в отношении симптомов и хондропротекции ("Results from a Randomized Controlled Trial of AMG 108 (a fully human monoclonal antibody to IL-1R type I) in Patients With Osteoarthritis of the Knee" Cohen et al., ACR2007). Обоим этим предложенным терапевтическим средствам предстоят дополнительные исследования для демонстрации четкой и надежной клинической эффективности.

Сохраняется потребность в новых и эффективных способах и композициях для лечения индивидуумов, страдающих остеоартритом.

Сущность изобретения

Изобретение относится к способам лечения остеоартрита (ОА) и боли. Такие способы включают введение индивидууму (человеку или другому млекопитающему) одного или нескольких связывающих белков, связывающихся с ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$ .

В одном из аспектов изобретения способ лечения остеоартрита у индивидуума (человека или другого млекопитающего) включает стадию введения индивидууму связывающего белка, связывающегося с ИЛ-1 $\alpha$  в комбинации (например, в смеси, путем последовательного введения или одновременного введения) со связывающим белком, связывающимся с ИЛ-1 $\beta$ , или введения индивидууму связывающего белка, связывающегося и с ИЛ-1 $\alpha$ , и с ИЛ-1 $\beta$ .

В варианте осуществления способ лечения остеоартрита у индивидуума включает введение индивидууму связывающего белка, связывающегося с ИЛ-1 $\alpha$ , где связывающий белок является антителом к ИЛ-1 $\alpha$ , например, моноклональным антителом к ИЛ-1 $\alpha$ . В другом варианте осуществления способ лечения остеоартрита у индивидуума включает введение индивидууму связывающего белка, связывающегося с ИЛ-1 $\beta$ , где связывающий белок является антителом, связывающимся с ИЛ-1 $\beta$ , например, моноклональным антителом, связывающимся с ИЛ-1 $\beta$ .

В другом аспекте изобретения способ лечения остеоартрита у индивидуума (человека или другого млекопитающего) включает стадию введения индивидууму связывающего белка, связывающегося и с ИЛ-1 $\alpha$ , и с ИЛ-1 $\beta$ . Предпочтительно, связывающий белок является иммуноглобулиновым связывающим белком с двойным переменным доменом (также обозначаемым в рамках изобретения как связывающий белок или молекула "DVD-Ig<sup>TM</sup>" или "DVD-Ig"), содержащим по меньшей мере один участок связывания, связывающийся с ИЛ-1 $\alpha$ , и по меньшей мере один участок связывания, связывающийся с ИЛ-1 $\beta$ . Более предпочтительно, связывающий белок DVD-Ig содержит два участка связывания, связывающихся с ИЛ-1 $\alpha$ , и два участка связывания, связывающихся с ИЛ-1 $\beta$ .

В другом варианте осуществления способ лечения остеоартрита по изобретению у индивидуума включает введение индивидууму фармацевтической композиции, содержащей связывающий белок, связывающийся с ИЛ-1 $\alpha$ , связывающий белок, связывающийся с ИЛ-1 $\beta$ , комбинацию связывающего белка, связывающегося с ИЛ-1 $\alpha$ , и связывающего белка, связывающегося с ИЛ-1 $\beta$ , или связывающий белок, связывающийся и с ИЛ-1 $\alpha$ , и с ИЛ-1 $\beta$ ; и фармацевтически приемлемый носитель.

В варианте осуществления изобретения способ лечения остеоартрита включает введение индивидууму кристаллизованного связывающего белка, связывающегося с ИЛ-1 $\alpha$ , и кристаллизованного связывающего белка, связывающегося с ИЛ-1 $\beta$ , или кристаллизованного связывающего белка, связывающегося и с ИЛ-1 $\alpha$ , и с ИЛ-1 $\beta$ . Такие применимые по изобретению кристаллизованные связывающие белки включают, в качестве неограничивающих примеров, кристаллизованное антитело к ИЛ-1 $\alpha$ , кристаллизованное антитело к ИЛ-1 $\beta$ , и кристаллизованный связывающий белок DVD-Ig, связывающийся и с ИЛ-1 $\alpha$ , и с ИЛ-1 $\beta$ .

Композиции, применимые в способах по изобретению для лечения остеоартрита у индивидуума, включают композицию для высвобождения кристаллизованного связывающего белка, связывающегося с ИЛ-1 $\alpha$ , кристаллизованного связывающего белка, связывающегося с ИЛ-1 $\beta$ , комбинацию кристаллизованного связывающего белка, связывающегося с ИЛ-1 $\alpha$ , и кристаллизованного связывающего белка,

связывающегося с ИЛ-1 $\beta$ , или кристаллизованного связывающего белка, связывающегося и с ИЛ-1 $\alpha$ , и с ИЛ-1 $\beta$ .

В варианте осуществления композиция, применимая в способе лечения остеоартрита по изобретению, содержит:

- 5 (а) состав, где указанный состав содержит кристаллизованный связывающий белок, связывающийся с ИЛ-1 $\alpha$ , кристаллизованный связывающий белок, связывающийся с ИЛ-1 $\beta$ , комбинацию кристаллизованного связывающего белка, связывающегося с ИЛ-1 $\alpha$ , и кристаллизованного связывающего белка, связывающегося с ИЛ-1 $\beta$ , или кристаллизованный связывающий белок, связывающийся и с ИЛ-1 $\alpha$ , и с ИЛ-1 $\beta$ ; и,   
10 необязательно, ингредиент; и  
(b) по меньшей мере один полимерный носитель.

В варианте осуществления описываемая выше композиция содержит комбинацию кристаллизованного связывающего белка, связывающегося с ИЛ-1 $\alpha$ , и кристаллизованного связывающего белка, связывающегося с ИЛ-1 $\beta$ . В другом варианте   
15 осуществления кристаллизованный связывающий белок, связывающийся с ИЛ-1 $\alpha$ , является кристаллизованным антителом, например, кристаллизованным моноклональным антителом, связывающимся с ИЛ-1 $\alpha$ , и кристаллизованный связывающий белок, связывающийся с ИЛ-1 $\beta$ , является кристаллизованным антителом, например, моноклональным антителом, связывающимся с ИЛ-1 $\beta$ .

20 В варианте осуществления описываемая выше композиция содержит кристаллизованный связывающий белок, связывающийся и с ИЛ-1 $\alpha$ , и с ИЛ-1 $\beta$ . В другом варианте осуществления кристаллизованный связывающий белок является кристаллизованным связывающим белком с двойным переменным доменом (DVD-Ig), связывающимся и с ИЛ-1 $\alpha$ , и с ИЛ-1 $\beta$ . В другом варианте осуществления способ   
25 лечения остеоартрита у индивидуума включает введение индивидууму композиции, содержащей кристаллизованный связывающий белок, связывающийся с ИЛ-1 $\alpha$ , кристаллизованный связывающий белок, связывающийся с ИЛ-1 $\beta$ , комбинацию кристаллизованного связывающего белка, связывающегося с ИЛ-1 $\alpha$ , и кристаллизованного связывающего белка, связывающегося с ИЛ-1 $\beta$ , или   
30 кристаллизованный связывающий белок, связывающийся и с ИЛ-1 $\alpha$ , и с ИЛ-1 $\beta$ ; где по меньшей мере один указанный полимерный носитель является полимером, выбранным из одного или нескольких из группы, состоящей из поли(акриловой кислоты), поли(цианоакрилатов), поли(аминокислот), поли(ангидридов), поли(депептида), сложных полиэфиров, поли(молочной кислоты), сополимеров молочной и гликолевой кислот или PLGA, поли(b-гидроксипропаноата), поли(капролактона), поли(диоксанона);   
35 полиэтиленгликоля, поли(гидроксипропил)метакриламида, поли[(органо)фосфазена], сложных поли(ортоэфиров), поли(винилового спирта), поливинилпирролидона, сополимеров малеинового ангидрида и алкилвинилового простого эфира, полиолов-плюроники, альбумина, альгината, целлюлозы и производных целлюлозы, коллагена,   
40 фибрина, желатина, гиалуроновой кислоты, олигосахаридов, гликозаминогликанов, сульфатированных полисахаридов, их смесей и сополимеров.

В варианте осуществления в случае наличия необязательного ингредиента в описываемой выше композиции, ингредиент выбран из группы, состоящей из альбумина, сахарозы, трегалозы, лактита, желатина, гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрина,   
45 метоксиполиэтиленгликоля и полиэтиленгликоля.

В варианте осуществления описываемый выше способ лечения остеоартрита дополнительно включает введение индивидууму второго средства, где второе средство придает дополнительное желательное свойство способу или композиции, используемому

в способе. Такое второе средство может являться одной или несколькими молекулами в группе, состоящей из будезонида, эпидермального фактора роста, кортикостероидов, циклоспорина, сульфасалазина, аминосалицилатов, 6-меркаптопуринов, азатиоприна, метронидазола, ингибиторов липоксигеназы, месалазина, олсалазина, балсалазида, антиоксидантов, ингибиторов тромбоксана, антагонистов рецептора ИЛ-1, моноклональных антител к ИЛ-1 $\beta$ , моноклональных антител к ИЛ-6, факторов роста, ингибиторов эластазы, пиридинил-имидазольных соединений, антител к ФНО, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-15, ИЛ-16, ИЛ-18, ИЛ-23, ЕМАР-II, ГМ-КСФ, FGF и PDGF, антител к CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 или их лигандам, метотрексата, циклоспорина, FK506, рапамицина, микофенолата мофетила, лефлуномида, NSAID, ибупрофена, преднизолона, ингибиторов фосфодиэстеразы, агонистов аденозиновых рецепторов, антитромботических средств, ингибиторов компонентов комплемента, адренергических средств, IRAK, NIK, IKK, p38, ингибиторов MAP-киназ, ингибиторов ИЛ-1 $\beta$ -превращающего фермента, ингибиторов ФНО-превращающего фермента, ингибиторов передачи сигнала Т-клеток, ингибиторов металлопротеиназы, ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента, растворимых рецепторов цитокинов, растворимого рецептора ФНО p55, растворимого рецептора ФНО p75, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, противовоспалительных цитокинов, ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-11, ИЛ-13 и TGF $\beta$ .

В другом аспекте изобретения способ лечения остеоартрита, представленный в рамках изобретения, включает введение индивидууму одного или нескольких связывающих белков, представленных в рамках изобретения, или композиции, представленной в рамках изобретения, по меньшей мере одним способом, выбранным из парентерального, подкожного, внутримышечного, внутривенного, внутрисуставного, внутрибронхиального, внутрибрюшного, интракапсульного, внутрихрящевого, внутриполостного, внутримозжечкового, интрацеребровентрикулярного, внутритолстокишечного, интрацервикального, внутрижелудочного, внутрипеченочного, интрамиокардиального, внутрикостного, внутритазового, интраперикардиального, интраперитонеального, интраплеврального, интрапростатического, интралегочного, ректального, внутрипочечного, интаретинального, интраспинального, интрасиновиального, интраторакального, внутриматочного, интравезикального, болюсного, вагинального, ректального, буккального, сублингвального, интраназального и трансдермального способа.

В одном из аспектов изобретения способ лечения боли у индивидуума (человека или другого млекопитающего) включает стадию введения индивидууму связывающего белка, связывающегося с ИЛ-1 $\alpha$ , в комбинации (например, в смеси, путем последовательного введения или одновременного введения) со связывающим белком, связывающимся с ИЛ-1 $\beta$ , или введения индивидууму связывающего белка, связывающегося и с ИЛ-1 $\alpha$ , и с ИЛ-1 $\beta$ .

Способы и композиции по изобретению можно использовать для лечения боли у индивидуума, имеющего любую форму боли, включая боль при злокачественном новообразовании, нейропатическую боль, мышечную боль, суставную боль, боль при переломе кости, боль при ранах, боль от хирургического вмешательства, головную боль, мигрень, а также болевые состояния, такие как аллодиния (аллодиническая боль), гипералгезия и комбинация аллодинии и гипералгезии.

В варианте осуществления способ лечения боли у индивидуума включает введение индивидууму связывающего белка, связывающегося с ИЛ-1 $\alpha$ , где связывающий белок является антителом к ИЛ-1 $\alpha$ , например, моноклональным антителом к ИЛ-1 $\alpha$ . В другом

варианте осуществления способ лечения боли у индивидуума включает введение индивидууму связывающего белка, связывающегося с ИЛ-1 $\beta$ , где связывающий белок является антителом, связывающимся с ИЛ-1 $\beta$ , например, моноклональным антителом, связывающимся с ИЛ-1 $\beta$ .

5 В другом аспекте изобретения способ лечения боли у индивидуума включает стадию введения индивидууму связывающего белка, связывающегося с ИЛ-1 $\alpha$ , и с ИЛ-1 $\beta$ .

Предпочтительно, связывающий белок является иммуноглобулиновым связывающим белком с двойным вариабельным доменом (также обозначаемым в рамках изобретения как связывающий белок или молекула "DVD-Ig<sup>TM</sup>" или "DVD-Ig"), содержащим по  
10 меньшей мере один участок связывания, связывающийся с ИЛ-1 $\alpha$ , и по меньшей мере один участок связывания, связывающийся с ИЛ-1 $\beta$ . Предпочтительно, связывающий белок DVD-Ig содержит два участка связывания, связывающихся с ИЛ-1 $\alpha$ , и два участка связывания, связывающихся с ИЛ-1 $\beta$ .

В другом варианте осуществления способ по изобретению для лечения боли у  
15 индивидуума включает введение индивидууму фармацевтической композиции, содержащей связывающий белок, связывающийся с ИЛ-1 $\alpha$ , связывающий белок, связывающийся с ИЛ-1 $\beta$ , комбинацию связывающего белка, связывающегося с ИЛ-1 $\alpha$ , и связывающего белка, связывающегося с ИЛ-1 $\beta$ , или связывающий белок, связывающийся с ИЛ-1 $\alpha$ , и с ИЛ-1 $\beta$ ; и фармацевтически приемлемый носитель.

В варианте осуществления изобретения способ лечения боли включает введение  
20 индивидууму кристаллизованного связывающего белка, связывающегося с ИЛ-1 $\alpha$ , и кристаллизованного связывающего белка, связывающегося с ИЛ-1 $\beta$ , или кристаллизованного связывающего белка, связывающегося с ИЛ-1 $\alpha$ , и с ИЛ-1 $\beta$ . Такие кристаллизованные связывающие белки, применимые в изобретении, включают, в  
25 качестве неограничивающих примеров, кристаллизованное антитело ИЛ-1 $\alpha$ , кристаллизованное антитело к ИЛ-1 $\beta$  и кристаллизованный связывающий белок DVD-Ig, связывающийся с ИЛ-1 $\alpha$ , и с ИЛ-1 $\beta$ .

Композиции, применимые в способах по изобретению для лечения боли у индивидуума, включают композицию для высвобождения кристаллизованного  
30 связывающего белка, связывающегося с ИЛ-1 $\alpha$ , кристаллизованного связывающего белка, связывающегося с ИЛ-1 $\beta$ , комбинации кристаллизованного связывающего белка, связывающегося с ИЛ-1 $\alpha$ , и кристаллизованного связывающего белка, связывающегося с ИЛ-1 $\beta$ , или кристаллизованного связывающего белка, связывающегося с ИЛ-1 $\alpha$ , и с ИЛ-1 $\beta$ .

35 В варианте осуществления композиция, применимая в способе лечения боли по изобретению, содержит:

(а) состав, где указанный состав содержит кристаллизованный связывающий белок, связывающийся с ИЛ-1 $\alpha$ , кристаллизованный связывающий белок, связывающийся с ИЛ-1 $\beta$ , комбинацию кристаллизованного связывающего белка, связывающегося с ИЛ-  
40 1 $\alpha$ , и кристаллизованного связывающего белка, связывающегося с ИЛ-1 $\beta$ , или кристаллизованный связывающий белок, связывающийся с ИЛ-1 $\alpha$ , и с ИЛ-1 $\beta$ ; и, необязательно, ингредиент; и

(b) по меньшей мере один полимерный носитель.

В варианте осуществления описываемая выше композиция содержит комбинацию  
45 кристаллизованного связывающего белка, связывающегося с ИЛ-1 $\alpha$ , и кристаллизованного связывающего белка, связывающегося с ИЛ-1 $\beta$ . В другом варианте осуществления кристаллизованный связывающий белок, связывающийся с ИЛ-1 $\alpha$ , является кристаллизованным антителом, например, кристаллизованным

моноклональным антителом, связывающимся с ИЛ-1 $\alpha$ , и кристаллизованный связывающий белок, связывающийся с ИЛ-1 $\beta$ , является кристаллизованным антителом, например, моноклональным антителом, связывающимся с ИЛ-1 $\beta$ .

В варианте осуществления описываемая выше композиция содержит кристаллизованный связывающий белок, связывающийся и с ИЛ-1 $\alpha$ , и с ИЛ-1 $\beta$ . В другом варианте осуществления кристаллизованный связывающий белок является кристаллизованным связывающим белком с двойным вариабельным доменом (DVD-Ig), связывающимся и с ИЛ-1 $\alpha$ , и с ИЛ-1 $\beta$ -Ig.

В другом варианте осуществления способ лечения боли у индивидуума включает введение индивидууму композиции, содержащей кристаллизованный связывающий белок, связывающийся с ИЛ-1 $\alpha$ , кристаллизованный связывающий белок, связывающийся с ИЛ-1 $\beta$ , комбинацию кристаллизованного связывающего белка, связывающегося с ИЛ-1 $\alpha$ , и кристаллизованного связывающего белка, связывающегося с ИЛ-1 $\beta$ , или кристаллизованный связывающий белок, связывающийся и с ИЛ-1 $\alpha$ , и с ИЛ-1 $\beta$ ; где указанный по меньшей мере один полимерный носитель является полимером, выбранным из одного или нескольких из группы, состоящей из поли(акриловой кислоты), поли(цианоакрилатов), поли(аминокислот), поли(ангидридов), поли(депсипептида), сложных полиэфигов, поли(молочной кислоты), сополимеров молочной и гликолевой кислот или PLGA, поли(b-гидроксibuтирата), поли(капролактона), поли(диоксанона); полиэтиленгликоля, поли(гидроксипропил)метакриламида, поли[(органо)фосфазена], сложных поли(ортоэфиров), поли(винилового спирта), поливинилпирролидона, сополимеров малеинового ангидрида и алкилвинилового простого эфира, полиолов-плюронинов, альбумина, альгината, целлюлозы и производных целлюлозы, коллагена, фибрина, желатина, гиалуроновой кислоты, олигосахаридов, гликозаминогликанов, сульфатированных полисахаридов, их смесей и сополимеров.

В варианте осуществления при наличии необязательного ингредиента в описываемой выше композиции ингредиент выбран из группы, состоящей из альбумина, сахарозы, трегалозы, лактита, желатина, гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрина, метоксиполиэтиленгликоля и полиэтиленгликоля.

В варианте осуществления описываемый выше способ лечения боли дополнительно включает введение индивидууму второго средства, где второе средство придает дополнительное желательное свойство способу или композиции, используемой в способе. Такое второе средство может являться одной или несколькими молекулами в группе, состоящей из будезонида, эпидермального фактора роста, кортикостероидов, циклоспорина, сульфасалазина, аминосалицилатов, б-меркаптопурина, азатиоприна, метронидазола, ингибиторов липоксигеназы, месалазина, олсалазина, балсалазида, антиоксидантов, ингибиторов тромбксана, антагонистов рецептора ИЛ-1, моноклональных антител к ИЛ-1 $\beta$ , моноклональных антител к ИЛ-6, факторов роста, ингибиторов эластазы, пиридинил-имидазольных соединений, антител к ФНО, LT, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-15, ИЛ-16, ИЛ-18, ИЛ-23, ЕМАР-II, ГМ-КСФ, FGF и PDGF, антител к CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 или их лигандам, метотрексата, циклоспорина, FK506, рапамицина, микофенолата мофетила, лефлуномида, NSAID, ибупрофена, преднизолона, ингибиторов фосфодиэстеразы, агонистов аденозиновых рецепторов, антитромботических средств, ингибиторов компонентов комплемента, адренергических средств, IRAK, NIK, IKK, p38, ингибиторов MAP-киназ, ингибиторов ИЛ-1 $\beta$ -превращающего фермента, ингибиторов ФНО-превращающего фермента, ингибиторов передачи сигнала Т-клеток,

ингибиторов металлопротеиназы, ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента, растворимых рецепторов цитокинов, растворимого рецептора ФНО р55, растворимого рецептора ФНО р75, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, противовоспалительных цитокинов, ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-11, ИЛ-13 и TGFβ.

5 В другом аспекте изобретения, способ лечения боли, представленный в рамках изобретения, включает введение индивидууму одного или нескольких связывающих белков, представленных в рамках изобретения, или композиции, представленной в рамках изобретения, по меньшей мере одним способом, выбранным из парентерального, подкожного, внутримышечного, внутривенного, внутрисуставного,  
10 внутрибронхиального, внутрибрюшного, внутрикапсульного, внутрихрящевого, внутрисуставного, внутримозжечкового, интрацеребровентрикулярного, внутритолстокишечного, интрацервикального, внутрижелудочного, внутрипеченочного, интрамиокардиального, внутрикостного, внутритазового, внутриперикардиального, интраперитонеального, внутриплеврального, внутрипростатического, внутрилегочного,  
15 ректального, внутрипочечного, интаретинального, интраспинального, интрасиновиального, интраторакального, внутриматочного, интравезикального, болюсного, вагинального, ректального, буккального, сублингвального, интраназального и трансдермального способа.

В другом варианте осуществления изобретение относится к способу лечения боли у индивидуума, страдающего заболеванием или нарушением, связанным с экспрессией ИЛ-1. Такая экспрессия ИЛ-1 у индивидуума может приводить к повышению уровней ИЛ-1 в плазме и/или периферической ткани индивидуума.

В варианте осуществления способы и композиции, представленные в рамках изобретения, используют для лечения боли у индивидуума, страдающего заболеванием или нарушением, выбранным из группы, включающей остеоартрит, ревматоидный артрит, ювенильный хронический артрит, септический артрит, артрит Лайма, псориатический артрит, реактивный артрит, спондилоартропатию, системную красную волчанку, болезнь Крона, язвенный колит, воспалительное заболевание кишечника, инсулинозависимый сахарный диабет, тиреоидит, астму, аллергические заболевания, псориаз, дерматит, склеродермию, реакцию "трансплантат против хозяина", отторжение трансплантата органа, острое или хроническое иммунное заболевание, связанное с трансплантацией органа, саркоидоз, атеросклероз, диссеминированное внутрисосудистое свертывание, синдром Кавасаки, болезнь Грейвса, нефротический синдром, синдром хронической усталости, гранулематоз Вегенера, пурпуру Шенлейн-Геноха,  
35 микроскопический васкулит почек, хронический активный гепатит, увеит, септический шок, синдром токсического шока, сепсис, кахексию, инфекционные заболевания, паразитические заболевания, острый поперечный миелит, болезнь Хантингтона, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, инсульт, первичный билиарный цирроз, гемолитическую анемию, злокачественные новообразования, сердечную  
40 недостаточность, инфаркт миокарда, болезнь Аддисона, спорадическую полигландулярную недостаточность типа I, полигландулярную недостаточность типа II (синдром Шмидта), острый респираторный дистресс-синдром взрослых, алопецию, гнездную алопецию, серонегативную артропатию, артропатию, болезнь Рейтера, псориатическую артропатию, артропатию при язвенном колите, энтеропатический  
45 синовит, Chlamydia-ассоциированную артропатию, Yersinia-ассоциированную артропатию, Salmonella-ассоциированную артропатию, спондилоартропатию, атероматозное заболевание/артериосклероз, atopическую аллергию, буллезные аутоиммунные дерматозы, обыкновенную пузырчатку, эксфолиативную пузырчатку,

пемфигиод, IgA-зависимый линейный дерматоз, аутоиммунную гемолитическую анемию, гемолитическую анемию с положительной реакцией Кумбса, приобретенную пернициозную анемию, ювенильную пернициозную анемию, миалгический энцефалит/ Синдром хронической усталости, хронический кандидоз кожи и слизистых оболочек, 5 гигантоклеточный артериит, первичный склерозирующий гепатит, криптогенный аутоиммунный гепатит, синдром приобретенного иммунодефицита, связанные с синдромом приобретенного иммунодефицита заболевания, гепатит В, гепатит С, переменный неклассифицируемый иммунодефицит (неклассифицируемую переменную гипогаммаглобулинемию), дилатационную кардиомиопатию, женское 10 бесплодие, недостаточность яичников, преждевременную недостаточность яичников, фиброз легких, криптогенный фиброзирующий альвеолит, поствоспалительную интерстициальную болезнь легких, интерстициальный пневмонит, интерстициальную болезнь легких, связанную с диффузной болезнью легких, интерстициальную болезнь легких, связанную со смешанной болезнью соединительной ткани, интерстициальную 15 болезнь легких, связанную с системной склеродермией, интерстициальную болезнь легких, связанную с ревматоидным артритом, болезнь легких, связанную с системной красной волчанкой, болезнь легких, связанную с дерматомиозитом/полимиозитом, болезнь легких, связанную с болезнью Шегрена, болезнь легких, связанную с анкилозирующим спондилитом, диффузную болезнь легких при васкулитах, болезнь 20 легких, связанную с гемосидерозом, лекарственную интерстициальную болезнь легких, фиброз, лучевой фиброз, облитерирующий бронхиолит, хроническую эозинофильную пневмонию, болезнь легких с лимфоцитарной инфильтрацией, постинфекционную интерстициальную болезнь легких, подагрический артрит, аутоиммунный гепатит, аутоиммунный гепатит типа 1 (классический аутоиммунный или волчаночный гепатит), 25 аутоиммунный гепатит типа 2 (гепатит с антителами против LKM), аутоиммунную гипогликемию, резистентность к инсулину типа В с акантозом, гипопаратиреоз, острое иммунное заболевание, связанное с трансплантацией органов, хроническое иммунное заболевание, связанное с трансплантацией органов, остеоартроз, первичный склерозирующий холангит, псориаз типа 1, псориаз типа 2, идиопатическую лейкопению, 30 аутоиммунную нейтропению, неуточненную нефропатию, гломерулонефрит, микроскопический васкулит почек, болезнь Лайма, дискоидную красную волчанку, идиопатическое или неуточненное мужское бесплодие, аутоиммунную реакцию на сперму, рассеянный склероз (все подтипы), симпатическую офтальмию, легочную гипертензию, вторичную относительно болезни соединительной ткани, синдром 35 Гудпасчера, легочное проявление узелкового полиартериита, острую ревматическую лихорадку, ревматоидный спондилит, болезнь Стилла, системную склеродермию, синдром Шегрена, синдром Такаясу/артериит, аутоиммунную тромбоцитопению, идиопатическую тромбоцитопению, аутоиммунный тиреоидит, гипертиреоз, аутоиммунный тиреоидит (болезнь Хашимото), атрофический аутоиммунный 40 гипотиреоз, первичную микседему, факогенный увеит, первичный васкулит, витилиго, острую печеночную недостаточность, хронические заболевания печени, алкогольный цирроз, алкогольное поражение печени, холестаза, идиосинкразический гепатит, лекарственный гепатит, неалкогольный стеатогепатит, аллергию, инфекцию стрептококками группы В (GBS), психические расстройства (например, депрессию и шизофрению), Th2-и Th1-опосредованные заболевания, острую и хроническую боль (различные формы боли), злокачественные новообразования, такие как рак легких, молочной железы, желудка, мочевого пузыря, толстого кишечника, поджелудочной железы, яичника, предстательной железы и прямой кишки и гематопозитические

злокачественные новообразования (лейкоз и лимфому), абеталипопротеинемию, акроцианоз, острые и хронические паразитические или инфекционные процессы, острый лейкоз, острый лимфобластный лейкоз (ALL), острый миелолейкоз (AML), острую или хроническую бактериальную инфекцию, острый панкреатит, острую почечную недостаточность, аденокарциномы, предсердные эктопические ритмы, комплекс СПИД-деменция, алкогольный гепатит, аллергический конъюнктивит, аллергический контактный дерматит, аллергический ринит, отторжение аллотрансплантата, недостаточность альфа-1-антитрипсина, боковой амиотрофический склероз, анемию, стенокардию, дегенерацию клеток передних рогов, терапию к CD3, антифосфолипидный синдром, антирецепторные реакции гиперчувствительности, аневризмы аорты и периферические аневризмы, расслоение аорты, артериальную гипертензию, артериосклероз, артериовенозный анастомоз, атаксию, фибрилляцию предсердий (длительную или пароксизмальную), трепетание предсердий, атриовентрикулярную блокаду, В-клеточную лимфому, отторжение костного трансплантата, отторжение трансплантата костного мозга (ВМТ), блокаду ножки пучка Гиса, лимфому Беркитта, ожоги, сердечные аритмии, синдром остановки сердца, опухоли сердца, кардиомиопатию, воспалительный ответ на сердечно-легочное шунтирование, отторжение трансплантата хряща, дегенерацию коры мозжечка, мозжечковые нарушения, хаотическую или мультифокальную предсердную тахикардию, связанные с химиотерапией нарушения, хронический миелоцитарный лейкоз (СМЛ), хронический алкоголизм, хронические воспалительные заболевания, хронический лимфоцитарный лейкоз (СLL), хроническую обструктивную болезнь легких (СOPD), хроническую интоксикацию салицилатами, колоректальную карциному, застойную сердечную недостаточность, конъюнктивит, контактный дерматит, легочное сердце, ишемическую болезнь легких, болезнь Крейтцфельда-Якоба, культурально-негативный сепсис, кистозный фиброз, нарушения, связанные с терапией цитокинами, деменцию боксеров, демиелинизирующие заболевания, геморрагическую лихорадку денге, дерматит, дерматологические нарушения, диабет, диабетический артериосклероз, деменцию с тельцами Леви, дилатационную застойную кардиомиопатию, нарушения базальных ганглиев, синдром Дауна в зрелом возрасте, двигательные нарушения, вызываемые лекарственными средствами, блокирующими допаминовые рецепторы в ЦНС, чувствительность к лекарственным средствам, экземе, энцефаломиелит, эндокардит, эндокринопатию, эпиглоттит, инфекцию вирусом Эпштейна-Барре, эритромелалгию, экстрапирамидные и мозжечковые нарушения, семейный гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз, отторжение импланта фетального тимуса, атаксию Фридрейха, функциональные нарушения периферических артерий, грибковый сепсис, газовую гангрену, язву желудка, гломерулонефрит, отторжение трансплантата любого органа или ткани, грамотрицательный сепсис, грамположительный сепсис, гранулемы по причине внутриклеточных паразитов, волосатоклеточный лейкоз, болезнь Галлервордена-Шпатца, тиреоидит Хашимото, полиноз, отторжение трансплантата сердца, гемохроматоз, гемодиализ, гемолитический уремический синдром/тромболитическую тромбоцитопеническую пурпуру, геморрагию, гепатит А, аритмии, связанные с нарушениями в пучке Гиса, инфекцию ВИЧ/нейропатию при ВИЧ, болезнь Ходжкина, гиперкинетические двигательные нарушения, реакции гиперчувствительности, экзогенный аллергический альвеолит, гипертоническую болезнь, гипокинетические двигательные нарушения, оценку функции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, идиопатическую болезнь Аддисона, идиопатический легочный фиброз, антитело-опосредованную цитотоксичность, астению, спинально-мышечную атрофию детей, воспаление аорты, грипп А, воздействие ионизирующего излучения,

иридоциклит/увеит/оптический неврит, повреждение при ишемии/реперфузии, ишемический инсульт, ювенильный ревматоидный артрит, ювенильную спинально-мышечную атрофию, саркому Капоши, отторжение трансплантата почки, легионеллез, лейшманиоз, проказу, поражения кортикоспинальной системы, липедему, отторжение трансплантата печени, лимфедему, малярию, злокачественную лимфому, злокачественный гистиоцитоз, злокачественную меланому, менингит, менингококкемию, метаболическую мигрень, идиопатическую мигрень, мультисистемное митохондриальное нарушение, смешанную болезнь соединительной ткани, моноклональную гаммопатию, множественную миелому, мультисистемные дегенерации (синдром Менцеля, Дежерина-Тома, Шая-Дрейджера и Мачадо-Джозефа), миастению, инфекцию комплексом *Mycobacterium avium* и *Mycobacterium intracellulare*, инфекцию *Mycobacterium tuberculosis*, миелодиспластический синдром, инфаркт миокарда, ишемические нарушения миокарда, назофарингеальную карциному, хронические заболевания легких новорожденных, нефрит, нефроз, нейродегенеративные заболевания, неврогенные мышечные атрофии, нейтропеническую лихорадку, неходжкинскую лимфому, окклюзию брюшной аорты и ее ветвей, окклюзирующие заболевания артерий, терапию ОКТЗ®, орхит/эпидидимит, орхит/реверсивную вазэктомию, органомегалию, остеопороз, отторжение трансплантата поджелудочной железы, карциному поджелудочной железы, паранеопластический синдром/гиперкальциемию при злокачественных новообразованиях, отторжение трансплантата паращитовидной железы, воспалительное заболевание тазовых органов, круглогодичный ринит, заболевание перикарда, атеросклеротическое поражение периферических сосудов, нарушения периферических сосудов, перитонит, пернициозную анемию, пневмоцистную пневмонию, пневмонию, синдром РОЕМС (полинейропатию, органомегалию, эндокринопатию, моноклональную гаммопатию и поражения кожи), постперфузионный синдром, посткардиотомный синдром, преэклампсию, прогрессирующий надъядерный паралич, первичную легочную гипертензию, лучевую терапию, феномен Рейно, болезнь Рейно, синдром Рефсума, тахикардию с широкими комплексами QRS, вазоренальную гипертензию, реперфузионное повреждение, рестриктивную кардиомиопатию, саркомы, сенильную хорею, сенильную деменцию с тельцами Леви, серонегативные артропатии, шок, серповидноклеточную анемию, отторжение аллотрансплантата кожи, поражения кожи, отторжение трансплантата тонкого кишечника, солидные опухоли, специфические аритмии, спинальную атаксию, спиноцеребеллярную дегенерацию сетчатки, стрептококковый миозит, структурные повреждения мозжечка, подострый склерозирующий панэнцефалит, обморок, сифилис сердечно-сосудистой системы, системную анафилаксию, синдром системного воспалительного ответа, системную форму ювенильного ревматоидного артрита, Т-клеточный или FAB ALL, телеангиэктазию, облитерирующий тромбангиит, тромбоцитопению, токсичность, трансплантаты, кровотечение при травме, реакции гиперчувствительности типа III, гиперчувствительность типа IV, нестабильную стенокардию, уремию, уросепсис, крапивницу, приобретенные пороки сердца, варикозное расширение вен, васкулит, заболевания вен, тромбоз вен, фибрилляцию желудочков, вирусные и грибковые инфекции, вирусный энцефалит/асептический менингит, вирус-ассоциированный гемофагоцитарный синдром, синдром Вернике-Корсакова, болезнь Вильсона-Коновалова, отторжение ксенотрансплантата любого органа или ткани, острый коронарный синдром, острую ишемию, болезнь Стилла взрослых, гнездную алопецию, анафилаксию, антифосфолипидный синдром, апластическую анемию, артериосклероз, атопическую экзему, атопический дерматит, аутоиммунный дерматит, аутоиммунное нарушение, связанное со стрептококковой инфекцией, аутоиммунную



рака пищевода, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака печени, рака желчного пузыря, рака желчных протоков, рака тонкого кишечника, рака толстого кишечника, рака мочевыводящих путей, рака почки, рака мочевого пузыря, уротелиального рака, злокачественных новообразований женских половых органов, рака шейки матки, рака матки, рака яичников, хориокарциномы, гестационной трофобластической болезни, злокачественных новообразований мужских половых органов, рака предстательной железы, злокачественных новообразований семенных пузырьков, рака яичка, опухолей половых клеток, злокачественных новообразований эндокринных желез, рака щитовидной железы, рака надпочечников, злокачественных новообразований гипофиза, рака кожи, гемангиомы, меланомы, саркомы, злокачественных новообразований костной ткани, злокачественных новообразований мягких тканей, саркомы Капоши, опухоли головного мозга, злокачественных новообразований нервной ткани, злокачественных новообразований глаза, злокачественных новообразований оболочек головного мозга, астроцитомы, глиомы, глиобластомы, ретинобластомы, невромы, нейробластомы, шванномы, менингиомы, солидной опухоли, возникающей из гематопозитического злокачественного новообразования, лейкоза, лимфомы Ходжкина и неходжкинской лимфомы.

Краткое описание чертежей

Фигура 1А представляет собой схематическое изображение конструкций иммуноглобулина с двойным вариабельным доменом (DVD-Ig), а также на ней показана стратегия получения молекулы DVD-Ig из двух родительских антител.

На фигуре 1В представлены схематические изображения генетических конструкций для DVD1-Ig, DVD2-Ig и двух химерных, моноспецифичных моноклональных антител 2D13.E3 (к ИЛ-1 $\alpha$ ) и 13F5.G5 (к ИЛ-1 $\beta$ ). Обозначениями "VH $\beta$ " и "VL $\beta$ " указывают, соответственно, вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи антигенсвязывающего участка антитела 13F5.G5, связывающего ИЛ-1 $\beta$ . Обозначениями "VH $\alpha$ " и "VL $\alpha$ " указывают, соответственно, вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи антитела 3D12.E3, связывающего ИЛ-1 $\alpha$ . "L" указывают лидерную последовательность. На диаграмме генетической конструкции для DVD2-Ig горизонтальными отметками между "VH $\beta$ " и "VH $\alpha$ " и между "VL $\beta$ " и "VL $\alpha$ " указывают наличие линкерной последовательности.

На фигуре 2 показаны гистограммы гистологической балльной оценки суставного хряща мышцы в остеоартритической модели нестабильности сустава (JIM). Каждый набор гистограмм представляет балльную оценку суставного хряща в коленях мышей в четырех исследуемых группах: лечение только разбавителем фосфатно-солевым буфером (PBS) ("PBS"), лечение моноклональным антителом к ИЛ-1 $\alpha$  ("mAb к ИЛ-1 $\alpha$ "), лечение моноклональным антителом к ИЛ-1 $\beta$  ("mAb к ИЛ-1 $\beta$ ") и лечение комбинацией моноклональных антител к ИЛ-1 $\alpha$  и к ИЛ-1 $\beta$  ("mAb к ИЛ-1 $\alpha$  + mAb к ИЛ-1 $\beta$ "). Отдельные гистограммы в каждом наборе представляют общие гистологические баллы и баллы для трех отдельных зон, где каждая зона представляет собой одну треть области медиального мениска коленного сустава (зона 1: внутренняя зона, зона 2: средняя зона, и зона 3: внешняя зона). Слева направо: гистограмма общих баллов для зон медиального мениска 1, 2 и 3; гистограмма баллов для зоны медиального мениска 1; гистограмма баллов для зоны медиального мениска 2; и гистограмма баллов для зоны медиального мениска 3. См. пример 3.3.1.

На фигуре 3 показаны гистограммы гистологической балльной оценки суставного хряща мышц в остеоартритической модели нестабильности сустава (JIM). Каждый набор гистограмм представляет балльную оценку суставного хряща коленей мышей в

четырёх исследуемых группах: лечение только разбавителем PBS ("Разбавитель"), лечение комбинацией моноклонального антитела к ИЛ-1 $\alpha$  и моноклонального антитела к ИЛ-1 $\beta$  ("mAb к ИЛ-1 $\alpha$  (6 мг/кг) + mAb к ИЛ-1 $\beta$  (6 мг/кг)"), лечение связывающим белком DVD-Ig к mIL-1 $\alpha/\beta$  в концентрации 6 мг/кг ("DVD-Ig к ИЛ-1 $\alpha/\beta$  (6 мг/кг)") и  
5 лечение связывающим белком DVD-Ig к mIL-1 $\alpha/\beta$  в концентрации 12 мг/кг ("DVD-Ig к ИЛ-1 $\alpha/\beta$  (12 мг/кг)"). Отдельные гистограммы в каждом наборе представляют общие гистологические баллы и баллы для трех отдельных зон, где каждая зона представляет собой одну треть области медиального мениска коленного сустава (зона 1: внутренняя зона, зона 2: средняя зона, и зона 3: внешняя зона). Слева направо: гистограмма общих  
10 баллов для зон медиального мениска 1, 2 и 3; гистограмма баллов для зоны медиального мениска 1; гистограмма баллов для зоны медиального мениска 2; и гистограмма баллов для зоны медиального мениска 3. См. пример 3.3.2.

На фигуре 4 показаны гистограммы гистологической балльной оценки суставного хряща мышей в остеоартритической модели нестабильности сустава (JIM). Каждый  
15 набор гистограмм представляет балльную оценку суставного хряща коленей мышей в четырех исследуемых группах: лечение только разбавителем PBS ("Разбавитель"), лечение комбинацией моноклонального антитела к ИЛ-1 $\alpha$  (6 мг/кг) и моноклонального антитела к ИЛ-1 $\beta$  (6 мг/кг) ("mAb к ИЛ-1 $\alpha$  (6 мг/кг) + mAb к ИЛ-1 $\beta$  (6 мг/кг)"), лечение  
20 моноклональным антителом к ИЛ-1 $\beta$  (12 мг/кг) ("mAb к ИЛ-1 $\beta$  (12 мг/кг)"), лечение моноклональным антителом к ИЛ-1 $\beta$  (6 мг/кг) ("mAb к ИЛ-1 $\beta$  (6 мг/кг)"), и лечение моноклональным антителом к ИЛ-1 $\beta$  (3 мг/кг) ("mAb к ИЛ-1 $\beta$  (3 мг/кг)"). Отдельные гистограммы в каждом наборе представляют общие гистологические баллы и баллы  
25 для трех отдельных зон, где каждая зона представляет собой одну треть области медиального мениска коленного сустава (зона 1: внутренняя зона, зона 2: средняя зона, и зона 3: внешняя зона). Слева направо: гистограмма общих баллов для зон медиального мениска 1, 2 и 3; гистограмма баллов для зоны медиального мениска 1; гистограмма  
баллов для зоны медиального мениска 2; и гистограмма баллов для зоны медиального мениска 3. См. пример 3.3.3.

На фигуре 5 показан уровень зимозан-индуцируемой продукции ИЛ-6 (пг/мл) у  
30 животных в остеоартритической модели нестабильности сустава при лечении только разбавителем PBS ("Разбавитель"), комбинацией моноклонального антитела к ИЛ-1 $\alpha$  (6 мг/кг) и моноклонального антитела к ИЛ-1 $\beta$  (6 мг/кг) ("mAb к ИЛ-1 $\alpha$  (6 мг/кг) + mAb к ИЛ-1 $\beta$  (6 мг/кг)"), связывающим белком DVD-Ig к mIL-1 $\alpha/\beta$  в концентрации 6 мг/кг  
("DVD-Ig к ИЛ-1 $\alpha/\beta$  (6 мг/кг)") и лечении связывающим белком DVD-Ig к mIL-1 $\alpha/\beta$  в  
35 концентрации 12 мг/кг ("DVD-Ig к ИЛ-1 $\alpha/\beta$  (12 мг/кг)"). См. пример 3.3.4.

На фигуре 6 показана общая балльная оценка дегенерации хряща у животных в остеоартритической модели дестабилизации медиального мениска (DMM), подвергнутых  
лечению разбавителем PBS ("Разбавитель"), комбинацией моноклонального антитела к ИЛ-1 $\alpha$  (6 мг/кг) и моноклонального антитела к ИЛ-1 $\beta$  (6 мг/кг) ("mAb к ИЛ-1 $\alpha$  (6 мг/  
40 кг) + mAb к ИЛ-1 $\beta$  (6 мг/кг)"), и связывающим белком DVD-Ig к mIL-1 $\alpha/\beta$  в концентрации 6 мг/кг ("DVD-Ig к ИЛ-1 $\alpha/\beta$  (6 мг/кг)"). См. пример 3.3.5.

На фигуре 7 показаны результаты 8-недельного исследования действия различных способов лечения на дегенерацию хряща у животных в остеоартритической модели дестабилизации медиального мениска (DMM). На каждой гистограмме указана средняя  
45 сумма баллов для дегенерации хряща у животных, подвергнутых лечению только разбавителем PBS ("Разбавитель"), моноклональным антителом к ИЛ-1 $\alpha$  (6 мг/кг) ("mAb к ИЛ-1 $\alpha$  6 мг/кг"), моноклональным антителом к ИЛ-1 $\beta$  (6 мг/кг) ("mAb к ИЛ-1 $\beta$  6 мг/кг"), комбинацией моноклонального антитела к ИЛ-1 $\alpha$  (6 мг/кг) и

моноклонального антитела к ИЛ-1 $\beta$  (6 мг/кг) ("mAb к ИЛ-1 $\alpha$  (6 мг/кг) + mAb к ИЛ-1 $\beta$  (6 мг/кг)", связывающим белком DVD-Ig к mIL-1 $\alpha/\beta$  в концентрации 1,5 мг/кг ("DVD-Ig к ИЛ-1 $\alpha/\beta$  1,5 мг/кг"), связывающим белком DVD-Ig к mIL-1 $\alpha/\beta$  в концентрации 3 мг/кг ("DVD-Ig к ИЛ-1 $\alpha/\beta$  3 мг/кг") или связывающим белком DVD-Ig к mIL-1 $\alpha/\beta$  в концентрации 6 мг/кг ("DVD-Ig к ИЛ-1 $\alpha/\beta$  6 мг/кг"). См. пример 3.3.6.

На фигуре 8 показаны результаты 4-недельного исследования лечения животных в остеоартритической модели дестабилизация медиального мениска (DMM) только разбавителем ("Разбавитель"), доксициклином (30 мг/кг) ("Доксициклин (30 мг/кг)") или комбинацией моноклонального антитела к ИЛ-1 $\alpha$  (6 мг/кг) и моноклонального антитела к ИЛ-1 $\beta$  (6 мг/кг) ("mAb к ИЛ-1 $\alpha$  (6 мг/кг) + mAb к ИЛ-1 $\beta$  (6 мг/кг)"). См. пример 3.3.7.

На фигуре 9 показаны гистограммы порога отдергивания конечности (граммы, "г") в конечностях мышей с хирургическим вмешательством DMM в дни 7, 14, 21, 28 и 35. Порог отдергивания конечностей после DMM ("DMM") значительно повышался по сравнению с контралатеральными конечностями (не подвергнутыми хирургическому вмешательству) ("Контралатеральная конечность") и конечностями, подвергнутыми "ложной" операции ("Ложная операция"). Конечности после DMM проявляли аллодинию уже в день 7 и проявляли это болевое поведение до дня 35. См. пример 4.

На фигуре 10 показаны гистограммы порога отдергивания конечности (граммы, "г") у мышей после DMM после лечения только разбавителем ("PBS-контроль"), IgG-изотипическим контролем (положительный контроль на развившееся заболевание и боль "IgG-контроль") или комбинацией моноклональных антител к ИЛ-1 $\alpha$  и против ИЛ-1 $\beta$  ("mAb к ИЛ-1 $\alpha$  (6 мг/кг) + mAb к ИЛ-1 $\beta$  (6 мг/кг)") через 5 недель (день 35) по сравнению с контралатеральными конечностями (не подвергнутыми хирургическому вмешательству) ("Контралатеральная конечность") и конечностями, подвергнутыми "ложной" операции ("Ложная операция"). Данные свидетельствуют о том, что нейтрализация ИЛ-1 $\alpha$ , и ИЛ-1 $\beta$  значительно предотвращает развитие аллодинии. Аналогичную эффективность наблюдали у животных после лечения через одну неделю (не представлено). См. пример 4.

На фигуре 11 показаны гистограммы порога отдергивания конечности (граммы, "г") у мышей после DMM, ранее подвергнутых лечению IgG-изотипическим контролем (положительный контроль на развившееся заболевание и боль) в течение 35 дней, которым затем вводили дозу комбинации моноклональных антител к ИЛ-1 $\alpha$  или к ИЛ-1 $\beta$  и тестировали на порог отдергивания конечности на 24 часа позже в день 36 ("mAb к ИЛ-1 $\alpha$  (6 мг/кг) + mAb к ИЛ-1 $\beta$  (6 мг/кг) (через 24 часа после введения дозы)"). Для сравнения, значения порога отдергивания конечности в день 35 представляли для контралатеральной (не подвергнутой хирургическому вмешательству) конечности ("Контралатеральная конечность"), конечности после "ложной" операции ("Ложная операция"), лечения только разбавителем ("PBS-контроль"), лечения IgG-изотипическим контролем ("IgG-контроль") и конечности после хирургического вмешательства, подвергнутой лечению комбинацией моноклональных антител к ИЛ-1 $\alpha$  и к ИЛ-1 $\beta$  ("mAb к ИЛ-1 $\alpha$  (6 мг/кг) + mAb к ИЛ-1 $\beta$  (6 мг/кг)") через 5 недель (день 35). Данные свидетельствуют о том, что нейтрализация ИЛ-1 $\alpha$ , и ИЛ-1 $\beta$  значительно реверсировала аллодинию у мышей с развившейся болью. См. пример 4.

На фигуре 12 показаны гистограммы порога отдергивания конечности (граммы, "г") у мышей после DMM, подвергнутых лечению только разбавителем PBS ("Разбавитель"), моноклональным антителом к ИЛ-1 $\alpha$  (6 мг/кг) ("mAb к ИЛ-1 $\alpha$  (6 мг/кг)"), моноклональным антителом к ИЛ-1 $\beta$  (6 мг/кг) ("mAb к ИЛ-1 $\beta$  (6 мг/кг)") или

комбинацией моноклонального антитела к ИЛ-1 $\alpha$  (6 мг/кг) и моноклонального антитела к ИЛ-1 $\beta$  (6 мг/кг) ("mAb к ИЛ-1 $\alpha$  (6 мг/кг) + mAb к ИЛ-1 $\beta$  (6 мг/кг)"), вводимых интраперитонеально (i.p.) дважды в неделю в течение четырех недель. Животных тестировали на аллодинию в день 28. На гистограмме для "контралатеральной конечности" представлен порог отдергивания конечности типичной не подвергнутой хирургическому вмешательству (контралатеральной) конечности. Ипсилатеральная (подвергнутая хирургическому вмешательству) конечность животных в группах, подвергнутых лечению разбавителем, проявляла аллодинию (являлась болезненной) по сравнению с контралатеральной (не подвергнутой хирургическому вмешательству) конечностью или по сравнению с животными, подвергнутыми "ложной" операции ("Ложная операция"). См. пример 5.

На фигуре 13 показаны гистограммы порога отдергивания конечности (граммы, "г") у мышей после DMM, подвергнутых лечению только разбавителем PBS ("Разбавитель") или комбинацией моноклонального антитела к ИЛ-1 $\alpha$  и моноклонального антитела к ИЛ-1 $\beta$ , вводимых интраперитонеально (i.p.) каждые четыре дня в течение четырех недель в концентрации 1 мг/кг ("mAb к ИЛ-1 $\alpha$  (1 мг/кг) + mAb к ИЛ-1 $\beta$  (1 мг/кг)"), в концентрации 3 мг/кг ("mAb к ИЛ-1 $\alpha$  (3 мг/кг) + mAb к ИЛ-1 $\beta$  (3 мг/кг)"), или в концентрации 6 мг/кг ("mAb к ИЛ-1 $\alpha$  (6 мг/кг) + mAb к ИЛ-1 $\beta$  (6 мг/кг)"). Животных тестировали в день 28. Ипсилатеральная (подвергнутая хирургическому вмешательству) конечность животных в группах, подвергнутых лечению только разбавителем PBS, проявляла аллодинию (являлась болезненной) по сравнению с контралатеральной (не подвергнутой хирургическому вмешательству) конечностью ("контралатеральной конечностью") или по сравнению с животными, подвергнутыми "ложной" операции ("Ложная операция"). Результаты показали, что лечение комбинацией моноклонального антитела к ИЛ-1 $\alpha$  и моноклонального антитела к ИЛ-1 $\beta$  предотвращает развитие аллодинии у мышей после DMM дозозависимым образом. См. пример 6.

На фигуре 14 показаны гистограммы порога отдергивания конечности (граммы, "г"), когда мышей после DMM с развившимся остеоартритом и механической аллодинией в день 27 подвергали лечению комбинацией моноклонального антитела к ИЛ-1 $\alpha$  и моноклонального антитела к ИЛ-1 $\beta$ , вводимых интраперитонеально (i.p.) в концентрации 1 мг/кг ("mAb к ИЛ-1 $\alpha$  (1 мг/кг) + mAb к ИЛ-1 $\beta$  (1 мг/кг)"), в концентрации 3 мг/кг ("mAb к ИЛ-1 $\alpha$  (3 мг/кг) + mAb к ИЛ-1 $\beta$  (3 мг/кг)"), или в концентрации 6 мг/кг ("mAb к ИЛ-1 $\alpha$  (6 мг/кг) + mAb к ИЛ-1 $\beta$  (6 мг/кг)"), за 24 часа до тестирования на аллодинию в день 28. Ипсилатеральная (подвергнутая хирургическому вмешательству) конечность животных в группах подвергнутых лечению разбавителем ("разбавитель") проявляла аллодинию (являлась болезненной) по сравнению с контралатеральной (не подвергнутой хирургическому вмешательству) конечностью ("контралатеральной конечностью") или по сравнению с животными, подвергнутыми "ложной" операции ("Ложная операция"). Результаты показали, что лечение комбинацией моноклонального антитела к ИЛ-1 $\alpha$  и моноклонального антитела к ИЛ-1 $\beta$  реверсирует развившуюся аллодинию у мышей после DMM с развившимся заболеванием дозозависимым образом. См. пример 7.

На фигуре 15 показаны гистограммы задержки отдергивания конечности (секунды, "сек") у животных в модели каррагенан-индуцированной воспалительной боли (гипералгезии) у мыши. Через 30 часов после внутривенной инъекции каррагенана мышей подвергали лечению только моноклональным антителом к ИЛ-1 $\alpha$  (900 мкг) ("mAb к ИЛ-1 $\alpha$ "), только моноклональным антителом к ИЛ-1 $\beta$  (900 мкг) ("mAb к ИЛ-

1β"), комбинацией моноклонального антитела к ИЛ-1α (900 мкг) и моноклонального антитела к ИЛ-1β (900 мкг) ("mAb к ИЛ-1α + mAb к ИЛ-1β"), разбавителем PBS ("PBS"), или IgG-изотипическим контролем ("IgG"). Другой группе вводили дозу (30 мг/кг) диклофенака (контрольного нестероидного противовоспалительного анальгетика) через 47 и 95 часов после внутриводовенного введения каррагенана. Тестирование термической гипералгезии с использованием стимуляции лучистым теплом осуществляли через 48 часов (фигура 15А) и 96 часов (фигура 15В) после внутриводовенного введения каррагенана. Закрашенными столбцами показана задержка отдергивания конечности для контрольной конечности (без каррагенана). Незакрашенными столбцами показана задержка отдергивания конечности для конечности, в которую вводили каррагенан. См. пример 8.

На фигуре 16 показаны гистограммы задержки отдергивания конечности (секунды, "сек") у животных в модели каррагенан-индуцированной воспалительной боли (гипералгезии) у мыши. Через 30 часов после внутриводовенной инъекции каррагенана мышцей подвергали лечению разбавителем ("PBS"), IgG-изотипическим контролем ("IgG") или одной из трех доз комбинации моноклонального антитела к ИЛ-1α и моноклонального антитела к ИЛ-1β, где каждое моноклональное антитело вводили в дозе 100 мкг ("mAb к ИЛ-1α (100 мкг) + mAb к ИЛ-1β (100 мкг)"), в дозе 300 мкг ("mAb к ИЛ-1α (300 мкг) + mAb к ИЛ-1β (300 мкг)") или в дозе 900 мкг ("mAb к ИЛ-1α (900 мкг) + mAb к ИЛ-1β (900 мкг)"). Другой группе вводили дозу (30 мг/кг) диклофенака (нестероидного противовоспалительного анальгетика для положительного контроля) через 47 и 95 часов после внутриводовенного введения каррагенана. Тестирование термической гипералгезии с использованием стимуляции лучистым теплом осуществляли через 48 часов (фигура 16А) и 96 часов (фигура 16В) после внутриводовенного введения каррагенана. Закрашенными столбцами показана задержка отдергивания конечности для контрольной конечности (без каррагенана). Незакрашенными столбцами показана задержка отдергивания конечности для конечности, в которую вводили каррагенан. См. пример 9.

На фигуре 17 показаны результаты тестирования комбинированного лечения моноклональными антителами к ИЛ-1α и к ИЛ-1β в модели воспалительной боли, индуцированной СФА ("полный адьювант Фрейнда"), у мыши. Через 30 часов после внутриводовенной инъекции СФА мышцей подвергали лечению комбинацией моноклонального антитела к ИЛ-1α (900 мкг) и моноклонального антитела к ИЛ-1β (900 мкг), разбавителем PBS ("PBS") или IgG-изотипическим контролем ("IgG"). Другой группе вводили дозу (30 мг/кг) диклофенака (нестероидного противовоспалительного анальгетика для положительного контроля) через 47 часов после внутриводовенного введения СФА. Тестирование механической аллодинии у животных с использованием мононити фон Фрея осуществляли через 48 часов после введения СФА. На фигуре 17А показаны гистограммы порога отдергивания конечности (граммы, "г"). Закрашенными столбцами показан порог отдергивания конечности для контралатеральных (без СФА) контрольных конечностей. Незакрашенными столбцами показан порог отдергивания конечности для конечности, в которую вводили СФА, у животных в исследуемых группах. На фигуре 17В показаны гистограммы величины эффективности (% MPE) для животных в исследуемых группах. См. пример 10.

На фигуре 18 показаны гистограммы порога отдергивания конечности (граммы, "г") у животных с нейропатической болью в модели лигатуры спинального нерва L5/L6 (SNL) мышцей. В день 6 после хирургического вмешательства SNL животных подвергали лечению комбинацией моноклонального антитела к ИЛ-1α (900 мкг) и

моноклонального антитела к ИЛ-1 $\beta$  (900 мкг) ("mAb к ИЛ-1 $\alpha$  + mAb к ИЛ-1 $\beta$ "), разбавителем PBS ("PBS") или IgG-изотипическим контролем ("IgG"). Тестирование механической аллодинии у животных с использованием мононити фон Фрея осуществляли через 24 часа (фигура 18А) и 72 часа (фигура 18В) после хирургического вмешательства SNL. В качестве положительного контроля другую группу подвергали лечению габапентином (100 мг/кг, "габапентин") за 1 час до тестирования. См. пример 11.

На фигуре 19 показаны гистограммы величины эффективности (% MPE) для животных в исследуемых группах через 24 и 72 часа, как описано для фигуры 18. Обозначением "Разбавитель" указаны животные после SNL, подвергнутые лечению разбавителем PBS. Обозначением "IgG" указаны животные после SNL, подвергнутые лечению IgG-изотипическим контролем. Обозначением "ИЛ-1 $\alpha\beta$ " указаны животные, подвергнутые лечению комбинацией моноклонального антитела к ИЛ-1 $\alpha$  (900 мкг) и моноклонального антитела к ИЛ-1 $\beta$ . См. пример 11.

15 Подробное описание изобретения

Изобретение основано на обнаружении того, что блокирование функции интерлейкина-1 (ИЛ-1) может являться эффективным средством для лечения остеоартрита (ОА) у индивидуума (человека или другого млекопитающего).

По изобретению блокирования функции ИЛ-1 для лечения ОА можно достигать введением индивидууму одного или нескольких белков, связывающихся с ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$ . Такой терапии "с двойной специфичностью" можно достигать введением пациенту с ОА связывающего белка (например, антитела), связывающего ИЛ-1 $\alpha$ , и связывающего белка (например, антитела), связывающего ИЛ-1 $\beta$ , или введением поливалентного и полиспецифического связывающего белка, связывающегося и с ИЛ-1 $\alpha$ , и с ИЛ-1 $\beta$ . Такой поливалентный и полиспецифический связывающий белок, применимый в изобретении, включает иммуноглобулиновый связывающий белок с двойным переменным доменом (также обозначаемый в рамках изобретения как связывающий белок или молекула "DVD-Ig<sup>TM</sup>" или "DVD-Ig"). См., например, публикацию РСТ № WO2007/024715 и Wu et al. (2007) Nature Biotech. 25(11): 1290-1297. Конкретную комбинацию связывающих белков к ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  или конкретную молекулу DVD-Ig, связывающую и ИЛ-1 $\alpha$ , и ИЛ-1 $\beta$ , применимую для лечения ОА, можно оценивать с использованием ОА модели на животных, такой как ОА модель нестабильности сустава (JIM) или ОА модель дестабилизации медиального мениска (DMM) (Glasson et al. (2007) Osteoarthritis. Cart. 15 (9): 1061-9).

35 Если в рамках изобретения не указано иначе, научные и технические термины, используемые в контексте настоящего изобретения, должны иметь значения, общепринято понимаемые специалистами в этой области. Значение и объем терминов должны являться четкими, однако, в случае любой скрытой двусмысленности, определения, представленные в рамках изобретения, превалируют над любым словарем или внешним источником. Кроме того, если иное не требуется по контексту, термины в единственном числе должны включать множественное число, и термины во множественном числе должны включать единственное число. В настоящей заявке использование термина "или" означает "и/или", если не указано иначе. Кроме того, использование термина "включая", а также других форм, таких как "включает" и "включенный", не является ограничивающим. Также, термины, такие как "элемент" или "компонент", включают элементы и компоненты, включающие одну единицу, и элементы и компоненты, включающие несколько субъединиц, если конкретно не указано иначе.

Как правило, номенклатуры и способы, используемые в связи с культивированием клеток и тканей, молекулярной биологией, иммунологией, микробиологией, генетикой, химией белков и нуклеиновых кислот и гибридизацией нуклеиновых кислот, представленные в рамках изобретения, хорошо известны и общеупотребительны в этой области. Способы по настоящему изобретению, как правило, осуществляют в соответствии с общепринятыми способами, хорошо известными в этой области и описываемыми в различных общих и более специальных источниках, цитируемых и обсуждаемых на всем протяжении настоящего описания, если не указано иначе. Способы ферментативных реакций и очистки осуществляли по инструкциям производителя, общепринятым в этой области или представленным в рамках изобретения.

Номенклатуры и лабораторные способы, используемые в связи с аналитической химией, синтетической органической химией и медицинской и фармацевтической химией, представленные в рамках изобретения, хорошо известны и общеупотребительны в этой области. Для химического синтеза, химических анализов, получения фармацевтических препаратов, составов, их доставки и лечения пациентов используют стандартные способы.

Для лучшего понимания настоящего изобретения избранные термины определены ниже.

Термин "полипептид" означает любую полимерную цепь аминокислот. Термины "пептид" и "белок" взаимозаменяемо используют с термином полипептид, и они также относятся к полимерной цепи аминокислот. Термин "полипептид" включает нативные или искусственные белки, фрагменты белков и полипептидные аналоги белковой последовательности. Полипептид может являться мономерным или полимерным.

Термин "выделенный белок" или "выделенный полипептид" означает белок или полипептид, который благодаря своему происхождению или источнику получения не связан с сопутствующими ему в природе компонентами, сопровождающими его в его нативном состоянии, по существу, не содержит другие белки того же вида, экспрессируется клетками разных видов или не существует в природе. Таким образом, полипептид, синтезированный химически или синтезированный в клеточной системе, отличающейся от клетки, в которой он в природе существует, будут "выделять" из сопутствующих ему в природе компонентов. Белок также можно получать, по существу, не содержащим сопутствующие ему в природе компоненты с помощью выделения с использованием способов очистки белка, хорошо известных в этой области.

Термин "выделение" означает способ получения химических соединений, таких как полипептид, по существу не содержащих сопутствующие им в природе компоненты с помощью выделения, например, с использованием способов очистки белка, хорошо известных в этой области.

Термин "ИЛ-1 $\alpha$  человека" (также сокращенно обозначаемый в рамках изобретения как "hIL-1 $\alpha$ " или "ИЛ-1 $\alpha$ ") включает плеiotропный цитокин, участвующий в различных иммунных ответах, воспалительных процессах и гемопоэзе. Например, ИЛ-1 $\alpha$  включает цитокин человека, продуцируемый активированными макрофагами; он стимулирует пролиферацию тимоцитов, индуцируя высвобождение ИЛ-2, созревание и пролиферацию В-клеток, и активность фактора роста фибробластов. Термин "ИЛ-1 $\alpha$  человека" предназначен для включения рекомбинантного ИЛ-1 $\alpha$  человека ("rhIL-1 $\alpha$ "), который можно получать стандартными способами рекомбинантной экспрессии.

Термин "ИЛ-1 $\beta$  человека" (также сокращенно обозначаемый в рамках изобретения как "hIL-1 $\beta$ " или "ИЛ-1 $\beta$ ") включает плеiotропный цитокин, участвующий в различных иммунных ответах, воспалительных процессах и гемопоэзе. Термин "ИЛ-1 $\beta$ " человека

включает рекомбинантный ИЛ-1 $\beta$  человека ("rhIL-1 $\beta$ "), который можно получать стандартными способами рекомбинантной экспрессии.

Аминокислотные последовательности ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  человека представлены в таблице 1.

5

Таблица 1 Последовательности ИЛ-1 $\alpha$ и ИЛ-1 $\beta$ человека		
Белок	Идентификатор последовательности	Последовательность
		123456789012345678901234567890
10 Про-ИЛ-1 $\alpha$ человека	SEQ ID NO:1	MAKVPDMFEDLKNCYSENEEDSSSIDHLSL NQKSFYHVSYGPLHEGCMQSVLSISSETS KTSKLTFFKESMVVATNGKVLKRRRLSLSQ SITDDDLLEAIAANDSEEEIIPRSAPFSFLS NVKYNFMRIKYEFILENDALNQSIIRANDQ YLTAALHNLDEAVKFDMGAYKSSKDDAKI TVILRISKTLQYVTAQDEDPVLLKEMPEI PKTITGSETNLLFFWETHGKKNYFTSV AHP NLFIATKQDYWVCLAGGPPSITDFQILENQ A
15 Зрелый ИЛ-1 $\alpha$ человека	Residues 113-271 of SEQ ID NO:1	SAPFSFLSNVKYNFMRIKYEFILENDALNQ SIIRANDQYLTAALHNLDEAVKFDMGAYK SSKDDAKITVILRISKTLQYVTAQDEDPV LLKEMPEIPKTITGSETNLLFFWETHGKKN YFTSV AHPNLFIATKQDYWVCLAGGPPSIT DFQILENQ A
20 Зрелый ИЛ-1 $\beta$ человека	SEQ ID NO:2	APVRSLNCTLRDSQQKSLVMSGPYELKALH LQGQDMEQQVVFMSFVQGEESNDKIPVAL GLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNY PKKKMEKRFVFNKIEINNKLEFESAQFPNW YISTSQAENMPVF LGGTGGQDITDFTMQF VSS

25

Термин "биологическая активность" относится ко всем характерным биологическим свойствам цитокина. Биологические свойства ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  включают, в качестве неограничивающих примеров, связывание с рецептором ИЛ-1.

30

"Биологическая активность" относится ко всем характерным биологическим свойствам ИЛ-1 $\alpha$ . Биологические свойства ИЛ-1 $\alpha$  включают, в качестве неограничивающих примеров, свойства, связывание с рецептором ИЛ-1 $\alpha$ , стимуляцию пролиферации тимоцитов посредством индуцирования высвобождения ИЛ-2, созревание и пролиферацию В-клеток, и активность фактора роста фибробластов.

35

Термины "специфическое связывание" или "специфически связывающий" по отношению к взаимодействию антитела, белка или пептида со вторым химическим соединением означает, что взаимодействие зависит от наличия конкретной структуры (например, антигенной детерминанты или эпитопа) в химическом соединении, например, антитело распознает конкретную белковую структуру и связывается с ней в большей степени, чем с белками вообще. Если антитело является специфичным для эпитопа "А", наличие молекулы, содержащей эпитоп А (или свободный, немеченый А), в реакции, содержащей меченый "А" и антитело, будет снижать количество меченого А, связанного с антителом.

40

Термин "антитело" в широком смысле относится к любой молекуле иммуноглобулина (Ig), состоящей из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, или любому его функциональному фрагменту, мутанту, варианту или производному, сохраняющему основные свойства связывания эпитопа молекулы Ig. Такие форматы мутанта, варианта, или производного антитела известны в этой области, и их неограничивающие варианты осуществления описаны ниже.

45

В полноразмерном антителе каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращенно обозначаемой в рамках изобретения как HCVR или VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех

доменов, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно обозначаемой в рамках изобретения как LCVR или VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена CL. Области VH и VL можно дополнительно разделять на гиперпеременные области, 5 обозначаемые как определяющие комплементарность области (CDR), перемежающиеся более консервативными областями, обозначаемыми как каркасные области (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, располагающихся от amino-конца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Молекулы иммуноглобулинов могут представлять собой любой тип (например, IgG, 10 IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класс (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласс.

Термин "антигенсвязывающая часть" антитела относится к одному или нескольким фрагментам антитела, сохраняющим способность специфически связываться с антигеном (например, hIL-1 $\alpha$ ). Антигенсвязывающую функцию антитела могут осуществлять 15 фрагменты полноразмерного антитела. Такие варианты антител также могут иметь биспецифические форматы, форматы с двойной специфичностью, или полиспецифические форматы, специфически связывающиеся с двумя или более различными антигенами. Примеры связывающих фрагментов, включенных в термин "антигенсвязывающая часть" антитела, включают (i) Fab-фрагмент, представляющий собой одновалентный 20 фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент, представляющий собой двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела; (v) dAb-фрагмент (Ward et al. (1989) Nature 341:544-546, 25 публикация РСТ № WO90/05144), содержащий отдельный переменный домен; и (vi) выделенную определяющую комплементарность область (CDR). Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются отдельными генами, их можно соединять с использованием рекомбинантных способов с помощью синтетического линкера, что позволяет получать их в виде единой белковой цепи, в которой области VL и VH попарно 30 соединяют для получения одновалентных молекул (известных как одноцепочечные Fv (scFv); см. например, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; и Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Такие одноцепочечные антитела (scFv) также предназначены для включения в термин "антигенсвязывающая часть" антитела. Также включают другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела. Диатела являются 35 двухвалентными биспецифическими антителами, в которых домены VH и VL экспрессируются на единой полипептидной цепи, но с использованием линкера, слишком короткого для образования пары между двумя доменами на одной цепи, что, таким образом, заставляет домены образовывать пары с комплементарными доменами другой цепи и позволяет получать два антигенсвязывающих участка (см., например, Holliger 40 et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak et al. (1994) Structure 2: 1121-1123). В этой области известны такие связывающие части антител (Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (Springer-Verlag, New York, 2001) (ISBN 3-540-41354-5)).

Термин "конструкция антитела" относится к полипептиду, содержащему одну или несколько антигенсвязывающих частей по изобретению, соединенных с линкерным 45 полипептидом или константным доменом иммуноглобулина. Линкерные полипептиды содержат два или более аминокислотных остатка, соединенных пептидными связями, и их используют для соединения одной или нескольких антигенсвязывающих частей. Такие линкерные полипептиды хорошо известны в этой области (см., например, Holliger

et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak et al. (1994) Structure 2: 1121-1123). Константный домен иммуноглобулина относится к константному домену тяжелой или легкой цепи. Аминокислотные последовательности константных доменов тяжелой цепи IgG (гамма) и легкой цепи (каппа и лямбда) человека известны в этой области и представлены в таблице 2.

Таблица 2 Последовательности константных доменов тяжелой и легкой цепи IgG человека		
Белок	Идентификатор последовательности	Последовательность
		123456789012345678901234567890
10 Константная область IgG1	SEQ ID NO:3	ASTKGPVSFVFLPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
15 Мутантная константная область IgG1	SEQ ID NO:4	ASTKGPVSFVFLPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAEEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
20 Константная область кап-па-цепи Ig	SEQ ID NO:5	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
25 Константная область лямбда-цепи Ig	SEQ ID NO:6	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQ SNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSQCQVTH EGSTVEKTVAPTECS

Кроме того, антитело или его антигенсвязывающая часть может являться частью большей иммуномолекулы адгезии, образованной посредством ковалентного или нековалентного соединения антитела или антигенсвязывающей части с одним или несколькими другими белками или пептидами. Примеры таких иммуномолекул адгезии включают использование коровой области стрептавидина для получения тетрамерной молекулы scFv (Kipriyanov, S. et al. (1995) Human Antibod. Hybridomas 6:93-101) и использование остатка цистеина, маркерного пептида и С-концевой полигистидиновой метки для получения бивалентных и биотинилированных молекул scFv (Kipriyanov, S. et al. (1994) Mol. Immunol. 31: 1047-1058). Антигенсвязывающие части антител, такие как Fab- и F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты, можно получать из целых антител с использованием общепринятых способов, таких как расщепление целых антител папаином или пепсином, соответственно. Кроме того, антитела, их антигенсвязывающие части и иммуномолекулы адгезии можно получать с использованием стандартных способов рекомбинантной ДНК, представленных в рамках изобретения.

Термин "выделенное антитело" относится к антителу, по существу, не содержащему другие антитела, имеющие различные антигенные специфичности (например, выделенное антитело, специфически связывающееся с hIL-1 $\alpha$ , по существу, не содержит антитела, специфически связывающиеся с антигенами, иными, чем hIL-1 $\alpha$ ). Однако выделенное антитело, специфически связывающееся с hIL-1 $\alpha$ , может иметь перекрестную реактивность с другими антигенами, такими как молекулы ИЛ-1 $\alpha$  другого вида. Кроме

того, выделенное антитело, по существу, может не содержать другой клеточный материал и/или химические вещества.

5 Термин "антитело человека" включает антитела, имеющие переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Антитела человека по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, мутации, вносимые случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro*, или соматическую мутацию *in vivo*), например в CDR и, в частности, CDR3. Однако термин "антитело человека" не включает антитела, 10 в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, таких как мышь, пересекаются на каркасные последовательности человека.

Термин "рекомбинантное антитело человека" включает все антитела человека, получаемые, экспрессируемые, создаваемые или выделяемые рекомбинантными 15 способами, например, антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантного экспрессирующего вектора, трансфицированного в клетку-хозяина (подробно описано в разделе II C ниже), антитела, выделяемые из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител человека (Hoogenboom, H. (1997) Trends Biotechnol. 15: 62-70; Azzazy и Highsmith (2002) Clin. Biochem. 35: 425-445; Gavilondo and Larrick (2000) BioTechniques 29: 128-145; Hoogenboom and Chames (2000) Immunol. Today 21: 371-378), антитела, 20 выделяемые из животного (например, мыши), трансгенного по генам иммуноглобулина человека (см., например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295; Kellermann and Green (2002) Curr. Opin. Biotechnol. 13: 593-597; Little et al. (2000) Immunol. Today 21:364-370), или антитела, получаемые, экспрессируемые, создаваемые или выделяемые любыми 25 другими способами, включающими сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулинов человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека содержат переменные и константные области, получаемые из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Однако в некоторых вариантах осуществления такие рекомбинантные антитела человека 30 подвергаются мутагенезу *in vitro* (или соматическому мутагенезу *in vivo*, если используют животное, трансгенное по последовательностям Ig человека) и, таким образом, аминокислотные последовательности областей VH и VL рекомбинантных антител являются последовательностями, которые, одновременно являясь выделяемыми из последовательностей VH и VL зародышевой линии человека и родственными им, могут 35 не существовать в природе в репертуаре антител зародышевой линии человека *in vivo*.

Термин "химерное антитело" относится к антителам, содержащим последовательности переменной области тяжелой и легкой цепи одного вида и последовательности константной области другого вида, таким как антитела, содержащие переменные области тяжелой и легкой цепей мыши, соединенные с константными областями 40 человека.

Термин "антитело с пересаженными CDR" относится к антителам, содержащим последовательности переменной области тяжелой и легкой цепи одного вида, но в которых последовательности одной или нескольких областей CDR областей VH и/или VL заменяются последовательностями CDR другого вида, такими как антитела, 45 содержащие переменные области тяжелой и легкой цепей человека, в которых одну или несколько CDR человека (например, CDR3) заменяются последовательностями CDR мыши, например, получаемыми из моноклонального антитела мыши к ИЛ-1 $\alpha$  человека.

В рамках изобретения термин "CDR" относится к определяющей комплементарности

области в последовательности вариабельной области антитела. В каждой из вариабельных областей тяжелой цепи и легкой цепи находятся три CDR, обозначаемых CDR1, CDR2 и CDR3, для каждой из вариабельных областей. В рамках изобретения термин "набор CDR" относится к группе из трех CDR, находящихся в одной вариабельной области (т.е. VH или VL) антигенсвязывающего участка. Точные границы этих CDR по-разному определяют согласно различным системам. Система, описываемая Kabat (Kabat et al. (1987, 1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland), не только представляет четкую систему нумерации остатков, применимую к любой вариабельной области антитела, но также позволяет определять точные границы остатков, определяющих три CDR. Эти CDR можно обозначать как CDR по Kabat. Chothia и соавт. (Chothia и Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917 и Chothia et al. (1989) Nature 342: 877-883) обнаружили, что конкретные субфрагменты в CDR по Kabat принимают почти идентичные конформации пептидного остова, несмотря на наличие значительного разнообразия на уровне аминокислотной последовательности. Эти субфрагменты обозначали как L1, L2 и L3 или H1, H2 и H3, где "L" и "H" обозначают области легкой цепи и тяжелой цепи, соответственно. Эти области можно обозначать как CDR по Chothia, имеющие границы, перекрывающиеся с CDR по Kabat. Другие границы, определяющие CDR, перекрывающиеся с CDR по Kabat, описывают Padlan et al. (1995) FASEB J. 9: 133-139 и MacCallum (1996) J. Mol. Biol. 262(5): 732-745). Другие определения границ CDR могут не следовать строго одной из указанных выше систем, но, тем не менее, будут перекрываться с CDR по Kabat, хотя их можно укорачивать или удлинять с учетом прогнозирования или экспериментальных результатов о том, что конкретные остатки или группы остатков или даже целые CDR не влияют значительно на связывание антигена. В способах, представленных в рамках изобретения, могут использовать CDR, определяемые по любой из этих систем, хотя в конкретных вариантах осуществления используют CDR, определяемые по Kabat или Chothia.

Термины "нумерация по Kabat", "определение по Kabat" и "мечение по Kabat" в рамках изобретения используют взаимозаменяемо. Эти термины относятся к системе нумерации аминокислотных остатков, более вариабельных (т.е. гипервариабельных), чем другие аминокислотные остатки в вариабельных областях тяжелой и легкой цепи антитела или его антигенсвязывающей части (Kabat et al. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190: 382-391 и Kabat, E. et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). В случае вариабельной области тяжелой цепи гипервариабельная область располагается в положениях аминокислот с 31 по 35 для CDR1, положениях аминокислот с 50 по 65 для CDR2 и положениях аминокислот с 95 по 102 для CDR3. В случае вариабельной области легкой цепи гипервариабельная область располагается в положениях аминокислот с 24 по 34 для CDR1, положениях аминокислот с 50 по 56 для CDR2 и положениях аминокислот с 89 по 97 для CDR3.

Рост обширных общедоступных баз данных об аминокислотных последовательностях вариабельных областей тяжелой и легкой цепей и их анализ за последние двадцать лет привели к пониманию типичных границ между последовательностями каркасных областей (FR) и CDR в последовательностях вариабельных областей и позволили специалистам в этой области точно определять CDR согласно нумерации по Kabat, нумерации по Chothia или другим системам. См., например, Martin, "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains", In Kontermann and Dubel, eds., Antibody Engineering (Springer-Verlag, Berlin, 2001), chapter 31, pages 432-433. Применимый способ

определения аминокислотных последовательностей CDR по Kabat в аминокислотных последовательностях переменных областей тяжелой цепи (VH) и переменных областей легкой цепи (VL) представлен ниже:

Для определения аминокислотной последовательности CDR-L1:

5 Начинается приблизительно через 24 аминокислотных остатка с amino-конца области VL;

Остаток перед последовательностью CDR-L1 всегда представляет собой цистеин (C);

Остаток после последовательности CDR-L1 всегда представляет собой остаток триптофана (W), как правило, Trp-Tyr-Gln (W-Y-Q), но также и Trp-Leu-Gln (W-L-Q),

10 Trp-Phe-Gln (W-F-Q) и Trp-Tyr-Leu (W-Y-L);

Длина, как правило, составляет от 10 до 17 аминокислотных остатков.

Для определения аминокислотной последовательности CDR-L2:

Всегда начинается через 16 остатков от конца CDR-L1;

15 Остатки перед последовательностью CDR-L2, как правило, представляют собой Ile-Tyr (I-Y), но также и Val-Tyr (V-Y), Ile-Lys (I-K) и Ile-Phe (I-F);

Длина всегда представляет собой 7 аминокислотных остатков.

Для определения аминокислотной последовательности CDR-L3:

Всегда начинается через 33 аминокислоты от конца CDR-L2;

20 Остаток перед аминокислотной последовательностью CDR-L3 всегда представляет собой цистеин (C);

Остатки после последовательности CDR-L3 всегда представляют собой Phe-Gly-X-Gly (F-G-X-G) (SEQ ID NO:7), где X является любой аминокислотой;

Длина, как правило, составляет от 7 до 11 аминокислотных остатков.

Для определения аминокислотной последовательности CDR-H1:

25 Начинается приблизительно через 31 аминокислотный остаток от amino-конца области VH и всегда через 9 остатков после цистеина (C);

Остатки перед последовательностью CDR-H1 всегда представляют собой Cys-X-X-X-X-X-X (SEQ ID NO: 151), где X является любой аминокислотой;

30 Остаток после последовательности CDR-H1 всегда представляет собой Trp (W), как правило, Trp-Val (W-V), но также и Trp-Ile (W-I) и Trp-Ala (W-A);

Длина, как правило, составляет от 5 до 7 аминокислотных остатков.

Для определения аминокислотной последовательности CDR-H2:

Всегда начинается через 15 аминокислотных остатков от конца CDR-H1;

35 Остатки перед последовательностью CDR-H2, как правило, представляют собой Leu-Glu-Trp-Ile-Gly (L-E-W-I-G) (SEQ ID NO: 8), но также и другие варианты;

Остатки после последовательности CDR-H2 представляют собой Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala (K/R-L/I/V/F/T/A-T/S/I/A);

Длина, как правило, составляет от 16 до 19 аминокислотных остатков.

Для определения аминокислотной последовательности CDR-H3:

40 Всегда начинается через 33 аминокислотных остатка от конца CDR-H2 и всегда через 3 аминокислотных остатка после цистеина (C);

Остатки перед последовательностью CDR-H3 всегда представляют собой Cys-X-X (C-X-X), где X является любой аминокислотой, как правило, Cys-Ala-Arg (C-A-R);

45 Остатки после последовательности CDR-H3 всегда представляют собой Trp-Gly-X-Gly (W-G-X-G) (SEQ ID NO: 9), где X является любой аминокислотой;

Длина, как правило, составляет от 3 до 25 аминокислотных остатков.

В рамках изобретения термины "акцептор" и "акцепторное антитело" относятся к антителу или последовательности нуклеиновой кислоты, определяющей или кодирующей

по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или 100% аминокислотных последовательностей одной или нескольких каркасных областей. В некоторых вариантах осуществления термин "акцептор" относится к аминокислотной последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты антитела, определяющей или кодирующей константные области. В еще одном варианте осуществления термин "акцептор" относится к аминокислотной последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты антитела, определяющей или кодирующей одну или несколько каркасных областей и константных областей. В конкретном варианте осуществления термин "акцептор" относится к аминокислотной последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты антитела человека, определяющей или кодирующей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или 100% аминокислотных последовательностей одной или нескольких каркасных областей. По этому варианту осуществления акцептор может содержать по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или по меньшей мере 10 аминокислотных остатков, не находящихся в одном или нескольких конкретных положениях антитела человека. Каркасные области акцептора и/или константные области акцептора, например, можно получать из гена антитела зародышевой линии, гена зрелого антитела, функционального антитела (например, антител, хорошо известных в этой области, антител, находящихся в разработке, или коммерчески доступных антител).

В рамках изобретения термин "канонический" остаток относится к остатку в CDR или каркасе, определяющему конкретную каноническую структуру CDR, как определяют по Chothia et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917 и Chothia et al. (1992) J. Mol. Biol. 227:799-817). Согласно Chothia et al., критические части CDR многих антител имеют почти идентичные конформации пептидного остова, несмотря на значительное многообразие на уровне аминокислотной последовательности. Каждая каноническая структура, главным образом, определяет набор торсионных углов пептидного остова для смежного сегмента аминокислотных остатков, формирующих петлю.

В рамках изобретения термины "донор" и "донорное антитело" относятся к антителу, из которого получают одну или несколько CDR. В одном из вариантов осуществления донорное антитело является антителом вида, отличным от антитела, из которого получают каркасные области. В отношении гуманизованного антитела термин "донорное антитело" относится к не принадлежащему человеку антителу, из которого получают одну или несколько CDR.

В рамках изобретения термин "каркас" или "каркасная последовательность" относится к оставшимся последовательностям варибельной области без CDR. т.к. точное определение последовательности CDR можно осуществлять с помощью различных систем, значение каркасной последовательности является предметом, соответственно, разных интерпретаций. Шесть CDR (CDR-L1, -L2 и -L3 легкой цепи и CDR-H1, -H2 и -H3 тяжелой цепи) также разделяют каркасные области легкой цепи и тяжелой цепи на четыре подобласти (FR1, FR2, FR3 и FR4) на каждой цепи, в которой CDR1 расположен между FR1 и FR2, CDR2 между FR2 и FR3 и CDR3 между FR3 и FR4. Без определения конкретных подобластей как FR1, FR2, FR3 или FR4, каркасная область, как указано другими, представляет комбинированные FR в варибельной области единой цепи природного иммуноглобулина. В рамках изобретения FR в единственном числе представляет одну из четырех подобластей, и FR во множественном числе представляет две или более из четырех подобластей, составляющих каркасную область.

В этой области известны акцепторные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи человека. В одном из вариантов осуществления изобретения акцепторные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи человека выбраны из последовательностей, описываемых в таблице 3 и таблице 4.

5

Таблица 3 Акцепторные последовательности тяжелой цепи		
SEQ ID No.	Область белка	Последовательность
		123456789012345678901234567890
10	VH2-70/JH6 FR1	EVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSL
11	VH2-70/JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLA
12	VH2-70/JH6 FR3	RLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCAR
13	VH2-70/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
14	VH2-26/JH6 FR1	EVTLKESGPVIVKPTETLTLTCTVSGFSL
15	VH2-26/JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLA
16	VH2-26/JH6 FR3	RLTISKDTSKSVVLMTNMDPVDATYYCAR
17	VH2-26/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
18	VH3-72/JH6 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
19	VH3-72/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVG
20	VH3-72/JH6 FR3	RFTISRDDSKNSLYLQMNLSKTEDTAVYYCAR
21	VH3-72/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
22	VH3-21/JH6 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
23	VH3-21/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
24	VH3-21/JH6 FR3	RFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCAR
25	VH3-21/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
26	VH1-69/JH6 FR1	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFS
27	VH1-69/JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
28	VH1-69/JH6 FR3	RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
29	VH1-69/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
30	VH1-18/JH6 FR1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT
31	VH1-18/JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
32	VH1-18/JH6 FR3	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
33	VH1-18/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
34	VH7-4.1/JH6 FR1	QVQLVQSGSELKPGASVKVSKASGYTFT
35	VH7-4.1/JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
36	VH7-4.1/JH6 FR3	RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAR
37	VH7-4.1/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS

10

15

20

25

30

35

40

45

Таблица 4 Акцепторные последовательности легкой цепи		
SEQ ID No.	Область белка	Последовательность
		123456789012345678901234567890
38	B3/JK4 FR1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC
39	B3/JK4 FR2	WYQQKPGQPPKLLIY
40	B3/JK4 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC
41	B3/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
42	L2/JK4 FR1	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC
43	L2/JK4 FR2	WYQQKPGQAPRLLIY
44	L2/JK4 FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC
45	L2/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
46	L15/JK4 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTC
47	L15/JK4 FR2	WYQQKPEKAPKSLIY
48	L15/JK4 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
49	L15/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
50	L5/JK4 FR1	DIQMTQSPSSVSASVGDRTTTC
51	L5/JK4 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
52	L5/JK4 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
53	L5/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR

54	1-33/018/JK2 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC
55	1-33/018/JK2 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
56	1-33/018/JK2 FR3	GVPSRFGSGSGTDFFTISLQPEDIATYYC
57	1-33/018/JK2 FR4	FGQGTKLEIKR
58	1-33/018/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR

5 В рамках изобретения термин "ген антитела зародышевой линии" или "фрагмент гена" относится к последовательности иммуноглобулина, кодируемой в нелимфоидных клетках, не подвергавшихся процессу созревания, приводящему к перегруппировке генов и мутации для экспрессии конкретного иммуноглобулина (см., например, Shapiro et al. (2002) Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200; Marchalonis et al. (2001) Adv. Exp. Med. Biol. 484: 13-30). Одно из преимуществ, обеспечиваемых различными вариантами осуществления настоящего изобретения, вытекает из утверждения, что гены антител зародышевой линии более вероятно, чем гены зрелого антитела, сохраняют основную структуру аминокислотной последовательности, характерную для индивидуумов этого вида, таким образом, менее вероятно, что они будут распознаваться как чужеродные при терапевтическом использовании для этого вида.

10 В рамках изобретения термин "ключевые" остатки относится к конкретным остаткам в варибельной области, в большей степени влияющим на специфичность связывания и/или аффинность антитела, в частности, гуманизированного антитела. Ключевой остаток включает, в качестве неограничивающих примеров, один или несколько из следующего: смежного с CDR остатка, потенциального участка гликозилирования (может представлять собой участок N- или O-гликозилирования), редкого остатка, остатка, способного взаимодействовать с антигеном, остатка, способного взаимодействовать с CDR, канонического остатка, контактного остатка между варибельной областью тяжелой цепи и варибельной областью легкой цепи, остатка в зоне Вернье и остатка в области перекрытия между определением CDR1 варибельной области тяжелой цепи по Chothia и определением первой каркасной области тяжелой цепи по Kabat.

20 Термин "гуманизированное антитело" относится к антителам, содержащим последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепи, не являющихся видом человека (например, мыши), но в которых, по меньшей мере, часть последовательности VH и/или VL изменена на более "человекоподобную", т.е. более схожую с варибельными последовательностями зародышевой линии человека. Одним из типов гуманизированного антитела является антитело с пересаженными CDR, в котором не принадлежащие человеку последовательности CDR встроены в последовательности VH и VL человека для замены соответствующих не принадлежащих человеку каркасных (FR) последовательностей. Например, "гуманизированное антитело" является антителом или его вариантом, производным, аналогом или фрагментом, иммуноспецифически связывающимся с интересующим антигеном и содержащим каркасную область (FR), имеющую, по существу, аминокислотную последовательность антитела человека, и определяющую комплементарную область (CDR), имеющую, по существу, аминокислотную последовательность не принадлежащего человеку антитела. В рамках изобретения термин "по существу" в отношении CDR относится к CDR, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или, по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности CDR не принадлежащего человеку антитела. Гуманизированное антитело содержит, по существу, все из по меньшей мере одного и, как правило, двух

вариабельных доменов (Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, FabC, Fv), в котором все или, по существу, все области CDR соответствуют таковым из не принадлежащего человеку иммуноглобулина (т.е. донорного антитела), и все или, по существу, все из каркасных областей являются таковыми из консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. В варианте осуществления гуманизированное антитело также содержит, по меньшей мере, часть константной области (Fc) иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина человека. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело содержит как вариабельный домен легкой цепи, так и, по меньшей мере, вариабельный домен тяжелой цепи. Антитело также может включать шарнирную область, области СН1, СН2, СН3 и СН4 тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело содержит только гуманизированную легкую цепь. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело содержит только гуманизированную тяжелую цепь. В конкретных вариантах осуществления гуманизированное антитело содержит только гуманизированный вариабельный домен легкой цепи и/или гуманизированную тяжелую цепь.

Гуманизированное антитело можно выбирать из любого класса иммуноглобулинов, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изотипа, включая, в качестве неограничивающих примеров IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Гуманизированное антитело может содержать последовательности из нескольких классов или изотипов, и для оптимизации желательных эффекторных функций можно выбирать конкретные константные домены с использованием способов, хорошо известных в этой области.

Каркасные области и CDR гуманизированного антитела могут не соответствовать точно родительским последовательностям, например, CDR донорного антитела или консенсусный каркас можно подвергать мутагенезу посредством замены, инсерции и/или делеции по меньшей мере одного аминокислотного остатка таким образом, что CDR или каркасный остаток в этом участке не соответствует остатку в донорном антителе или консенсусном каркасе. Однако в одном из вариантов осуществления такие мутации не будут протяженными. Как правило, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% и по меньшей мере 95% остатков гуманизированного антитела будут соответствовать таковым в последовательностях родительских FR и CDR. В рамках изобретения термин "консенсусный каркас" относится к каркасной области в консенсусной последовательности иммуноглобулина. В рамках изобретения термин "консенсусная последовательность иммуноглобулина" относится к последовательности, образованной наиболее часто встречающимися аминокислотами (или нуклеотидами) в семействе родственных последовательностей иммуноглобулинов (см., например, Winnaker (1987) From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany)). Таким образом, "консенсусная последовательность иммуноглобулина" может содержать "консенсусный вариабельный домен" и/или "консенсусный константный домен". В свою очередь, "консенсусный вариабельный домен" может содержать одну или несколько "консенсусных каркасных областей" и/или одну или несколько "консенсусных CDR". В семействе иммуноглобулинов каждое положение в консенсусной последовательности занято аминокислотой, встречающейся наиболее часто в этом положении в семействе. Если две аминокислоты встречаются в равной степени часто, то в консенсусную последовательность можно включать любую.

В рамках изобретения термин "зона Вернье" относится к подгруппе каркасных остатков, которые могут регулировать структуру CDR и точно настраивать ее для соответствия антигену, как описывают Foote и Winter (1992) J. Mol. Biol. 224:487-499. Остатки зоны Вернье образуют слой, лежащий под CDR, и могут влиять на структуру

CDR и аффинность антитела.

В рамках изобретения термин "поливалентный связывающий белок" означает связывающий белок, содержащий два или более антигенсвязывающих участка. Поливалентный связывающий белок конструируют содержащим три или более антигенсвязывающих участка, и, как правило, он не является природным антителом. Термин "полиспецифический связывающий белок" относится к связывающему белку, способному связываться с двумя или более родственными или неродственными мишенями. Связывающие белки с двойным вариабельным доменом (DVD) являются связывающими белками, содержащими два или более антигенсвязывающих участка и являющимися четырехвалентными или поливалентными связывающими белками. Такие связывающие белки с DVD могут являться моноспецифическими, т.е. способными связываться с одним антигеном, или полиспецифическими, т.е. способными связываться с двумя или более антигенами. Связывающие белки с DVD, содержащие два полипептида тяжелой цепи с DVD и два полипептида легкой цепи с DVD, обозначают как молекула DVD-Ig<sup>TM</sup>. Каждая половина молекулы DVD-Ig<sup>TM</sup> содержит полипептид тяжелой цепи с DVD, полипептид легкой цепи с DVD и два антигенсвязывающих участка. Каждый участок связывания содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи всего с 6 CDR, участвующих в связывании антигена, на антигенсвязывающий участок. Связывающие белки с DVD и способы получения связывающих белков с DVD описывают в патенте США № 7612181.

Один из аспектов изобретения относится к связывающему белку с DVD, включающему связывающие белки, способные связываться с ИЛ-1 $\alpha$  человека. В другом аспекте связывающий белок с DVD способен связываться с ИЛ-1 $\alpha$  и второй мишенью. В одном из вариантов осуществления связывающий белок с DVD способен связываться с ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$ .

Термин "нейтрализация" относится к нейтрализации биологической активности цитокина, когда связывающий белок специфически связывается с цитокином. В варианте осуществления нейтрализующий связывающий белок является нейтрализующим антителом, связывание которого с hIL-1 $\alpha$  приводит к ингибированию биологической активности hIL-1 $\alpha$ . В варианте осуществления нейтрализующий связывающий белок связывается с hIL-1 $\alpha$  и снижает биологическую активность hIL-1 $\alpha$  по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95% или по меньшей мере приблизительно на 100%. Ингибирование биологической активности hIL-1 $\alpha$  посредством нейтрализации связывающего белка можно оценивать с помощью измерения одного или нескольких показателей биологической активности hIL-1 $\alpha$ , хорошо известных в этой области.

Термин "эпитоп" включает любую полипептидную детерминанту, способную специфически связываться с иммуноглобулином или Т-клеточным рецептором. В некоторых вариантах осуществления эпитопы включают химически активные поверхностные группировки молекул, таких как аминокислоты, боковые сахарные цепи, фосфорильные или сульфонильные группы и в некоторых вариантах осуществления могут иметь конкретные трехмерные структурные характеристики и/или конкретные характеристики заряда. Эпитоп является областью антигена, связываемой антителом. Таким образом, эпитоп состоит из аминокислотных остатков области антигена (или его фрагмента), о которых известно, что они связываются с комплементарным участком на специфичном партнере по связыванию. Антигенный фрагмент может содержать

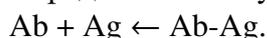
несколько эпитопов. В некоторых вариантах осуществления указывают, что антитело специфически связывается с антигеном, когда оно распознает свой антиген-мишень в сложной смеси белков и/или макромолекул. Указывают, что антитела "связываются с одним и тем же эпитопом", если антитела перекрестно конкурируют (одно предотвращает связывание или модулирует эффект другого). Кроме того, структурные определения эпитопов (перекрывающиеся, аналогичные, идентичные) являются информативными, но функциональные определения часто являются более значимыми, т.к. они включают структурные (связывание) и функциональные (модуляция, конкуренция) параметры.

Термин "поверхностный плазмонный резонанс" относится оптическому явлению, позволяющему анализировать биоспецифичные взаимодействия в реальном времени с помощью определения изменений концентраций белков в матрице биосенсора, например, с использованием системы BIACORE™ (Biacore International AB, a GE Healthcare company, Uppsala, Sweden and Piscataway, New Jersey). Дополнительно описание см. в Jonsson, U. et al. (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51: 19-26; Jonsson, U. et al. (1991) *BioTechniques* 11: 620-627; Johnsson, B. et al. (1995) *J. Mol. Recognit.* 8: 125-131; и Johnsson, B. et al. (1991) *Anal. Biochem.* 198: 268-277.

Термин " $K_{on}$ " относится к константе скорости прямой реакции для ассоциации связывающего белка (например, антитела) с антигеном для образования, например, комплекса антитело/антиген, как известно в этой области. " $K_{on}$ " также известна по терминам "константа скорости ассоциации" или " $k_a$ ", как взаимозаменяемо используют в рамках изобретения. Это значение, свидетельствующее о скорости связывания антитела со своим антигеном-мишенью или скорости образования комплекса между антителом и антигеном, также представлено уравнением:

Антитело ("Ab") + Антиген ("Ag")  $\rightarrow$  Ab-Ag.

Термин " $K_{off}$ " относится к константе скорости обратной реакции для диссоциации связывающего белка (например, антитела), например, от комплекса антитело/антиген, как известно в этой области. " $K_{off}$ " также известна по терминам "константа скорости диссоциации" или " $k_d$ ", как взаимозаменяемо используют в рамках изобретения. Это значение свидетельствует о скорости диссоциации антитела от своего антигена-мишени или разделения комплекса Ab-Ag с течением времени на свободное антитело и антиген, как представлено в уравнении ниже:



Термины "равновесная константа диссоциации" или " $K_D$ ", как взаимозаменяемо используют в рамках изобретения, относятся к значению, полученному при измерении титрованием при равновесии, или посредством разделения константы скорости диссоциации ( $k_{off}$ ) на константу скорости ассоциации ( $k_{on}$ ). Константу скорости ассоциации, константу скорости диссоциации и равновесную константу скорости диссоциации используют для представления аффинности связывания антитела с антигеном. Способы определения констант скорости ассоциации и диссоциации хорошо известны в этой области. Использование способов на основе флуоресценции характеризуется высокой чувствительностью и возможностью анализировать образцы в физиологических буферах при равновесии. Можно использовать другие экспериментальные подходы и инструменты, такие как анализ BIACORE™ (анализ бимолекулярного взаимодействия) (например, инструмент, доступный в Biacore International AB, a GE Healthcare company, Uppsala, Sweden). Кроме того, также можно использовать анализ KinExA® (Kinetic Exclusion Assay), доступный в Sapidyne Instruments

(Boise, Idaho).

В рамках изобретения термин "меченый связывающий белок" относится к белку со встроеной меткой, обеспечивающей идентификацию связывающего белка. В одном из аспектов метка является детектируемым маркером, например, в случае встраивания радиоактивно меченой аминокислоты или прикрепления к полипептиду остатков биотина, которые можно определять с помощью меченого авидина (например, стрептавидина, содержащего флуоресцентный маркер, или ферментативной активности, которую можно определять оптическими или колориметрическими способами). Примеры меток для полипептидов включают, в качестве неограничивающих примеров, следующее:

радиоактивные изотопы или радионуклиды (например,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{166}\text{Ho}$  и  $^{153}\text{Sm}$ ), флуоресцентные метки (например, FITC, родамин и фосфаты лантаноидов), ферментативные метки (например, пероксидазу хрена, люциферазу, щелочную фосфатазу), хемилюминесцентные маркеры, биотинильные группы, заранее определенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, парные последовательности лейциновой молнии, участки связывания вторичных антител, металлсвязывающие домены и эпитопные метки), и магнитные средства, такие как хелаты гадолия.

Термин "конъюгат антитела" относится к связывающему белку, такому как антитело, химически связанное со вторым химическим соединением, таким как терапевтическое или цитотоксическое средство. Термин "средство" используют в рамках изобретения для обозначения химического соединения, смеси химических соединений, биологической макромолекулы или экстракта, получаемого из биологических материалов. В одном из аспектов терапевтические или цитотоксические средства включают, в качестве неограничивающих примеров, коклюшный токсин, таксол, цитохалазин В, грамицидин D, бромистый этидий, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубин, даунорубин, дигидроксиантрацендион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пурамицин и их аналоги или гомологи.

Термины "кристалл" и "кристаллизованный" относятся к антителу или его антигенсвязывающей части, существующим в форме кристалла. Кристаллы являются одной из форм твердого состояния вещества, отличающейся от других форм, таких как аморфное твердое состояние или жидкокристаллическое состояние. Кристаллы состоят из регулярных, повторяющихся, трехмерных решеток атомов, ионов, молекул (например, белков, таких как антитела) или молекулярных агрегатов (например, комплексов антиген/антитело). Эти трехмерные решетки расположены в соответствии с конкретными математическими закономерностями, хорошо известными в этой области. Основную единицу или структурный элемент, повторяющийся в кристалле, называют ассиметричной единицей. Повторение ассиметричной единицы в порядке, соответствующем установленной, четко определенной кристаллографической симметрии, представляет "базисную клетку" кристалла. Повторение базисной клетки с помощью регулярных трансляций во всех трех измерениях представляет кристалл. См. Giege и Ducruix (1999) Chapter 1, In *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach*, 2nd ed., (Ducruix and Giege, eds.) (Oxford University Press, New York, 1999) pp. 1-16.

Термин "полинуклеотид" означает полимерную форму из двух или более нуклеотидов, как рибонуклеотидов, так и дезоксирибонуклеотидов, или модифицированную форму любого типа нуклеотида. Термин включает одно- и двухцепочечные формы ДНК или РНК, но в варианте осуществления это двухцепочечная ДНК.

Термин "выделенный полинуклеотид" означает полинуклеотид (например, геномного,

кДНК- или синтетического происхождения, или их комбинацию), не связанную со всем полинуклеотидом или его частью, с которыми он связан в природе, с которыми он функционально связан в природе или с которыми он совместно находится в природе как часть большей последовательности.

5 Термин "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой он связан. Одним из типов вектора является "плаزمид", обозначающая замкнутую кольцевую двухцепочечную ДНК, в которую можно лигировать дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, где дополнительные сегменты ДНК можно  
10 лигировать в вирусный геном. Конкретные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую их встраивают (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальный участок начала репликации, и эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, не эписомные векторы млекопитающих) можно встраивать в геном клетки-хозяина после введения в клетку-хозяина, и, таким  
15 образом, они реплицируются вместе с геномом хозяина. Кроме того, конкретные векторы способны регулировать экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы в рамках изобретения обозначают как "рекомбинантные экспрессирующие векторы" (или просто "экспрессирующие векторы"). В основном, экспрессирующие векторы, подходящие для способов рекомбинантной ДНК, часто  
20 являются формой плазмид. В рамках изобретения термины "плаزمид" и "вектор" можно использовать взаимозаменяемо, т.к. плазмид является наиболее общеупотребительной формой вектора. Однако изобретение предназначено для включения других форм экспрессирующих векторов, таких как вирусные векторы (например, ретровирусы с дефективной репликацией, аденовирусы и  
25 аденоассоциированные вирусы), выполняющие эквивалентные функции.

Термин "функционально связанный" относится к такому положению компонентов, что они функционируют определенным образом. Контролирующая последовательность, "функционально связанная" с кодирующей последовательностью, лигирована таким образом, что экспрессии кодирующей последовательности достигают в условиях,  
30 совместимых с контрольными последовательностями. "Функционально связанные" последовательности включают контролирующие экспрессию последовательности, смежные с интересующей нуклеиновой кислотой, контролирующие экспрессию последовательности, действующие в транс-положении, т.е. находящиеся на иной молекуле нуклеиновой кислоты, чем интересующая нуклеиновая кислота, но, несмотря  
35 на это, осуществляющие контроль над интересующей нуклеиновой кислотой, и контролирующие экспрессию последовательности, локализованные на той же молекуле нуклеиновой кислоты, что и интересующая нуклеиновая кислота, но на расстоянии от нее. В рамках изобретения термин "контролирующая экспрессию последовательность" относится к полинуклеотидным последовательностям, необходимым для воздействия  
40 на экспрессию и процессинга кодирующих последовательностей, с которыми они лигированы. Контролирующие экспрессию последовательности включают соответствующие последовательности инициации транскрипции, терминирующие, промоторные и энхансерные последовательности, эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования, последовательности,  
45 стабилизирующие цитоплазматическую мРНК, последовательности, повышающие эффективность трансляции (т.е. консенсусная последовательность Козак), последовательности, повышающие стабильность белка, и, при желании, последовательности, повышающие секрецию белка. Природа таких контролирующих

последовательностей отличается в зависимости от организма-хозяина, у прокариот такие контролирующие последовательности, как правило, включают промотор, участок связывания рибосомы и последовательность терминации транскрипции, у эукариот, как правило, такие контролирующие последовательности включают промоторы и последовательность терминации транскрипции. Термин "контролирующие последовательности" предназначен для включения компонентов, наличие которых важно для экспрессии и процессинга, и они также могут включать дополнительные компоненты, наличие которых является преимуществом, например, лидерные последовательности и последовательности партнера по слиянию.

"Трансформация" относится к любому процессу, с помощью которого экзогенная ДНК проникает в клетку-хозяина. Трансформация может происходить в естественных или искусственных условиях с использованием различных способов, хорошо известных в этой области, например, для встраивания чужеродных последовательностей нуклеиновой кислоты в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяина. Способ выбирают с учетом клетки-хозяина, подлежащей трансформации, и они могут включать, в качестве неограничивающих примеров, вирусную инфекцию, электропорацию, липофекцию и бомбардировку частицами. Такие "трансформированные" клетки включают стабильно трансформированные клетки, в которых встраиваемая ДНК способна реплицироваться как автономно реплицирующаяся плаزمиды или как часть хромосомы хозяина. Они также включают клетки, транзиторно экспрессирующие встраиваемую ДНК или РНК в течение ограниченного периода времени.

В рамках изобретения термин "рекомбинантная клетка-хозяин" (или просто "клетка-хозяин") предназначен для обозначения клетки, в которую встраивают экзогенную ДНК. Такие термины предназначены для включения не только конкретной указанной клетки, но и потомства такой клетки. Т.к. конкретные модификации могут происходить в последующих поколениях по причине мутации или воздействия окружающей среды, такое потомство может, по существу, не являться идентичным родительской клетке, но все равно входить в объем термина "клетка-хозяин", в рамках изобретения. В одном из аспектов клетки-хозяева включают прокариотические и эукариотические клетки, выбранные из любого Царства. Эукариотические клетки включают клетки простейших, грибов, растений и животных. В другом аспекте клетки-хозяева включают, в качестве неограничивающих примеров, линию клеток прокариот *Escherichia coli*, линии клеток млекопитающих СНО, НЕК 293 и COS, линию клеток насекомых Sf9 и клетка грибов *Saccharomyces cerevisiae*.

Можно использовать стандартные способы для рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов и культивирования и трансформации тканей (например, электропорации и липофекции). Способы ферментативных реакций и очистки можно осуществлять согласно инструкциям производителя, или как общепринято в этой области или представлено в рамках изобретения. Приведенные выше способы, как правило, можно осуществлять согласно общепринятым способам, хорошо известным в этой области и как описано в различных общих и более специальных источниках, цитируемых и обсуждаемых на всем протяжении настоящего описания. См. например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989).

Термин "трансгенный организм" относится к организму, имеющему клетки, содержащие трансген, где с трансгена, встраиваемого в организм (или предка организма), экспрессируется полипептид, не экспрессируемый в природе в организме.

"Трансген" является конструкцией ДНК, стабильно функционально встроенной в геном клетки, из которой развивается трансгенный организм, направляющей экспрессию продукта кодируемого гена в одном или нескольких типах клеток или тканей трансгенного организма.

5 Термины "регулирует" и "модулирует" используют взаимозаменяемо, и он относится к изменению активности интересующей молекулы (например, биологической активности hIL-1 $\alpha$ ). Модуляция может представлять собой повышение или снижение величины конкретной активности или функции интересующей молекулы. Примеры активностей и функций молекулы включают, в качестве неограничивающих примеров,  
10 характеристики связывания, ферментативную активность, активацию клеточного рецептора и передачу сигнала.

Соответственно, термин "модулятор" означает соединение, способное изменять активность или функцию интересующей молекулы (например, биологическую активность hIL-1 $\alpha$ ). Например, модулятор может вызывать повышение или снижение величины  
15 конкретной активности или функции молекулы по сравнению с величиной активности или функции, наблюдаемой в отсутствие модулятора. В некоторых вариантах осуществления модулятор является ингибитором, снижающим величину по меньшей мере одну активность или функцию молекулы. Примеры ингибиторов включают, в качестве неограничивающих примеров, белки, пептиды, антитела, пептидные антитела,  
20 углеводы или небольшие органические молекулы. Пептидные антитела описывают, например, в публикации РСТ № WO 01/83525.

Термин "агонист" относится к модулятору, который при контакте с интересующей молекулой, вызывает повышение величины конкретной активности или функции молекулы по сравнению с величиной активности или функции, наблюдаемой в отсутствие  
25 агониста. Конкретные интересующие агонисты могут включать, в качестве неограничивающих примеров, полипептид, нуклеиновую кислоту, углевод или любую другую молекулу, связывающуюся с ИЛ-1 $\alpha$  и/или ИЛ-1 $\beta$ .

Термин "антагонист" или "ингибитор" относится к модулятору, который при контакте с интересующей молекулой вызывает снижение величины конкретной активности или  
30 функции молекулы по сравнению с величиной активности или функции, наблюдаемой в отсутствие антагониста. Антагонисты включают те, что блокируют или модулируют биологическую или иммунологическую активность ИЛ-1 $\alpha$  и/или ИЛ-1 $\beta$ . Антагонисты и ингибиторы ИЛ-1 $\alpha$  могут включать, в качестве неограничивающих примеров, полипептид, нуклеиновую кислоту, углевод или любую другую молекулу,  
35 связывающуюся с ИЛ-1 $\alpha$ . Антагонисты и ингибиторы ИЛ-1 $\beta$  могут включать, в качестве неограничивающих примеров, полипептид, нуклеиновую кислоту, углевод или любую другую молекулу, связывающуюся с ИЛ-1 $\beta$ .

Термин "эффективное количество" относится к количеству терапевтического средства, достаточному для снижения тяжести и/или продолжительности нарушения или одного  
40 или нескольких его симптомов, профилактики прогрессирования нарушения, вызывания регрессирования нарушения, профилактики рецидивирования, развития, дебюта или прогрессирования одного или нескольких симптомов, ассоциированных с нарушением, определения нарушения, или повышения или улучшения профилактических или терапевтических эффектов другого терапевтического средства (например,  
45 профилактического или терапевтического средства).

Термин "образец" используют в его широчайшем смысле. Термин "биологический образец" включает, в качестве неограничивающих примеров, любое количество вещества из живого организма или ранее живого организма. Такие живые организмы включают,

в качестве неограничивающих примеров, человека, мышей, крыс, обезьян, собак, кроликов и других животных. Такие вещества включают, в качестве неограничивающих примеров, кровь, сыворотку, мочу, синовиальную жидкость, клетки, органы, ткани, костный мозг, лимфоузлы и селезенку.

5 "Аффинно зрелое" антитело является антителом с одним или несколькими изменениями в одной или нескольких CDR или их каркасах, приводящим к улучшению аффинности антитела к антигену по сравнению с родительским антителом, не имеющим таких изменений. Предпочтительные аффинно зрелые антитела будут иметь наномолярные или даже пикомолярные аффинности для антигена-мишени. Аффинно  
10 зрелые антитела получают известными в этой области способами. В Marks et al. (1992) *BioTechnology* 10: 779- 783 описывают созревание аффинности перетасовкой доменов VH и VL. Случайный мутагенез CDR и/или каркасных остатков описывают в Barbas et al. (1994) *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91: 3809-3813; Schier et al. (1995) *Gene* 169: 147-155; Yelton et al. (1995) *J. Immunol.* 155: 1994-2004; Jackson et al. (1995) *J. Immunol.* 154(7): 3310-  
15 3319; and Hawkins et al. (1992) *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896.

Боль, сохраняющаяся у индивидуума после исчезновения ее исходной причины, является уже не симптомом, а отдельным признанным заболеванием. В рамках изобретения термин "аллодиния" относится к состоянию, при котором индивидуум испытывает болезненный ответ на безопасный в норме стимул, как правило,  
20 механической природы, такой как обработка кожи щеткой. Аллодиническая боль не вовлекает ноцицепторы и, таким образом, ее также можно обозначать как "не ноцицептивную" боль. В рамках изобретения термин "гипералгезия" относится к состоянию, при котором индивидуум обладает повышенной чувствительностью к боли, являющейся результатом воздействия болевого стимула, особенно, стимула,  
25 активирующего ноцицепторы, такого как болезненная механическая, термическая или химическая стимуляция. Стимул, активирующий ноцицепторы, вызывает боль. Гипералгезия является состоянием, при котором индивидуум имеет повышенный болевой ответ на нормальный болевой стимул. Индивидуум может страдать аллодинией, гипералгезией или комбинацией аллодинии и гипералгезии.

30 I. Получение связывающих белков DVD-Ig<sup>TM</sup>, связывающихся с ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$   
Описывают конструирование и получение иммуноглобулиновых связывающих белков с двойным переменным доменом (DVD-Ig<sup>TM</sup>), способных связываться с одним или несколькими антигенами-мишенями (или эпитопами) (см., например, публикацию РСТ № WO 2007/024715). Связывающий белок DVD-Ig, применимый в способах и  
35 композициях для лечения остеоартрита, представленных в рамках изобретения, связывается с ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$ . В варианте осуществления связывающий белок DVD-Ig<sup>TM</sup> содержит по меньшей мере две полипептидные цепи, где первая полипептидная цепь содержит VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, где VD1 является первым переменным доменом тяжелой цепи, VD2 является вторым переменным доменом тяжелой цепи, C является  
40 константным доменом тяжелой цепи, X1 является линкером при условии, что он не является CH1, и X2 является Fc-областью, и где указанная вторая полипептидная цепь содержит VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, где VD1 является первым переменным доменом легкой цепи, VD2 является вторым переменным доменом легкой цепи, C является константным доменом легкой цепи, X1 является линкером при условии, что он не является CH1, и X2 не содержит Fc-область, и n является 0 или 1. Связывающий белок DVD-Ig<sup>TM</sup>, состоящий из первой и второй полипептидных цепей имеет два антигенсвязывающих участка.

В другом варианте осуществления связывающий белок DVD-Ig<sup>TM</sup> содержит четыре

полипептидные цепи, где каждая из первых двух полипептидных цепей содержит VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>, соответственно, где VD1 является первым вариабельным доменом тяжелой цепи, VD2 является вторым вариабельным доменом тяжелой цепи, C является константным доменом тяжелой цепи, X1 является линкером при условии, что он не является CH1, и X2 является Fc-областью, и каждая из вторых двух полипептидных цепей содержит VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub> соответственно, где VD1 является первым вариабельным доменом легкой цепи, VD2 является вторым вариабельным доменом легкой цепи, C является константным доменом легкой цепи, X1 является линкером при условии, что он не является CH1, и X2 не содержит Fc-область, и n является 0 или 1.

10 Такой связывающий белок DVD-Ig<sup>TM</sup> имеет четыре антигенсвязывающих участка.

В качестве примера, связывающий белок DVD-Ig, применимый в способах и композициях для лечения остеоартрита у индивидуума, представленных в рамках изобретения, можно конструировать имеющими участок связывания ИЛ-1β, образованный соединением вариабельных доменов VD1 двух (первого и второго) полипептидов, и участок связывания ИЛ-1α, образованный соединением вариабельных доменов VD2 двух (первого и второго) полипептидов. Альтернативно, связывающий белок DVD-Ig, применимый в способах и композициях для лечения остеоартрита у индивидуума, представленных в рамках изобретения, может иметь участок связывания ИЛ-1α, образованный соединением вариабельных доменов VD1 двух (первого и второго) полипептидов, и участок связывания ИЛ-1β, образованный соединением вариабельных доменов VD2 двух (первого и второго) полипептидов.

#### А. Получение родительских моноклональных антител

Вариабельные домены связывающего белка с DVD можно получать из родительских антител, включая поликлональные и моноклональные антитела, способные связываться с интересующими антигенами. Эти антитела могут являться природными, или их можно получать с помощью рекомбинантной технологии.

Моноклональные антитела можно получать с использованием широкого спектра способов, известных в этой области, включая использование гибридом, рекомбинантной технологии, технологии фагового дисплея или их комбинации. Например, моноклональные антитела можно получать с использованием гибридных способов, включая известные в этой области и приведенные, например, в Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988); Hammerling, et al., *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* (Elsevier, N.Y., 1981), pages 563-581 (указанные источники включены в качестве ссылок в полном объеме). В рамках изобретения термин "моноклональное антитело" (сокращенно "mAb") не ограничен антителами, получаемыми с помощью гибридной технологии. Термин "моноклональное антитело" относится к антителу, получаемому из одного клона, включая любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон, а не способу, которым его получают. Гибридомы подвергают селекции, клонируют и дополнительно подвергают скринингу относительно желаемых характеристик, включая устойчивый рост гибридомы, высокую продукцию антител и желаемые характеристики антител, с использованием стандартных способов. Гибридомы можно культивировать и выращивать *in vivo* в сингенных животных, в животных с дефектной иммунной системой, например, безтимусных мышах, или в культуре клеток *in vitro*. Способы селекции, клонирования и выращивания гибридом хорошо известны специалистам в этой области. В предпочтительном варианте осуществления гибридомы являются гибридомами мыши. В другом варианте осуществления гибридомы получают в не принадлежащих человеку, не принадлежащих мыши видах, таких как крысы, овцы, свиньи, козы, крупный рогатый скот или лошади.

В другом варианте осуществления гибридомы являются гибридомами человека, в которых несекреторную миелому человека подвергают слиянию с клеткой человека, экспрессирующей антитело, способное связываться с желаемым специфичным антигеном, таким как ИЛ-1 $\alpha$  или ИЛ-1 $\beta$ .

5 Рекомбинантные моноклональные антитела также получают из отдельных выделенных лимфоцитов с использованием способа, обозначаемого в этой области как способ выделения антител из выбранных лимфоцитов (SLAM), как описано в патенте США № 5627052, публикации РСТ № WO 92/02551 и Babcook et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848. В этом способе определяют отдельные клетки, секретирующие  
10 интересующие антитела, например, лимфоциты, полученные из иммунизированных животных, и выделяют кДНК переменных областей тяжелой и легкой цепи из клеток с помощью ПЦР с обратной транскрипцией и затем эти переменные области можно экспрессировать, в отношении соответствующих константных областей иммуноглобулинов (например, константных областей человека), в клетках-хозяевах  
15 млекопитающих, таких как клетки COS или CHO. Клетки-хозяева, трансфицированные амплифицированными последовательностями иммуноглобулина, полученными из селектированных *in vivo* лимфоцитов, затем можно подвергать дополнительному анализу и селекции *in vitro*, например, пэннингом трансфицированных клеток для выделения клеток, экспрессирующих антитела к интересующему антигену. На  
20 амплифицированные последовательности иммуноглобулина можно дополнительно воздействовать *in vitro*, например, с помощью способов созревания аффинности *in vitro*, таких как описываемые в публикации РСТ № WO 97/29131 и публикации РСТ № WO 00/56772.

Моноклональные антитела также получают иммунизацией не принадлежащего  
25 человеку животного, содержащего часть или весь иммуноглобулиновый локус человека, с использованием интересующего антигена. В варианте осуществления не принадлежащее человеку животное является трансгенной мышью XENOMOUSE, являющейся сконструированной линией мышей, содержащих большие фрагменты иммуноглобулиновых локусов человека и дефектных по продукции антител мыши.  
30 См., например, Green et al. (1994) Nature Genetics 7: 13-21 и патенты США №№ 5916771, 5939598, 5985615, 5998209, 6075181, 6091001, 6114598 и 6130364. См. также публикации РСТ №№ WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096, WO 96/33735, WO 98/16654, WO 98/24893, WO 98/50433, WO 99/45031, WO 99/53049, WO 00/09560 и WO 00/037504. Трансгенная мышь XENOMOUSE продуцирует подобный взрослому репертуар человека  
35 полностью человеческих антител и антигенспецифичные моноклональные антитела человека. Трансгенная мышь XENOMOUSE содержит приблизительно 80% репертуара антител человека, благодаря встраиванию фрагментов локусов тяжелой цепи зародышевой линии человека, конфигурации YAC размером порядка мегабазы и х-локусов легкой цепи. См., Mendez et al. (1997) Nature Genet. 15: 146-156 и Green и Jakobovits  
40 (1998) J. Exp. Med. 188: 483-495.

Для получения родительских антител также можно использовать способы *in vitro*, где библиотеку антител подвергают скринингу для определения антитела, имеющего желаемую специфичность связывания. Способы такого скрининга библиотек рекомбинантных антител хорошо известны в этой области и включают способы,  
45 описываемые, например, в патенте США № 5223409, публикациях РСТ №№ WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690, WO 97/29131 и Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9: 1369-1372; Hay et al. (1992) Hum. Antibod. Hybridomas 3: 81-85; Huse et al. (1989) Science 246: 1275-1281; McCafferty et al.

(1990) Nature 348: 552-554; Griffiths et al. (1993) EMBO J. 12: 725-734; Hawkins et al. (1992) J. Mol. Biol. 226: 889-896; Clackson et al. (1991) Nature 352: 624-628; Gram et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 3576-3580; Garrard et al. (1991) Bio/Technology 9: 1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) Nucl. Acid Res. 19: 4133-4137; and Barbas et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7978-7982, и патентной публикации США № 2003/0186374.

Родительские антитела, применимые в настоящем изобретении, также можно получать с использованием различных способов фагового дисплея, известных в этой области. В способах фагового дисплея домены функционального антитела представляются на поверхности фаговых частиц, несущих кодирующие их полинуклеотидные последовательности. В частности, такой фаг можно использовать для представления антигенсвязывающих доменов, экспрессируемых из репертуара или комбинаторной библиотеки антител (например, человека или мыши). Фаг, экспрессирующий антигенсвязывающий домен, связывающий интересующий антиген можно подвергать селекции или идентифицировать с использованием антигена, например, с использованием меченого антигена или антигена, связанного или фиксированного на твердой поверхности или бусине. Фаг, используемый в этих способах, как правило, является нитевидным фагом, включая fd и M13, связывающие домены, экспрессируемые из фага с доменами Fab, Fv или стабилизированного дисульфидными связями Fv антитела, подвергали рекомбинантному слиянию с геном белка III или белка VIII фага. Примеры способов фагового дисплея, которые можно использовать для получения антител по настоящему изобретению, включают описываемые в Brinkman et al. (1995) J. Immunol. Способы 182:41-50; Ames et al. (1995) J. Immunol. Способы 184: 177-186; Kettleborough et al. (1994) Eur. J. Immunol. 24: 952-958; Persic et al. (1997) Gene 187: 9-18; Burton et al. (1994) Adv. Immunol. 57: 191-280; заявке РСТ № РСТ/GB91/01134, публикациях РСТ №№ WO90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982 и WO 95/20401, и патентах США №№ 5698426, 5223409, 5403484, 5580717, 5427908, 5821047, 5571698, 5427908, 5516637, 5780225, 5658727, 5733743 и 5969108.

Как описано в указанных выше ссылках, после селекции фага кодирующие антитело области из фага можно выделять и использовать для получения целых антител, включая антитела человека или любой другой желаемый антигенсвязывающий фрагмент, и экспрессировать в любом желаемом хозяине, включая клетки млекопитающих, клетки насекомых, растительные клетки, дрожжи и бактерии, например, как подробно описано ниже. Например, способы рекомбинантного получения Fab-, Fab'-, и F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов также можно использовать с помощью известных в этой области способов, таких как описываемые в публикации РСТ № WO 92/22324; Mullinax et al. (1992) BioTechniques 12 (6): 864-869; и Sawai et al. (1995) AJRI 34: 26-34; и Better et al. (1988) Science, 240: 1041-1043. Примеры способов, которые можно использовать для получения одноцепочечных Fv и антител, включают описываемые в патентах США №№ 4946778 и 5258498; Huston et al. (1991) Methods Enzymol. 203: 46-88; Shu et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7995-7999; и Skerra et al. (1988) Science 240: 1038-1041.

Альтернативно скринингу библиотек рекомбинантных антител с помощью фагового дисплея, можно использовать другие способы, известные в этой области для скрининга больших комбинаторных библиотек для идентификации родительских антител. Одним из типов альтернативных систем экспрессии является система, в которой библиотеку рекомбинантных антител экспрессируют в виде продукта слияния РНК-белок, как описано в публикации РСТ № WO 98/31700 Szostak и Roberts и в Roberts, R. W. and Szostak, J. W. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 12297-12302. В этой системе получают ковалентное слияние между мРНК и пептидом или белком, который она кодирует,

посредством трансляции *in vitro* синтетической мРНК, несущей пуромидин, пептидильный акцепторный антибиотик, на своем 3'-конце. Таким образом, специфичную мРНК можно обогащать из сложной смеси мРНК (например, комбинаторной библиотеки) на основе свойств кодируемого пептида или белка, например, антитела или его части, таких как

5 связывание антитела или его части с антигеном двойной специфичности.

Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела или их части, выделяемые при скрининге таких библиотек, можно экспрессировать рекомбинантными способами, как описано выше (например, в клетках-хозяевах млекопитающих), и, кроме того, их можно подвергать дополнительному созреванию аффинности посредством

10 дополнительных раундов скрининга продуктов слияния мРНК-пептид, в которых мутации введены в исходно выбранные последовательности, или другими способами созревания аффинности *in vitro* рекомбинантных антител, как описано выше.

В другом подходе родительские антитела также можно получать с использованием способов дрожжевого дисплея, известного в этой области. В способах дрожжевого

15 дисплея генетические способы используют для присоединения доменов антитела к стенке дрожжевой клетки и представления их на поверхности дрожжевой клетки. В частности, такие дрожжи можно использовать для представления антигенсвязывающих доменов, экспрессируемых из репертуара или комбинаторной библиотеки антител (например, человека или мыши). Примеры способов дрожжевого дисплея, которые

20 можно использовать для получения родительских антител, включают описываемые в патенте США № 6699658.

Описываемые выше антитела можно дополнительно модифицировать для получения антител с пересаженными CDR и гуманизованных родительских антител. Родительские антитела с пересаженными CDR содержат последовательности варибельной области

25 тяжелой и легкой цепи из антитела человека, где одну или несколько областей CDR VH и/или VL заменяют последовательностями CDR антител мыши, способных связываться с интересующим антигеном. Каркасная последовательность из любого антитела человека может служить матрицей для пересаживания CDR. Однако замена неразветвленной цепи на таком каркасе часто приводит к некоторой потере аффинности связывания с

30 антигеном. Чем более гомологичным является антитело человека относительно исходного мышинового антитела, тем меньше вероятность того, что комбинирование CDR мыши с каркасом человека каркас будет вносить искривления в CDR, которые могут снижать аффинность. Таким образом, предпочтительно, варибельная область каркаса человека, выбранная для замены варибельной области каркаса мыши за

35 исключением CDR имеет по меньшей мере 65% идентичность последовательности с варибельной областью каркаса антитела мыши. Более предпочтительно, варибельные области человека и мыши за исключением CDR имеют по меньшей мере 70% идентичность последовательности. Даже более предпочтительно, варибельные области человека и мыши за исключением CDR имеют по меньшей мере 75% идентичность

40 последовательности. Наиболее предпочтительно, варибельные области человека и мыши за исключением CDR имеют по меньшей мере 80% идентичность последовательности. Способы получения таких антител известны в этой области (см. EP 239400, публикацию PCT № WO 91/09967; патенты США №№ 5225539, 5530101 и 5585089), ремоделирование поверхности антител (EP 592106; EP 519596; Padlan (1991)

45 Mol. Immunol. 28(4/5): 489-498; Studnicka et al. (1994) Protein Engineering 7(6): 805-814; Roguska et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 969-973) и перестановка цепей (патент США № 5565352).

Гуманизованные антитела являются молекулами антител из не являющихся

человеком видов антител, связывающих желаемый антиген, содержащими одну или несколько определяющие комплементарность областей (CDR) из не являющихся человеком видов и каркасные области из молекулы иммуноглобулина человека.

Описывают известные последовательности Ig человека, например, /query.fcgi;

- 5 www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/;  
www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; www.public.iastate.edu/.about.pedro/  
research\_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/  
immunology/CH-05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html;  
www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/m-ikeimages.html;  
10 www.antibodyresource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immuno-  
logy.html.www.immunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.-html;  
www.biotech.ufl.edu/.about.hcl/; www.pebio.com/pa/340913/340913.html-; www.nal.usda.gov/  
awic/pubs/antibody/; www.m.ehime-u.ac.jp/.about.yasuhito-/Elisa.html; www.biodesign.com/  
table.asp; www.icnet.uk/axp/facs/davies/lin-ks.html; www.biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html;  
15 www.isac-net.org/sites\_geo.html; aximtl.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEP-Start.html;  
baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/linksl.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/; www.mrc-  
cpe.cam.ac.uk/imt-doc/pu-blic/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V\_mice.html; imgt.cnusc.fr:  
8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/;  
abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; www.unizh.ch/.about.honegger/AHOsem-inar/  
20 Slide01.html; www.cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm;  
www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/h-umanisation/ТАННP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/  
stat\_aim.html; www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.cryst.bioc.cam.ac.uk/.abo-  
ut.fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html; roducts.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html.Kabat  
et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983), содержание  
25 каждого включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Такие  
импортированные последовательности можно использовать для снижения  
иммуногенности или снижения, повышения или модификации связывания, аффинности,  
скорости прямой реакции, скорости обратной реакции, авидности, специфичности,  
времени полужизни или любой другой подходящей характеристики, как известно в этой  
30 области.

Каркасные остатки в каркасных областях человека можно заменять соответствующим  
остатком из CDR-донорного антитела для изменения, предпочтительно, улучшения  
связывания антигена. Эти замены в каркасе определяют способами, хорошо известными  
в этой области, например, посредством моделирования взаимодействий CDR и каркасных  
35 остатков для определения каркасных остатков, важных для связывания антигена, и  
сравнения последовательностей для определения необычных каркасных остатков в  
конкретных положениях. См., например, патент США № 5585089; Riechmann et al. (1988)  
Nature 332: 323. Трехмерные модели иммуноглобулинов являются общедоступными и  
хорошо известны специалистам в этой области. Доступны компьютерные программы,  
40 иллюстрирующие и представляющие возможные трехмерные конформационные  
структуры выбранных кандидатов-последовательностей иммуноглобулинов.  
Исследование этих дисплеев позволяет анализировать возможную роль остатков в  
функционировании кандидата-последовательности иммуноглобулина, т.е. анализировать  
остатки, влияющие на способность иммуноглобулина-кандидата связываться с  
45 антигеном. Таким образом, остатки в FR можно выбирать и комбинировать из  
консенсусных и импортных последовательностей таким образом, что достигали  
желаемой характеристики антитела, такой как повышенная аффинность для антигена-  
мишени. В основном, остатки в CDR напрямую и наиболее значительно участвуют в

воздействии на связывание антигена. Антитела можно гуманизировать с использованием различных способов, известных в этой области, таких как, в качестве неограничивающих примеров, описываемые в Jones et al. (1986) Nature 321:522; Verhoeyen et al. (1988) Science 239:1534; Sims et al. (1993) J. Immunol. 151: 2296; Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901; Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285; Presta et al. (1993) J. Immunol. 151:2623; Padlan (1991) Mol. Immunol. 28(4/5):489-498; Studnicka et al. (1994) Protein Engineering 7(6):805-814; Roguska, et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969-973; публикациях PCT №№ WO 91/09967, WO 90/14443, WO 90/14424, WO 90/14430, WO 99/06834 (PCT/US98/16280), WO 97/20032 (PCT/US96/18978), WO 92/11272 (PCT/US91/09630), WO 92/03461 (PCT/US91/05939), WO 94/18219 (PCT/US94/01234), WO 92/01047 (PCT/GB91/01134) и WO 93/06213 (PCT/GB92/01755), EP 0 592 106, EP 0 519 596, EP 0 239 400, патентах США №№ 5565332, 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5766886, 5714352, 6204023, 6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539, и 4816567.

Родительские моноклональные антитела можно выбирать из различных моноклональных антител, способных связываться с ИЛ-1 $\alpha$  или ИЛ-1 $\beta$ .

Родительские моноклональные антитела также можно выбирать из различных терапевтических антител, одобренных для использования, находящихся на стадии клинических испытаний или разработки для клинического использования.

#### В. Конструирование молекул DVD-Ig

Молекулу иммуноглобулина с двойным варибельным доменом (DVD-Ig) конструируют таким образом, что два различных варибельных домена легких цепей (VL) из двух различных родительских моноклональных антител соединяют в тандем напрямую или через короткий линкер способами рекомбинантной ДНК за которыми следует константный домен легкой цепи. Аналогично, тяжелая цепь содержит два различных варибельных домена тяжелой цепи (VH), соединенные в тандем, за которыми следует константный домен CH1 и Fc-область. См. публикацию PCT № WO 2007/024715.

Варибельные домены можно получать с использованием способов рекомбинантной ДНК из родительского антитела, полученного любым из описываемых выше способов. В предпочтительном варианте осуществления варибельный домен является варибельным доменом тяжелой или легкой цепи мыши. Более предпочтительно, варибельный домен является варибельным доменом с пересаженными CDR или гуманизированным варибельным доменом тяжелой или легкой цепи. Наиболее предпочтительно, варибельный домен является варибельным доменом тяжелой или легкой цепи человека.

В одном из вариантов осуществления первый и второй варибельные домены соединяют напрямую друг с другом с использованием способов рекомбинантной ДНК. В другом варианте осуществления варибельные домены соединяют через линкерную последовательность. Предпочтительно, соединяют два варибельных домена. Также можно соединять три или более варибельных домена напрямую или через линкерную последовательность. Варибельные домены могут связываться с одним и тем же антигеном или могут связываться с различными антигенами. Молекулы DVD-Ig по изобретению могут включать один варибельный домен иммуноглобулина и один неиммуноглобулиновый варибельный домен, такой как лиганд-связывающий домен рецептора, активный домен фермента. Молекулы DVD-Ig также могут содержать 2 или более не-Ig домена.

Последовательность линкера может представлять собой одну аминокислоту или полипептидную последовательность. Примеры последовательностей линкера, которые можно использовать в конструировании и получении связывающих белков DVD-Ig,

применимых в способах и композициях, представленных в рамках изобретения, включают, в качестве неограничивающих примеров, АКТПКЛЕЕГЕФСЕАР (SEQ ID NO: 59), АКТПКЛЕЕГЕФСЕАР V (SEQ ID NO: 60), АКТПКЛГГ (SEQ ID NO: 61), САКТПКЛГГ (SEQ ID NO: 62), САКТП (SEQ ID NO: 63), РАДААР (SEQ ID NO: 64), РАДААРТВС (SEQ ID NO: 65), РАДААААГГПГС (SEQ ID NO: 66), РАДАААА(Г4S)4 (SEQ ID NO: 67), САКТПКЛЕЕГЕФСЕАРV (SEQ ID NO: 68), АДААР (SEQ ID NO: 69), АДААРТВСИФПП (SEQ ID NO: 70), ТВААР (SEQ ID NO: 71), ТВААРПСВФИФПП (SEQ ID NO: 72), QPKAAP (SEQ ID NO: 73), QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID NO: 74), АКТПП (SEQ ID NO: 75), АКТППСПТЛАП (SEQ ID NO: 76), АКТПАР (SEQ ID NO: 77), АКТПАРСВЫЛАП (SEQ ID NO: 78), АСТКГП (SEQ ID NO: 79), АСТКГПСВФЛАП (SEQ ID NO: 80), GGSGGGSG (SEQ ID NO: 81), GGGSGGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 82), GENKVEYAPALMALS (SEQ ID NO: 83), GPAKELTPLKEAKVS (SEQ ID NO: 84), GHEAAVMQVQYPAS (SEQ ID NO: 85), ТВААРПСВФИФПРТВААРПСВФИФПП (SEQ ID NO: 86) и АСТКГПСВФЛАП АСТКГПСВФЛАП (SEQ ID NO: 87). Выбор последовательностей линкеров основан на анализе кристаллической структуры нескольких молекул Fab. Между переменным доменом и константным доменом СН1/СL в молекулярной структуре Fab или антитела существует природное гибкое соединение. Это природное соединение содержит приблизительно 10-12 аминокислотных остатков, представленных 4-6 остатками из С-конца V-домена и 4-6 остатками из N-конца домена СL/СН1. В варианте осуществления молекулу DVD-Ig, применимую в изобретении получают с использованием 5-6 N-концевых аминокислотных остатков или 11-12 аминокислотных остатков СL или СН1 в качестве линкера в легкой и тяжелой цепях молекулы DVD-Ig, соответственно. N-концевые остатки доменов СL или СН1, в частности, первые 5-6 аминокислотных остатков, принимают конформацию петли без устойчивых вторичных структур и, таким образом, могут действовать как гибкие линкеры между двумя переменными доменами. N-концевые остатки доменов СL или СН1 являются природными продолжениями переменных доменов, т.к. они являются частью последовательностей иммуноглобулинов, и, таким образом, в значительной степени минимизируют любую иммуногенность, потенциально возникающую из-за линкеров и соединений.

Другие последовательности линкеров могут включать любую последовательность любой длины из домена СL/СН1, но не все остатки домена СL/СН1, например, первые 5-12 аминокислотных остатков доменов СL/СН1, линкеры легкой цепи можно получать из С<sub>κ</sub> или С<sub>λ</sub>, и линкеры тяжелой цепи можно получать из СН1 любых изотипов, включая С<sub>γ1</sub>, С<sub>γ2</sub>, С<sub>γ3</sub>, С<sub>γ4</sub>, С<sub>α1</sub>, С<sub>α2</sub>, С<sub>δ</sub>, С<sub>ε</sub> и С<sub>μ</sub>. Последовательности линкеров также можно получать из других белков, таких как Ig-подобные белки (например, ТСR, FcR, КIР), последовательностей на основе G/S (например, повторы G4S (SEQ ID NO: 88)), последовательностей на основе шарнирной области и других природных последовательностей из других белков.

В варианте осуществления константный домен соединяют с двумя соединяемыми переменными доменами с использованием способов рекомбинантной ДНК. Предпочтительно, последовательность, содержащую соединяемые переменные домены тяжелой цепи, соединяют с константным доменом тяжелой цепи и последовательность, содержащую соединяемые переменные домены легкой цепи, соединяют с константным доменом легкой цепи. Предпочтительно, константные домены являются константным доменом тяжелой цепи человека и константным доменом легкой цепи человека, соответственно, если связывающий белок DVD-Ig подлежит использованию у человека. Предпочтительно, тяжелую цепь DVD-Ig дополнительно

соединяют с Fc-область. Fc-область может являться нативной последовательностью Fc-области или вариантом Fc-области. Наиболее предпочтительно, Fc-область является Fc-областью человека. В предпочтительном варианте осуществления Fc-область включает Fc-область IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE или IgD.

5 В варианте осуществления два полипептида тяжелой цепи DVD-Ig и два полипептида легкой цепи DVD-Ig комбинируют для образования молекулы DVD-Ig. Существует подробное описание примеров конкретных молекул DVD-Ig, способных связываться с конкретными мишенями, и способы их получения. См., например, публикацию РСТ № WO 2007/024715.

10 С. Получение связывающих белков DVD-Ig

Белки DVD-Ig, связывающиеся с ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  и применимые в способах и композициях, представленных в рамках изобретения для лечения остеоартрита можно получать любым из ряда способов, известных в этой области. См., например, публикацию РСТ № 2007/024715. Например, экспрессия из клеток-хозяев, где  
15 экспрессирующие векторы, кодирующие тяжелые и легкие цепи DVD-Ig трансфицируют в клетку-хозяина стандартными способами. Различные формы термина "трансфекция" предназначены для включения широкого спектра способов, общеупотребительных для введения экзогенной ДНК в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяина, например, электропорации, осаждения фосфатом кальция, трансфекции DEAE-  
20 декстраном и т.п. Хотя можно экспрессировать связывающие белки DVD-Ig в прокариотических или эукариотических клетках-хозяевах, экспрессия белков DVD-Ig в эукариотических клетках является предпочтительной, и наиболее предпочтительно - в клетках-хозяевах млекопитающих, т.к. такие эукариотические клетки (и, в частности, клетки млекопитающих) более вероятно, чем прокариотические клетки, будут собирать,  
25 и секретировать и правильно свернутый и иммунологически активный белок DVD-Ig.

Предпочтительно клетки-хозяева млекопитающих для экспрессии рекомбинантных антител по изобретению включают клетки китайского хомяка (клетки CHO) (включая клетки dhfr-CHO, описываемые Urlaub и Chasin (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220, используемые с селективным маркером DHFR, например, как описано в R.J. Kaufman и P.A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159: 601-621), миеломные клетки NS0, клетки COS  
30 и клетки SP2. Если рекомбинантные экспрессирующие векторы, кодирующие белки DVD-Ig, встраивают в клетки-хозяева млекопитающих, белки DVD-Ig получают культивированием клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного, чтобы сделать возможной экспрессию белков DVD-Ig в клетках-хозяевах или, более  
35 предпочтительно, секрецию белков DVD-Ig в среду для культивирования, в которой выращивают клетки-хозяева. Белки DVD-Ig можно выделять из среды для культивирования с использованием стандартных способов очистки белка.

В предпочтительной системе для рекомбинантной экспрессии белков DVD-Ig, применимых в изобретении, рекомбинантный экспрессирующий вектор, кодирующий  
40 и тяжелую цепь DVD-Ig, и легкую цепь DVD-Ig встраивают в клетки dhfr-CHO с помощью опосредуемой фосфатом кальция трансфекции. В рекомбинантном экспрессирующем векторе каждый из генов тяжелой и легкой цепи DVD-Ig функционально связан с регуляторными элементами энхансером CMV/промотором AdMLP для запуска высоких уровней транскрипции генов. Рекомбинантный экспрессирующий вектор также несет  
45 ген DHFR, делающий возможной селекцию клеток CHO, трансфицированных с использованием вектора с помощью селекции /амплификации метотрексатом. Селектированные трансформированные клетки-хозяева культивируют, делая возможной экспрессию тяжелых и легких цепей DVD-Ig, и выделяют интактный белок DVD-Ig из

среды для культивирования. Используют стандартные способы молекулярной биологии для получения рекомбинантного экспрессирующего вектора, трансфекции клеток-хозяев, селекции трансформантов, культивирования клеток-хозяев и выделения белка DVD-Ig из среды для культивирования. Кроме того, изобретение относится к способу синтеза белка DVD-Ig по изобретению посредством культивирования клетки-хозяина по изобретению в подходящей среде для культивирования, пока не синтезируется белок DVD-Ig по изобретению. Способ может дополнительно включать выделение белка DVD-Ig из среды для культивирования.

Важным свойством связывающего белка DVD-Ig является то, что его можно получать и очищать аналогично общепринятому антителу. Получение связывающего белка DVD-Ig приводит к гомогенному, одному основному продукту с желаемой двойной специфичной активностью без какой-либо модификации последовательности константной области или химических модификаций любого типа. Другие описываемые ранее способы получения "биспецифичных", "полиспецифических" и "полиспецифических поливалентных" полноразмерных связывающих белков не приводят к одному основному продукту, но, фактически, приводят к внутриклеточной продукции или секреции смеси собранных неактивных, моноспецифичных, полиспецифических, поливалентных, полноразмерных связывающих белков и поливалентных полноразмерных связывающих белков с комбинацией различных участков связывания. Например, на основе конструирования, описываемого Miller и Presta (публикация PCT № WO2001/077342, существует 16 возможных комбинаций тяжелых и легких цепей. Таким образом, только 6,25% белка, вероятно, находятся в желаемой активной форме. До сих пор не продемонстрировано отделение полностью активных форм белка от неактивных и частично активных форм белка с использованием стандартных способов хроматографии, как правило, используемых в крупномасштабном производстве.

Неожиданно, конструирование связывающих белков DVD-Ig, являющихся "поливалентными полноразмерными связывающими белками с двойной специфичностью", приводит к получению легкой цепи с двойным варибельным доменом и тяжелой цепи с двойным варибельным доменом, собирающихся, главным образом, в желаемый "поливалентные полноразмерные связывающие белки с двойной специфичностью", т.е. функциональный связывающий белок DVD-Ig. См., публикацию PCT № WO 2007/024715.

## II. Кристаллические и дериватизированные связывающие белки

Изобретение включает способы и композиции для лечения остеоартрита, где связывающий белок является кристаллом. В варианте осуществления кристаллизованный связывающий белок имеет большее время полужизни *in vivo*, чем растворимый вариант связывающего белка. В другом варианте осуществления связывающий белок сохраняет биологическую активность после кристаллизации.

Кристаллизованные связывающие белки, применимые в изобретении, можно получать известными в этой области способами и как описывают в публикации PCT № WO 02072636, включенной в настоящее описание в качестве ссылки.

В другом варианте осуществления изобретения используют гликозилированный связывающий белок, где связывающий белок или его антигенсвязывающая часть содержит один или несколько углеводных остатков. Образующийся *in vivo* белковый продукт может подвергаться дальнейшему процессингу, известному как посттрансляционная модификация. В частности, остатки сахара (гликозилы) могут добавляться ферментативно в процессе, известном как гликозилирование. Получаемые белки, несущие ковалентно связанные олигосахаридные боковые цепи, известны как

гликозилированные белки или гликопротеины. Антитела являются гликопротеинами с одним или несколькими углеводными остатками в Fc-домене, а также вариабельном домене. Углеводные остатки в Fc-домене оказывают важный эффект на эффекторную функцию Fc-домена с минимальным эффектом на связывание антигена или время полужизни антитела (Jefferis (2005) *Biotechnol. Prog.*, 21: 11-16). Наоборот, гликозилирование вариабельного домена может оказывать эффект на антигенсвязывающую активность антитела. Гликозилирование в вариабельном домене может оказывать отрицательный эффект на аффинность связывания антитела вероятно, в результате стерического несоответствия (Co et al. (1993) *Mol. Immunol.* 30: 1361-1367) или приводить к повышению аффинности к антигену (Wallick et al. (1998) *Exp. Med.* 168: 1099-1109, Wright et al. (1991) *EMBO J* 10:2717-2723).

Также можно получать мутантов по участку гликозилирования, в которых O- или N-связанный участок гликозилирования связывающего белка является мутантным. Специалист в этой области может получать таких мутантов с использованием стандартных способов. Мутантов по участку гликозилирования, сохраняющих биологическую активность, но имеющих повышенную или сниженную активность связывания также можно использовать в способах и композициях, представленных в рамках изобретения для лечения остеоартрита.

Можно модифицировать гликозилирование связывающего белка или его антигенсвязывающей части, применимых в способах и композициях по изобретению. Например, можно получать агликозилированное антитело (т.е. антитело без гликозилирования). Гликозилирование можно изменять, например, для повышения аффинности антитела к антигену. Такие модификации углеводов можно осуществлять, например, изменяя один или несколько участков гликозилирования в последовательности антитела. Например, можно делать одну или несколько замен аминокислот, приводящих к устранению одного или нескольких участков гликозилирования в вариабельной области, таким образом, устраняя гликозилирование в этом участке. Такое агликозилирование может повышать аффинность антитела к антигену. Такой подход подробно описывают в публикации РСТ № WO 2003/016466 и патентах США №№ 5714350 и 6350861.

Дополнительно или альтернативно, можно получать модифицированный связывающий белок, применимый в изобретении, с измененным типом гликозилирования, таким как гипофукозилированное антитело со сниженным количеством фукозильных остатков или антитело с повышением структур с бисектным GlcNAc. Показано, что такие измененные профили гликозилирования повышают способность антител к ADCC. Такие модификации углеводов можно осуществлять, например, экспрессируя связывающий белок в клетке-хозяине с измененным механизмом гликозилирования. Клетки с измененным механизмом гликозилирования описаны в этой области, и их можно использовать в качестве клеток-хозяев, в которых экспрессируют рекомбинантные антитела по изобретению, таким образом, получая антитело с измененным гликозилированием. См., например, Shields et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 26733-26740; Umana et al. (1999) *Nat. Biotech.* 17: 176-181, а также европейский патент № EP 1176195 и публикации РСТ №№ WO 03/035835 и WO 99/5434280.

Гликозилирование белка зависит от аминокислотной последовательности интересующего белка, а также клетки-хозяина, в которой экспрессируют белок. Различные организмы могут продуцировать различные ферменты гликозилирования (например, гликозилтрансферазы и гликозидазы) и иметь различные доступные субстраты (сахара нуклеотидов). По причине таких факторов, профиль

гликозилирования белка и композиция гликозильных остатков могут отличаться в зависимости от системы хозяина, в которой экспрессируют конкретный белок. Гликозильные остатки связывающего белка, примененного в изобретении, могут включать, в качестве неограничивающих примеров, глюкозу, галактозу, маннозу, фукозу, *n*-ацетилглюкозамин и сиаловую кислоту. Предпочтительно, гликозилированный связывающий белок содержит гликозильные остатки таким образом, что профиль гликозилирования является профилем человека.

Специалистам в этой области известно, что различное гликозилирование белков может приводить к различным свойствам белка. Например, эффективность терапевтического белка, продуцируемого микроорганизмом-хозяином, такого как дрожжи, и гликозилированного с использованием эндогенного пути дрожжей, может быть ниже чем эффективность того же, экспрессируемого в клетке млекопитающего, например, клеточной линии СНО. Такие гликопротеины также могут являться иммуногенными для человека и демонстрировать сниженное время полужизни *in vivo* после введения. Конкретные рецепторы у человека и других животных могут распознавать конкретные гликозильные остатки и способствовать быстрому выведению белка из кровотока. Другие побочные эффекты могут включать изменения фолдинга белка, растворимости, подверженности воздействию протеаз, миграции, транспорта, компарментализации, секреции, распознавания другими белками или факторами, антигенности или аллергенности. Таким образом, практикующий специалист может предпочитать терапевтический белок с конкретной композицией и профилем гликозилирования, например композицией и профилем гликозилирования, идентичными, или, по меньшей мере, аналогичными таковым в клетках человека или в видо-специфичных клетках предполагаемого исследуемого животного.

Экспрессии гликозилированных белков, отличающихся от таковых клетки-хозяина, можно достигать генетической модификацией клетки-хозяина для экспрессии гетерологичных ферментов гликозилирования. С применением известных в этой области способов практикующий специалист может получать антитела или их антигенсвязывающие части, проявляющие профиль гликозилирования белка человека. Например, штаммы дрожжей генетически модифицировали для экспрессии неприродных ферментов гликозилирования таким образом, что гликозилированные белки (гликопротеины), продуцируемые в этих штаммах дрожжей, проявляют гликозилирование белка, идентичное таковому в клетках животных, особенно клетках человека (патентные публикации США №№ 2004/0018590 и 2002/0137134 и публикация РСТ № WO 2005/100584).

Кроме того, специалисту в этой области следует понимать, что интересующий белок можно экспрессировать с использованием библиотеки клеток-хозяев генетически сконструированных для экспрессии различных ферментов гликозилирования таким образом, что член библиотеки клеток-хозяев продуцирует интересующий белок с вариантами профилей гликозилирования. Затем практикующий специалист может выбирать и выделять интересующий белок с конкретными новыми профилями гликозилирования. Предпочтительно, белок, имеющий конкретный выбранный новый профиль гликозилирования, проявляет улучшенные или измененные биологические свойства.

#### IV. Фармацевтические композиции

В способах по изобретению используют фармацевтические композиции для лечения остеоартрита или боли у индивидуума, содержащие один или несколько связывающих белков, связывающихся с ИЛ-1 $\alpha$  и/или ИЛ-1 $\beta$ . Такие композиции также могут содержать

фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, и/или эксципиент, или любые другие соединения, оказывающие желаемый терапевтический, фармацевтический или фармакологический благоприятный эффект на композицию, иную, чем активность одного или нескольких связывающих белков по связыванию ИЛ-1 $\alpha$  и/или ИЛ-1 $\beta$ . В варианте осуществления композиция по изобретению, применимая в лечении 5 остеоартрита или боли у индивидуума, содержит связывающий белок, связывающийся с ИЛ-1 $\alpha$ , например антитело к ИЛ-1 $\alpha$ , и связывающий белок, связывающийся с ИЛ-1 $\beta$ , такой как антитело к ИЛ-1 $\beta$ , или связывающий белок, связывающийся с ИЛ-1 $\alpha$ , и/или ИЛ-1 $\beta$ , такой как связывающий белок DVD-Ig к ИЛ-1 $\alpha/\beta$ .

Связывающие белки, применимые в способах по изобретению, можно включать в фармацевтические композиции, подходящие для введения индивидууму. Как правило, фармацевтическая композиция содержит один или несколько связывающих белков, связывающихся с ИЛ-1 $\alpha$  и/или ИЛ-1 $\beta$ , и фармацевтически приемлемый носитель. В рамках изобретения "фармацевтически приемлемый носитель" в широком смысле 15 включает любой и все растворители, диспергирующие среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и замедляющие абсорбцию средства и т.п., являющиеся физиологически приемлемыми. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают один или несколько из воды, физиологического раствора, фосфатно-солевого буфера, декстрозы, глицерина, этанола 20 и т.п., а также их комбинации. Во многих случаях предпочтительно включать в композицию изотоническое средство, например, сахар, полиспирт (например, маннит или сорбит) или хлорид натрия. Фармацевтически приемлемые носители дополнительно могут содержать незначительные количества вспомогательных средств, таких как увлажнители или эмульгаторы, консерванты или буферы, повышающие срок хранения 25 или эффективность антитела или части антитела.

Известны различные системы доставки, и их можно использовать для введения одного или нескольких связывающих белков, применимых в изобретении, или комбинации одного или нескольких связывающих белков и профилактического средства или другого терапевтического средства, применимого для профилактики, лечения или 30 улучшения остеоартрита или боли у индивидуума, например, инкапсуляция в липосомах, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать связывающий белок или фрагмент, и рецептор-опосредованный эндоцитоз (см., например, Wu и Wu (1987) J. Biol. Chem., 262: 4429-4432), конструирование нуклеиновой кислоты как часть ретровирусного или другого вектора и т.д. Способы введения 35 индивидууму связывающего белка, связывающегося с ИЛ-1 $\alpha$  и/или ИЛ-1 $\beta$ , включают, в качестве неограничивающих примеров, парентеральное введение (например, внутривенное, внутримышечное, интраперитонеальное, внутривенное и подкожное), эпидуральное введение, внутриопухолевое введение и введение в слизистые оболочки (например, интраназальным и пероральным путями). Кроме того, можно использовать 40 легочное введение, например, с использованием ингалятора или небулайзера, и состав с аэрозольным средством. См., например, патенты США №№ 6019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064, 5855913 и 5290540 и публикации РСТ №№ WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 и WO 99/66903. В одном из вариантов осуществления связывающий белок, применимый в изобретении, вводят с использованием технологии 45 легочной доставки лекарственных средств Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.). В конкретном варианте осуществления связывающий белок, применимый в изобретении вводят внутримышечно, внутривенно, внутриопухолевое, перорально, интраназально, легочно или подкожно. Связывающий белок можно вводить

общепринятым способом, например, с помощью вливания или болюсной инъекции, с помощью абсорбции через эпителий и слизистые оболочки (например, слизистую оболочку ротовой полости, слизистую оболочку прямой кишки и желудочно-кишечного тракта и т.д.), и его можно вводить вместе с другими биологически активными средствами. Введение может являться системным или местным.

В конкретном варианте осуществления, желательным может являться местное введение связывающего белка в нуждающуюся в лечении область, например, напрямую в область сустава. Этого можно достигать, в качестве неограничивающих примеров, с помощью местного вливания, инъекции или импланта, где имплант является пористым или непористым материалом, включая мембраны и матрицы, такие как силиконовые мембраны, полимеры, волокнистые матрицы (например, Tissuel®) или коллагеновые матрицы. В варианте осуществления эффективное количество одного или нескольких связывающих белков вводят местно в пораженный сустав для лечения, улучшения и/или профилактики дальнейшего прогрессирования дегенерации хряща, как в ином случае происходит при остеоартрите, включая боль. В другом варианте осуществления, эффективное количество одного или нескольких связывающих белков вводят местно в поврежденный сустав в комбинации с эффективным количеством одного или нескольких других терапевтических средств (например, одного или нескольких профилактических или терапевтических средств), иных, чем связывающие белки для профилактики, лечения и/или улучшения остеоартрита или одного или нескольких его симптомов, включая боль.

В другом варианте осуществления, связывающиеся с ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  белки можно доставлять в системе с контролируемым высвобождением или замедленным высвобождением. В одном из вариантов осуществления для достижения контролируемого или замедленного высвобождения можно использовать помпу (см. Langer (1990) *Science* 249: 1527-1533; Sefton (1987) *CRC Crit. Rev. Biomed. Eng.*, 14: 201-240; Buchwald et al. (1980) *Surgery*, 88: 507-516; Saudek et al. (1989) *N. Engl. J. Med.*, 321: 574-579). В другом варианте осуществления для достижения контролируемого или замедленного высвобождения связывающих белков, применимых в изобретении, можно использовать полимерные материалы (см., например, *Medical Applications of Controlled Release*, (Langer and Wise, eds.) (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1984); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, (Smolen and Ball, eds.) (Wiley, New York, 1984); Langer and Peppas (1983) *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. Phys.*, C23: 61-126; смотри также Levy et al. (1985) *Science* 228:190-192; During et al. (1989) *Ann. Neurol.*, 25: 351-356; Howard et al. (1989) *J. Neurosurg.* 71:105-112); патенты США №№ 5679377, 5916597, 5912015, 5989463 и 5128326 и публикации PCT №№ WO 99/15154 и WO 99/20253. Примеры полимеров, которые можно использовать в составах с замедленным высвобождением, включают, в качестве неограничивающих примеров, поли(2-гидроксиэтилметакрилат), поли(метилметакрилат), поли(акриловую кислоту), сополимеры этилена и винилацетата, поли(метакриловую кислоту), полигликолиды (PLG), полиангидриды, поли(N-винилпирролидон), поли(виниловый спирт), полиакриламид, поли(этиленгликоль), полилактиды (PLA), сополимеры молочной и гликолевой кислот (PLGA) и сложные полиортоэферы. В варианте осуществления полимер, используемый в составе с замедленным высвобождением, является инертным, не содержащим вымываемые примеси, стабильным при хранении, стерильным и биodeградируемым. В еще одном варианте осуществления системы для контролируемого или замедленного высвобождения можно помещать вблизи профилактической или терапевтической мишени, таким образом, требуется только фракция системной дозы

(см., например, Goodson, J.M., Chapter 6, In Medical Applications of Controlled release, Vol. II, Applications and Evaluation, (Langer and Wise, eds.) (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1984), pp. 115-138).

Системы для контролируемого высвобождения обсуждают в обзоре Langer, Science, 249: 1527-1533(1990). Можно использовать любой способ, известный специалисту в этой области, для получения составов с замедленным высвобождением, содержащих одно или несколько терапевтических средств по изобретению. См., например, патент США № 4526938, публикации PCT №№ WO 91/05548 и WO 96/20698; Ning et al. (1996) Radiother. Oncol., 39: 179-189; Song et al. (1996) PDA J. Pharm. Sci. Technol., 50: 372-377; Cleek et al. (1997) Proceed. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24: 853-854; and Lam et al. (1997) Proceed. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater., 24: 759-760.

В конкретном варианте осуществления, где композиция, применимая в изобретении, является нуклеиновой кислотой, кодирующей белок, связывающийся с ИЛ-1 $\alpha$  и/или ИЛ-1 $\beta$ , нуклеиновую кислоту можно вводить *in vivo* для усиления экспрессии кодируемого ею профилактического или терапевтического средства, конструируя ее как часть соответствующего экспрессирующего нуклеиновую кислоту вектора и вводя ее таким образом, что она становится внутриклеточной, например, с использованием ретровирусного вектора (см., например, патент США № 4980286), или с помощью прямой инъекции, или с использованием бомбардировки микрочастицами (например, "генной пушки"; Biolistic, DuPont), или покрывая липидами, или рецепторами поверхности клетки или средствами для трансфекции, или вводя ее соединенной с гомеобокс-подобным пептидом, который, как известно, проникает в ядро (см., например, Joliot et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1864-1868). Альтернативно, нуклеиновую кислоту можно вводить внутриклеточно и встраивать в ДНК клетки-хозяина для экспрессии посредством гомологичной рекомбинации.

Фармацевтическую композицию, применимую в изобретении, для лечения остеоартрита или боли составляют совместимой с предполагаемым путем ее введения. Примеры путей введения включают, в качестве неограничивающих примеров, парентеральное, например, внутривенное, внутрикожное, подкожное, пероральное, интраназальное (например, ингаляцию), трансдермальное (например, местное), трансмукозальное и ректальное введение. В конкретном варианте осуществления композицию составляют общепринятыми способами как фармацевтическую композицию, адаптированную для внутривенного, подкожного, внутримышечного, перорального, интраназального или местного введения человеку. Как правило, композиции для внутривенного введения являются растворами в стерильном изотоничном водном буфере. При необходимости, композиция также может включать солюбилизатор и местный анестетик, такой как лигнокаин, для облегчения боли в участке инъекции.

Если композиции, применимые в изобретении, для лечения остеоартрита или боли подлежат местному введению, композиции можно составлять в форме мази, крема, трансдермального пластыря, лосьона, геля, шампуня, спрея, аэрозоля, раствора, эмульсии или другой форме, хорошо известной специалисту в этой области. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19th ed., (Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, 1995). В случае нераспыляемых местных лекарственных форм, как правило, используют формы от вязких до полутвердых или твердых, содержащие носитель или один или несколько эксципиентов, совместимых с местным применением и имеющих динамическую вязкость, предпочтительно, выше воды. Другие подходящие составы включают, в качестве

неограничивающих примеров, суспензии, порошки, линименты, мази и т.п. В варианте осуществления такие составы стерилизуют или смешивают со вспомогательными средствами (например, консервантами, стабилизаторами, увлажнителями, буферами или солями) для воздействия на различные их свойства, такие как, например, осмотическое давление. Другие подходящие местные лекарственные формы включают распыляемые аэрозольные препараты, где активный ингредиент, например, в комбинации с твердым или жидким инертным носителем, упаковывают в смеси с летучим веществом под давлением (например, газообразным пропеллентом, таким как FREON®) или в мягкой бутылки. При желании в фармацевтические композиции и лекарственные формы также можно добавлять увлажнители. Примеры таких дополнительных ингредиентов хорошо известны в этой области.

Если способ по изобретению для лечения остеоартрита или боли включает интраназальное введение композиции, ее можно составлять в форме аэрозоля, спрея или в форме капель. В частности, связывающий белок для применения по настоящему изобретению общепринято можно доставлять в форме аэрозольного спрея в упаковках под давлением или небулайзере с использованием подходящего пропеллента (например, дихлордифторметана, трихлорфторметана, дихлортетрафторэтана, диоксида углерода или другого подходящего газа). В случае аэрозоля под давлением единицу дозирования можно определять с помощью клапана для доставки измеренного количества. Капсулы и картриджи (например, состоящие из желатина) для применения в ингаляторе или инсуффляторе можно составлять содержащими порошковую смесь соединения и подходящую порошковую основу, такую как лактоза или крахмал.

Если способ по изобретению для лечения остеоартрита или боли включает пероральное введение, можно составлять пероральную композицию в форме таблеток, капсул, крахмальных капсул, желатиновых капсул, растворов, суспензий и т.п. Таблетки или капсулы можно получать общепринятыми способами с использованием фармацевтически приемлемых эксципиентов, таких как связующие средства (например, прежелатинизированный кукурузный крахмал, поливинилпирролидон или гидроксипропилметилцеллюлозу), наполнители (например, лактозу, микрокристаллическую целлюлозу, или гидрофосфат кальция), смазочные средства (например, стеарат магния, тальк или диоксид кремния), разрыхлители (например, картофельный крахмал или крахмал гликолят натрия) или увлажнители (например, лаурилсульфат натрия). Таблетки можно покрывать способами, хорошо известными в этой области. Жидкие препараты для перорального введения можно получать в форме, в качестве неограничивающих примеров, растворов, сиропов или суспензий, или их можно предоставлять в качестве сухого продукта для разведения водой или другим подходящим разбавителем перед использованием. Такие жидкие препараты можно получать общепринятыми способами с фармацевтически приемлемыми добавками, такими как суспендирующие средства (например, сорбитный сироп, производные целлюлозы или гидрогенизированные пищевые жиры), эмульгаторы (например, лецитин или гуммиарабик), неводные разбавители (например, миндальное масло, масляные сложные эфиры, этиловый спирт или фракционированные растительные масла) и консерванты (например, метил или пропил-р-гидроксibenзоаты или сорбиновую кислоту). При необходимости препараты также могут содержать буферные соли, ароматизаторы, красители и подсластители. Препараты для перорального введения можно соответствующим образом составлять для контролируемого высвобождения или замедленного высвобождения связывающих белков, применимых в изобретении, для лечения остеоартрита или боли.

Способ лечения остеоартрита или способ лечения боли по изобретению может включать легочное введение композиции, составляемой с аэрозольным средством, например, с использованием ингалятора или небулайзера. См., например, патенты США №№ 6019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064, 5855913 и 5290540 и публикации РСТ №№ WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 и WO 99/66903. В конкретном варианте осуществления связывающий белок, связывающийся с ИЛ-1 $\alpha$  и/или ИЛ-1 $\beta$ , или комбинированное терапевтическое средство для лечения остеоартрита вводят с использованием технологии легочной доставки лекарственного средства Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Massachusetts).

Способ по изобретению может включать введение композиции, содержащей связывающий белок, связывающийся с ИЛ-1 $\alpha$  и/или ИЛ-1 $\beta$ , составляемой для парентерального введения с помощью инъекции (например, с помощью болюсной инъекции или длительного вливания). Составы для инъекции могут находиться в стандартной лекарственной форме (например, в ампулах или в контейнерах для многократного приема) с добавлением консерванта. Композиции могут находиться в таких формах, как суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных разбавителях, и могут содержать вспомогательные средства, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие средства. Альтернативно, связывающий белок может находиться в форме порошка для разведения подходящим разбавителем (например, стерильной водой без пирогенов) перед использованием.

Способы по изобретению дополнительно могут включать введение композиций, составляемых как депо-препараты. Такие составы длительного действия можно вводить с помощью имплантации (например, подкожно или внутримышечно) или внутримышечной инъекции. Таким образом, например, композиции можно составлять с использованием подходящих полимерных или гидрофобных материалов (например, в виде эмульсии в подходящем масле) или ионообменных смол, или в виде труднорастворимых производных (например, в виде труднорастворимой соли).

Способы по изобретению включают введение композиций, составляемых в нейтральной или солевой форме. Фармацевтически приемлемые соли включают соли, образованные с анионами, такими как получаемые из соляной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислот и т.д., и соли, образованные с катионами, такими как получаемые из гидроксидов натрия, калия, аммония, кальция, железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т.д.

Как правило, ингредиенты композиций добавляют отдельно или смешивают вместе в стандартной лекарственной форме, например, в виде лиофилизированного порошка или безводного концентрата, в герметично запаянном контейнере, таком как ампула или саше с указанием количества активного средства. Если способом введения является вливание, композицию можно распределять в бутылки для инфузий, содержащие стерильную фармацевтического качества воду или физиологический раствор. Если способом введения является инъекция, можно предоставлять ампулу стерильной воды для инъекции или физиологический раствор таким образом, что ингредиенты можно смешивать перед введением.

Изобретение также относится к одному или нескольким связывающим белкам, связывающим ИЛ-1 $\alpha$  и/или ИЛ-1 $\beta$ , или фармацевтической композиции, содержащей такие связывающие белки, упакованной в герметично запаянный контейнер, такой как ампула или саше, указывая количество средства. В варианте осуществления один или несколько связывающих белков, связывающихся с ИЛ-1 $\alpha$  и/или ИЛ-1 $\beta$ , или фармацевтическую композицию, содержащую такие связывающие белки поставляют

как стерилизованный лиофилизированный порошок или безводный концентрат в герметично запаянном контейнере, и его можно разводить (например, с использованием воды или физиологического раствора) до подходящей концентрации для введения индивидууму для лечения артрита или боли. В варианте осуществления один или несколько связывающих белков, связывающихся с ИЛ-1 $\alpha$  и/или ИЛ-1 $\beta$ , или фармацевтическую композицию, содержащую такие связывающие белки, поставляют как стерильный лиофилизированный порошок в герметично запаянном контейнере при единице дозирования по меньшей мере приблизительно 5 мг, по меньшей мере приблизительно 10 мг, по меньшей мере приблизительно 15 мг, по меньшей мере приблизительно 25 мг, по меньшей мере приблизительно 35 мг, по меньшей мере приблизительно 45 мг, по меньшей мере приблизительно 50 мг, по меньшей мере приблизительно 75 мг или по меньшей мере приблизительно 100 мг. Лиофилизированные связывающие белки или фармацевтическую композицию, содержащую такие связывающие белки, необходимо хранить при температуре от приблизительно 2°C до приблизительно 8°C в таре изготовителя, и связывающие белки или фармацевтическую композицию, содержащую такие связывающие белки, необходимо вводить в течение 1 недели, в течение 5 дней, в течение 72 часов, в течение 48 часов, в течение 24 часов, в течение 12 часов, в течение 6 часов, в течение 5 часов, в течение 3 часов или в течение 1 часа после разведения. В альтернативном варианте осуществления один или несколько связывающих белков, связывающихся с ИЛ-1 $\alpha$  и/или ИЛ-1 $\beta$ , или фармацевтическую композицию, содержащую такие связывающие белки, поставляют в жидкой форме в герметично запаянном контейнере, указывая количество и концентрацию средства. В варианте осуществления жидкую форму вводимой композиции поставляют в герметично запаянном контейнере при концентрации, по меньшей мере приблизительно 0,25 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 0,5 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 1 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 2,5 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 5 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 8 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 10 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 15 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 25 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 50 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 75 мг/мл или, по меньшей мере приблизительно 100 мг/мл. Жидкую форму необходимо хранить при температуре от приблизительно 2°C до приблизительно 8°C в таре изготовителя.

Связывающие белки, применимые в способах и композициях, представленных в рамках изобретения, можно включать в фармацевтическую композицию, подходящую для парентерального введения. В одном из аспектов связывающие белки будут получать в виде инъеклируемого раствора, содержащего от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 250 мг/мл антитела. Инъеклируемый раствор может состоять из жидкой или лиофилизированной лекарственной формы в сосуде из бесцветного или желтого стекла, ампуле или заранее наполненном шприце. Буфер может являться L-гистидином (от приблизительно 1 мМ до приблизительно 50 мМ), оптимально - от приблизительно 5 мМ до приблизительно 10 мМ, при pH от приблизительно 5,0 до приблизительно 7,0 (оптимально - приблизительно pH 6,0). Другие подходящие буферы включают, в качестве неограничивающих примеров, сукцинат натрия, цитрат натрия, фосфат натрия или фосфат калия. Хлорид натрия можно использовать для модификации токсичности раствора при концентрации от приблизительно 0 до приблизительно 300 мМ (оптимально - приблизительно 150 мМ для жидкой лекарственной формы). В случае лиофилизированной лекарственной формы можно включать криопротекторы, в основном, от приблизительно 0% до приблизительно 10% сахарозы (оптимально - от

приблизительно 0,5% до приблизительно 1,0%). Другие подходящие криопротекторы включают трегалозу и лактозу. В случае лиофилизированной лекарственной формы можно включать объемобразующие средства, в основном, от приблизительно 1% до приблизительно 10% маннита (оптимально - от приблизительно 2% до приблизительно 4%). В жидких и лиофилизированных лекарственных формах можно использовать стабилизаторы, в основном, от приблизительно 1 мМ до приблизительно 50 мМ L-метионина (оптимально - от приблизительно 5 мМ до приблизительно 10 мМ). Другие подходящие объемобразующие средства включают глицин, аргинин, можно включать от приблизительно 0% до приблизительно 0,05% полисорбата-80 (оптимально - от приблизительно 0,005% до приблизительно 0,01%). Дополнительные поверхностно-активные вещества включают, в качестве неограничивающих примеров, полисорбат 20 и поверхностно-активные вещества BRIJ.

Композиции, применимые для лечения остеоартрита или боли по изобретению, могут находиться в различных формах. Они включают, например, жидкие, полутвердые и твердые лекарственные формы, такие как жидкие растворы (например, инъеклируемые и вливаемые растворы), дисперсии или суспензии, таблетки, пилюли, порошки, липосомы и суппозитории. Конкретная форма зависит от предполагаемого способа введения и терапевтического назначения. Типичные композиции находятся в форме инъеклируемых или вливаемых растворов, таких как композиции, аналогичные используемым для пассивной иммунизации человека с использованием антител. Способ введения является парентеральным (например, внутривенным, подкожным, интраперитонеальным, внутримышечным). В варианте осуществления антитело вводят внутривенным вливанием или инъекцией. В другом варианте осуществления антитело вводят внутримышечной или подкожной инъекцией.

Терапевтические композиции, как правило, должны являться стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композицию можно составлять в виде раствора, микроэмульсии, дисперсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Стерильные инъеклируемые растворы можно получать включением активного соединения (т.е. антитела или его антигенсвязывающей части) в необходимом количестве в подходящем растворителе с одним или комбинацией указанных выше ингредиентов должным образом с последующей стерилизацией фильтрацией. Как правило, дисперсии получают включением активного соединения в стерильный разбавитель, содержащий основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из указанных выше. В случае стерильных лиофилизированных порошков для получения стерильных инъеклируемых растворов примерами способов получения являются вакуумная сушка и сушка распылением, с помощью которых получают порошок активного ингредиента и любого дополнительного желаемого ингредиента из его раствора, ранее стерилизованного фильтрацией. Можно поддерживать соответствующую текучесть раствора, например, с использованием покрытия, такого как лецитин, посредством поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и с использованием поверхностно-активных веществ. Можно достигать пролонгированной абсорбции инъеклируемых композиций, включая в композицию средство, замедляющее абсорбцию, например, моностеаратные соли и желатин.

Связывающие белки, применимые для лечения остеоартрита или боли по изобретению, можно вводить множеством известных в этой области способов, хотя примером пути/способа введения является подкожная инъекция, внутривенная инъекция или вливание. Как будет понятно специалистам в этой области, путь и/или способ введения будет

варьироваться в зависимости от желаемых результатов. В некоторых вариантах осуществления связывающие белки можно получать с носителем, который будет защищать связывающие белки от быстрого высвобождения, таким как состав с контролируемым высвобождением, включая импланты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Можно использовать биodeградируемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, сложные полиортоэфир и полимолочная кислота. Многие способы получения таких составов запатентованы или, как правило, известны специалистам в этой области. См., например, Sustained and Controlled release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., (Marcel Dekker, Inc., New York, 1978).

В некоторых вариантах осуществления связывающие белки, применимые в изобретении, могут являться перорально вводимыми, например, с инертным разбавителем или усваиваемым съедобным носителем. Связывающие белки (и, при желании, другие ингредиенты) также можно заключать в твердую или мягкую желатиновую капсулу, прессовать в таблетки или напрямую включать в рацион индивидуума. Для перорального терапевтического введения соединения можно включать с эксципиентами и использовать в форме проглатываемых таблеток, буккальных таблеток, пастилок, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, пластинок и т.п. Для введения соединения по изобретению иным способом, чем парентеральное введение, необходимым может являться покрытие соединения или совместное введение соединения с материалом для предотвращения его инактивации.

В композиции также можно включать дополнительные активные соединения. В некоторых вариантах осуществления связывающий белок (например, антитело) или его антигенсвязывающую часть, применимые в изобретении, составляют совместно и/или вводят совместно с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами, применимыми для лечения остеоартрита или боли. Например, связывающий белок, связывающийся с hIL-1 $\alpha$  и/или hIL-1 $\beta$ , или его антигенсвязывающие части можно составлять совместно и/или вводить совместно с одним или несколькими дополнительными антителами, связывающими другие мишени (например, антитела, связывающие другие цитокины или связывающие молекулы поверхности клетки). Кроме того, можно использовать один или несколько связывающих белков в комбинации с одним или несколькими другими терапевтическими средствами. В таких способах комбинированного лечения преимущественно можно использовать меньшие дозы вводимых терапевтических средств, таким образом, избегая возможных токсичностей или осложнений, ассоциированных с различными способами монотерапии.

В некоторых вариантах осуществления белки, связывающие ИЛ-1 $\alpha$  и/или ИЛ-1 $\beta$ , или их связывающую часть соединяют с известным в этой области разбавителем, повышающим время полужизни. Такие разбавители включают, в качестве неограничивающих примеров, Fc-домен, полиэтиленгликоль и декстран. Такие разбавители описывают, например, в патенте США № 6660843.

В конкретном варианте осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие один или несколько полипептидов связывающего белка, вводят для лечения, профилактики или улучшения остеоартрита посредством генотерапии. Генотерапия относится к терапии, осуществляемой посредством введения индивидууму экспрессируемой нуклеиновой кислоты. В этом варианте осуществления изобретения с помощью нуклеиновых кислот получают кодируемые ими связывающие полипептиды для связывающих белков, связывающихся с ИЛ-1 $\alpha$  и/или ИЛ-1 $\beta$ , и они опосредуют профилактический или терапевтический эффект

в отношении остеоартрита или боли.

Любой из способов генотерапии, доступных в этой области, можно использовать по настоящему изобретению. Общие обзоры способов генотерапии, см. Goldspiel et al. (1993) Clin. Pharm. 12:488-505; Wu and Wu (1991) Biotherapy 3: 87-95; Tolstoshev (1993) Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573-596; Mulligan (1993) Science 260: 926-932; Morgan and Anderson (1993) Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; and Robinson, C. (1993) Trends Biotechnol. 11(5):155. Способы, общеизвестные в области технологии рекомбинантных ДНК, которые можно использовать, описывают в Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, New York, 1993); and Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, (Stockton Press, New York, 1990). Подробные описания различных способов генотерапии описывают в публикации патентной заявки США №№ 2005/0042664.

Связывающие белки, связывающие ИЛ-1 $\alpha$  и/или ИЛ-1 $\beta$  можно использовать в отдельности или в комбинации с одним или несколькими дополнительными средствами, применимыми в лечении остеоартрита или боли. Например, дополнительное средство может являться терапевтическим средством, известным в этой области как применимое для лечения одного или нескольких симптомов остеоартрита или для воздействия на мишень, иную, чем ИЛ-1, ассоциированную с болью. Дополнительное средство также может являться средством, придающим терапевтической композиции полезное свойство, например, средством, влияющим на вязкость композиции, подлежащей введению индивидууму.

Также следует понимать, что комбинации, подлежащие включению в это изобретение, являются комбинациями, применимыми для своего предполагаемого назначения. Приведенные ниже средства предназначены для иллюстрирования целей, но не для ограничения. Комбинации, являющиеся частью данного изобретения, могут представлять связывающие белки, связывающие ИЛ-1 $\alpha$  и/или ИЛ-1 $\beta$ , и по меньшей мере одно дополнительное средство, обеспечивающее желаемое свойство. Комбинация также может включать несколько дополнительных средств, например, два или три дополнительных средства, если комбинация является такой, что образованная композиция может выполнять свою предполагаемую функцию. Предпочтительные комбинации для лечения остеоартрита или боли включают нестероидные противовоспалительные лекарственные средства, также обозначаемые как НПВС, включающие лекарственные средства, подобные ибупрофену. Другими предпочтительными комбинациями являются противовоспалительные средства, включая кортикостероиды, такие как преднизолон; хорошо известные побочные эффекты использования стероидов можно снижать или даже устранять, воздействуя на дозу стероидов, необходимую при лечении пациентов, в комбинации со связывающими белками, связывающими ИЛ-1 $\alpha$  и/или ИЛ-1 $\beta$ . Неограничивающие примеры терапевтических средств для применения в лечении индивидуума, страдающего остеоартритом или болью, могут включать, в качестве неограничивающих примеров, один или несколько из следующего: будезонида, эпидермального фактора роста, кортикостероидов, циклоспорина, сульфасалазина, аминосалицилатов, 6-меркаптопуринов, азатиоприна, метронидазола, ингибиторов липоксигеназы, месалазина, олсалазина, балсалазида, антиоксидантов, ингибиторов тромбксана, антагонистов рецептора ИЛ-1, моноклональных антител к ИЛ-1 $\beta$ , моноклональных антител к ИЛ-6, факторов роста, ингибиторов эластаз, пиридинил-имидазольных соединений, антител к ФНО, LT, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-15, ИЛ-16, ИЛ-18, ИЛ-23, ЕМАР-II, ГМ-КСФ, FGF и PDGF, антител к CD2, CD3, CD4, CD8,

CD19, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 или их лигандам, метотрексата, циклоспорина, FK506, рапамицина, микофенолата мофетила, лефлуномида, НПВС, ибупрофена, преднизолона, ингибиторов фосфодиэстеразы, агонистов аденозиновых рецепторов, антитромботических средств, ингибиторов компонентов комплемента, адренергических средств, IRAK, NIK, IKK, p38, ингибиторов MAP-киназ, ингибиторов ИЛ-1 $\beta$ -превращающего фермента, ингибиторов ФНО-превращающего фермента, ингибиторов передачи сигнала Т-клеток, ингибиторов металлопротеиназ, ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента, растворимых рецепторов цитокина, растворимого рецептора ФНО p55, растворимого рецептора ФНО p75, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, противовоспалительных цитокинов, ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-11, ИЛ-13 и TGF $\beta$ .

Фармацевтические композиции по изобретению могут включать "терапевтически эффективное количество" или "профилактически эффективное количество" одного или нескольких связывающих белков, связывающихся с ИЛ-1 $\alpha$  и/или ИЛ-1 $\beta$ . "Терапевтически эффективное количество" относится к количеству, эффективному в необходимых дозах и в течение необходимых периодов времени для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество связывающего белка может определять специалист в этой области, и оно может варьировать в соответствии с факторами, такими как состояние заболевания, возраст, пол и масса индивидуума, и способности связывающего белка вызывать желаемый ответ у индивидуума.

Терапевтически эффективное количество также является количеством, при котором любые токсические или вредные эффекты связывающих белков или их частей перевешиваются терапевтически положительным воздействием. "Профилактически эффективное количество" относится к количеству, эффективному в необходимых дозах и в течение необходимых периодов времени для достижения желаемого профилактического результата, такого как профилактика дальнейшей дегенерации или потери суставного хряща в поврежденном суставе при остеоартрите или профилактика дебюта или интенсификации боли. Как правило, т.к. профилактическую дозу используют у индивидуумов до развития заболевания или на ранней стадии заболевания, профилактически эффективное количество будет меньше, чем терапевтически эффективное количество.

В варианте осуществления способ лечения боли у индивидуума, где индивидуум страдает заболеванием или нарушением, ассоциированным с накоплением ИЛ-1. Такое накопление ИЛ-1 у индивидуума может являться результатом сниженной экспрессии ИЛ-1 или сниженного метаболизма ИЛ-1. Накопление ИЛ-1 может происходить в крови (включая плазму, сыворотку) или периферических тканях индивидуума.

В варианте осуществления изобретение относится к способу лечения боли у индивидуума, где индивидуум страдает заболеванием или нарушением, ассоциированным с накоплением ИЛ-1.

В варианте осуществления композиции и способы, представленные в рамках изобретения, можно использовать для лечения боли у индивидуума, страдающего заболеванием или нарушением, выбранным из группы, включающей остеоартрит, ревматоидный артрит, ювенильный хронический артрит, септический артрит, артрит Лайма, псориатический артрит, реактивный артрит, спондилоартропатию, системную красную волчанку, болезнь Крона, язвенный колит, воспалительное заболевание кишечника, инсулинозависимый сахарный диабет, тиреоидит, астму, аллергические заболевания, псориаз, дерматит, склеродермию, реакцию "трансплантат против хозяина", отторжение трансплантата органа, острое или хроническое иммунное заболевание, связанное с трансплантацией органа, саркоидоз, атеросклероз, диссеминированное

внутрисосудистое свертывание, синдром Кавасаки, болезнь Грейвса, нефротический синдром, синдром хронической усталости, гранулематоз Вегенера, пурпуру Шенлейн-Геноха, микроскопический васкулит почек, хронический активный гепатит, увеит, септический шок, синдром токсического шока, сепсис, кахексию, инфекционные

5 заболеваний, паразитические заболевания, острый поперечный миелит, болезнь Хантингтона, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, инсульт, первичный биллиарный цирроз, гемолитическую анемию, злокачественные новообразования, сердечную недостаточность, инфаркт миокарда, болезнь Аддисона, спорадическую полигландулярную недостаточность типа I, полигландулярную недостаточность типа

10 П (синдром Шмидта), острый респираторный дистресс-синдром взрослых, алопецию, гнездную алопецию, серонегативную артропатию, артропатию, болезнь Рейтера, псориатическую артропатию, артропатию при язвенном колите, энтеропатический синовит, Chlamydia-ассоциированную артропатию, Yersinia-ассоциированную артропатию, Salmonella-ассоциированную артропатию, спондилоартропатию,

15 атероматозное заболевание/артериосклероз, atopическую аллергию, буллезные аутоиммунные дерматозы, обыкновенную пузырчатку, эксфолиативную пузырчатку, пемфигоид, IgA-зависимый линейный дерматоз, аутоиммунную гемолитическую анемию, гемолитическую анемию с положительной реакцией Кумбса, приобретенную пернициозную анемию, ювенильную пернициозную анемию, миалгический энцефалит/

20 синдром хронической усталости, хронический кандидоз кожи и слизистых оболочек, гигантоклеточный артериит, первичный склерозирующий гепатит, криптогенный аутоиммунный гепатит, синдром приобретенного иммунодефицита, связанные с синдромом приобретенного иммунодефицита заболевания, гепатит В, гепатит С, вариабельный неклассифицируемый иммунодефицит (неклассифицируемую

25 вариабельную гипогаммаглобулинемию), дилатационную кардиомиопатию, женское бесплодие, недостаточность яичников, преждевременную недостаточность яичников, фиброз легких, криптогенный фиброзирующий альвеолит, поствоспалительную интерстициальную болезнь легких, интерстициальный пневмонит, интерстициальную болезнь легких, связанную с диффузной болезнью легких, интерстициальную болезнь

30 легких, связанную со смешанной болезнью соединительной ткани, интерстициальную болезнь легких, связанную с системной склеродермией, интерстициальную болезнь легких, связанную с ревматоидным артритом, болезнь легких, связанную с системной красной волчанкой, болезнь легких, связанную с дерматомиозитом/полимиозитом, болезнь легких, связанную с болезнью Шегрена, болезнь легких, связанную с

35 анкилозирующим спондилитом, диффузную болезнь легких при васкулитах, болезнь легких, связанную с гемосидерозом, лекарственную интерстициальную болезнь легких, фиброз, лучевой фиброз, облитерирующий бронхиолит, хроническую эозинофильную пневмонию, болезнь легких с лимфоцитарной инфильтрацией, постинфекционную интерстициальную болезнь легких, подагрический артрит, аутоиммунный гепатит,

40 аутоиммунный гепатит типа 1 (классический аутоиммунный или волчаночный гепатит), аутоиммунный гепатит типа 2 (гепатит с антителами к LKM), аутоиммунную гипогликемию, резистентность к инсулину типа В с акантозом, гипопаратиреоз, острое иммунное заболевание, связанное с трансплантацией органов, хроническое иммунное заболевание, связанное с трансплантацией органов, остеоартроз, первичный

45 склерозирующий холангит, псориаз типа 1, псориаз типа 2, идиопатическую лейкопению, аутоиммунную нейтропению, неуточненную нефропатию, гломерулонефрит, микроскопический васкулит почек, болезнь Лайма, дискоидную красную волчанку, идиопатическое или неуточненное мужское бесплодие, аутоиммунную реакцию на

сперму, рассеянный склероз (все подтипы), симпатическую офтальмию, легочную гипертензию, вторичную относительно болезни соединительной ткани, синдром Гудпасчера, легочное проявление узелкового периартериита, острую ревматическую лихорадку, ревматоидный спондилит, болезнь Стилла, системную склеродермию, синдром Шегрена, синдром Такаясу/артериит, аутоиммунную тромбоцитопению, идиопатическую тромбоцитопению, аутоиммунный тиреоидит, гипертиреоз, аутоиммунный тиреоидит (болезнь Хашимото), атрофический аутоиммунный гипотиреоз, первичную микседему, факогенный увеит, первичный васкулит, витилиго, острую печеночную недостаточность, хронические заболевания печени, алкогольный цирроз, алкогольное поражение печени, холестаза, идиосинкразический гепатит, лекарственный гепатит, неалкогольный стеатогепатит, аллергию, инфекцию стрептококками группы В (GBS), психические расстройства (например, депрессию и шизофрению), Th2-и Th1-опосредованные заболевания, острую и хроническую боль (различные формы боли), злокачественные новообразования, такие как рак легких, молочной железы, желудка, мочевого пузыря, толстого кишечника, поджелудочной железы, яичника, предстательной железы и прямой кишки и гематопоэтические злокачественные новообразования (лейкоз и лимфому), абеталипопротеинемию, акроцианоз, острые и хронические паразитические или инфекционные процессы, острый лейкоз, острый лимфобластный лейкоз (ALL), острый миелолейкоз (AML), острую или хроническую бактериальную инфекцию, острый панкреатит, острую почечную недостаточность, аденокарциномы, предсердные эктопические ритмы, комплекс СПИД-деменция, алкогольный гепатит, аллергический конъюнктивит, аллергический контактный дерматит, аллергический ринит, отторжение аллотрансплантата, недостаточность альфа-1-антитрипсина, боковой амиотрофический склероз, анемию, стенокардию, дегенерацию клеток передних рогов, терапию к CD3, антифосфолипидный синдром, антирецепторные реакции гиперчувствительности, аневризмы аорты и периферические аневризмы, расслоение аорты, артериальную гипертензию, артериосклероз, артериовенозный анастомоз, атаксию, фибрилляцию предсердий (длительную или пароксизмальную), трепетание предсердий, атриовентрикулярную блокаду, В-клеточную лимфому, отторжение костного трансплантата, отторжение трансплантата костного мозга (ВМТ), блокаду ножки пучка Гиса, лимфому Беркитта, ожоги, сердечные аритмии, синдром остановки сердца, опухоли сердца, кардиомиопатию, воспалительный ответ на сердечно-легочное шунтирование, отторжение трансплантата хряща, дегенерацию коры мозжечка, мозжечковые нарушения, хаотическую или мультифокальную предсердную тахикардию, связанные с химиотерапией нарушения, хронический миелоцитарный лейкоз (СМЛ), хронический алкоголизм, хронические воспалительные заболевания, хронический лимфоцитарный лейкоз (СLL), хроническую обструктивную болезнь легких (СОPD), хроническую интоксикацию салицилатами, колоректальную карциному, застойную сердечную недостаточность, конъюнктивит, контактный дерматит, легочное сердце, ишемическую болезнь легких, болезнь Крейтцфельда-Якоба, культурально-негативный сепсис, кистозный фиброз, нарушения, связанные с терапией цитокинами, деменцию боксеров, демиелинизирующие заболевания, геморрагическую лихорадку денге, дерматит, дерматологические нарушения, диабет, диабетический артериосклероз, деменцию с тельцами Леви, дилатационную застойную кардиомиопатию, нарушения базальных ганглиев, синдром Дауна в зрелом возрасте, двигательные нарушения, вызываемые лекарственными средствами, блокирующими допаминовые рецепторы в ЦНС, чувствительность к лекарственным средствам, экзему, энцефаломиелит, эндокардит, эндокринопатию, эпиглоттит, инфекцию вирусом

Эпштейна-Барре, эритромелалгию, экстрапирамидные и мозжечковые нарушения, семейный гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз, отторжение имплантата фетального тимуса, атаксию Фридрейха, функциональные нарушения периферических артерий, грибковый сепсис, газовую гангрену, язву желудка, гломерулонефрит, отторжение  
5 трансплантата любого органа или ткани, грамотрицательный сепсис, грамположительный сепсис, гранулемы по причине внутриклеточных паразитов, волосатоклеточный лейкоз, болезнь Галлервордена-Шпатца, тиреоидит Хашимото, поллиноз, отторжение трансплантата сердца, гемохроматоз, гемодиализ, гемолитический уремический синдром/тромболитическую тромбоцитопеническую пурпуру, геморрагию,  
10 гепатит А, аритмии, связанные с нарушениями в пучке Гиса, инфекцию ВИЧ/нейропатию при ВИЧ, болезнь Ходжкина, гиперкинетические двигательные нарушения, реакции гиперчувствительности, экзогенный аллергический альвеолит, гипертоническую болезнь, гипокинетические двигательные нарушения, оценку функции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, идиопатическую болезнь Аддисона, идиопатический легочный  
15 фиброз, антитело-опосредованную цитотоксичность, астению, спинально-мышечную атрофию детей, воспаление аорты, грипп А, воздействие ионизирующего излучения, иридоциклит/увеит/оптический неврит, повреждение при ишемии/реперфузии, ишемический инсульт, ювенильный ревматоидный артрит, ювенильную спинально-мышечную атрофию, саркому Капоши, отторжение трансплантата почки, легионелу,  
20 лейшманиоз, проказу, поражения кортикоспинальной системы, липедему, отторжение трансплантата печени, лимфедему, малярию, злокачественную лимфому, злокачественный гистиоцитоз, злокачественную меланому, менингит, менингококкемию, метаболическую мигрень, идиопатическую мигрень, мультисистемное митохондриальное нарушение, смешанную болезнь соединительной ткани, моноклональную гаммопатию,  
25 множественную миелому, мультисистемные дегенерации (синдром Менцеля, Дежерина-Тома, Шая-Дрейджера и Мачадо-Джозефа), миастению, инфекцию комплексом *Mycobacterium avium* и *Mycobacterium intracellulare*, инфекцию *Mycobacterium tuberculosis*, миелодиспластический синдром, инфаркт миокарда, ишемические нарушения миокарда, назофарингеальную карциному, хронические заболевания легких новорожденных,  
30 нефрит, нефроз, нейродегенеративные заболевания, неврогенные мышечные атрофии, нейтропеническую лихорадку, неходжкинскую лимфому, окклюзию брюшной аорты и ее ветвей, окклюзирующие заболевания артерий, терапию ОКТЗ®, орхит/эпидидимит, орхит/реверсивную вазэктомию, органомегалию, остеопороз, отторжение трансплантата поджелудочной железы, карциному поджелудочной железы, паранеопластический  
35 синдром/гиперкальцемию при злокачественных новообразованиях, отторжение трансплантата паращитовидной железы, воспалительное заболевание тазовых органов, круглогодичный ринит, заболевание перикарда, атеросклеротическое поражение периферических сосудов, нарушения периферических сосудов, перитонит, пернициозную анемию, пневмоцистную пневмонию, пневмонию, синдром ROEMS (полинейропатию,  
40 органомегалию, эндокринопатию, моноклональную гаммопатию и поражения кожи), постперфузионный синдром, посткардиотомный синдром, презклампсию, прогрессирующий надъядерный паралич, первичную легочную гипертензию, лучевую терапию, феномен Рейно, болезнь Рейно, синдром Рефсума, тахикардию с широкими комплексами QRS, вазоренальную гипертензию, реперфузионное повреждение,  
45 рестриктивную кардиомиопатию, саркомы, сенильную хорею, сенильную деменцию с тельцами Леви, серонегативные артропатии, шок, серповидноклеточную анемию, отторжение аллотрансплантата кожи, поражения кожи, отторжение трансплантата тонкого кишечника, солидные опухоли, специфические аритмии, спинальную атаксию,



шоковое легкое, склерит, ишиас, вторичную недостаточность коры надпочечников, связанные с диоксидом кремния заболевания соединительной ткани, дерматоз Снеддона-Уилкинсона, анкилозирующий спондилит, синдром Стивенса-Джонсона (SJS), синдром системного воспалительного ответа, височный артериит, токсоплазмозный ретинит, синдром Лайелла, поперечный миелит, TRAPS (периодический синдром, ассоциированный с рецептором 1 типа фактора некроза опухоли (TNFR)), аллергическую реакцию типа 1, диабет типа 2, крапивницу, обычную интерстициальную пневмонию (UIP), васкулит, весенний конъюнктивит, вирусный ретинит, синдром Фогта-Коянаги-Харады (синдром VKN), влажную дегенерацию желтого пятна и заживление ран.

Композиции и способы, представленные в рамках изобретения, можно использовать для лечения боли у индивидуума, страдающего заболеванием, выбранным из группы, состоящей из первичных и метастазирующих злокачественных новообразований, включая карциномы молочной железы, толстого кишечника, прямой кишки, легкого, ротоглотки, гортаноглотки, пищевода, желудка, поджелудочной железы, печени, желчного пузыря и желчных протоков, тонкого кишечника, мочевыводящих путей (включая почки, мочевой пузырь и уретерий), женской половой системы (включая шейку матки, матку и яичники, а также хориокарциному и гестационную трофобластическую болезнь), мужской половой системы (включая предстательную железу, семенные пузырьки, яички и опухоли половых клеток), эндокринных желез (включая щитовидную железу, надпочечники и гипофиз) и кожи, а также гемангиомы, меланомы, саркомы (включая возникающие из костной ткани и мягких тканей, а также саркому Капоши), опухоли головного мозга, нервов, глаз и оболочек головного мозга (включая астроцитомы, глиомы, глиобластомы, ретинобластомы, невромы, нейробластомы, шванномы и менингиомы), солидные опухоли, возникающие из гематопозитических злокачественных новообразований, таких как лейкозы и лимфомы (ходжкинские и неходжкинские лимфомы).

Режимы дозирования можно корректировать для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического или профилактического ответа). Например, можно вводить один болюс, можно вводить несколько отдельных доз в течение периода времени или дозу можно пропорционально снижать или повышать, в зависимости от терапевтической ситуации. Особенно предпочтительно составлять парентеральные композиции в стандартной лекарственной форме для облегчения введения и однородности доз. В рамках изобретения стандартная лекарственная форма относится к физически отдельным единицам, подходящим в качестве однократных доз для подвергнутых лечению млекопитающих; каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения, вычисляемое для получения желаемого терапевтического эффекта, вместе с необходимым фармацевтическим носителем. Характеристика стандартных лекарственных форм по изобретению определяется и напрямую зависит от (а) уникальных характеристик связывающих белков, связывающихся с ИЛ-1 $\alpha$  и/или ИЛ-1 $\beta$ , и конкретного достигаемого терапевтического или профилактического эффекта, и (б) ограничений, свойственных области составления таких белков для лечения индивидуумов.

Например, неограничивающий диапазон терапевтически или профилактически эффективного количества связывающего белка, примененного в лечении остеоартрита или боли, составляет 0,1-20 мг/кг, более предпочтительно - 1-10 мг/кг. Следует отметить, что значения доз могут варьироваться в зависимости от типа и тяжести облегчаемого состояния. Также следует понимать, что для конкретного индивидуума конкретные режимы дозирования с течением времени необходимо корректировать в соответствии

с потребностями индивидуума и профессионального суждения специалиста, осуществляющего введение или руководящего введением композиций, и что диапазоны доз, приведенные в рамках изобретения, являются исключительно примерами и не предназначены для ограничения объема или практического осуществления заявленной композиции.

Специалистам в этой области будет понятно, что другие подходящие модификации и адаптации способов и композиций по изобретению, представленных в рамках изобретения, являются очевидными, и их можно осуществлять с использованием подходящих эквивалентов без отклонения от объема изобретения или вариантов осуществления, представленных в рамках изобретения. После подробного описания настоящего изобретения оно будет более понятным со ссылкой на следующие примеры, включенные исключительно в иллюстративных целях и не предназначенные для ограничения изобретения.

#### ПРИМЕРЫ

Пример 1. Получение иммуноглобулинового белка с двойным вариабельным доменом (DVD-Ig)

Молекулу иммуноглобулина с двойным вариабельным доменом (DVD-Ig) конструируют таким образом, что два различных вариабельных домена легких цепей (VL) из двух различных родительских mAb соединяют напрямую в тандем или через короткий линкер способами рекомбинантной ДНК, за которыми следует константный домен легкой цепи. Аналогично, тяжелая цепь содержит два различных вариабельных домена тяжелой цепи (VH), соединенных напрямую в тандем или через короткий линкер, за которыми следует константный домен CH1 и Fc-область. См. фигуру 1А. Описывают конструирование и получение связывающих белков DVD-Ig из родительских моноклональных антител, включая примеры связывающего белка DVD-Ig, связывающегося с ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$ , получаемые из родительского моноклонального антитела к ИЛ-1 $\alpha$  и родительского моноклонального антитела к ИЛ-1 $\beta$ . См., публикацию РСТ № WO 2007/024715 A2 и Wu et al., Nature Biotechnol., 25(11): 1290-1297 (2007), включенных в рамках изобретения в качестве ссылки. В рамках изобретения представлена характеристика выбранных моноклональных антител к ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  и их использование в качестве родительских моноклональных антител для получения молекул DVD-Ig, связывающихся и с ИЛ-1 $\alpha$ , и с ИЛ-1 $\beta$ . Молекулы DVD-Ig охарактеризовывали по возможной терапевтической активности с использованием известных моделей ревматоидного артрита и остеоартрита на животных.

Пример 1.1. Получение моноклональных антител мыши к ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$

Моноклональные антитела (mAb) к ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  получали следующим образом с использованием стандартной гибридомной технологии.

Пример 1.1.A. Иммунизация мышей

Очищенные рекомбинантные ИЛ-1 $\alpha$  человека и ИЛ-1 $\beta$  мыши (R&D Systems)

использовали в качестве иммуногенов, а также покрывающих антигенов в анализах титрованием и скрининге ELISA. Дозы для иммунизации находились в диапазоне от 5,0 до 20,0 мкг/мышь/инъекцию для всех антигенов для первичной и повторной иммунизации. Адъювант ImmunEasy приобретали в Qiagen (Waltham, MA) и использовали при соотношении адъювант/антиген 20 мл адъюванта ImmunEasy на 10,0 мкг антигена. Каждая группа подлежащих иммунизации животных включала пять нокаутных по ИЛ-1 $\alpha$  $\beta$  мышей, полученных от Dr. Yoichiro Iwakura (University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo, Japan). Мышей иммунизировали согласно описываемому ниже режиму дозирования. Клетки MRC-5 приобретали в ATCC (Manassas, VA) и использовали для биологического

анализа ИЛ-1. Наборы для ELISA ИЛ-8 человека и контрольные антитела мыши к hIL-1 $\alpha$  и к hIL-1 $\beta$  (MAB200 и MAB201) приобретали в R&D Systems (Minneapolis, MN).

В кратком изложении, смесь адъювант-антиген получали, сначала осторожно перемешивая адъювант в сосуде с использованием центрифуги типа вортекс. Желаемое количество адъюванта удаляли из сосуда и помещали в автоклавируемую микроцентрифужную пробирку 1,5 мл. Получали антиген в PBS или физиологическом растворе с концентрацией в диапазоне 0,5-1,0 мг/мл. Затем добавляли вычисляемое количество антигена в микроцентрифужную пробирку с адъювантом и смешивали раствор, осторожно пипетируя вверх и вниз 5 раз. Смесь адъювант-антиген инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут и затем снова смешивали, осторожно пипетируя вверх и вниз 5 раз. Раствор адъювант-антиген забирали в подходящий шприц для инъекции животному. Всего инъецировали 5-20 мкг антигена в объеме 50-100 мкл. Каждое животное иммунизировали и затем повторно иммунизировали от 2 до 3 раз в зависимости от титра. Животным с хорошими титрами вводили конечную повторную внутривенную инъекцию перед вливанием и получением гибридом.

#### Пример 1.1.В. Скрининг гибридом

Гибридомы, получаемые как описано выше, подвергали скринингу и определяли титр антител с использованием ELISA. Белковыми антигенами напрямую покрывали планшеты ELISA для определения специфичных антител с использованием стандартных способов ELISA. В кратком изложении, планшеты ELISA покрывали 100 мкл rhIL-1 $\alpha$  или rhIL-1 $\beta$  (1,0 мкг/мл в PBS) в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали 3 раза с использованием 250 мкл PBS/0,5% Tween20 и блокировали 200 мкл блокирующего буфера (2% BSA в PBS с 0,5% Tween 20). Разведенные сыворотки или супернатант гибридомы (100 мкл) добавляли в каждую лунку и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов. Затем планшеты промывали три раза PBS/0,5% Tween 20. Для определения использовали конъюгированный с HRP IgG козла против мыши и наблюдали OD при связывании при 450 нм. Клоны гибридом, продуцирующие антитела, демонстрирующие высокую активность специфичного связывания при ELISA, субклонировали и очищали, и охарактеризовывали аффинность (Biacore) и активность (MRC-5 биологический анализ) антител следующим образом.

#### Пример 1.1.С. Характеристика моноклональных антител мыши к ИЛ-1 $\alpha$ и ИЛ-1 $\beta$

Для характеристики антител, получаемых с помощью гибридом, как описано в примере 1.1.В. использовали следующие анализы.

##### 35 Пример 1.1.С.1. Поверхностный плазмонный резонанс

В реальном времени связывающие взаимодействия между антителом (антитело мыши к рекомбинантному mIL-1), фиксированным на матрице биосенсора с помощью IgG козла к мыши, и gmIL-1 измеряли с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием системы BIACore (Biacore AB, Uppsala, Sweden) по инструкциям производителя и стандартными способами. В кратком изложении, gmIL-1 разбавляли в подвижном буфере HBS (Biacore AB) и инъецировали аликвоты 50 мкл на иммобилизованные белковые матрицы при скорости потока 5 мл/минуту. Используемые концентрации rhIL-1 составляли 62,5, 125, 187,5, 250, 375, 500, 750, 1000, 1500 и 2000 нМ. Для определения константы диссоциации (скорости обратной реакции), константы ассоциации (скорости прямой реакции), использовали программное обеспечение для оценки кинетики BIACore (версии 3.1).

##### 45 Пример 1.1.С.2. Биологический анализ антител к ИЛ-1

Линия клеток MRC-5 представляет собой клеточную линию фибробластов легких

человека, продуцирующую ИЛ-8 в ответ на ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  человека дозозависимым образом (см., Dinarello, Muegge, и Durum (2000) Curr. Protocols Immunol. 6:1). Клетки MRC-5 культивировали в полной MEM с 10% FBS и выращивали при 37°C в инкубаторе при 5% CO<sub>2</sub>. Для определения нейтрализующих активностей моноклональных антител (mAb) к рекомбинантному ИЛ-1 $\alpha$  или ИЛ-1 $\beta$  человека различные концентрации (0-10 мкг/мл) mAb (50 мкл) добавляли в 96-луночный планшет и предварительно инкубировали с 50 мкл rhIL-1 $\alpha$  или rhIL-1 $\beta$  (10-50 пг/мл) в течение 1 часа при 37°C. Собирали супернатанты, разбавляли их и измеряли концентрации ИЛ-8 с помощью ELISA с использованием стандартного набора для ELISA ИЛ-8 (R&D Systems). Активность антитела определяли по его способности ингибировать продукцию ИЛ-8 клетками MRC-5.

На основе данных Viacore и биологического анализа MRC-5 определяли ряд антител мыши к hIL-1 $\alpha$  и к hIL-1 $\beta$  с высокой аффинностью и активностью, как показано в таблице 1 ниже:

Клон mAb №	Специфичность	KD (M)	IC <sub>50</sub> (M)
3D12.E3	hIL-1 $\alpha$	1,11 $\times 10^{-9}$	6,70 $\times 10^{-10}$
18F4.2C8	hIL-1 $\alpha$	5,78 $\times 10^{-10}$	8,90 $\times 10^{-11}$
6H3.1A4.3E11	hIL-1 $\alpha$	3,54 $\times 10^{-10}$	2,40 $\times 10^{-10}$
13F5.G5	hIL-1 $\beta$	2,91 $\times 10^{-10}$	6,00 $\times 10^{-10}$
1B12.4H4	hIL-1 $\beta$	2,13 $\times 10^{-10}$	5,30 $\times 10^{-10}$
6B12.4F6	hIL-1 $\beta$	5,54 $\times 10^{-10}$	3,20 $\times 10^{-10}$

Пример 1.1.D. Клонирование и секвенирование моноклональных антител (mAb) мыши к ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$

Клонирование и секвенирование генов варибельных областей тяжелой (VH) и легкой (VL) цепей всех mAb к ИЛ-1  $\alpha/\beta$  приведены в таблице 1 (выше) и получали дополнительные антитела после выделения и очистки тотальной РНК из каждой гибридомной клеточной линии с использованием реагента тризол (Invitrogen) по инструкциям производителя. Амплификацию генов VH и VL осуществляли с использованием олигонуклеотидов IgGVH и IgKVL из набора Mouse Ig-Primer Set (Novagen, Madison, WI) с использованием набора для RT-ПЦР в одной пробирке (Qiagen), как предложено производителем. Фрагменты ДНК, полученные при производственных амплификациях, клонировали в вектор pCR-TOPO (Invitrogen) по инструкциям производителя. Затем многочисленные клоны VH и VL секвенировали посредством дидезокси-способа терминации цепи с использованием секвенатора ABI 3000 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Последовательности всех генов VL и VH mAb представлены ниже в таблице 2.

Белок	Идентификационный номер последовательности	Последовательность
		12345678901234567890
VH 3D12.E3	SEQ ID NO:89	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFRNYG MNWVKQAPGKDLKRMWINTYTGESTYADDF KGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNEEDTATYFCA RGIYYYYSSYAMDYWGQGTSTVTVSS
vI 3D12.E3	SEQ ID NO:90	niqmtqtsslsaslgdrvüiscrasqdisnclnwyqqkpdgtvklliyts rlhsgvpsrfsfgsgsgtdysltisnleqediatyfcqgktpyafgggkkl einr

	VH 18F4.2C8	SEQ ID NO:91	evqlqqsgaelvkgasvklscasglnikdymhwlkqrpeqglewi gridpangnakydprflgkatitadtsntaylqlsllsdtavycargd gnfhfdywgqgttlvss
	VL 18F4.2C8	SEQ ID NO:92	divmtqsqrfmstsvgdrvsvtckasqnvgtniawyqqkpgqsprali ysasyrysgvprdfgsgsgtdflltismvqsvdlaeyfcqytrypltfgg gtkleikr
5	VH 6H3.1A4.3E11	SEQ ID NO:93	qvqlqqsgaelvrpgasvklscasgyfttywmnwvkqrpeqglew igrldpydsetlysqkfkdtailtvdkssstaymqllsllsedsavyycary gfdywgqgttlvss
	VL 6H3.1A4.3E11	SEQ ID NO:94	qivltqspalmsaspekvmtmcsasssvnymywyqqkprsspkpw iyltsnlasgvparfsgsgsgtsysltissmeaedaatyycqqwnsnpyt fgggtkleikr
10	VH 13F5.G5	SEQ ID NO:95	qvqlqqsgaelvrpgssvklscasgyafssywmnwvkqrpgqgle wigqiypgdgdtynngkfkgtatltadkssstsymqlsgltsedsamy fcvrfptgndyamydwgqgtsvtvss
	VL 13F5.G5	SEQ ID NO:96	nivltqspalmsavslgqratiserasesvdsyngsymhwyqqkpgqpp klliyasnlsgvparfsgsgsrtdflltidpveaddaatyycqnnedpf tfsggtkleikr
	VH 1B12.4H4	SEQ ID NO:97	qvhlkesgpglvapsqslsitctvsgfsltdygvsvwirppgkglewgl iwgggdyynsplksrlsirkdnksqvfllkmnslqtddtavycakqr tlwydygmdywgqgtsvtvss
15	VL 1B12.4H4	SEQ ID NO:98	ettvtqspalmsaigekvtricitstdidvdmnwyqqkpgpeppkllisq gntlrpgvpsrfsfsgsgtdfviienmlsdevadyyclqsdnlpltfag tkleikr
	VH 6B12.4F6	SEQ ID NO:99	evqlqqsgpelvtgtsvklscasgyfttygmhvwvrqshgkslewi gyiscyngfssynpkfkgkatftvdtssstayiqfsltsedsavyycarsd yygndywgqgttlvss
20	VL 6B12.4F6	SEQ ID NO:100	qivltqspalmsaspekvmtmcsasssvnymywyqqkpgqspklyw stsnlasgvparfsgsgsgtsysltvsvrmeaedaatyycqqrstyptfgg gtkleikr

**Пример 1.2. Получение и характеристика химерных антител мыши-человека**

Все описываемые выше mAb преобразовывали в химерные антитела (с константной областью человека) и экспрессировали, очищали и охарактеризовывали для подтверждения активности. Также антитела использовали в качестве контролей для последующего анализа связывающего белка DVD-Ig. Для преобразования 3D12.E3 в химерную форму 3D12.E3-VL амплифицировали с помощью ПЦР с использованием праймеров P1 и P2; при этом ген Ск человека (в векторе pBOS, полученном для внутреннего пользования, Abbott Bioresearch Center, Worcester, MA) амплифицировали с использованием праймеров P3 и P4. Обе реакции ПЦР осуществляли согласно стандартным способам ПЦР. Два продукта ПЦР выделяли из геля и использовали вместе в качестве перекрывающейся матрицы для последующей ПЦР с перекрыванием с использованием праймеров P1 и P4 с использованием стандартных условий ПЦР. Конечный продукт ПЦР химерную легкую цепь 3D12.E3-VL-hСк субклонировали в экспрессирующий вектор млекопитающих pEF6 ТОРО (Invitrogen) ТОРО-клонированием по инструкциям производителя. В таблице 3 представлены последовательности каждого из праймеров ПЦР, используемого в этом способе.

Таблица 3 Праймеры для ПЦР	
P1: 5' ATG GTG TCC ACA GCT CAG TTC C 3'	SEQ ID NO:101
P2: 5' GC AGC CAC CGT ACG CCG GTT TAT TTC CAG 3'	SEQ ID NO:102
P3: 5' CGT ACG GTG GCT GCA CCA TCT GTC 3'	SEQ ID NO:103
P4: 5' TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GC 3'	SEQ ID NO:104

Для преобразования тяжелой цепи 3D12.E3 в химерную форму 3D12.E3-VH амплифицировали с помощью ПЦР с использованием праймеров P5 и P6; при этом ген Сγ1 человека (в векторе pBOS, полученном для внутреннего пользования в ABC) амплифицировали с использованием праймеров P7 и P8. Обе реакции ПЦР осуществляли согласно стандартным способам ПЦР. Два продукта ПЦР выделяли из геля и использовали вместе в качестве перекрывающейся матрицы для последующей ПЦР с

перекрыванием с использованием праймеров P5 и P8 с использованием стандартных условий ПЦР. Конечный продукт ПЦР химерную легкую цепь 3D12.E3-VH-hC $\gamma$ 1 субклонировали в экспрессирующий вектор млекопитающих pcDNA3.1 TOPO (Invitrogen) по инструкциям производителя. В таблице 4 представлены последовательности каждого из праймеров ПЦР, используемых в этом способе.

Таблица 4 Праймеры для ПЦР	
P5: 5' ATG GCT TGG GTG TGG ACC TTG C 3'	SEQ ID NO:105
P6: 5' GGG CCC TTG GTC GAC GCT GAG GAG ACG GTG ACT GAG G 3'	SEQ ID NO:106
P7: 5' GCG TCG ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC C 3'	SEQ ID NO:107
P8: 5' TC ATT TAC CCG GAG ACA GGG AGA GGC 3'	SEQ ID NO:108

Аналогично, получали химерную 13F5.G5-VH-C $\gamma$ 1 с использованием праймеров P21/P22 (в случае VH) и P7/P8 (в случае hC $\gamma$ 1) и клонировали в вектор pcDNA3.1 TOPO, и получали химерную 13F5.G5-VL-Ск с использованием праймеров P23/P24 (в случае VL) и P3/P4 (в случае hСк) и клонировали в вектор pEF6 TOPO. В таблице 5 представлены последовательности каждого из праймеров для ПЦР, используемых в этом способе.

Таблица 5 Праймеры для ПЦР	
P21: 5' ATA GAA TGG AGC TGG GTT TTC CTC 3'	SEQ ID NO:109
P22: 5' GGG CCC TTG GTC GAC GC TGA GGA GAC GGT GAC TGA 3'	SEQ ID NO:110
P23: 5' ATG GTC CTC ATG TCC TTG CTG TTC 3'	SEQ ID NO:111
P24: 5' GC AGC CAC CGT ACG CCG TTT TAT TTC CAG CTT TG 3'	SEQ ID NO:112

Для экспрессии химерных антител 13F5.G5-VL-Ск и 13F5.G5-VH-C $\gamma$ 1 коэкспрессировали в клетках COS с использованием липофектамина (Invitrogen) в течение 72 часов, собирали среду и выделяли IgG с помощью хроматографии с протеином А. Аналогично, коэкспрессировали 13F5.G5-VL-Ск и 13F5.G5-VH-C $\gamma$ 1 в COS с использованием липофектамина (Invitrogen) в течение 72 часов, собирали среду и выделяли IgG с помощью хроматографии с протеином А. Оба очищенных химерных Аб охарактеризовывали с помощью Вiascore и биологического анализа MRC-5 для подтверждения активности. Результаты показали, что эти химерные Аб демонстрировали аффинность и активность, аналогичную таковым у исходных mAb мыши.

Пример 1.3. Конструирование, экспрессия и очистка молекулы иммуноглобулина с двойным варибельным доменом (DVD-Ig) к ИЛ-1 $\alpha/\beta$

Конструкция, используемая для получения связывающего белка DVD-Ig, способного связываться с hIL-1 $\alpha$  и hIL-1 $\beta$ , представлена на фигуре 1B. В кратком изложении, родительские mAb, включая два высокоаффинных антитела мыши, к hIL-1 $\alpha$  (клон 3D12.E3) и к hIL-1 $\beta$  (клон 13F5.G5), получали иммунизацией мышей Balb/c с использованием рекомбинантного белка ИЛ-1 $\alpha$  (rhIL-1 $\alpha$ ) и рекомбинантного белка ИЛ-1 $\beta$  (rhIL-1 $\beta$ ), соответственно. Гены VL/VH двух этих клонов гибридом выделяли с помощью RT-ПЦР с использованием набора Mouse Ig Primer (Novagen, Madison, WI). Гены VL/VH сначала преобразовывали в химерные антитела (с константными областями человека) для подтверждения активности. Для получения связывающего белка DVD1-Ig VH и VL 13F5.G5 напрямую подвергали слиянию с N-концом VH и VL 3D12.E3, соответственно (как показано на фигуре 1B). Связывающий белок DVD2-Ig конструировали аналогично, за тем исключением, что он содержит линкер между двумя варибельными доменами и в легкой цепи (последовательность линкера представляет собой ADAAP), и в тяжелой цепи (последовательность линкера представляет собой АКТПРР). Эти последовательности выбирали из последовательностей N-концов Ск и

СН1 мыши. Эти последовательности линкеров, выбранные из N-концов Ск и СН1 мыши, являются природным продолжением вариабельных доменов и имеют гибкую конформацию без значительных вторичных структур по результатам анализа нескольких структур кристаллов Fab. Подробно способы клонирования с помощью ПЦР описаны

5

ниже.  
 Пример 1.3.А. Молекулярное клонирование связывающего белка DVD1-Ig к hIL-1 $\alpha/\beta$  13F5.G5-VH амплифицировали с помощью ПЦР с использованием праймеров P21 и P25. 3D12.E3-VH-hC $\gamma$ 1 амплифицировали с использованием праймеров P14 и P8. Обе реакции ПЦР осуществляли согласно стандартным способам ПЦР. Два продукта ПЦР

10

15

Таблица 6 Праймеры для ПЦР	
P14: 5' cag atc cag ttg gtg cag tct gg3'	SEQ ID NO:113
P25: 5' CAC CAA CTG GAT CTG TGA GGA GAC GGT GAC TGA GG 3'	SEQ ID NO:114

20

Для получения легкой цепи DVD1-Ig к hIL-1 $\alpha/\beta$ , 13F5.G5-VL амплифицировали с помощью ПЦР с использованием праймеров P23 и P26; при этом 3D12.E3-VL-hCк амплифицировали с использованием праймеров P16 и P4. Обе реакции ПЦР осуществляли согласно стандартным способам ПЦР. Два продукта ПЦР выделяли из геля и использовали вместе в качестве перекрывающейся матрицы для последующей ПЦР с

25

30

Таблица 7 Праймеры для ПЦР	
P16: 5' AAT ATC CAG ATG ACA CAG ACT ACA TCC 3'	SEQ ID NO:115
P26: 5' GTGT CAT CTG GAT ATT CCG TTT TAT TTC CAG CTT TG 3'	SEQ ID NO:116

35

Пример 1.3.В. Молекулярное клонирование DVD2-Ig к hIL-1 $\alpha/\beta$  13F5.G5-VH амплифицировали с помощью ПЦР с использованием праймеров P21 и P17. 3D12.E3-VH-hC $\gamma$ 1 амплифицировали с использованием праймеров P18 и P8. Обе реакции ПЦР осуществляли согласно стандартным способам ПЦР. Два продукта ПЦР выделяли из геля и использовали вместе в качестве перекрывающейся матрицы для последующей ПЦР с перекрыванием с использованием праймеров P21 и P8 с использованием стандартных условий ПЦР. Конечный продукт ПЦР тяжелую цепь DVD2-Ig к hIL-1 $\alpha/\beta$  DVD2-VH-hC $\gamma$ 1, субклонировали в экспрессирующий вектор млекопитающих pcDNA3.1 TOPO (Invitrogen) по инструкциям производителя. В таблице 8 представлены последовательности каждого из праймеров для ПЦР, используемых в этом способе.

40

45

Таблица 8 Праймеры для ПЦР	
P17: 5' tgg ggg tgt cgt ttt ggc tga gg 3'	SEQ ID NO:117
P18: 5' GCC AAA ACG ACA CCC CCA CAG ATC CAG TTG GTG CAG 3'	SEQ ID NO:118

Для получения легкой цепи DVD2-Ig к hIL-1 $\alpha$ / $\beta$ , 13F5.G5-VL амплифицировали с помощью ПЦР с использованием праймеров P23 и P19. 3D12.E3-VL-hC $\kappa$  амплифицировали с использованием праймеров P20 и P4. Обе реакции ПЦР осуществляли согласно стандартным способам ПЦР. Два продукта ПЦР выделяли из геля и использовали вместе в качестве перекрывающейся матрицы для последующей ПЦР с перекрыванием с использованием праймеров P23 и P4 с использованием стандартных условий ПЦР. Конечный продукт ПЦР легкую цепь DVD2-Ig к hIL-1 $\alpha$ / $\beta$  hIL-1 $\alpha$ / $\beta$ DVD2-VL-hC $\kappa$  субклонировали в экспрессирующий вектор млекопитающих pEF6 TOPO (Invitrogen) по инструкциям производителя. В таблице 9 представлены последовательности каждого из праймеров для ПЦР, используемых в этом способе.

Таблица 9 Праймеры для ПЦР	
P19: 5' TGG TGC AGC ATC AGC CCG TTT TAT TTC 3'	SEQ ID NO:119
P20: 5' GCT GAT GCT GCA CCA AAT ATC CAG ATG ACA CAG 3'	SEQ ID NO:120

Конечные последовательности hIL-1 $\alpha$ / $\beta$ DVD1-Ig и hIL-1 $\alpha$ / $\beta$ DVD2-Ig описывают в таблице 10.

Таблица 10 Аминокислотная последовательность связывающего белка DVD1-Ig к hIL-1 $\alpha$ / $\beta$ и DVD2-Ig к hIL-1 $\alpha$ / $\beta$		
Белок	Идентификатор последовательности	Последовательность
Область белка		12345678901234567890
Вариабельная область тяжелой цепи DVD-Ig hIL-1 $\alpha$ / $\beta$ DVD1-Ig	SEQ ID NO:121	QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPQGQLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGKATLTDKSSSTSYMQLSGLTSEDSAMYFCVRFPTGNDYYAMYWGQGTSTVTVSSQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFRNYGMNWKVQAPGKDLKRMWINTYTGESTYADDFKGRFAFSLSEASTAYLQINNLKNEATATYFCARGIYYGSSYAMDYWGQGTSTVTVSS
VH 13F5.G5	SEQ ID NO:95	QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPQGQLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGKATLTDKSSSTSYMQLSGLTSEDSAMYFCVRFPTGNDYYAMYWGQGTSTVTVSS
Линкер		NONE
3D12.E3 VH	SEQ ID NO:89	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFRNYGMNWKVQAPGKDLKRMWINTYTGESTYADDFKGRFAFSLSEASTAYLQINNLKNEATATYFCARGIYYGSSYAMDYWGQGTSTVTVSS
CH	SEQ ID NO:122	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLSPGK
Вариабельная область легкой цепи DVD-Ig hIL-1 $\alpha$ / $\beta$ DVD1-Ig	SEQ ID NO:123	NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASEVDSYGNYSYHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESQVPAFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNNEPFTFGSGTKLEIKRNIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNCLNWKYQQKPDGTVKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGKTLPAFGGGTKLEINRR
13F5.G5 VI	SEQ ID NO:96	NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASEVDSYGNYSYHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESQVPAFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNNEPFTFGSGTKLEIKR
Линкер		NONE
3D12.E3 VI	SEQ ID NO:90	NIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNCLNWKYQQKPDGTVKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGKTLPAFGGGTKLEINRR
CL	SEQ ID NO:124	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Вариабельная область тяжелой цепи DVD-Ig hIL-1 $\alpha$ / $\beta$ DVD2-Ig	SEQ ID NO:125	QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPQGQLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGKATLTDKSSSTSYMQLSGLTSEDSAMYFCVRFPTGNDYYAMYWGQGTSTVTVSSQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFRNYGMNWKVQAPGKDLKRMWINTYTGESTYADDFKGRFAFSLSEASTAYLQINNLKNEATATYFCARGIYYGSSYAMDYWGQGTSTVTVSS

			DKSSSTSYMQLSGLTSEDSAMYFCVRFPTGNDYYAM DYWGQTSVTVSSAKTTPPQIQLVQSGPELKKPGETV KISCKASGYTFRNYGMNWVKQAPGKDLKRMWINT YTGESTYADDFKGRFAFSLTASASTAYLQINNKNED TATYFCARGIYYGSSYAMDYWGQTSVTVSS
5	13F5.G5 VH	SEQ ID NO:95	QVQLQQSGAELVVRPSSVKISCKASGYAFSSYWMNW VKQRPQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGKATLTA DKSSSTSYMQLSGLTSEDSAMYFCVRFPTGNDYYAM DYWGQTSVTVSS
	Линкер	SEQ ID NO:75	AKTTPP
10	3D12.E3 VH	SEQ ID NO:89	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFRNYGMNW VKQAPGKDLKRMWINTYTGESTYADDFKGRFAFSL ETSASTAYLQINNKNEDTATYFCARGIYYGSSYAM DYWGQTSVTVSS
15	CH	SEQ ID NO:122	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTFLHQQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTI KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
20	Вариабельная область легкой цепи DVD-Ig hIL-1 $\alpha$ / $\beta$ DVD2-Ig	SEQ ID NO:126	NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASEVDSYGNSYM HWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSRD FTLTIDPVEADDAATYYCQQNEDPFTFGSGTKLEIK RADAAPNIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNC LNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGT DYSLTISNLEQEDIATYFCQQGKTLPYAFGGGKLEINR
	13F5.G5 VI	SEQ ID NO:96	NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASEVDSYGNSYM HWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSRD FTLTIDPVEADDAATYYCQQNEDPFTFGSGTKLEIKR
	Линкер	SEQ ID NO:69	ADAAP
25	3D12.E3 VI	SEQ ID NO:90	NIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNCLNWYQ KQPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTI SNLEQEDIATYFCQQGKTLPYAFGGGKLEINR
	CL	SEQ ID NO:124	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Пример 1.3.C. Экспрессия и очистка связывающего белка DVD1-Ig к hIL- $\alpha$ / $\beta$

Тяжелую и легкую цепь каждой конструкции субклонировали в векторы pcDNA3.1  
 30 TOPO и pEF6 TOPO (Invitrogen Inc.), соответственно, и секвенировали для обеспечения  
 точности. Плазмиды, кодирующие тяжелые и легкие цепи каждой конструкции  
 транзиторно экспрессировали с использованием реагентов липофектамина 2000 и  
 293fectin, соответственно, в клетках COS, а также эмбриональных клетках почки  
 человека 293 (American Type Culture Collection, Manassas, VA). Среды для культивирования  
 35 клеток собирали через 72 часа после транзиторной трансфекции и очищали антитела  
 с использованием хроматографии с протеином А (Pierce, Rockford, IL) по инструкциям  
 производителя. Антитела анализировали с помощью SDS-PAGE и количественно  
 анализировали с помощью A280 и BCA (Pierce, Rockford, IL). В таблице 11 показано,  
 что уровни экспрессии DVD1-Ig к hIL-1 $\alpha$ / $\beta$  и DVD2-Ig к hIL-1 $\alpha$ / $\beta$  сравнимы с таковыми  
 40 для химерных антител, свидетельствуя о том, что связывающий белок DVD-Ig можно  
 эффективно экспрессировать в клетках млекопитающих.

	Уровень экспрессии (нг/мл)		Молекулярная масса (Дальтоны)		
	COS	Freestyle 293	Легкая цепь	Тяжелая цепь	Полноразмерный
Отрицательный контроль	0	0			
3D12.E3-Ch	2788	3886	23696	49914	147220
13F5.G5-Ch	3260	3562	24084	49518	147204
DVD1-Ig	2988	3300	35797 (35790)	64380 (64371)	200346 (200521)

DVD2-Ig	2433	3486	36222 (36220)	64976 (64973)	202354 (202573)
Молекулярную массу легкой цепи, тяжелой цепи и полноразмерного связывающего белка DVD1-Ig и связывающего белка DVD2-Ig определяли экспериментально с помощью масс-спектрометрии, как показано в скобках.					

#### Пример 1.4. Масс-спектрометрия и анализ SEC связывающего белка DVD-Ig к hIL- $\alpha/\beta$

Для измерения молекулярной массы (MW) легких и тяжелых цепей связывающего белка DVD-Ig 10 мкл молекулы DVD-Ig (0,8 мкг/мкл) восстанавливали раствором 1,0 M DTT (5 мкл). Белковую колонку PLRP-S, 8мк, 4000Å, и 1×150 мм (Michrom BioResource, Auburn, MA) использовали для разделения тяжелых и легких цепей молекулы DVD-Ig. Систему для капиллярной ВЭЖХ Agilent HP1100 (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA) использовали с масс-спектрометром QSTAR (Applied Biosystems, Foster City, CA). Клапан Valco устанавливали на 10 минут для переключения потока со стока на MS для высаливания образца. Буфер А представлял собой 0,02% TFA, 0,08% FA, 0,1% ACN и 99,8% H<sub>2</sub>O для ВЭЖХ. Буфер В содержал 0,02% TFA, 0,08% FA, 0,1% H<sub>2</sub>O для ВЭЖХ и 99,8% ACN. Скорость потока при ВЭЖХ составляла 50 мкл/минут, и объем инъекции образца составлял 8,0 мл. Температуру колонного термостата устанавливали на 60°C, и градиент разделения составлял: 5%B в течение 5 минут; от 5%B до 65%B в течение 35 минут; от 65%B до 95%B в течение других 5 минут, и от 95%B до 5%B в течение 5 минут. Осуществляли сканирование TOFMS от 800 до 2500 а.е.м при 3600 циклах. Для определения MW полноразмерного связывающего белка DVD-Ig использовали картридж Protein MicroTrap (Michrom BioResource, Auburn, MA) для высаливания образца. Градиент ВЭЖХ составлял: 5%B в течение 5 минут; от 5%B до 95%B в течение 1 минуты; и от 95%B до 5%B в течение других 4 минут. Осуществляли сканирование QSTAR TOFMS от 2000 до 3500 а.е.м при 899 циклах. Все исходные данные MS анализировали с использованием программного обеспечения Analyst QS (Applied Biosystems). Для анализа SEC связывающего белка DVD-Ig очищенный связывающий белок DVD-Ig и химерные Ab в PBS наносили на колонку Superose 6 10/300 G2, 300×10 мм (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ). Инструмент для ВЭЖХ модели 10A (Shimadzu, Columbia, MD) использовали для SEC. Все белки определяли с использованием УФ-детекции при 280 нм и 214 нм. Элюция являлась изократической при скорости потока 0,5 мл/минуту. Для использования стабильности образцы в диапазоне концентраций 0,2-0,4 мг/мл в PBS подвергали 3 циклам замораживания-оттаивания при температуре от -80°C до 25°C, или инкубировали при 4°C, 25°C или 40°C в течение 4 недель и 8 недель с последующим анализом SEC.

Связывающий белок DVD-Ig и химерные антитела очищали с помощью хроматографии с протеином А. Выход при очистке (3-5 мг/л) соответствовал количественному анализу hIgG в среде для экспрессии для каждого белка. Композицию и чистоту очищенных связывающих белков DVD-Ig и химерных антител анализировали с помощью SDS-PAGE в восстановительных и невосстановительных условиях. В невосстановительных условиях каждый из четырех белков мигрировал в виде одной полосы. Белки DVD-Ig демонстрировали большую молекулярную массу, чем химерные антитела, как и ожидали. В невосстановительных условиях каждый из четырех белков приводил к образованию двух полос - одной тяжелой цепи и одной легкой цепи. Снова, тяжелые и легкие цепи связывающих белков DVD-Ig являлись большими по размеру, чем химерные антитела. SDS-PAGE показал, что каждый связывающий белок DVD-Ig экспрессируется в виде единой молекулы, и тяжелые и легкие цепи эффективно соединяются попарно с образованием IgG-подобной молекулы. Размеры тяжелых и легких цепей, а также полноразмерный белок из двух молекул DVD-Ig соответствовал

их молекулярной массе, вычисляемой на основании аминокислотных последовательностей (см. таблицу 11).

Для определения точной молекулярной массы связывающих белков DVD-Ig использовали масс-спектрометрию. Как показано в таблице 1, определенная экспериментально молекулярная масса каждого связывающего белка DVD-Ig, включая легкую цепь, тяжелую цепь и полноразмерный белок, хорошо согласуется с прогнозируемым значением. Для дальнейшего исследования физических свойств связывающего белка DVD-Ig в растворе использовали эксклюзионную хроматографию (SEC) для анализа каждого белка. И химерные Ab, и связывающий белок DVD2-Ig демонстрировали один пик, что свидетельствует о физической гомогенности в виде мономерных белков. Химерное Ab 3D12.E3 демонстрировало меньший физический размер, чем химерное Ab 13F5.G5, что свидетельствует о том, что химерное Ab 3D12.E3 принимает более компактную глобулярную форму. Связывающий белок DVD1-Ig демонстрировал основной пик, а также плечевой пик справа, позволяя предполагать, что часть связывающего белка DVD1-Ig возможно находится в агрегированной форме в условиях конкретного буфера.

Пример 1.5: Анализ стабильности In Vitro связывающих белков DVD-Ig к hIL-1 $\alpha/\beta$

Физическую стабильность DVD-Ig тестировали следующим образом. Очищенные антитела в диапазоне концентрации 0,2-0,4 мг/мл в PBS подвергали 3 циклам замораживания-оттаивания при температуре от -80°C до 25°C или инкубировали при 4°C, 25°C или 40°C в течение 4 недель и 8 недель с последующим анализом с использованием эксклюзионной хроматографии (SEC) (см. таблицу 12).

Таблица 12  
Анализ стабильности in vitro DVD-Ig к hIL-1 $\alpha/\beta$  с использованием SEC

	3D12.E3-Ch			13F5.G5-Ch			DVD1-Ig			DVD2-Ig		
	Agg	Ab	Frgm	Agg	Ab	Frgm	Agg	Ab	Frgm	Agg	Ab	Frgm
3x Freeze-Thaw	1,72	98,28	0,00	13,0	87,0	0,0	46,50	53,50	0,00	0,0	100,0	0,0
4°C @ 4 Wks	0,85	99,15	0,00	4,2	95,8	0,0	42,43	56,63	0,94	0,0	100,0	0,0
25°C @ 4 Wks	1,29	98,71	0,00	0,0	100,0	0,0	45,66	54,34	0,00	0,0	100,0	0,0
40°C @ 4 Wks	1,65	98,35	0,00	20,3	78,1	1,6	36,70	59,42	3,88	0,0	100,0	0,0
4°C @ 8 Wks	5,35	90,33	4,32	2,2	97,8	0,0	38,18	56,91	4,91	0,0	100,0	0,0
25°C @ 8 Wks	1,11	60,55	38,34	1,4	97,5	1,0	24,42	67,39	8,19	0,0	100,0	0,0
40°C @ 8 Wks	4,74	81,47	13,79	34,6	65,4	0,0	20,55	67,16	12,29	0,0	100,0	0,0

Степень агрегации и фрагментации представлены в процентных долях, в то время как процентные доли Ab представляют интактную молекулу.  
Agg: агрегаты;  
Ab: интактное антитело;  
Frgm: фрагменты.

Оба химерных антитела демонстрировали незначительные степени агрегации и фрагментации, нормальной для упорядоченной молекулы IgG. Связывающий белок DVD1-Ig демонстрировал некоторую агрегацию при SEC после очистки. При анализе стабильности связывающий белок DVD1-Ig также демонстрировал агрегацию в PBS в различных условиях; однако, процентная доля агрегированной формы связывающего белка DVD1-Ig не повышалась при длительном хранении или при более высоких температурах. Процентная доля фрагментированной формы связывающего белка DVD1-Ig находилась в нормальном диапазоне, аналогично химерному Ab 3D12.E3. Наоборот, связывающий белок DVD2-Ig демонстрировал исключительную стабильность.

В случае связывающего белка DVD2-Ig не определяли ни агрегацию, ни фрагментацию во всех тестируемых условиях, и 100 % связывающего белка DVD2-Ig сохранялось в виде интактной мономерной молекулы.

Пример 1.6. Определение аффинности связывания антигена связывающими белками DVD-Ig к rhIL-1 $\alpha/\beta$

Кинетику связывания молекул DVD-Ig с rhIL1- $\alpha$  и rhIL1- $\beta$  определяли с помощью измерений на основе поверхностного плазмонного резонанса на инструменте Biacore 3000 (Biacore AB, Uppsala, Sweden) с использованием HBS-EP (10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА и 0,005% поверхностно-активного вещества P20) при 25°C. Все химические вещества получали от Biacore AB (Uppsala, Sweden) или в ином случае из различных источников, представленных в рамках изобретения. Приблизительно, 5000 RU Fc $\gamma$ -фрагмента специфичного поликлонального антитела козла против IgG человека (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL), разбавленного 10 mM ацетата натрия, (pH 4,5) напрямую иммобилизовывали на исследовательском биосенсорном чипе CM5 с использованием стандартного набора для присоединения по аминокгруппе по инструкциям и способам производителя при 25 мг/мл. Непрореагировавшие молекулы на поверхности биосенсора блокировали этаноламином. Модифицированную карбоксиметилдекстраном поверхность в проточных кюветах 2 и 4 использовали в качестве реакционной поверхности. Немодифицированный карбоксиметилдекстран без антител козла против IgG человека в проточных кюветах 1 и 3 использовали в качестве референсной поверхности. Для кинетического анализа уравнения скорости, полученные из модели связывания Ленгмюра 1:1, аппроксимировали одновременно для фаз ассоциации и диссоциации для всех десяти инъекций (с использованием анализа глобальной аппроксимации) с использованием программного обеспечения Bioevaluation 4.0.1. Очищенные образцы DVD-Ig разбавляли в HEPES-забуференном физиологическом растворе для захвата на покрытых антителами козла к Fc IgG человека специфичных реакционных поверхностях и инъецировали на реакционные матрицы при скорости потока 5 мл/минуту. Константы скорости ассоциации и диссоциации  $k_{on}$  ( $M^{-1}s^{-1}$ ) и  $k_{off}$  ( $s^{-1}$ ) определяли при постоянной скорости потока 25 мл/минуту. Константы скорости получали с помощью измерений кинетики связывания при десяти различных концентрациях антигена в диапазоне от 1,25 до 1000 нМ. Затем равновесную константу диссоциации (M) реакции между молекулой DVD-Ig и rhIL1 $\alpha/\beta$  вычисляли из кинетических констант скорости по следующей формуле:  $KD = k_{off}/k_{on}$ . Также одновременно аликвоты образцов rhIL1 $\alpha/\beta$  инъецировали на пустую референсную поверхность и реакционную поверхность CM для записи и вычитания любого фонового неспецифического связывания для устранения преобладания изменения показателя преломления и шумового сигнала при инъекции. Поверхности восстанавливали с помощью двух последовательных инъекций 25 мл 10 mM глицина (pH 1,5) при скорости потока 5 мл/минуту. Поверхности с иммобилизованным антителом к Fc полностью восстанавливали и они сохраняли свою полную способность к захвату в течение двадцати циклов. Кажущийся показатель стехиометрии фиксированного комплекса DVD-Ig-rhIL1 $\alpha/\beta$  вычисляли в насыщающих условиях связывания (устойчивом равновесии) с использованием следующей формулы:

Показатель стехиометрии	=	Ответ rhIL-1 $\alpha/\beta$ (RU)	×	DVD-Ig (MW)
		Ответ DVD (RU)		rhIL1 $\alpha/\beta$ (MW)

Определенные с помощью анализа Biacore химерные антитела обладали кинетикой связывания и аффинностями к ИЛ-1, аналогичными исходным гибридным

моноклональным антителам, что свидетельствует о том, что выделяли правильные последовательности VL/VH (таблица 13). Общие параметры связывания с hIL-1 $\alpha$  для двух связывающих белков DVD-Ig являлись схожими, при этом аффинности связывающих белков DVD-Ig составляли только в 2-3 раза меньше, чем для химерного антитела 3D12.E3. Аффинность связывания с hIL-1 $\beta$  для связывающего белка DVD2-Ig составляла немногим менее чем для химерного антитела 13F5.G5, но в 3 раза выше, чем для связывающего белка DVD1-Ig. Аффинность двух связывающих белков DVD-Ig к hIL-1 по сравнению с аффинностью химерных антител к hIL-1 являлась схожей, на что указывает оценка стехиометрии взаимодействия с ИЛ-1. Оба химерных антитела, являясь бивалентными моноспецифичными, связывались с ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  при анализе Viacore с показателем стехиометрии 1,6 и 1,7, соответственно. Это характерно для IgG по причине межмолекулярных помех, когда антитела плотно иммобилизуют на биосенсорном чипе Viacore, что приводит к показателю стехиометрии в диапазоне от 1,5 до 2,0. Показатели стехиометрии обоих связывающих белков DVD-Ig для hIL-1 $\alpha$  и hIL-1 $\beta$  являлись схожими с таковыми для двух химерных антител, что свидетельствует о том, что оба связывающих белка DVD-Ig обладали бивалентной способностью к связыванию каждого антигена.

Таблица 13  
Функциональная характеристика связывающихся с ИЛ-1 белков

Связывающий ИЛ-1 белок	Антиген	$k_{on}$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$k_{off}$ ( $s^{-1}$ )	$K_d$ (M)	Показатель стехиометрии	Активность IC <sub>50</sub> (M)
3D13.E3	hIL-1 $\alpha$	$6,43 \times 10^{+5}$	$7,13 \times 10^{-4}$	$1,11 \times 10^{-9}$	2,0	$6,70 \times 10^{-10}$
3D12.E3-Ch	hIL-1 $\alpha$	$4,12 \times 10^{+5}$	$5,52 \times 10^{-4}$	$1,34 \times 10^{-9}$	1,6	$7,00 \times 10^{-10}$
DVD1-Ig	hIL-1 $\alpha$	$3,70 \times 10^{+4}$	$1,05 \times 10^{-4}$	$2,83 \times 10^{-9}$	1,8	$2,30 \times 10^{-9}$
DVD2-Ig	hIL-1 $\alpha$	$7,35 \times 10^{+4}$	$2,52 \times 10^{-4}$	$3,42 \times 10^{-9}$	2,0	$2,90 \times 10^{-9}$
13F5.G5	hIL-1 $\beta$	$2,13 \times 10^{+6}$	$6,21 \times 10^{-4}$	$2,91 \times 10^{-10}$	1,8	$6,00 \times 10^{-10}$
13F5.G5-Ch	hIL-1 $\beta$	$1,41 \times 10^{+6}$	$6,54 \times 10^{-4}$	$4,62 \times 10^{-10}$	1,7	$5,30 \times 10^{-10}$
DVD1-Ig	hIL-1 $\beta$	$6,09 \times 10^{+5}$	$1,59 \times 10^{-3}$	$2,60 \times 10^{-9}$	1,5	$3,10 \times 10^{-9}$
DVD2-Ig	hIL-1 $\beta$	$1,19 \times 10^{+6}$	$9,50 \times 10^{-4}$	$7,98 \times 10^{-10}$	1,8	$1,60 \times 10^{-9}$

Аффинность и показатель стехиометрии измеряли с помощью Viacore; активность (IC<sub>50</sub>) определяли с помощью биологического анализа MRC-5; Ch = химерное антитело

Кроме того, связывание антигена тетравалентным связывающим белком DVD-Ig с двойной специфичностью также анализировали с помощью Viacore (Таблица 14). Связывающий белок DVD-Ig сначала фиксировали с помощью антитела козла к Fc человека на биосенсорном чипе Viacore, инъецировали первый антиген и наблюдали сигнал связывания. Связывающий белок DVD-Ig насыщали первым антигеном, затем инъецировали второй антиген и наблюдали второй сигнал. Этого достигали, сначала инъецируя ИЛ-1 $\beta$ , затем ИЛ-1 $\alpha$ , или сначала инъецируя ИЛ-1 $\alpha$ , а затем ИЛ-1 $\beta$  в случае связывающего белка DVD2-Ig. В любом случае определяли активность двойного связывания. Аналогичные результаты получали для связывающего белка DVD1-Ig. Таким образом, каждый связывающий белок DVD-Ig способен связываться с обоими антигенами одновременно, как тетравалентная молекула с двойной специфичностью. Как показано в таблице 14, показатель стехиометрии для обоих связывающих белков DVD-Ig к первому антигену, hIL-1 $\alpha$  или hIL-1 $\beta$ , составлял более 1,5, аналогично показателю для моноспецифичного бивалентного связывания. После инъекции второго антигена, в то время как связывающий белок DVD-Ig занимал первый антиген, показатель стехиометрии обоих связывающих белков DVD-Ig ко второму антигену (т.е. hIL-1 $\alpha$  или hIL-1 $\beta$ ) составлял от 1,0 до 1,3. Таким образом, связывающий белок DVD-

Ig способен связываться с двумя молекулами ИЛ-1 $\alpha$  и двумя молекулами ИЛ-1 $\beta$ . Связывающий белок DVD-Ig сначала фиксировали с помощью антитела козла к Fc человека на биосенсорном чипе Viacore, инъецировали первый антиген и наблюдали сигнал связывания, а затем инъецировали второй антиген.

5

Таблица 14 Стехиометрический анализ связывающего белка DVD-Ig к hIL-1 $\alpha/\beta$ в тетравалентном связывании с двойной специфичностью с ИЛ-1 $\alpha/\beta$				
Единица ответа			Показатель стехиометрии	
Фиксированный связывающий белок	1-й антиген	2-й антиген	hIL-1 $\alpha$ :DVD-Ig	hIL-1 $\beta$ :DVD-Ig
DVD1-Ig: 932	hIL-1 $\alpha$ : 190	hIL-1 $\beta$ : 75	2,3	1,0
DVD1-Ig: 1092	hIL-1 $\beta$ : 141	hIL-1 $\alpha$ : 107	1,1	1,5
DVD2-Ig: 1324	hIL-1 $\alpha$ : 209	hIL-1 $\beta$ : 137	1,8	1,3
DVD2-Ig: 1184	hIL-1 $\beta$ : 159	hIL-1 $\alpha$ : 131	1,2	1,6

10

#### Пример 1.7. Определение функциональной гомогенности молекул DVD-Ig

15

Т.к. связывающий белок DVD2-Ig очищали с помощью хроматографии с протеином А вместо мишень-специфичной аффинной хроматографии, любые потенциально неправильно свернутые и/или несовпадающие домены VL/VH, если присутствуют, можно оценивать с помощью исследования связывания с двумя различными антигенами. Такой анализ связывания осуществляли с помощью эксклюзионной жидкостной хроматографии (SEC). Связывающий белок DVD2-Ig в отдельности или после 120-минутного периода инкубации при 37°C с ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  или с ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  в равном молярном соотношении наносили на колонку. Каждый из антигенов также отдельно пропускали через колонку в качестве контроля. Результаты SEC показали, что связывающий белок DVD2-Ig способен связываться с ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  в растворе, и такое связывание приводило к сдвигу сигнала при SEC, свидетельствуя о повышении динамического размера связывающего белка DVD2-Ig, когда он находится в комплексе с любым антигеном. Сдвиг сигнала связывающего белка DVD2-Ig составлял 100%, т.е. он не являлся частичным, что позволяет предполагать, что молекулы DVD2-Ig способны связываться с антигеном. В присутствии и ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  наблюдали дополнительный и полный сдвиг сигнала связывающего белка DVD2-Ig, свидетельствующий о том, что все молекулы DVD2-Ig способны связываться с обоими антигенами единообразно. Этот эксперимент показал, что связывающий белок DVD-Ig экспрессировался как функционально гомогенный белок. Это имеет важные последствия, т.к. показывает, что связывающий белок DVD-Ig можно получать как единую гомогенную функциональную молекулу, отличающуюся от описываемых ранее биспецифичных, полиспецифических и поливалентных иммуноглобулино-подобных молекул и молекул на основе иммуноглобулинов.

20

25

30

35

#### Пример 1.8. Определение биологической активности связывающих белков DVD-Ig

40

Биологическую активность DVD-Ig измеряли с использованием биологического анализа MRC-5. Линия клеток MRC-5 является линией клеток фибробластов легкого человека, продуцирующих ИЛ-8 в ответ на ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  человека дозозависимым образом. Клетки MRC-5 получали из АТСС и культивировали в полной MEM с 10% FBS при 37°C в инкубаторе при 5% CO<sub>2</sub>. Для определения нейтрализующей активности DVD-Ig против ИЛ-1 $\alpha$  или ИЛ-1 $\beta$  человека 50 мкл антитела (от 1 $\times$ 10<sup>-7</sup> до 1 $\times$ 10<sup>-12</sup> М) в MEM/10%FBS добавляли в 96-луночный планшет и предварительно инкубировали с 50 мкл hIL-1 $\alpha$  или hIL-1 $\beta$  (200 пг/мл) в течение 1 часа при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Затем во все лунки добавляли клетки MRC-5 в концентрации 1 $\times$ 10<sup>5</sup>/мл (100 мкл) и инкубировали планшеты

45

в течение ночи при 37°C в инкубаторе при 5% CO<sub>2</sub>. Собирали супернатанты и измеряли продукцию ИЛ-8 человека с помощью стандартной ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN). Нейтрализующую активность связывающего белка DVD-Ig определяли по его способности ингибировать продукцию ИЛ-8.

5 Как представлено в таблице 13, оба связывающих белка DVD-Ig способны нейтрализовать hIL-1 $\alpha$  и hIL-1 $\beta$ . В соответствии с аффинностью связывания с hIL-1 $\alpha$ , нейтрализующие активности связывающего белка DVD1-Ig и связывающего белка DVD2-Ig к hIL-1 $\alpha$  также являлись схожими, т.е. в 3 раза меньше, чем у химерных антител (см. таблицу 13). В соответствии со своей аффинностью связывания с hIL-1 $\beta$ ,  
10 нейтрализующая активность связывающего белка DVD2-Ig к hIL-1 $\beta$  являлась немного меньшей, чем у химерного Ab 13F5.G5, но в 3 раза выше, чем у связывающего белка DVD1-Ig. В целом, не наблюдали значимого снижения биологических активностей молекул DVD-Ig по сравнению с исходными моноклональными антителами.

Для определения того, способен ли связывающий белок DVD-Ig ингибировать  
15 продукцию ИЛ-8 в присутствии ИЛ-1 $\alpha$ , и ИЛ-1 $\beta$ , равные количества hIL-1 $\alpha$  и hIL-1 $\beta$  добавляли в одну и ту же систему культивирования анализа MRC-5. И связывающий белок DVD1-Ig, и связывающий белок DVD2-Ig способны ингибировать синтез ИЛ-8 клетками MRC-5 в присутствии ИЛ-1 $\alpha$ , и ИЛ-1 $\beta$ , с активностями, аналогичными  
20 таковым в моно-анализах, в которых присутствовал только один цитокин (таблица 13). В этом анализе, где присутствовали ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$ , активность двойного ингибирования связывающим белком DVD2-Ig (1,2 нМ) являлась более высокой, чем у связывающего белка DVD1-Ig (2,2 нМ).

Пример 2. Анализ размера линкера и ориентации вариабельного домена в связывающих белках DVD-Ig

25 Конструировали дополнительные молекулы DVD-Ig с различными парами родительских mAb, как представлено в таблице 15. Для каждой пары mAb получали четыре различных конструкции DVD-Ig: 2 с коротким линкером и 2 с длинным линкером, каждую с двумя различными ориентациями доменов: a-b-C (альфа-бета-константный домен) и b-a-C (бета-альфа-константный домен). Последовательности линкера получали  
30 из N-концевой последовательности домена C $\kappa$  или CH1 человека следующим образом: короткий линкер: легкая цепь: TVAAP (SEQ ID NO: 71); тяжелая цепь: ASTKGP (SEQ ID NO: 79); и длинный линкер: легкая цепь: TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 72); тяжелая цепь: ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 80).

35 Все конструкции тяжелой и легкой цепи субклонировали в экспрессирующий вектор pBOS и экспрессировали в клетках COS или клетках Freestyle 293.

Для конструирования новых клонов DVD-Ig вариабельные домены двух mAb и легкой цепи, и тяжелой цепи сначала соединяли в тандем с использованием ПЦР с  
40 перекрыванием, как описано для DVD1-Ig к hIL-1 $\alpha/\beta$  и DVD2-Ig к hIL-1 $\alpha/\beta$ . Затем соединенные фрагменты субклонировали в вектор pBOS с использованием гомологичной рекомбинации. В кратком изложении, векторы линейаризовывали с помощью рестрикции (2 мкг вектора pBOS-hC $\kappa$  расщепляли с использованием FspAI и BsiWI в буфере O+, и 2 мкг вектора pBOS-hC $\gamma$  расщепляли с использованием FspAI и Sall в буфере O+). Расщепленные образцы подвергали электрофорезу в 1% агарозном геле, и фрагмент  
45 остова очищали в 50 мкл воды. Для гомологичной рекомбинации и трансформации компетентные клетки DH5 $\alpha$  размораживали на льду и смешивали с 20-50 нг соединенного продукта ПЦР и 20-50 нг линейаризованного вектора (на каждые 50 мкл клеток DH5 $\alpha$ ). Смесь осторожно смешивали и инкубировали на льду в течение 45 минут с последующим тепловым шоком при 42°C в течение 1 минуты. Затем добавляли 100 мкл среды SOC и

инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Трансформированную культуру инокулировали на планшетах со средой LB/агаром, содержащими ампициллин, и инкубировали при 37°C в течение 18-20 часов. Выделяли бактериальные клоны, из которых выделяли ДНК и подвергали ее анализу секвенированием. Конечные клоны с проверенной последовательностью котрансфецировали (сопоставляя HV и LC одной пары антител) в клетках COS или 293 для экспрессии и очистки антител, как описано выше.

Характеристики очищенных белков DVD-Ig приведены в таблице 16. В левой части таблицы 16 представлены специфичность, аффинность связывания и активность нейтрализации 2 пар mAb, используемых для конструирования новых молекул DVD-Ig к hIL-1α/β. Антитела 18F4.2C8 и 1B12.4H4 (см. Пример 1.1.D) использовали для конструирования DVD3a-Ig к hIL-1α/β, DVD4a-Ig к hIL-1α/β, DVD3b-Ig к hIL-1α/β и DVD4b-Ig к hIL-1α/β. DVD3a-Ig к hIL-1α/β и DVD4a-Ig к hIL-1α/β находились в ориентации a-b-C с коротким и длинным линкером, соответственно. DVD3b-Ig к hIL-1α/β и DVD4b-Ig к hIL-1α/β находились в ориентации b-a-C с коротким и длинным линкером, соответственно. Антитела 6H3.1A4 и 6B12.4F6 использовали для конструирования DVD5a-Ig к hIL-1α/β, DVD6a-Ig к hIL-1α/β, DVD5b-Ig к hIL-1α/β и DVD6b-Ig к hIL-1α/β. DVD5a-Ig к hIL-1α/β и DVD6a-Ig к hIL-1α/β находились в ориентации a-b-C с коротким и длинным линкером, соответственно. DVD5b-Ig к hIL-1α/β и DVD6b-Ig к hIL-1α/β находились в ориентации b-a-C с коротким и длинным линкером, соответственно. Молекулярное клонирование этих дополнительных связывающих белков DVD-Ig к hIL-1α/β осуществляли с использованием способа, описанного выше для DVD1-Ig к hIL-1α/β (см. пример 1.3), с использованием ПЦР с перекрытием. Аминокислотные последовательности этих дополнительных связывающих белков DVD-Ig к hIL-1α/β представлены в таблице 15.

Таблица 15  
Аминокислотная последовательность тяжелой цепи и легкой цепи шести белков DVD-Ig, способных связываться с ИЛ-1α и ИЛ-1β

Белок	Идентификатор последовательности	Последовательность
Область белка		12345678901234567890
30 Вариабельная область тяжелой цепи DVD-Ig hIL-1α/β DVD3a-Ig	SEQ ID NO:127	evqlqsgaelvkpgasvklstasglnikdtyhmwlkqrpeqglewigr dpangnakydprflgkatitadtsntaylqlsstedtavycargdgnfhf dywgqgttlvtssastkqpvhkkesgpglvapsqslsitcvsgfsltdygv swirpppgkglewlgliwgggdytynsplksrslrkdnsksqvflkmnsl qtddtavyycaqrllwgydlygm dywgqgtsvtvss
18F4.2C8 VH	SEQ ID NO:91	evqlqsgaelvkpgasvklstasglnikdtyhmwlkqrpeqglewigr dpangnakydprflgkatitadtsntaylqlsstedtavycargdgnfhf dywgqgttlvtss
35 Линкер	SEQ ID NO:79	ASTKGP
1B12.4H4 VH	SEQ ID NO:97	QVHLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLTDYGV WIRQPPGKGLEWLGLIWGGGDTY YNSPLKSRLSIR KDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAVYYCAKQRTLWG YDLYGMDYWGQGTSVTVSS
40 CH	SEQ ID NO:122	astkgpsvfplapssksts ggtaalgcclvdyfpepvtvswngaltsgvhff pavlqssglyslssvvtvpsslgtqyicnvnhkpntkvdkkvepkscdk thtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmsirtpevtcvvvdvshedpevk fnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckv snkalpapiektiskakgqprepvtylppsreemtknqvsltelvkgfyfs diawesngqpennykttppvltdsgsfflyskltvdksrwqqgnvfscs vmhealhnhytqkslsispk
45 Вариабельная область легкой цепи DVD-Ig hIL-1α/β DVD3a-Ig	SEQ ID NO:128	divmtqsqrfmstsvgdrvsvtckasqnvgtniawyyqkpgqspraliysa syrsgvprdfitgsgsgtdfilitisnqvsvlaeyfcqytrypltfgggtklei krtvaapettvtqspaslsmaigekevircitstdidvdmnwyqqkpggepp kllisqgntlrpvgvpsrfsssgsgtdfvfiienmlsedvadyyclqsdnplptfg agtklelkr
18F4.2C8 VL	SEQ ID NO:92	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNIA WYQQKPGQSPRALIYSASYRYSVGVPRDFITGSGSG TDFLITISNVQSVDLAEYFCQYTRYPLTFGGGT LEIKR
Линкер	SEQ ID NO:71	tvaap

5	1B12.4H4 VL	SEQ ID NO:98	ETT V T Q S P A S L S M A I G E K V T I R C I T S T D I D V D M N W Y Q Q K P G E P P K L L I S Q G N T L R P G V P S R F S S S G S G T D F V F I I E N M L S E D V A D Y Y C L Q S D N L P L T F G A G T K L E L K R
	CL	SEQ ID NO:124	tvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfypreakvqwkvdnalqsgns qesvteqskdstyslssltilskadyekhkvayacevthqglsspvtksfng ec
10	Вариабельная область тяжелой цепи DVD-Ig hIL-1α/β DVD3b-Ig	SEQ ID NO:129	qvhkkesgpglvapsqslsitctvsgfsltdygvswirpppgkglewlgliw gggdytnsplsrlsirkdnksqvfllmnsllqtdtavycakqrtlwgy dlygmdywgqgtsvvtvssastkqpevqlqqsgaelvkpgasvklscasgl nikdtymhwlkqrpeglewigriddpangnakydprflgkatitadtsnta ylqslsstedtavycargdgnfhfdywgqgtltvss
	1B12.4H4 VH	SEQ ID NO:97	QVHLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLTDYGVSWIRQPPGKLEWLGLIWGGGDTY YNSPLKSRLSIR KDNSKSVFLKMNSLQTD D T A V Y Y C A K Q R T L W G Y D L Y G M D Y W G Q G T S V T V S S
15	Линкер	SEQ ID NO:79	ASTKGP
	18F4.2C8 VH	SEQ ID NO:91	evlqqsgaelvkpgasvklscasglnikdtymhwlkqrpeglewigr dpangnakydprflgkatitadtsntaylqslsstedtavycargdgnfhf dywgqgtltvss
	CH	SEQ ID NO:122	astkgpsvflpapssktsggtaalgcldyfpvptvswngaltsgvhtf pavlqssgylsslsvvtpssslgtqyicvnhkpsntkvdkkvepkscdk thtccppapellggpsvflfppkpkdtlmsirtevtcvvvdshedpevk fnwyvdgvevhnaktprreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckv snkalpapiektiskakqprepqvylppreemtknqvslclvkgfyys diavewesngqpennyktpplvdsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscs vmhealhnhtqkslslspgk
20	Вариабельная область легкой цепи DVD-Ig hIL-1α/β DVD3b-Ig	SEQ ID NO:130	Ettvtqspaslsmaigekvtircitstdidvdmnwyqqkpgpeppkllisqgn tlrpgvpsrfsstgtdfvfiienmlsedvadyclqsdnlpltfagtklelkr rtvaapdivmtqsqrfmstsvgdrvsvtckasqnvgtnia wyyqqkpgqspraliysasyrysgvppdrftgsgsg tdfTLTISNVQSVDLAEYFCQYTRYPLTFGGGK LEIKR
	1B12.4H4 VL	SEQ ID NO:98	ETT V T Q S P A S L S M A I G E K V T I R C I T S T D I D V D M N W Y Q Q K P G E P P K L L I S Q G N T L R P G V P S R F S S S G S G T D F V F I I E N M L S E D V A D Y Y C L Q S D N L P L T F G A G T K L E L K R
25	Линкер	SEQ ID NO:71	tvaap
	18F4.2C8 VL	SEQ ID NO:92	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNIA WYQQKPGQSPRALIYSASYRYSGVPPDRFTGSGSG TDFTLTISNVQSVDLAEYFCQYTRYPLTFGGGK LEIKR
30	Вариабельная область тяжелой цепи DVD-Ig hIL-1α/β DVD4a-Ig	SEQ ID NO:131	evlqqsgaelvkpgasvklscasglnikdtymhwlkqrpeglewigr dpangnakydprflgkatitadtsntaylqslsstedtavycargdgnfhf dywgqgtltvssastkqpsvflpapqvhkkesgpglvapsqslsitctvsgf sltdygvswirpppgkglewlgliwgggdytnsplsrlsirkdnksqvf llmnsllqtdtavycakqrtlwgydlygmdywgqgtsvtvss
	18F4.2C8 VH	SEQ ID NO:91	evlqqsgaelvkpgasvklscasglnikdtymhwlkqrpeglewigr dpangnakydprflgkatitadtsntaylqslsstedtavycargdgnfhf dywgqgtltvss
	Линкер	SEQ ID NO:80	astkgpsvflpap
35	1B12.4H4 VH	SEQ ID NO:97	QVHLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLTDYGVSWIRQPPGKLEWLGLIWGGGDTY YNSPLKSRLSIR KDNSKSVFLKMNSLQTD D T A V Y Y C A K Q R T L W G Y D L Y G M D Y W G Q G T S V T V S S
	CH	SEQ ID NO:122	astkgpsvflpapssktsggtaalgcldyfpvptvswngaltsgvhtf pavlqssgylsslsvvtpssslgtqyicvnhkpsntkvdkkvepkscdk thtccppapellggpsvflfppkpkdtlmsirtevtcvvvdshedpevk fnwyvdgvevhnaktprreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckv snkalpapiektiskakqprepqvylppreemtknqvslclvkgfyys diavewesngqpennyktpplvdsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscs vmhealhnhtqkslslspgk
40	Вариабельная область легкой цепи DVD-Ig hIL-1α/β DVD4a-Ig	SEQ ID NO:132	divmtqsqrfmstsvgdrvsvtckasqnvgtnia wyyqqkpgqspraliysasyrysgvppdrftgsgsg tdfTLTISNVQSVDLAEYFCQYTRYPLTFGGGK LEIKR
	18F4.2C8 VL	SEQ ID NO:92	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNIA WYQQKPGQSPRALIYSASYRYSGVPPDRFTGSGSG TDFTLTISNVQSVDLAEYFCQYTRYPLTFGGGK LEIKR
45	Линкер	SEQ ID NO:72	Tvaapsvfifpp

	1B12.4H4 VL	SEQ ID NO:98	ETT V T Q S P A S L S M A I G E K V T I R C I T S T D I D V D M N W Y Q Q K P G E P P K L L I S Q G N T L R P G V P S R F S S S G S G T D F V F I I E N M L S E D V A D Y Y C L Q S D N L P L T F G A G T K L E L K R
5	CL	SEQ ID NO:124	tvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfypreakvqwkvdnalqsgns qesvteqskdstyslssltslkadyekhkvacevthqglsspvtksfng ec
	Вариабельная область тяжелой цепи DVD-Ig hIL-1 $\alpha$ / $\beta$ DVD4b-Ig	SEQ ID NO:133	qvhkkesgpglvapsqslsitctvsgfsltdygvswirpppgkglewglw gggdyynsplksrslrkdnsksqvlkmnslqtdtavycakqrtlwgy dlygmdywgqgtsvtsvastkpgsvfplapevqlqsgaelvkpgasvk lscasglnikdtymhwlkqrpeqglewigrdpangnakydprflgkatit adtsstntaylqslsstedtavycargdnfhfdywgqgttlvss
10	1B12.4H4 VH	SEQ ID NO:97	QVHLKESGPGVLAPSQSL SITCTVSGFSLTDYGVSWIRPPPGKLEWLG LIWGGGDTY YNSPLKSRLSIRKDNSKSVFLKMNLSQTD DTA VY YCAKQRTLWG YDLYGMDYWGQGTSVTVSS
	Линкер	SEQ ID NO:80	astkpgsvfplap
	18F4.2C8 VH	SEQ ID NO:91	evqlqsgaelvkpgasvklscasglnikdtymhwlkqrpeqglewigr dpangnakydprflgkatitadtsntaylqslsstedtavycargdnfhf dywgqgttlvss
15	CH	SEQ ID NO:122	astkpgsvfplapssktsggtaalgcvkdyfpepvtvswngaltsgvhtf pavlqssglyslsvvtvpssslgtqyicvnhkpsntkvdkkvepkscdk thtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmsirtpetvctvvdvshedpevk fnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckv snkalpapiektiskakgpreppqvytlppsreemtknqvsltclvkgyfys diavewesngqpennyktpplvdsdgsfflyskltvdkrswqqgnvfscs vmhealthnhtqkslslspgk
20	Вариабельная область легкой цепи DVD-Ig hIL-1 $\alpha$ / $\beta$ DVD4b-Ig	SEQ ID NO:134	ettvtqspaslsmaigekvtircitstdidvdmnwqqkpgpepklisqgn tlrpgvpsrfsssgtdfvfiienmlsedvadyclqsdnlpftgagtkleikr rtvaapsvfifppdivmtsqrfmstsvgdrvsvtckasqnvgniaawyqg kpgqspraliysasyrysgvprdrftsgsgtdftltisnqvslaeayfcqyt rypltfgggkcleikr
	1B12.4H4 VL	SEQ ID NO:98	ETT V T Q S P A S L S M A I G E K V T I R C I T S T D I D V D M N W Y Q Q K P G E P P K L L I S Q G N T L R P G V P S R F S S S G S G T D F V F I I E N M L S E D V A D Y Y C L Q S D N L P L T F G A G T K L E L K R
25	Линкер	SEQ ID NO:72	Tvaapsvfifpp
	18F4.2C8 VL	SEQ ID NO:92	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNIAWYQKPGQSPRALIY SASYRYSGVPRDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSVDLAEYFCQYTRYPLTFGGG TKLEIKR
	CL	SEQ ID NO:124	tvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfypreakvqwkvdnalqsgns qesvteqskdstyslssltslkadyekhkvacevthqglsspvtksfng ec
30	Вариабельная область тяжелой цепи DVD-Ig hIL-1 $\alpha$ / $\beta$ DVD5a-Ig	SEQ ID NO:135	qvqlqppgaelvrpgasvklscasgyfttywmnwvkqrpeqglewig ridpydsetlyskfkdtailtvkssstaymqlsstedsavycarygfdy wgqgttlvssastkpgpelvqlqsgpelvktgsvkiscasgysftgyymh wvrqshgkslewigyiscyngftsypnkfkgkatftvdtssstayiqfslrte dsavycarsdygndywgqgttlvss
	6H3.1A4.3E11 VH	SEQ ID NO:93	qvqlqppgaelvrpgasvklscasgyfttywmnwvkqrpeqglewig ridpydsetlyskfkdtailtvkssstaymqlsstedsavycarygfdy wgqgttlvss
35	Линкер	SEQ ID NO:79	ASTKGP
	6B12.4F6 VH	SEQ ID NO:99	evqlqsgpelvktgsvkiscasgysftgyymhwvrqshgkslewigy iscyngftsypnkfkgkatftvdtssstayiqfslrtesdavycarsdygnt ndywgqgttlvss
40	CH	SEQ ID NO:122	astkpgsvfplapssktsggtaalgcvkdyfpepvtvswngaltsgvhtf pavlqssglyslsvvtvpssslgtqyicvnhkpsntkvdkkvepkscdk thtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmsirtpetvctvvdvshedpevk fnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckv snkalpapiektiskakgpreppqvytlppsreemtknqvsltclvkgyfys diavewesngqpennyktpplvdsdgsfflyskltvdkrswqqgnvfscs vmhealthnhtqkslslspgk
45	Вариабельная область легкой цепи DVD-Ig hIL-1 $\alpha$ / $\beta$ DVD5a-Ig	SEQ ID NO:136	qivltqspalmsaspgekvtmtcsasssvnywyqqprsspkpwyl tsnlasgvparfsgsgtsysltissmeaadaatyqcqwnspytfgggt klemkrtaapqivltqspalmsaspgekvtitcsasssvnyhwfqqk gaspklwystnlasgvparfsgsgtsysltsvrmeaadaatyqcqqrst ypytfgggtkleikr
	6H3.1A4.3E11 VL	SEQ ID NO:94	QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSASSSVNYMYWYQKPRSSPKPWY LTSNLAGV PARFSGSGGTSYSLTSSMEAEADAATYYCQQWNSNPYTFGGG TKLEMKR
	Линкер	SEQ ID NO:71	Tvaap
	6B12.4F6 VL	SEQ ID NO:100	QIVLTQSPALMSASPGEKVTITCSASSSVNYMHWYQKPGASPKLWY STSNLAGV PARFSGSGGTSYS



	CL	SEQ ID NO:124	rtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfypreakvqwkvdnalqsgns qesvteqdkdskdystslstltskadyekhkvayacevthqglsspvtksfng ec
5	Варибельная область тяжелой цепи DVD-Ig hIL-1 $\alpha$ / $\beta$ DVD6b-Ig	SEQ ID NO:141	evqlqqsgpelvktgtsvkiscakasgysftgyymhwvrqshgkslewigy iscyngftsypnkfkgkatftvdtssstayiqfsltsedsavyycarsdygt ndywgqgtltvssastkgspsvfplapqvlqppgaelvrpgasvklscakas gyfttymwnwvkqrpeglewigrldpydsetlysqkfkdtailtvdkss staymqlsstsedsavyyarygfdywgqgtltvss
	6B12.4F6 VH	SEQ ID NO:99	evqlqqsgpelvktgtsvkiscakasgysftgyymhwvrqshgkslewigy iscyngftsypnkfkgkatftvdtssstayiqfsltsedsavyycarsdygt ndywgqgtltvss
	Линкер	SEQ ID NO:80	astkgspsvfplap
10	6H3.1A4.3E11 VH	SEQ ID NO:93	qvqlqqgaelvrpgasvklscakasgyfttymwnwvkqrpeglewig ridpydsetlysqkfkdtailtvdkssstaymqlsstsedsavyyarygfdy wgqgtltvss
15	CH	SEQ ID NO:122	astkgspsvfplapssktsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtf pavlqssgylsylvtpssslgtqyicvnhkpsntkvdkkvepkscdk thtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtevtcvvdvshedpevk fnwyvdgvevhnaktprreeqynstyrvvsvlvlhqdwlngkeyckv snkalpapiektiskakgqprepvtylppsreemtknqvsltlvkgfyys diavevesngqpennyktpplvdsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscs vmhealthnhytqkslslspgk
	Варибельная область легкой цепи DVD-Ig hIL-1 $\alpha$ / $\beta$ DVD6b-Ig	SEQ ID NO:142	qivltqspaimspgkvtitcsasssvymhwfqqkpgaspklwiysts nlasgvparfsgsgtsyltsvrmeaadaatyecqqrstypytfgggtkle ikrtvaapsvfifppqivltqspalmsaspgekvtmtcsasssvnymywyq qkprsspkwiyltsnlasgvparfsgsgtsyltissmeaadaatyecq wnsnpytfgggtklemkrr
20	6B12.4F6 VL	SEQ ID NO:100	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVYMHWFQ QKPGASPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYS LTVSRMEAEDAATYYCQQRSTYPYTFGGGTKLEI KR
	Линкер	SEQ ID NO:72	tvaapsvfifpp
	6H3.1A4.3E11 VL	SEQ ID NO:94	QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSASSSVNYMYW YQQKPRSSPKWIYLTSNLASGVPARFSGSGSGTS YSLTSSMEAEDAATYYCQQWNSNPYTFGGGTKL EMKR
25	CL	SEQ ID NO:124	tvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfypreakvqwkvdnalqsgns qesvteqdkdskdystslstltskadyekhkvayacevthqglsspvtksfng ec

Характеристики новых конструкций DVD-Ig представлены в таблице 16. Аффинность (K<sub>d</sub>) и биологическую активность (IC<sub>50</sub>) определяли с помощью анализа Viacore и биологического анализа MRC-5, соответственно. Анализ с помощью SDS-PAGE всех новых белков DVD-Ig показал нормальные профили миграции в восстановительных и невосстановительных условиях, аналогично регулярному антителу и DVD1/2-Ig.

mAb	Специфичность	K <sub>d</sub> (M)	IC <sub>50</sub> (M)	DVD	Ориентация	Линкер	Аффинность (K <sub>d</sub> )		Активность (IC <sub>50</sub> )	
							IL-1 $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-1 $\alpha$	IL-1 $\beta$
18F4.2C8 1B12.4H4	rhIL-1 $\alpha$	5.95 $\times$ 10 <sup>-10</sup>	3.30 $\times$ 10 <sup>-10</sup>	DVD3a	a-b-C	короткий	8.37 $\times$ 10 <sup>-10</sup>	6.37 $\times$ 10 <sup>-8</sup>	7.50 $\times$ 10 <sup>-10</sup>	NA
				DVD4a	a-b-C	длинный	7.01 $\times$ 10 <sup>-10</sup>	9.30 $\times$ 10 <sup>-10</sup>	3.50 $\times$ 10 <sup>-10</sup>	1.00 $\times$ 10 <sup>-8</sup>
	rhIL-1 $\beta$	2.61 $\times$ 10 <sup>-10</sup>	6.00 $\times$ 10 <sup>-10</sup>	DVD3b	b-a-C	короткий	1.24 $\times$ 10 <sup>-9</sup>	1.90 $\times$ 10 <sup>-10</sup>	7.00 $\times$ 10 <sup>-10</sup>	4.00 $\times$ 10 <sup>-10</sup>
				DVD4b	b-a-C	длинный	5.60 $\times$ 10 <sup>-10</sup>	1.28 $\times$ 10 <sup>-10</sup>	3.50 $\times$ 10 <sup>-10</sup>	5.00 $\times$ 10 <sup>-10</sup>
6H3.1A4 6B12.4F6	rhIL-1 $\alpha$	3.54 $\times$ 10 <sup>-10</sup>	2.40 $\times$ 10 <sup>-10</sup>	DVD5a	a-b-C	короткий	5.08 $\times$ 10 <sup>-10</sup>	1.25 $\times$ 10 <sup>-8</sup>	2.60 $\times$ 10 <sup>-9</sup>	1.90 $\times$ 10 <sup>-8</sup>
				DVD6a	a-b-C	длинный	1.06 $\times$ 10 <sup>-9</sup>	2.09 $\times$ 10 <sup>-9</sup>	2.30 $\times$ 10 <sup>-9</sup>	7.00 $\times$ 10 <sup>-8</sup>
	rhIL-1 $\beta$	5.54 $\times$ 10 <sup>-10</sup>	4.00 $\times$ 10 <sup>-10</sup>	DVD5b	b-a-C	короткий	1.32 $\times$ 10 <sup>-8</sup>	6.71 $\times$ 10 <sup>-10</sup>	3.30 $\times$ 10 <sup>-9</sup>	2.50 $\times$ 10 <sup>-10</sup>
				DVD6b	b-a-C	длинный	8.20 $\times$ 10 <sup>-10</sup>	6.97 $\times$ 10 <sup>-10</sup>	1.00 $\times$ 10 <sup>-9</sup>	7.50 $\times$ 10 <sup>-10</sup>

mAb = моноклональное антитело; NA = нейтрализующая активность не определена.

Функциональная характеристика новых молекул DVD-Ig показала, что при любой ориентации молекулы DVD-Ig с длинным линкером действовали лучше, чем молекулы с коротким линкером в отношении связывания и нейтрализации обоих антигенов. Что

касается молекул DVD-Ig с длинными линкерами, молекулы с ориентацией b-a-C показали хорошее связывание и нейтрализацию обоих антигенов, в то время как молекулы DVD-Ig с ориентацией a-b-C показали хорошее связывание и нейтрализацию ИЛ-1 $\alpha$  и сниженное связывание и нейтрализацию ИЛ-1 $\beta$  (например, DVD4b по сравнению с DVD4a). Молекула DVD-Ig, DVD4b, связывалась с ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  и нейтрализовала их с субнаномолярной активностью и полностью сохраняла связывающие и нейтрализующие свойства родительских mAb.

### Пример 3. Получение молекул DVD-Ig к mIL-1 $\alpha/\beta$

Для исследования ключевых вопросов, касающихся фармакокинетики, эффективности *in vivo*, проникновения в ткань и иммуногенности молекул DVD-Ig, конструировали молекулы DVD-Ig мыши к ИЛ-1 $\alpha/\beta$  мыши, как описано ниже.

#### Пример 3.1. Конструирование молекул DVD-Ig к mIL-1 $\alpha/\beta$

Молекулы DVD-Ig мыши к ИЛ-1 $\alpha/\beta$  мыши конструировали с использованием двух моноклональных антител мыши к ИЛ-1 $\alpha/\beta$  мыши (9H10 и 10G11), полученных из мыши с двойным нокаутом по ИЛ-1 $\alpha/\beta$ . Моноклональные антитела мыши к ИЛ-1 $\alpha$  мыши и моноклональные антитела мыши к ИЛ-1 $\beta$  мыши (mAb) получали иммунизацией мышей с двойным нокаутом по ИЛ-1 $\alpha/\beta$  с использованием ИЛ-1 $\alpha$  мыши, или ИЛ-1 $\beta$  мыши, соответственно. Выбирали одно mAb мыши к ИЛ-1 $\alpha$  мыши (клон 9H10) и одно mAb мыши к ИЛ-1 $\beta$  мыши (клон 10G11) и использовали для получения молекул DVD-Ig к mIL-1 $\alpha/\beta$ . Тестировали различные размеры линкера и различные ориентации доменов. Конечную функциональную молекулу DVD-Ig к mIL-1 $\alpha/\beta$  конструировали в ориентации V(против mIL-1 $\beta$ -линкер-V(к mIL-1 $\alpha$ )- константная область мыши (C $\gamma$ 2a и C $\kappa$ ). Способы клонирования, экспрессии и очистки аналогичны таковым для связывающего белка DVD-Ig к hIL-1 $\alpha/\beta$ . Клонирование связывающего белка DVD-Ig к mIL-1 $\alpha/\beta$  осуществляли с использованием аналогичного ПЦР с перекрыванием и гомологичной рекомбинации, как описано для DVD3-Ig к hIL-1 $\alpha/\beta$ . Последовательности связывающих белков DVD-Ig к mIL-1 $\alpha/\beta$  представлены ниже в таблице 17.

Таблица 17 Аминокислотная последовательность связывающего белка DVD-Ig к mIL-1 $\alpha/\beta$		
Белок	Идентификатор последовательности	Последовательность
Область белка		12345678901234567890
Вариабельная область тяжелой цепи DVD-Ig к mIL-1 $\alpha/\beta$	SEQ ID NO:143	EVQLQQSGPELVKPGTSVKMSCKTSGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYIIPYNDNTKYNEKFRGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARRNEYYGSSFFDYWGQGTTLTVSSAKTTAPSVYPLAPQVILKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTYGTAVNWIRQPSGKGLEWLAQIGSDDRKLYNPFLKSRITLSEDTSNSQVFLKITSVDTEDSATYYCANGVMEYWGLGTSVTVSS
10G11 VH	SEQ ID NO:144	EVQLQQSGPELVKPGTSVKMSCKTSGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYIIPYNDNTKYNEKFRGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARRNEYYGSSFFDYWGQGTTLTVSS
Линкер	SEQ ID NO:78	AKTTAPSVYPLAP
9H10 VH	SEQ ID NO:145	QVILKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTYGTAVNWIRQPSGKGLEWLAQIGSDDRKLYNPFLKSRITLSEDTSNSQVFLKITSVDTEDSATYYCANGVMEYWGLGTSVTVSS
CH	SEQ ID NO:146	AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQITCNVAHPASSTKVDKKEIPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISSLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMGSKFEKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWVTNNGKTE

			LNYKNTPEVLSDSGSYFMYSKLRVEKKNW VERNYSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
5	Вариабельная область легкой цепи DVD-Ig к mIL-1 $\alpha$ / $\beta$	SEQ ID NO:147	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRGSGILHN YLVWYQQKQKSPQLLYSAKILADGVPS RFGSGSGTQYSLKINSLQPEDFGSYCQH FWSTPFTFGSGTKLEIKRADAAPTVISIFPSI VMTQTPKFLVLSAGDRVITITCKASQSVNH DVAWYQQMPGQSPKLLIYFASNRYTGVPD RFTGSGYGTDFTFITISTVQAEDLAVYFCQQ DYSSPYTFGGGKLEIKR
10	10G11 VL	SEQ ID NO:148	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRGSGILHN YLVWYQQKQKSPQLLYSAKILADGVPS RFGSGSGTQYSLKINSLQPEDFGSYCQH FWSTPFTFGSGTKLEIKR
	Линкер	SEQ ID NO:70	ADAAPTVISIFPP
	9H10 VL	SEQ ID NO:149	SIVMTQTPKFLVLSAGDRVITITCKASQSVN HDVAWYQQMPGQSPKLLIYFASNRYTGVP DRFTGSGYGTDFTFITISTVQAEDLAVYFCQ QDYSSPYTFGGGKLEIKR
15	CL	SEQ ID NO:150	ADAAPTVISIFPPSEQLTSGGASVVCFLNPF YPKDINVKWKIDGSRQNGVLSWTDQDS KDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATH KTSTSPIVKSFNREK

Связывающие белки DVD-Ig мыши к mIL-1 $\alpha$ / $\beta$  сохраняли аффинность/активность *in vitro* и к ИЛ-1 $\alpha$  мыши (mIL-1 $\alpha$ ), и к ИЛ-1 $\beta$  мыши (mIL-1 $\beta$ ). В таблице 18 представлена характеристика mAb 9H10 (к mIL-1 $\alpha$ ), 10G11 (к mIL-1 $\beta$ ), и связывающих белков DVD-Ig к mIL-1 $\alpha$ / $\beta$ .

Таблица 18  
Характеристика mDVD4-Ig

	Антиген	K <sub>D</sub> (M)	IC <sub>50</sub> (M)
9H10	mIL-1 $\alpha$	1,73 $\times 10^{-10}$	2,00 $\times 10^{-10}$
10G11	mIL-1 $\beta$	2,30 $\times 10^{-10}$	3,70 $\times 10^{-10}$
mIL-1 $\alpha$ / $\beta$ DVD-Ig	mIL-1 $\alpha$	7,66 $\times 10^{-10}$	2,00 $\times 10^{-9}$
	mIL-1 $\beta$	6,94 $\times 10^{-10}$	8,00 $\times 10^{-10}$

Пример 3.2. Активность *in vivo* связывающих белков DVD-Ig к mIL-1 $\alpha$ / $\beta$  в модели ревматоидного артрита

Терапевтические эффекты DVD4-Ig к ИЛ-1 $\alpha$ , DVD4-Ig к ИЛ-1 $\beta$ , комбинированных DVD4-Ig к ИЛ-1 $\alpha$ /к ИЛ-1 $\beta$  и DVD4-Ig мыши к ИЛ-1 $\alpha$ / $\beta$  оценивали на модели коллаген-индуцированного артрита мыши, хорошо известной в этой области. В кратком изложении, самцов мыши DBA-1 иммунизировали в основание хвоста с использованием бычьего коллагена II типа в CFA. Мышей повторно иммунизировали интраперитонеально (i.p) с использованием зимозана в день 21. После начала заболевания в день 24-27 выбирали мышей и делили на отдельные группы по 10 мышей в каждой. Средние баллы при оценке артрита в контрольной группе и в противоицитокиновой группе являлись сравнимыми в начале лечения. Для нейтрализации ИЛ-1 мышам через день интраперитонеально инъецировали 1-3 мг/кг mAb к ИЛ-1 $\alpha$ , mAb к ИЛ-1 $\beta$ , комбинации mAb к ИЛ-1 $\alpha$  и к ИЛ-1 $\beta$ , или DVD4-Ig мыши к ИЛ-1 $\alpha$ / $\beta$ . Мышей осторожно обследовали три раза в неделю на внешние артритические изменения в периферических суставах, и определяли баллы активности заболевания.

Блокада ИЛ-1 терапевтическим способом эффективно снижала тяжесть артрита, при этом антитело к ИЛ-1 $\beta$  демонстрировало большую эффективность (24% снижение средних баллов при оценке артрита по сравнению с контрольной группой), чем антитело к ИЛ-1 $\alpha$  (10% снижение). Наблюдали аддитивный эффект между антителами к ИЛ-1 $\alpha$  и к ИЛ-1 $\beta$  с 40% снижением средних баллов при оценке артрита у мышей, подвергнутых лечению и mAb к ИЛ-1 $\alpha$ , и mAb к ИЛ-1 $\beta$ . Неожиданно, при одном и том же уровне дозы

лечение связывающим белком mDVD-Ig демонстрировало 47% снижение средних баллов при оценке артрита, что свидетельствует о терапевтической эффективности *in vivo* связывающего белка mDVD-Ig. Аналогичную эффективность также наблюдали при измерениях опухания сустава в этой модели на животных.

5 Пример 3.3. Активность *in vivo* связывающего белка DVD-Ig мыши к ИЛ-1 $\alpha/\beta$  в модели остеоартрита

Представленное выше исследование показало, что блокада и ИЛ-1 $\alpha$ , и ИЛ-1 $\beta$  с использованием комбинации антител к ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  мыши, а также связывающих белков DVD-Ig мыши к ИЛ-1 $\alpha/\beta$  мыши являлась значительно более эффективной, чем  
10 одно любое антитело в отдельности в модели коллаген-индуцированного артрита мыши (CIA) для ревматоидного артрита (см., также, Wu et al., Nature Biotech., 25(11): 12901297 (2007)). Эффективность терапии к ИЛ-1 при остеоартрите (ОА) исследовали на двух моделях ОА на животных, т.е. модели нестабильности сустава ("JEM") и дестабилизации медиального мениска ("DMM") на мышах.

15 Пример 3.3.1. Активность *in vivo* моноклональных антител мыши к ИЛ-1 $\alpha$  мыши и к ИЛ-1 $\beta$  мыши на остеоартритической модели нестабильности сустава (JIM) у мыши

Пример 3.3.1.А. Дизайн исследования

Дизайн исследования активности *in vivo* молекулы DVD-Ig к mIL-1 $\alpha/\beta$  на остеоартритической модели нестабильности сустава (JIM) у мышей представлена в  
20 таблице 19. Все группы включали 25 мышей (n = 25), весящих приблизительно 30 граммов (BW = 30 г). Исследование заканчивали через 21 день. Самцов мышей Swiss Webster (25/группу/момент времени) возрастом по два с половиной месяца, содержащихся по 5/клетку, анестезировали с использованием анестезии изофлураном. Наносили травму передней крестообразной связки (ACL) на правое и левое колено в день 0, пытаясь  
25 вызвать повреждения ОА. Интраперитонеальное (*i.p.*) введение ингибирующих ИЛ-1 антител к ИЛ-1 $\alpha$  (9H10) и ИЛ-1 $\beta$  (10G11) в отдельности и в комбинации начинали в день нанесения травмы ACL и продолжали каждый 4-й день (q4d) в течение 20 дней. Разбавителем в случае контроля без лечения являлся PBS. Собирали правое и левое  
30 колено в день 21, проводили балльную оценку и охарактеризовывали гистологические изменения. Данные анализировали с использованием только тех суставов, которые имели пролиферативные ответы, свидетельствующие об успешной стимуляции нестабильности. Пролиферативный ответ/нестабильность оценивали в 0-3 балла и в конечном анализе использовали только нестабильные суставы (баллы 1, 2 или 3). Проводили балльную оценку дегенерации медиального и латерального бедренного и  
35 большеберцового хряща на тяжесть дегенерации хряща по шкале 0-5 баллов. Через четыре дня после введения последней дозы антитела, у всех животных из каждой группы забирали кровь для сбора сыворотки. Массу тела записывали еженедельно. В последний день животным (10 животным в группах 1, 2, 3, 4) вводили дозу зимозана А и забирали кровь через 4 часа (в конце) для анализа ИЛ-6 (ИЛ-1/ФНО-зависимого) в сыворотке.  
40 Животных умерщвляли в день 21 и собирали правое и левое колено в формалин.

Таблица 19  
Дизайн исследования на остеоартритической модели нестабильности сустава у животных

Группа лечения	Соединение	Путь введения	Режим дозирования
Группа 1	Разбавитель 1 (PBS)	<i>ip</i>	Q4D (2 раза в неделю)
Группа 2	Антитело к ИЛ-1 $\alpha$ (9H10)	<i>ip</i>	Q4D (2 раза в неделю)
Группа 3	Антитело к ИЛ-1 $\beta$ (10G11)	<i>ip</i>	Q4D (2 раза в неделю)

Группа 4	Антитело к ИЛ-1 $\alpha$ (9H10) и Антитело к ИЛ-1 $\beta$ (10G11)	ip	Q4D (2 раза в неделю)
----------	---	----	--------------------------

### Пример 3.3.1.В. Подготовка и анализ ткани

Подготовка ткани: После 2-3 дней в декальцифицирующем фиксаторе (Surgipath Decalifier, Surgipath Medical Ind., Inc., Richmond VA) оба коленных сустава отделяли от посторонней ткани, заливали препарат во фронтальной плоскости и получали срезы. Брели один срез от каждого животного (2 сустава/блок) приблизительно в средней точке фронтальной плоскости. Все срезы имели толщину 8 мкм, и их окрашивали толуидиновым синим. Микроскопические препараты исследовал сертифицированный ветеринарный патолог, не знавший об обозначениях исследуемых групп, и выставял баллы согласно представленному ниже способу. Статистический анализ осуществляли с использованием Microsoft Excel, и он включал 2-сторонний t-критерий Стьюдента со сравнением всех исследуемых групп с контрольной группой с использованием 95% доверительного интервала.

Гистологическая балльная оценка суставов: Проводили балльную оценку дегенерации медиального и латерального бедренного и большеберцового хряща на тяжесть дегенерации хряща с использованием следующей системы: глубина/степень потери хондроцитов и протеогликанов с разрастанием волокнистой соединительной ткани:

1 = поверхностное повреждение, тангенциальный слой коллагена отсутствует на протяжении 50% или более поверхности зоны или до 10% потеря протеогликанов и/или хондроцитов при фокальном или диффузном распределении в зоне

2 = потеря матрикса распространяется в верхнюю 1/4 на протяжении 50% или большей области зоны или до 25% потеря протеогликанов и/или хондроцитов при фокальном или диффузном распределении в зоне

3 = потеря матрикса распространяется в верхнюю 1/2 толщины хряща на протяжении 50% или более зоны или до 50% потеря протеогликанов и/или хондроцитов при фокальном или диффузном распределении в зоне

4 = потеря матрикса распространяется через 3/4 толщины хряща на протяжении 50% или более зоны или до 75% потеря протеогликанов и/или хондроцитов при фокальном или диффузном распределении в зоне

5 = потеря матрикса распространяется через всю толщину хряща на протяжении 50% или более зоны или до 100% потеря протеогликанов и/или хондроцитов при фокальном или диффузном распределении в зоне.

Приписывали баллы с учетом зонального (внутреннего, среднего и внешнего) распределения повреждений и баллы (0-5) для каждого третьего суммировали для каждой области сустава и затем для целого сустава.

Остеофиты (при оценке наибольшие на большеберцовой или бедренной поверхности) измеряли с использованием цифрового программного обеспечения (NIS-Elements версии 3.0).

Оценка остеофита = 1, 2 или 3 для небольшого, среднего или большого в зависимости от размера

Небольшие остеофиты = 1 (до 150 мкм)

Средние остеофиты = 2 (151-300 мкм)

Большие остеофиты = 3 (>301 мкм)

Синовиальную реакцию описывали и охарактеризовывали в отношении типа воспаления, и ее степень, если присутствовала, не включали в балльную оценку.

Определяли среднее  $\pm$  SE для каждого из различных параметров для каждого животного и суммируют для получения общих баллов оценки сустава.

Суставы с гистологическими доказательствами стимуляции нестабильности определяли по присутствию пролиферативных изменений в медиальной синовиальной оболочке и коллатеральных связках. Кроме того, записывали баллы нестабильности для каждого сустава согласно следующим критериям.

- 5 0 = отсутствие нестабильности  
 1 = Слабая нестабильность (пролиферативные изменения в связках и краевых зонах от минимальных до слабых)  
 2 = Умеренная нестабильность (умеренные пролиферативные изменения в связках и краевых зонах)  
 10 3 = Тяжелая нестабильность (тяжелые пролиферативные изменения в связках и краевые зоны)

Результаты: В конечном анализе данных использовали только нестабильные суставы с баллами 1, 2 или 3 (или 2, 3). В конечном итоге данные анализировали скорее с учетом общего количества поврежденных суставов, чем с учетом заболевших животных.

- 15 Результаты исследования свидетельствуют о том, что суставы животных, подвергнутых лечению с использованием моноклональных антител к ИЛ-1 $\alpha$  или ИЛ-1 $\beta$ , демонстрировали дегенерацию хряща, аналогичную наблюдаемой в обработанных разбавителем контрольных суставах. Однако, комбинированное лечение mAb мыши к ИЛ-1 $\alpha$  мыши (9H10) и mAb мыши к ИЛ-1 $\beta$  мыши (10G11) значительно снижало баллы дегенерации медиального большеберцового хряща. На фигуре 2 показаны гистограммы баллов дегенерации хряща в суставах животных в различных исследуемых группах.

Пример 3.3.2. Активность *in vivo* связывающего белка DVD-Ig к mIL-1 $\alpha/\beta$  в остеоартритической модели нестабильности сустава (JIM) у мыши

- 25 Остеоартритическую модель нестабильности сустава, как описано выше в примере 3.3.1, также использовали для сравнения эффективности терапии к ИЛ-1, обеспечиваемой комбинацией моноклонального антитела мыши к mIL-1 $\alpha$  (9H10) и моноклонального антитела мыши к mIL-1 $\beta$  (10G11), с эффективностью связывающего белка DVD-Ig к mIL-1 $\alpha/\beta$ , получаемого из двух моноклональных антител.

Пример 3.3.2.A. Дизайн исследования

- 30 Дизайн этого исследования являлся аналогичным описываемому выше в примере 3.3.1. Самцов мышей Swiss Webster (25/группу/момент времени) возрастом два с половиной месяца, содержащихся по 5/клетку, анестезировали с использованием анестезии изофлураном, клипировали область правого и левого колена и подготавливали для внутрисуставной травмы крестообразных связок в день 0. Введение доз (начатое в день 0, *i.p.*) осуществляли однократно каждые 4 дня (Q4D) и умерщвляли животных в день 21 (для группы 2). Введение доз (начатое в день 0, *i.p.*) осуществляли три раза в неделю, умерщвляли животных в день 21 (для групп 1, 3 и 4). Через четыре дня после последней дозы антитела у всех животных из каждой группы забирали кровь для сбора сыворотки. Еженедельно записывали массу тела. В последний день животным (10 40 животным в группах 1, 2, 3, 4) вводили дозу зимозана А и забирали кровь через 4 часа (в конце) для анализа ИЛ-6 (ИЛ-1/ФНО-зависимого) в сыворотке. Животных подвергали эвтаназии в день 21 и правый и левый коленные суставы собирали в формалин. См. дизайн исследования в таблице 20.

45 Таблица 20  
 Дизайн исследования на остеоартритической модели нестабильности сустава на животных

Исследуемая группа	Соединение	Путь введения	Режим дозирования	Уровень дозы (мг/кг)
Группа 1	Разбавитель 1 (PBS)	<i>i.p.</i>	3 раза в неделю	6,7 мг/кг

Группа 2	Антитело к ИЛ-1 $\alpha$ (9H10) и антитело к ИЛ-1 $\beta$ (10G11)	i.p.	Q4D (3 раза в неделю)	Антитело к ИЛ-1 $\alpha$ в дозе 6 мг/кг (180 мкг/мышь) и антитело к ИЛ-1 $\beta$ в дозе 6 мг/кг (180 мкг/мышь)
Группа 3	DVD-Ig к mIL-1 $\alpha/\beta$	i.p.	3 раза в неделю	12 мг/кг (500 мкг/мышь)
Группа 4	DVD-Ig к mIL-1 $\alpha/\beta$	i.p.	3 раза в неделю	6 мг/кг (250 мкг/мышь)

### Пример 3.3.2.В. Подготовка и анализ ткани

Подготовку ткани и гистологическую балльную оценку суставных хрящей суставов животных в различных исследуемых группах осуществляли, как описано выше в примере 3.3.1

Результаты: Результаты свидетельствуют о том, что лечение мышей связывающим белком DVD-Ig 10G11-9H10 к mIL-1 $\alpha/\beta$  значительно ингибирует прогрессирование остеоартрита ( $p < 0,05$  по сравнению с разбавителем) с эффективностью, сравнимой с комбинацией родительских mAb 9H10 и 10G11. На фигуре 3 показаны гистограммы баллов дегенерации хряща в суставах животных в различных исследуемых группах. Как показано на фигуре 3, результаты лечения 6 или 12 мг/кг связывающего белка DVD-Ig являлись аналогичными по своей эффективности в отношении профилактики остеоартритических повреждений. (Лечение с использованием 3 мг/кг связывающего белка DVD-Ig не оказывало эффекта на дегенерацию хряща, и результаты являлись аналогичными результатам для суставов, обработанных разбавителем. См. пример 3.3.3. ниже.) Результаты этого исследования свидетельствовали о том, что лечение комбинацией моноклональных антител к ИЛ-1 $\alpha$  и к ИЛ-1 $\beta$  или связывающим белком DVD-Ig к ИЛ-1 $\alpha/\beta$  оказывало значительное положительное воздействие на гистопатологические параметры на модели остеоартрита мыши.

Пример 3.3.3. Проспективное исследование на остеоартритической модели нестабильности сустава для сравнения лечения моноклональным антителом к ИЛ-1 $\beta$  и другими связывающими белками

Перспективное исследование осуществляли с использованием остеоартритической модели нестабильности сустава для более точного определения, может ли иметь место достоверный эффект на баллы дегенерации медиального большеберцового хряща у животных, подвергнутых лечению моноклональным антителом к ИЛ-1 $\beta$  в отдельности, по сравнению с другими способами лечения. Эффект лечения моноклональным антителом к ИЛ-1 $\beta$  оценивали в 21 день исследования.

### Пример 3.3.3.А. Дизайн исследования

Дизайн исследования являлся аналогичным описываемому выше в примере 3.3.1.

Исследуемая группа	Соединение	Путь введения	Режим дозирования	Уровень дозы (мг/кг)
Группа 1	Разбавитель 1 (PBS)	i.p.	Q4D	6,7 мл/кг
Группа 2	Антитело к ИЛ-1 $\alpha$ (9H10) и антитело к ИЛ-1 $\beta$ (10G11)	i.p.	Q4D	Антитело к ИЛ-1 $\alpha$ в дозе 6 мг/кг (180 мкг/мышь) и антитело к ИЛ-1 $\beta$ в дозе 6 мг/кг (180 мкг/мышь)
Группа 3	Антитело к ИЛ-1 $\beta$ (10G11)	i.p.	Q4D	12 мг/кг (360 мкг/мышь)
Группа 4	Антитело к ИЛ-1 $\beta$ (10G11)	i.p.	Q4D	6 мг/кг (180 мкг/мышь)
Группа 5	Антитело к ИЛ-1 $\beta$ (10G11)	i.p.	Q4D	3 мг/кг (90 мкг/мышь)

### Пример 3.3.3.В. Подготовка и анализ ткани

Подготовку ткани и гистологическую балльную оценку суставных хрящей из суставов животных в различных исследуемых группах осуществляли, как описано выше в примере 3.3.1.

Результаты: Как показано на фигуре 4, результаты подтверждали данные предыдущих исследований, в которых аналогичные положительные эффекты лечения отмечали при использовании комбинации моноклональных антител к ИЛ-1 $\alpha$  и к ИЛ-1 $\beta$ , и лечение моноклональным антителом к ИЛ-1 $\beta$  в отдельности не являлось эффективным в профилактике дегенерации хряща при любой тестируемой дозе.

Пример 3.3.4. Индуцированная зимозаном продукция интерлейкина-6 (ИЛ-6) в исследовании на модели нестабильности сустава

В исследовании на ОА модели нестабильности сустава для исследования фармакодинамических параметров для определения, являются ли моноклональные антитела к ИЛ-1 $\alpha$  и к ИЛ-1 $\beta$ , а также связывающий белок DVD-Ig к mIL-1 $\alpha/\beta$  функциональными и способными нейтрализовать ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  *in vivo*, измеряли индуцируемую зимозаном (ИЛ-1 $\alpha$ - и ИЛ-1 $\beta$ -зависимую) продукцию интерлейкина-6 (ИЛ-6).

В кратком изложении, в день 21 исследования модели зимозан суспендировали в разбавителе PBS и помещали в кипящую воду на полчаса, затем позволяли охлаждаться перед использованием. Затем мышам инъецировали *i.p.* 50 мг/кг зимозана в суспензии (хорошо смешанной перед инъекцией) в 0,5 мл PBS. Затем мышам выпускали кровь через 4 часа после инъекции зимозана. Собирали сыворотки для измерений ИЛ-6.

Результаты: Как показано на фигуре 5, комбинация моноклонального антитела к ИЛ-1 $\alpha$  (6 мг/кг) и моноклонального антитела к ИЛ-1 $\beta$  (6 мг/кг), а также связывающий белок DVD-Ig к mIL-1 $\alpha/\beta$  (в концентрации 6 мг/кг или 12 мг/кг) значительно нейтрализовали индуцированную зимозаном продукцию ИЛ-6 по сравнению с контрольными животными, которым вводили разбавитель. Таким образом, антитела проявляли функциональную активность *in vivo*.

Пример 3.3.5. Эффект лечения ингибирующими цитокины антителами на остеоартрит, индуцированный моделью дестабилизации медиального мениска (DMM), у мышей SV129

Для исследования эффекта активности антител к ИЛ-1 $\alpha$  и к ИЛ-1 $\beta$  на замедление прогрессирования дегенерации хряща при остеоартрите также использовали альтернативную модель на животных. Остеоартритическая модель дестабилизации медиального мениска (DMM) мыши является менее инвазивной и воспалительной, чем модель JIM (см. выше) и приводит к повреждениям, главным образом, центральной несущей весовую нагрузку области медиального большеберцового плато и медиального мыщелка бедренной кости. Тяжесть и локализация повреждений после DMM больше соответствуют друг другу по сравнению с JIM.

Пример 3.3.5.A. Дизайн исследования

Самцов мышей SV129, весящих приблизительно 30 граммов, содержащихся по 5/клетку, анестезировали в день 0 с использованием смеси кетамин/ксилазин, вводимой интраперитонеально (*i.p.*), и затем медиальную коллатеральную связку подвергали отделению тупым путем и рассекали для отгибания мениска относительно бедренной кости. Полость сустава ушивали викриловым швом 8-0. Кожу соединяли клеем для ран. В случае ложного хирургического вмешательства, делали вертикальный разрез кожи медиально относительно колена и открывали капсулу сустава. Капсулу ушивали викриловым швом 8-0 и кожу соединяли клеем для ран. Затем группы животных подвергали лечению интраперитонеальными (*i.p.*) инъекциями антитела или разбавителя согласно дизайну исследования, представленному в таблице 22. Двух наивных мышей, подобранных по полу, возрасту и линии, также включали в исследование. Животных подвергали эвтаназии после 8 недель лечения и собирали коленные суставы в 10%

нейтральный забуференный формалин.

Исследуемая группа	Соединение	Количество животных (n)	Доза, путь и режим	Время умерщвления животных
A	Ложное (нет)	5	нет	8 недель
B	Разбавитель (PBS)	10	i.p., 3 раза в неделю	8 недель
C	mAb к ИЛ-1 $\alpha$ и mAb к ИЛ-1 $\beta$	11	180 мкг/мышь для каждого антитела, i.p., каждый 4-й день	8 недель
D	DVD-Ig к mIL-1 $\alpha/\beta$	10	250 мкг/мышь, i.p., 3 раза в неделю	8 недель

#### Пример 3.3.5.В. Исследование тканей

Фиксированные формалином образцы декальцифицировали и получали срезы образцов во фронтальной плоскости по 15 последовательных срезов каждый. Каждый срез составлял приблизительно 6 мкм в толщину, и последовательные срезы отделяли на 70 мкм. Все микроскопические препараты окрашивали толуидиновым синим (Т. Blue). Сертифицированный ветеринарный патолог оценивал срезы способом Chambers (Chambers et al. (2001) Arthritis Rheum 44: 1455-65) на дегенерацию хряща (см. ниже). Проводили балльную оценку 0-6 по шкале, представленной в таблице 23, для каждой из четырех поверхностей хряща, медиальный мышцелок бедренной кости (MFC), медиальное большеберцовое плато (MTP), латеральный мышцелок бедренной кости (LFC) и латеральное большеберцовое плато (LTP).

Степень	Остеоартритическое повреждение
0	Отсутствие повреждения
1	Шероховатая суставная поверхность и небольшие разрастания соединительной ткани
2	Разрастание соединительной ткани ниже непосредственно поверхностного слоя (зона 2) и некоторая потеря поверхностной пластинки
3	Потеря поверхностной пластинки и разрастание соединительной ткани, распространяющееся в кальцифицированный хрящ
4	Значительные разрастания соединительной ткани и эрозия хряща до субхондральной кости
5	Значительные разрастания соединительной ткани и эрозия хряща до 80%
6	Потеря хряща до 80%

Статистический анализ осуществляли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism версии 4.03 с использованием критерия Манна-Уитни.

#### Пример 3.3.5.С. Результаты

Как показано на фигуре 6, комбинированное лечение с использованием моноклонального антитела к ИЛ-1 $\alpha$  мыши (9H10, 6 мг/кг) и моноклонального антитела к ИЛ-1 $\beta$  мыши (10G11, 6 мг/кг) или с использованием связывающего белка DVD-Ig к ИЛ-1 $\alpha/\beta$  (6 мг/кг) значительно снижало дегенерацию хряща в остеоартритической модели DMM мыши.

Пример 3.3.6. Титрование антител к ИЛ-1 $\alpha$  и антител к ИЛ-1 $\beta$  у мышей в остеоартритической модели дестабилизации медиального мениска (DMM) (8-недельное исследование)

Проводили 8-недельное исследование эффектов на дегенерацию хряща в ответ на различные дозы моноклонального антитела к mIL-1 $\alpha$  (mAb 9H10) и моноклонального антитела к mIL-1 $\beta$  (mAb 10G11) в отдельности или в комбинации и связывающего белка DVD-Ig к mIL-1 $\alpha/\beta$  10G11-9H10 в остеоартритической модели DMM.

#### Пример 3.3.6.А. Дизайн исследования

Самцов мышей SV129 массой приблизительно 30 граммов, содержащихся по 5/клетку,

анестезировали в День 0 с использованием смеси кетамин/ксилазин, вводимой интраперитонеально (i.p.), и затем медиальную коллатеральную связку подвергали тупому отделению, и рассекали для отгибания мениска относительно бедренной кости. Полость сустава ушивали викриловым швом 8-0. Кожу соединяли клеем для ран. В случае ложного хирургического вмешательства, вертикальный разрез кожи делали медиально относительно колена и открывали капсулу сустава. Капсулу ушивали викриловым швом 8-0 и кожу соединяли клеем для ран. Затем группы животных подвергали лечению интраперитонеальными (i.p.) инъекциями моноклонального антитела к mIL-1 $\alpha$ , к mIL-1 $\beta$  (в отдельности или в комбинации), связывающим белком DVD-Ig к mIL-1 $\alpha/\beta$  или разбавителем согласно дизайну исследования, представленному в таблице ниже (таблица 24). Животных подвергали эвтаназии через 8 недель лечения и собирали коленные суставы в 10% нейтральный забуференный формалин.

Таблица 24  
Дизайн исследования для тестирования различных способов лечения в остеоартритической модели DMM

Исследуемая группа	Соединение	Количество животных (n)	Доза, путь и режим	Время умерщвления животных
A	Ложное (нет)	5	нет	8 недель
B	Разбавитель (PBS)	10 (9)	i.p., 3 раза в неделю	8 недель
C	Антитело к ИЛ-1 $\alpha$ (9H10)	10 (5)	180 мкг/мышь, i.p., каждый 4-й день	8 недель
D	Антитело к ИЛ-1 $\beta$ (10G11)	10 (8)	180 мкг/мышь, i.p., каждый 4-й день	8 недель
E	Антитело к ИЛ-1 $\alpha$ (9H10) + антитело к ИЛ-1 $\beta$ (10G11)	10 (8)	180 мкг/мышь для каждого антитела, i.p., каждый 4-й день	8 недель
F	DVD-Ig к mIL- $\alpha\beta$	10 (9)	62,5 мкг/мышь, i.p., 3 раза в неделю	8 недель
G	DVD-Ig к mIL- $\alpha\beta$	10	125 мкг/мышь, i.p., 3 раза в неделю	8 недель
H	DVD-Ig к mIL- $\alpha\beta$	10	250 мкг/мышь, i.p., 3 раза в неделю	8 недель

Числа в скобках в колонке 3 приведенной выше таблицы (количество животных) представляют собой точное количество животных, включенных в набор данных.

Краткое описание критериев исключения представлено ниже:

Группа В: Только 9 животных включали в группу В. Одно животное исключали из набора данных, т.к. при гистологическом исследовании медиальный мениск являлся интактным, и, по существу, не наблюдали остеоартритических изменений.

Группа С: Только 5 животных включали в группу С. Пять животных исключали из набора данных т.к. при гистологическом исследовании медиальный мениск являлся, главным образом, интактным, и наблюдали небольшое остеоартритическое изменение.

Группа D: Только 8 животных включали в группу D. Микроскопические препараты для одного животного отсутствовали. Другое животное исключали из набора данных, т.к. при гистологическом исследовании медиальный мениск являлся, главным образом, интактным, и наблюдали небольшое остеоартритическое изменение.

Группа E: Только 8 животных включали в группу E. Двух животных исключали, т.к. данные для них сочли статистическими выбросами.

Группа F: Только 9 животных включали в группу F. Одно животное исключали из набора данных, т.к. при гистологическом исследовании медиальный мениск являлся интактным, и, по существу, не наблюдали остеоартритических изменений.

Пример 3.3.6.B. Подготовка и анализ ткани

Получали ткани и проводили балльную оценку, как описано выше в примере 3.3.5.

Пример 3.3.6.C. Результаты

Результаты представлены на фигуре 7. Аналогично результатам, полученным на остеоартритической модели нестабильности сустава (JIM) (см. выше), лечение моноклональным антителом к ИЛ-1 $\alpha$  (9H10) или моноклональным антителом к ИЛ-1 $\beta$  (10G11) в отдельности приводило к снижению дегенерации хряща, различия которого с наблюдаемым при использовании разбавителя в случае контрольных суставов не являлись статистически значимыми. Однако, комбинированное лечение с использованием моноклональных антител или связывающего белка DVD-Ig к ИЛ-1 $\alpha/\beta$  (за исключением DVD-Ig к ИЛ-1 $\alpha/\beta$  при 1,5 мг/кг) значительно снижало среднюю сумму баллов по шкале Chambers (свидетельствующей об общей дегенерации хряща) и средний максимум баллов по шкале Chambers (наиболее поврежденная область в суставе). Статистически значимый эффект дозы наблюдали для средней суммы баллов по шкале Chambers в исследуемых группах DVD-Ig к mIL-1 $\alpha/\beta$ . Таким образом, в этом исследовании 8 недель лечения с использованием моноклонального антитела к mIL-1 $\alpha$  и моноклонального антитела к mIL-1 $\beta$  (6 мг/кг, каждому) и с использованием связывающего белка DVD-Ig к mIL-1 $\alpha/\beta$  (при дозе 3 и 6 мг/кг) снижали прогрессирование дегенерации хряща, индуцированное в остеоартритической модели DMM.

Пример 3.3.7. Эффекты лечения антителами к ИЛ-1 $\alpha$  и к ИЛ-1 $\beta$  и низкомолекулярными соединениями на дегенерацию хряща у животных в остеоартритической модели дестабилизации медиального мениска (DMM)

Показано, что доксициклин предотвращает дегенерацию хряща в остеоартритической модели DMM (Effects of Disease-modifying Osteoarthritis Drugs in an in vivo Animal Model ISilva et al., Univ. Mass. Med. School, Worcester, MA, USA, Trans ORS 2009 - необходимо полное цитирование), а также в клиническом испытании на людях (Brandt et al. (2005) Arthrit. Rheum. 52(7): 2015-2025). В этом исследовании эффект лечения животных на модели DMM с использованием доксициклина сравнивали с эффектом лечения животных с использованием комбинации моноклональных антител к ИЛ-1 $\alpha$  и к ИЛ-1 $\beta$ .

Пример 3.3.7.A. Дизайн исследования

Медиальную коллатеральную связку самцов мышей SV129 массой приблизительно 30 граммов подвергали тупому отделению и рассекали ее для отгибания мениска относительно бедренной кости. Полость сустава ушивали викриловым швом 8-0. Кожу соединяли клеем для ран. В случае ложных хирургических вмешательств делали вертикальный разрез кожи медиально относительно колена и открывали капсулу сустава. Капсулу ушивали викриловым швом 8-0, и соединяли кожу клеем для ран. Затем группы животных подвергали лечению перорально (р.о.) или с помощью интраперитонеальных (i.p.) инъекций разбавителя или лекарственных средств согласно дизайну исследования, представленному в таблице 25. В исследование также включали трех наивных мышей, подходящих по полу, возрасту и линии. Животных подвергали эвтаназии через 4 недели лечения и собирали коленные суставы в 10% нейтральный забуференный формалин.

Таблица 25 Дизайн исследования для тестирования различных способов лечения антителами к ИЛ-1 и лечения доксициклином в остеоартритической модели DMM				
Исследуемая группа	Соединение	Количество животных (n)	Доза, путь и режим	Время умерщвления животных
A	Ложное (нет)	3	нет	4 недели
B	Разбавитель (0,02% Tween 80/0,5% НРМС)	10	р.о., BID	4 недели
C	Доксициклин	10	30 мг/кг, р.о., BID	4 недели
D	Антитело к ИЛ-1 $\alpha$ (9H10) + антитело к ИЛ-1 $\beta$ (10G11)	10	180 мкг/мышь для каждого антитела, i.p. каждый 4-й день	4 недели

### Пример 3.3.7.В. Подготовка и анализ ткани

Получали ткани и проводили балльную оценку, как описано выше в примере 3.3.5.

### Пример 3.3.7.С. Результаты

Результаты представлены на фигуре 8. В условиях исследования 4 недель лечения с использованием комбинации моноклональных антител к ИЛ-1 $\alpha$  и к ИЛ-1 $\beta$  в дозе 180 мкг/мышь каждое приводило к значительному снижению остеоартритических изменений, индуцируемых дестабилизацией медиального мениска у самцов мышей SV129. Средняя сумма баллов по шкале Chambers и средние максимальные баллы по шкале Chambers значительно снижались, и средняя общая сумма баллов по шкале Chambers значительно снижалась в результате этого комбинированного лечения по сравнению с контрольной группой при использовании разбавителя. Лечение доксициклином при дозе 30 мг/кг также приводило к аналогичному терапевтическому эффекту, но комбинированное лечение антителами являлось более эффективным.

### Пример 4. Эффективность терапии к ИЛ-1 $\alpha/\beta$ при лечении боли

С использованием модели DMM также получали измеряемую боль у мышей. Недавно, Malfait et al. (см., Malfait et al. (2010) *Osteoarthritis Cartilage*, 18: 572-580) показали устойчивое снижение порога отдергивания конечности (свидетельство механической аллодинической боли) в задних конечностях после DMM, но не после "ложной" операции. Эффективность терапии к ИЛ-1 $\alpha/\beta$  исследовали на модели DMM на животных. Как показано в этой серии исследований, мыши с хирургическим вмешательством DMM проявляли аллодинию уже в день 7 после хирургического вмешательства и демонстрировали снижение порога отдергивания конечности до дня 35.

Потенциал терапии к ИЛ-1 в снижении боли тестировали на модели ОА DMM мыши в отношении механической аллодинии. Введение доз комбинации mAb к ИЛ-1 $\alpha$  и к ИЛ-1 $\beta$  начинали в день хирургического вмешательства и повторяли дважды в неделю в течение 5 недель. Животных подвергали лечению разбавителем PBS в отдельности, с IgG-изотипическим контролем или с комбинацией mAb к ИЛ-1 $\alpha$  и к ИЛ-1 $\beta$  (при дозе 6 мг/кг для каждого mAb). Животных еженедельно тестировали на порог отдергивания конечности. Ипсилатеральная (подвергнутая хирургическому вмешательству) конечность в группах подвергнутых лечению PBS или IgG-изотипическим контролем проявляла аллодинию (являлась болезненной) по сравнению с контралатеральной (не подвергнутой хирургическому вмешательству) конечности или по сравнению с животными, подвергнутыми "ложной" операции. См. фигуру 9. Наоборот, группа подвергнутых лечению комбинацией mAb к ИЛ-1 $\alpha$  и к ИЛ-1 $\beta$  демонстрировала значительно более высокий порог отдергивания конечности, что свидетельствует о снижении развития аллодинии (боли) по сравнению с группами подвергнутых лечению разбавителем PBS или IgG-изотипическим контролем на неделе 5 (день 35). См. фигуру 10. Это снижение боли наблюдали уже на неделе 1 после лечения (данные не представлены).

Для оценки эффекта терапии ИЛ-1 при развившейся боли животных в группе IgG-контроля с развившимся ОА и механической аллодинией подвергали лечению в день 35 с использованием комбинации моноклональных антител к ИЛ-1 $\alpha$  и к ИЛ-1 $\beta$  и тестировали порог отдергивания конечности через 24 часа (день 36). Данные показали, что комбинированное лечение mAb к ИЛ-1 $\alpha$  и к ИЛ-1 $\beta$  реверсировало аллодинию (снижало боль при ОА) у животных с развившимся заболеванием. Эти данные свидетельствуют о том, что терапия к ИЛ-1 обеспечивает аналгезирующий эффект независимо от потенциального, модифицирующего заболевание эффекта. См. фигуру 11.

Пример 5. Дальнейшее исследование эффективности комбинированного лечения к ИЛ-1 $\alpha$ / $\beta$  при лечении боли

Дополнительно оценивали потенциал терапии кв ИЛ-1 для снижения боли модели ОА DMM мыши (см. выше) в отношении механической аллодинии. Введение доз комбинации mAb к ИЛ-1 $\alpha$  и к ИЛ-1 $\beta$  начинали в день хирургического вмешательства и повторяли дважды в неделю в течение 4 недель. Животных после DMM подвергали лечению с использованием только разбавителя PBS, mAb к ИЛ-1 $\alpha$  (6 мг/кг), mAb к ИЛ-1 $\beta$  (6 мг/кг) или комбинации mAb к ИЛ-1 $\alpha$  mAb (6 мг/кг) и к ИЛ-1 $\beta$  (6 мг/кг), вводимых интраперитонеально (i.p.) дважды в неделю в течение четырех недель. Животных тестировали на аллодинию в день 28. Ипсилатеральные (подвергнутые хирургическому вмешательству) конечности в группах подвергнутых лечению разбавителем проявляли аллодинию (являлась болезненной) по сравнению с контралатеральной (не подвергнутой хирургическому вмешательству) конечностью или по сравнению с животными, подвергнутыми "ложной" операции. См. фигуру 12. Аналогично, конечности в группе подвергнутых лечению mAb к ИЛ-1 $\alpha$  или к ИЛ-1 $\beta$  в отдельности проявляли аллодинию (являлись болезненными). Наоборот, группа подвергнутых лечению комбинацией mAb к ИЛ-1 $\alpha$  и к ИЛ-1 $\beta$  демонстрировала значительно более высокий порог отдергивания конечности, что свидетельствует о снижении развития аллодинии (боли) по сравнению с группами подвергнутыми лечению разбавителем (фигура 12).

Пример 6. Дозозависимая эффективность комбинированного лечения к ИЛ-1 $\alpha$ / $\beta$  при лечении боли

Введение животным в модели DMM мыши доз комбинации mAb к ИЛ-1 $\alpha$  и к ИЛ-1 $\beta$  начинали в день хирургического вмешательства и повторяли дважды в неделю в течение четырех недель. Животных подвергали лечению только разбавителем PBS или комбинацией mAb к ИЛ-1 $\alpha$  и mAb к ИЛ-1 $\beta$ , вводимых интраперитонеально (i.p.) каждые четыре дня в течение четырех недель в концентрации 1 мг/кг, в концентрации 3 мг/кг или в концентрации 6 мг/кг. В день 28 животных тестировали на порог отдергивания конечности. Ипсилатеральные (подвергнутые хирургическому вмешательству) конечности в группах подвергнутых лечению разбавителем демонстрировали значительное снижение порога отдергивания конечности, что свидетельствует об аллодинии (боли) по сравнению с контралатеральной (не подвергнутой хирургическому вмешательству) конечности или по сравнению с животными, подвергнутыми "ложной" операции (фигура 13). Наоборот, группа подвергнутых лечению комбинацией mAb к ИЛ-1 $\alpha$  и к ИЛ-1 $\beta$  демонстрировала дозозависимое повышение порога отдергивания конечности, что свидетельствует о снижении развития аллодинии (боли) по сравнению с группами подвергнутых лечению разбавителем (фигура 13).

Пример 7. Комбинированное лечение к ИЛ-1 $\alpha$ / $\beta$  при развившейся боли

Для оценки эффекта комбинированного лечения к ИЛ-1 $\alpha$ / $\beta$  при развившейся боли, животных в модели DMM мыши с развившимся ОА и механической аллодинией подвергали лечению в день 27 с использованием комбинации mAb к ИЛ-1 $\alpha$  и mAb к ИЛ-1 $\beta$ , вводимых интраперитонеально (i.p.) в концентрации 1 мг/кг, в концентрации 3 мг/кг или в концентрации 6 мг/кг за 24 часа до тестирования на аллодинию в день 28. Результаты представлены на фигуре 14. Данные демонстрировали, что комбинированное лечение mAb к ИЛ-1 $\alpha$  и к ИЛ-1 $\beta$  реверсировало механическую аллодинию (снижало боль при ОА) у животных с развившимся заболеванием дозозависимым образом (фигура 14).

Пример 8. Антигипералгезический эффект комбинированного лечения к ИЛ-1 $\alpha$ / $\beta$

Для оценки того, вызывает ли нейтрализация ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  антиноцицептивные

эффекты в условиях воспалительной боли, к mAb ИЛ-1 $\alpha$  и к ИЛ-1 $\beta$  оценивали на способность реверсировать развившуюся боль в конечности мыши на модели каррагенан-индуцированной ноцицептивной боли.

Эффективность mAb к ИЛ-1 $\alpha$  и к ИЛ-1 $\beta$  оценивали при введении в отдельности или в комбинации на модели каррагенан-индуцированной боли у мыши (фигура 15). Через 30 часов после внутривенной инъекции каррагенана: 900 мкг mAb к ИЛ-1 $\alpha$ , mAb к ИЛ-1 $\beta$  или их комбинации вводили различным группам мышей. Тестирование термической гипералгезией осуществляли через 48 и 96 часов после введения каррагенана. Как показано в предыдущем исследовании, доза комбинации 900 мкг значительно снижала термическую гипералгезию (конечность, в которую вводили каррагенан -  $8,11 \pm 0,62$  сек по сравнению с  $4,98 \pm 0,34$  сек в группе PBS через 48 часов,  $p < 0,01$ , фигура 15A; конечность, в которую каррагенан  $7,62 \pm 0,45$  сек по сравнению с  $4,45 \pm 0,55$  сек в группе PBS через 96 часов,  $p < 0,01$ , фигура 15B). Антиноцицептивный эффект в группе, которой вводили 900 мкг комбинации, составлял  $53 \pm 7\%$  через 48 часов и  $82 \pm 11\%$  через 96 часов. Группа положительного контроля диклофенака (нестероидного противовоспалительного анальгетика) снова проявляла значительное снижение термической гипералгезии ( $p < 0,01$  для обоих моментов времени). Наоборот, не наблюдали значительного антиноцицептивного эффекта в обоих моментах времени при введении mAb к ИЛ-1 $\alpha$  и к ИЛ-1 $\beta$  в отдельности, что свидетельствует о необходимости одновременной нейтрализации ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  для антиноцицептивной эффективности в модели каррагенан-индуцированной воспалительной боли у мышей.

Пример 9. Дозозависимый антигипералгезический эффект комбинированного лечения к ИЛ-1 $\alpha/\beta$

Как показано на фигуре 16, внутривенная инъекция каррагенана у мышей (самок BALB/c) приводила к длительной термической гипералгезии, о чем свидетельствует снижение задержки отдергивания конечности в ответ на стимуляцию лучистым теплом (тестирование осуществляли через 48 и 96 часов после инъекции каррагенана;  $p < 0,01$  для неповрежденного контроля по сравнению с конечностями, в которые вводили каррагенан, в группе, которой вводили разбавитель PBS, в обоих моментах времени). Различные группы животных подвергали лечению разбавителем или комбинацией mAb к ИЛ-1 $\alpha$  и к ИЛ-1 $\beta$  (100, 300, или 900 мкг/мышь каждого mAb) через 30 часов после инъекции каррагенана. Наблюдали дозозависимый эффект, при этом доза 900 мкг комбинации mAb к ИЛ-1 $\alpha$  и к ИЛ-1 $\beta$  значительно снижала термическую гипералгезию (конечность, в которую вводили каррагенан -  $3,23 \pm 0,34$  сек в группе PBS по сравнению с  $7,88 \pm 0,93$  сек в группах, которым вводили 900 мкг, через 48 часов,  $p < 0,01$ , фигура 16A; конечность, в которую вводили каррагенан -  $4,45 \pm 0,55$  сек в группе PBS по сравнению с  $7,62 \pm 0,45$  сек в группах, которым вводили 900 мкг, через 96 часов,  $p < 0,01$ , фигура 16B). Антиноцицептивный эффект в группе, которой вводили 900 мкг, составлял  $70 \pm 9\%$  через 48 часов и  $62 \pm 4\%$  через 96 часов. Нестероидный противовоспалительный анальгетик диклофенак (30 мг/кг) включали в исследование в качестве положительного контроля, и он повышал среднюю задержку отдергивания конечности в случае поврежденной конечности до  $7,01 \pm 0,58$  сек через 48 часов и  $7,48 \pm 0,34$  сек через 96 часов при введении р.о. за 60 минут перед тестированием ( $p < 0,01$  в обоих моментах времени). В группах IgG-контроля и низкой дозы mAb 100 мкг термическая гипералгезия не снижалась в любой момент времени. mAb и диклофенак не изменяли значительно значения задержки отдергивания конечности в случае контрольной неповрежденной конечности.

Пример 10. Эффективность комбинированного лечения к ИЛ-1 $\alpha/\beta$  в модели боли

## CFA

Модель воспалительной боли, индуцированной CFA (полным адьювантом Фрейнда), использовали для тестирования того, будет ли комбинация mAb к ИЛ-1 $\alpha$  и к ИЛ-1 $\beta$  иметь эффективность к механической аллодинии. Таким образом, механическую аллодинию оценивали с использованием мононити фон Фрея у животных (самок мышей BALB/c) через 48 часов после внутривенных инъекций CFA. Как показано на фигуре 17А, внутривенная инъекция CFA вызывает устойчивую механическую аллодинию, о чем свидетельствует сниженный порог отдергивания конечности в конечности, в которую инъецировали CFA, подвергнутую лечению только разбавителем PBS ( $0,052 \pm 0,028$  г по сравнению с  $0,860 \pm 0,090$  г в контралатеральной неповрежденной конечности,  $p < 0,01$ ). Отдельные группы животных подвергали лечению IgG-изотипическим контролем или комбинацией mAb к ИЛ-1 $\alpha$  и к ИЛ-1 $\beta$  (900 мкг/мышь каждого mAb) через 30 часов после инъекции CFA. Группа подвергнутых лечению mAb демонстрировала значительное снижение механической аллодинии ( $0,419 \pm 0,101$  г,  $p < 0,01$  по сравнению с разбавителем PBS, фигура 17А). Величина эффективности (% MPE) составляла  $65,51 \pm 12,35\%$  (фигура 17В). Противовоспалительный, анальгетик диклофенак, используемый в качестве положительного контроля (30 мг/кг, за 1 час до лечения), также снижал механическую аллодинию, повышая порог отдергивания конечности ( $0,359 \pm 0,088$  г,  $p < 0,01$  по сравнению с разбавителем PBS) с %MPE  $64,51 \pm 10,20\%$ .

Пример 11. Эффективность комбинированного лечения к ИЛ-1 $\alpha/\beta$  при нейропатической боли

На модели лигатуры спинального нерва L5/L6 (SNL) у мышей (самцов CD1) исследовали, будет ли комбинированное лечение mAb к ИЛ-1 $\alpha$  и к ИЛ-1 $\beta$  иметь эффективность в условиях нейропатической боли. Тестирование осуществляли через шесть дней после хирургического вмешательства SNL, через 24 и 72 часа после этого животных подвергали лечению комбинацией mAb (900 мкг /мышь каждого mAb). Наблюдали механическую аллодинию у мышей, подвергнутых лечению только разбавителем PBS после хирургического вмешательства SNL, о чем свидетельствует сниженный порог отдергивания конечности в ответ на стимуляцию мононити фон Фрея ( $0,073 \pm 0,032$  г по сравнению с  $0,735 \pm 0,109$  г для контралатеральной конечности через 24 часа, фигура 18А;  $0,128 \pm 0,048$  г по сравнению с  $0,732 \pm 0,132$  г для контралатеральной конечности через 72 часа, фигура 18В;  $p < 0,01$  в обоих моментах времени). Группа подвергнутых лечению mAb демонстрировала значительное снижение механической аллодинии в обоих моментах времени ( $0,477 \pm 0,131$  г,  $p < 0,01$  по сравнению с разбавителем PBS через 24 часа, фигура 18А;  $0,527 \pm 0,111$  г,  $p < 0,01$  по сравнению с разбавителем PBS через 72 часа, фигура 18В). Величина эффективности (% MPE) составляла  $72,20 \pm 14,39\%$  через 24 часа и  $80,62 \pm 12,33\%$  через 72 часа (фигура 19). Положительный контроль габапентин (100 мг/кг, за 1 час до лечения) являлся полностью эффективным в снижении механической аллодинии, значительно повышая порог отдергивания конечности ( $0,858 \pm 0,077$  г через 24 часа и  $1,138 \pm 0,096$  г через 72 часа,  $p < 0,01$  по сравнению с разбавителем PBS в обоих моментах времени). Наоборот, группа IgG-контроля не демонстрировала какого-либо эффекта на механическую аллодинию в обоих моментах времени.

## Выводы исследования лечения боли

Результаты исследований боли, представленных в рамках изобретения, свидетельствуют о том, что комбинированное лечение к ИЛ-1 по изобретению является эффективным в качестве лечения любой формы боли и не только боли, ассоциированной с остеоартритом. Такое комбинированное лечение к ИЛ-1 $\alpha/\beta$  можно использовать для

лечения боли у индивидуума, страдающего любым типом боли, включая, в качестве неограничивающих примеров, аллодинию, гипералгезию и комбинацию аллодинии и гипералгезии. Можно проводить комбинированное лечение к ИЛ-1 $\alpha$ / $\beta$  для индивидуума посредством введения индивидууму комбинации (например, в виде смеси, при  
 5 одновременном введении или последовательном введении) связывающих белков к ИЛ-1 $\alpha$  и к ИЛ-1 $\beta$ , такой как комбинация моноклональных антител к ИЛ-1 $\alpha$  и к ИЛ-1 $\beta$ , или посредством введения индивидууму белка, связывающегося и с ИЛ-1 $\alpha$ , и с ИЛ-1 $\beta$ , такого как биспецифическое антитело или связывающий белок DVD-Ig к ИЛ-1 $\alpha$ / $\beta$ , связывающийся и с ИЛ-1 $\alpha$ , и с ИЛ-1 $\beta$ .

10 Включение в качестве ссылки

Содержание всех приведенных ссылок (включая литературные источники, патенты, патентные заявки и веб-сайты), которые могли быть процитированы на всем протяжении этой заявки, таким образом, определенно включают в качестве ссылки в полном объеме, как и цитируемые в них ссылки. В практическом осуществлении настоящего изобретения  
 15 применяют, если не указано иначе, общепринятые способы фармации, иммунологии, молекулярной биологии и клеточной биологии, хорошо известные в этой области.

Эквиваленты

Изобретение можно осуществлять в других конкретных формах без отклонения от его сущности или важных свойств. Приведенные выше варианты осуществления, таким  
 20 образом, необходимо рассматривать как во всех отношениях иллюстративные и неограничивающие изобретение, представленное в рамках изобретения. Таким образом, объем изобретения скорее приведен в формуле изобретения, а не представленном выше описании, и все изменения, находящиеся в пределах значения и диапазона эквивалентности формулы изобретения, таким образом, необходимо включать в рамки  
 25 изобретения.

#### Формула изобретения

1. Способ лечения остеоартрита у индивидуума, страдающего остеоартритом, включающий стадию введения индивидууму:

30 иммуноглобулинового связывающего белка с двойным вариабельным доменом (DVD-Ig), связывающего и ИЛ-1 $\alpha$ , и ИЛ-1 $\beta$ , с лечением, таким образом, остеоартрита у индивидуума.

2. Способ по п. 1, где указанный связывающий белок, связывающийся и с ИЛ-1 $\alpha$ , и с ИЛ-1 $\beta$ , составляют в фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически  
 35 приемлемый носитель.

3. Способ по п. 1, где указанный связывающий белок, связывающийся и с ИЛ-1 $\alpha$ , и с ИЛ-1 $\beta$ , является кристаллизованным.

4. Способ по п. 3, где указанный кристаллизованный связывающий белок составляют в композиции, дополнительно содержащей необязательный ингредиент и полимерный  
 40 носитель.

5. Способ по п. 4, где указанный полимерный носитель является полимером, выбранным из одного или нескольких из группы, состоящей из поли(акриловой кислоты), поли(цианоакрилата), поли(аминокислоты), поли(ангидрида), поли(депсипептида), сложного полиэфира, поли(молочной кислоты), сополимера молочной  
 45 и гликолевой кислот или PLGA, поли(b-гидроксипропирилата), поли(капролактона), поли(диоксанона); полиэтиленгликоля, поли(гидроксипропил)метакриламида, поли[(орган) фосфазена], поли(ортоэфира), поли(винилового спирта), поливинилпирролидона, сополимера малеинового ангидрида и алкилвинилового простого эфира, полиола-

плюроники, альбумина, альгината, целлюлозы и производного целлюлозы, коллагена, фибрина, желатина, гиалуроновой кислоты, олигосахарида, гликозаминогликана, сульфатированного полисахарида, их смеси и сополимера.

6. Способ по п. 4, где указанный необязательный ингредиент выбран из группы, состоящей из альбумина, сахарозы, трегалозы, лактитола, желатина, гидроксипропил-β-циклодекстрина, метоксиполиэтиленгликоля и полиэтиленгликоля.

7. Способ по п. 1, дополнительно включающий введение индивидууму второго средства, где указанное второе средство является одним или несколькими соединениями из группы, состоящей из будезонида, эпидермального фактора роста, кортикостероидов, циклоспорина, сульфасалазина, аминосалицилатов, б-меркаптопурина, азатиоприна, метронидазола, ингибиторов липоксигеназы, месалазина, олсалазина, балсалазида, антиоксидантов, ингибиторов тромбоксана, антагонистов рецептора ИЛ-1, моноклональных антител к ИЛ-1β, моноклональных антител к ИЛ-6, факторов роста, ингибиторов эластазы, пиридинил-имидазольных соединений, антител к ФНО, LT, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-15, ИЛ-16, ИЛ-18, ИЛ-23, ЕМАР-II, ГМ-КСФ, FGF и PDGF, антител к CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 или их лигандам, метотрексата, циклоспорина, FK506, рапамицина, микофенолата мофетила, лефлуномида, НПВС, ибупрофена, преднизолона, ингибиторов фосфодиэстеразы, агонистов аденозиновых рецепторов, антитромботических средств, ингибиторов компонентов комплемента, адренергических средств, IRAK, NIK, IKK, p38, ингибиторов MAP-киназ, ингибиторов ИЛ-1β-превращающего фермента, ингибиторов ФНОα-превращающего фермента, ингибиторов передачи сигнала Т-клеток, ингибиторов металлопротеиназ, ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента, растворимых рецепторов цитокинов, растворимого рецептора ФНО p55, растворимого рецептора ФНО p75, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, противовоспалительных цитокинов, ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-11, ИЛ-13 и TGFβ.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где указанную стадию введения указанному индивидууму осуществляют по меньшей мере одним способом, выбранным из парентерального, подкожного, внутримышечного, внутривенного, внутрисуставного, внутрибронхиального, внутрибрюшного, внутрикапсульного, внутрихрящевого, внутривнутриполостного, внутримозжечкового, интрацеребровентрикулярного, внутритолстокишечного, интрацервикального, внутрижелудочного, внутривнутрипеченочного, интрамиокардиального, внутрикостного, внутритазового, внутривнутриперикардиального, интраперитонеального, внутривнутриплеврального, внутривнутрипростатического, внутривнутрилегочного, ректального, внутривнутрипочечного, интраретинального, интраспинального, интрасиновиального, интраторакального, внутривнутриматочного, интравезикального, болюсного, вагинального, ректального, буккального, сублингвального, интраназального и трансдермального.

9. Способ по п. 1, в котором остеоартрит включает остеоартритическое повреждение.

10. Способ по п. 1, в котором остеоартрит включает повреждение передней крестообразной связки.

11. Способ по п. 1, в котором остеоартрит включает дегенерацию хряща и экспрессию ИЛ-6.

12. Способ по п. 11, в котором дегенерация хряща включает дегенерацию бедренного хряща или дегенерацию большеберцового хряща.

13. Способ по п. 1, в котором введение связывающего белка оказывает антиноцицептивный эффект.

14. Способ по п. 1, в котором связывающий белок дополнительно лечит боль.

15. Способ по п. 14, в котором боль выбрана из группы, состоящей из аллодинии, гипералгезии и комбинации аллодинии и гипералгезии.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

## СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Abbott Laboratories  
 КАМАТН, Rajesh V.

<120> Лечение остеоартрита и боли

<130> АВТ-122.1 PCT (10918W001)

<140> PCT/US2012/024356  
 <141> 2012-02-08

<150> US 61/440,853  
 <151> 2011-02-08

<160> 151

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
 <211> 271  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Lys Val Pro Asp Met Phe Glu Asp Leu Lys Asn Cys Tyr Ser  
 1 5 10 15

Glu Asn Glu Glu Asp Ser Ser Ser Ile Asp His Leu Ser Leu Asn Gln  
 20 25 30

Lys Ser Phe Tyr His Val Ser Tyr Gly Pro Leu His Glu Gly Cys Met  
 35 40 45

Asp Gln Ser Val Ser Leu Ser Ile Ser Glu Thr Ser Lys Thr Ser Lys  
 50 55 60

Leu Thr Phe Lys Glu Ser Met Val Val Val Ala Thr Asn Gly Lys Val  
 65 70 75 80

Leu Lys Lys Arg Arg Leu Ser Leu Ser Gln Ser Ile Thr Asp Asp Asp  
 85 90 95

Leu Glu Ala Ile Ala Asn Asp Ser Glu Glu Glu Ile Ile Lys Pro Arg  
 100 105 110

Ser Ala Pro Phe Ser Phe Leu Ser Asn Val Lys Tyr Asn Phe Met Arg  
 115 120 125

Ile Ile Lys Tyr Glu Phe Ile Leu Asn Asp Ala Leu Asn Gln Ser Ile  
 130 135 140

Ile Arg Ala Asn Asp Gln Tyr Leu Thr Ala Ala Ala Leu His Asn Leu  
 145 150 155 160

Asp Glu Ala Val Lys Phe Asp Met Gly Ala Tyr Lys Ser Ser Lys Asp  
 165 170 175

Asp Ala Lys Ile Thr Val Ile Leu Arg Ile Ser Lys Thr Gln Leu Tyr  
 180 185 190

Val Thr Ala Gln Asp Glu Asp Gln Pro Val Leu Leu Lys Glu Met Pro  
 195 200 205

Glu Ile Pro Lys Thr Ile Thr Gly Ser Glu Thr Asn Leu Leu Phe Phe  
 210 215 220

Trp Glu Thr His Gly Thr Lys Asn Tyr Phe Thr Ser Val Ala His Pro  
 225 230 235 240

Asn Leu Phe Ile Ala Thr Lys Gln Asp Tyr Trp Val Cys Leu Ala Gly  
 245 250 255

Gly Pro Pro Ser Ile Thr Asp Phe Gln Ile Leu Glu Asn Gln Ala  
 260 265 270

<210> 2  
 <211> 153  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Phe Thr Met Gln Phe Val Ser Ser  
 145 150

<210> 3  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Phe Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175

RU 2563 830 C2

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 225 230 235 240  
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330  
 <210> 4  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 4  
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr



325

330

<210> 5  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 5

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 1 5 10 15

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 20 25 30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
 35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 100 105

<210> 6  
 <211> 105  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 6

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

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe  
 20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val  
 35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys  
 50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser  
 65 70 75 80



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

<400> 11

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala  
 1 5 10

<210> 12  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr  
 1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

<210> 13  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 13

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

<210> 14  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 14

Glu Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu  
 1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser  
 20 25 30

<210> 15  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 15

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala  
 1 5 10

<210> 16  
 <211> 32

<212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 16

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Val Leu Thr  
 1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

<210> 17  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 17

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

<210> 18  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 18

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser  
 20 25 30

<210> 19  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 19

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly  
 1 5 10

<210> 20  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 20

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

<210> 21  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 21

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

<210> 22  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 22

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser  
 20 25 30

<210> 23  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 23

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

<210> 24  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 24

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

<210> 25  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 25

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

<210> 26  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 26

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser  
 20 25 30

<210> 27  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 27

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly  
 1 5 10

<210> 28  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 28

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu  
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

<210> 29  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 29

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

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

<400> 30

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

	20	25	30
<210>	31		
<211>	14		
<212>	PRT		
<213>	Homo sapiens		
<400>	31		
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly			
1	5		10
<210>	32		
<211>	32		
<212>	PRT		
<213>	Homo sapiens		
<400>	32		
Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu			
1	5		10 15
Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg			
	20	25	30
<210>	33		
<211>	11		
<212>	PRT		
<213>	Homo sapiens		
<400>	33		
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser			
1	5		10
<210>	34		
<211>	30		
<212>	PRT		
<213>	Homo sapiens		
<400>	34		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala			
1	5		10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr			
	20	25	30
<210>	35		
<211>	14		
<212>	PRT		
<213>	Homo sapiens		
<400>	35		
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly			
1	5		10

<210> 36  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 36

Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15

Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30

<210> 37  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 37

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

<210> 38  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 38

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys  
 20

<210> 39  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 39

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

<210> 40  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 40

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 41  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 41

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 1 5 10

<210> 42  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 42

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys  
 20

<210> 43  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 43

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

<210> 44  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 44

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 45  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 45

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 1 5 10

<210> 46  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 46

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
 20

<210> 47  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 47

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

<210> 48  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 48

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 49  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 49

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 1 5 10

<210> 50  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 50

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly



<400> 55

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

<210> 56

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 57

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 1 5 10

<210> 58

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 1 5 10

<210> 59

<211> 16

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> последовательность пептидного линкера

<400> 59

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

<210> 60

<211> 17

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> последовательность пептидного линкера

&lt;400&gt; 60

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

Val

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; последовательность пептидного линкера

&lt;400&gt; 61

Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly  
 1 5

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; последовательность пептидного линкера

&lt;400&gt; 62

Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly  
 1 5 10

&lt;210&gt; 63

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; последовательность пептидного линкера

&lt;400&gt; 63

Ser Ala Lys Thr Thr Pro  
 1 5

&lt;210&gt; 64

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; последовательность пептидного линкера

&lt;400&gt; 64

Arg Ala Asp Ala Ala Pro

1

5

<210> 65  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> последовательность пептидного линкера

<400> 65

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser  
 1 5

<210> 66  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> последовательность пептидного линкера

<400> 66

Arg Ala Asp Ala Ala Ala Ala Gly Gly Pro Gly Ser  
 1 5 10

<210> 67  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> последовательность пептидного линкера

<400> 67

Arg Ala Asp Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 20 25

<210> 68  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> последовательность пептидного линкера

<400> 68

Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala  
 1 5 10 15

Arg Val

<210> 69  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> последовательность пептидного линкера  
  
 <400> 69

Ala Asp Ala Ala Pro  
 1 5

<210> 70  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> последовательность пептидного линкера  
  
 <400> 70

Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro  
 1 5 10

<210> 71  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> последовательность пептидного линкера  
  
 <400> 71

Thr Val Ala Ala Pro  
 1 5

<210> 72  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> последовательность пептидного линкера  
  
 <400> 72

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro  
 1 5 10

<210> 73  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> последовательность пептидного линкера

<400> 73

Gln Pro Lys Ala Ala Pro  
 1 5

<210> 74  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> последовательность пептидного линкера

<400> 74

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro  
 1 5 10

<210> 75  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> последовательность пептидного линкера

<400> 75

Ala Lys Thr Thr Pro Pro  
 1 5

<210> 76  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> последовательность пептидного линкера

<400> 76

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Thr Pro Leu Ala Pro  
 1 5 10

<210> 77  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> последовательность пептидного линкера

<400> 77

Ala Lys Thr Thr Ala Pro  
 1 5

<210> 78  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> последовательность пептидного линкера  
  
 <400> 78

Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro  
 1 5 10

<210> 79  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> последовательность пептидного линкера  
  
 <400> 79

Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
 1 5

<210> 80  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> последовательность пептидного линкера  
  
 <400> 80

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro  
 1 5 10

<210> 81  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> последовательность пептидного линкера  
  
 <400> 81

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 1 5

<210> 82  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> последовательность пептидного линкера

<400> 82

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

<210> 83

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> последовательность пептидного линкера

<400> 83

Gly Glu Asn Lys Val Glu Tyr Ala Pro Ala Leu Met Ala Leu Ser  
 1 5 10 15

<210> 84

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> последовательность пептидного линкера

<400> 84

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

<210> 85

<211> 15

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> последовательность пептидного линкера

<400> 85

Gly His Glu Ala Ala Ala Val Met Gln Val Gln Tyr Pro Ala Ser  
 1 5 10 15

<210> 86

<211> 24

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> последовательность пептидного линкера

<400> 86

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Thr Val Ala Ala  
 1 5 10 15

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro

20

<210> 87  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> последовательность пептидного линкера  
  
 <400> 87

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ala Ser Thr  
 1 5 10 15

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro  
 20 25

<210> 88  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> последовательность пептидного линкера  
  
 <400> 88

Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5

<210> 89  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 89

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Arg Asn Tyr  
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Asp Leu Lys Arg Met  
 35 40 45

Ala Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp  
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 90  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 90

Asn Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

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

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Tyr  
 85 90 95

Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg  
 100 105

<210> 91  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 91

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Leu Asn Ile Lys Asp Thr  
 20 25 30

Tyr Met His Trp Leu Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

RU 2 563 830 C2

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ala Lys Tyr Asp Pro Arg Phe  
 50 55 60

Leu Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Asp Gly Asn Phe His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 92  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 92

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Arg Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn  
 20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser  
 65 70 75 80

Val Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Thr Arg Tyr Pro Leu  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 93  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 93

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

RU 2563 830 C2

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr  
 20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr Leu Tyr Ser Gln Lys Phe  
 50 55 60

Lys Asp Thr Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

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

Ser Ser

- <210> 94
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> Mus musculus

<400> 94

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met  
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
 35 40 45

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu  
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Tyr Thr  
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys Arg  
 100 105

<210> 95  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 95

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

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

Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ser Tyr  
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys  
 85 90 95

Val Arg Phe Pro Thr Gly Asn Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 96  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 96

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr  
 20 25 30

Gly Asn Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp



RU 2 563 830 C2

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Pro Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Ser Gln Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Val Phe Ile Ile Glu Asn Met Leu Ser  
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu  
 85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg  
 100 105

<210> 99  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 99

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr  
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Phe Thr Ser Tyr Asn Pro Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Ile Gln Phe Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Thr Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 100  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 100

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30

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

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Val Ser Arg Met Glu Ala Glu  
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 101

<211> 22

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер для переменного домена легкой цепи 3D12.E3

<400> 101

atggtgtcca cagctcagtt cc

22

<210> 102

<211> 29

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер для переменного домена легкой цепи 3D12.E3

<400> 102

gcagccaccg tacgccggtt tatttccag

29

<210> 103

<211> 24

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ПЦР-праймер для гена Ск человека

<400> 103

cgtacgggtgg ctgcaccatc tgtc 24

<210> 104  
 <211> 23  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> ПЦР-праймер для гена Ск человека

<400> 104  
 tcaaacactct cccctgttga agc 23

<210> 105  
 <211> 22  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> ПЦР-праймер для переменного домена тяжелой цепи 3D12.E3

<400> 105  
 atggccttggg tgtggacstt gc 22

<210> 106  
 <211> 37  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> ПЦР-праймер для переменного домена тяжелой цепи 3D12.E3

<400> 106  
 gggcccttgg tgcagcgtga ggagacggtg actgagg 37

<210> 107  
 <211> 28  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> ПЦР-праймер для гена Сгамма1 человека

<400> 107  
 gcgtcgacca agggcccatc ggtcttcc 28

<210> 108  
 <211> 26  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> ПЦР-праймер для гена С гамма1 человека

<400> 108  
 tcatttaccc ggagacaggg agaggg 26

<210> 109

<211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> ПЦР-праймер для переменного домена тяжелой цепи 13F5.G5  
  
 <400> 109  
 atagaatgga gctgggtttt cctc 24  
  
  
 <210> 110  
 <211> 35  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> ПЦР-праймер для переменного домена тяжелой цепи 13F5.G5  
  
 <400> 110  
 gggcccttgg tcgacgctga ggagacggtg actga 35  
  
  
 <210> 111  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> ПЦР-праймер для переменного домена легкой цепи 13F5.G5  
  
 <400> 111  
 atggtcctca tgccttgct gttc 24  
  
  
 <210> 112  
 <211> 34  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> ПЦР-праймер для переменного домена легкой цепи 13F5.G5  
  
 <400> 112  
 gcagccaccg tacgcccgtt tatttccagc ttg 34  
  
  
 <210> 113  
 <211> 23  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> ПЦР-праймер для переменного домена тяжелой цепи 3D12.E3  
  
 <400> 113  
 cagatccagt tgggtcagtc tgg 23  
  
  
 <210> 114  
 <211> 35  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> ПЦР-праймер для переменного домена тяжелой цепи 13F5.G5

<400> 114  
 caccaactgg atctgtgagg agacgggtgac tgagg 35

<210> 115  
 <211> 27  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> ПЦР-праймер для переменного домена легкой цепи 3D12.E3

<400> 115  
 aatatccaga tgacacagac tacatcc 27

<210> 116  
 <211> 36  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> ПЦР-праймер для переменного домена легкой цепи 13F5.G5

<400> 116  
 gtgtcatctg gatattccgt tttatttcca gctttg 36

<210> 117  
 <211> 23  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> ПЦР-праймер для переменного домена тяжелой цепи 13F5.G5

<400> 117  
 tgggggtgtc gttttggctg agg 23

<210> 118  
 <211> 36  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> ПЦР-праймер для переменного домена тяжелой цепи 3D12.E3

<400> 118  
 gssaaaасга сассссаса gatccagttg gtgсag 36

<210> 119  
 <211> 27  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> ПЦР-праймер для переменного домена легкой цепи 13F5.G5

<400> 119

tggtgcagca tcagcccggtt ttatttc

27

<210> 120  
 <211> 33  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> ПЦР-праймер для переменного домена легкой цепи 3D12.E3

<400> 120  
 gctgatgctg caccaaatat ccaagatgaca cag

33

<210> 121  
 <211> 243  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Тандемные переменные домены тяжелой цепи DVD-Ig к ИЛ-1 альфа/бета

<400> 121

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

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

Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ser Tyr  
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys  
 85 90 95

Val Arg Phe Pro Thr Gly Asn Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser  
 115 120 125

Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys  
 130 135 140

Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Arg Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln  
 145 150 155 160

RU 2563 830 C2

Ala Pro Gly Lys Asp Leu Lys Arg Met Ala Trp Ile Asn Thr Tyr Thr  
 165 170 175

Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser  
 180 185 190

Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys  
 195 200 205

Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr  
 210 215 220

Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr  
 225 230 235 240

Val Ser Ser

- <210> 122
- <211> 330
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 122 -

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 123  
 <211> 221  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Тандемные переменные домены легкой цепи DVD-Ig к ИЛ-1  
 альфа/бета

<400> 123

RU 2563 830 C2

Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr  
 20 25 30  
 Gly Asn Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala  
 50 55 60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp  
 65 70 75 80  
 Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn  
 85 90 95  
 Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105 110  
 Asn Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
 115 120 125  
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Cys  
 130 135 140  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile  
 145 150 155 160  
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 165 170 175  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln  
 180 185 190  
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Tyr  
 195 200 205  
 Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Arg  
 210 215 220  
 <210> 124  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 124  
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln



Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Gln  
 115 120 125

Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr  
 130 135 140

Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Arg Asn Tyr Gly  
 145 150 155 160

Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Asp Leu Lys Arg Met Ala  
 165 170 175

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys  
 180 185 190

Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu  
 195 200 205

Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala  
 210 215 220

Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
 225 230 235 240

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 245

- <210> 126
- <211> 225
- <212> PRT
- <213> Искусственная последовательность

- <220>
- <223> Тандемные вариабельные домены легкой цепи DVD-Ig к ИЛ-1 альфа/бета

<400> 126

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr  
 20 25 30

Gly Asn Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp  
65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn  
85 90 95

Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105 110

Ala Asp Ala Ala Pro Asn Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu  
115 120 125

Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
130 135 140

Asp Ile Ser Asn Cys Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr  
145 150 155 160

Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro  
165 170 175

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile  
180 185 190

Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly  
195 200 205

Lys Thr Leu Pro Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn  
210 215 220

Arg  
225

<210> 127  
<211> 246  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Тандемные переменные домены тяжелой цепи DVD-Ig к ИЛ-1  
альфа/бета

<400> 127

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Leu Asn Ile Lys Asp Thr  
20 25 30

RU 2 563 830 C2

Tyr Met His Trp Leu Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ala Lys Tyr Asp Pro Arg Phe  
 50 55 60

Leu Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Asp Gly Asn Phe His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Gln Val His Leu  
 115 120 125

Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile  
 130 135 140

Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr Gly Val Ser Trp  
 145 150 155 160

Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Leu Ile Trp  
 165 170 175

Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Ser Pro Leu Lys Ser Arg Leu Ser  
 180 185 190

Ile Arg Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser  
 195 200 205

Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gln Arg Thr  
 210 215 220

Leu Trp Gly Tyr Asp Leu Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 225 230 235 240

Ser Val Thr Val Ser Ser  
 245

<210> 128

<211> 222

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тандемные вариабельные домены легкой цепи DVD-Ig к ИЛ-1 альфа/бета

<400> 128

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Arg Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn  
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser  
65 70 75 80

Val Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Thr Arg Tyr Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Glu Thr Thr Val Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Met Ala Ile  
115 120 125

Gly Glu Lys Val Thr Ile Arg Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Val  
130 135 140

Asp Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Pro Pro Lys Leu Leu  
145 150 155 160

Ile Ser Gln Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser  
165 170 175

Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Val Phe Ile Ile Glu Asn Met Leu  
180 185 190

Ser Glu Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro  
195 200 205

Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Arg  
210 215 220

<210> 129

<211> 246

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тандемные вариабельные домены тяжелой цепи DVD-Ig к ИЛ-1 альфа/бета

<400> 129

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr  
20 25 30

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

Gly Leu Ile Trp Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Ser Pro Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Arg Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Lys Gln Arg Thr Leu Trp Gly Tyr Asp Leu Tyr Gly Met Asp Tyr Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
115 120 125

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
130 135 140

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Leu Asn Ile Lys Asp Thr  
145 150 155 160

Tyr Met His Trp Leu Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
165 170 175

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ala Lys Tyr Asp Pro Arg Phe  
180 185 190

Leu Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
195 200 205

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
210 215 220

Ala Arg Gly Asp Gly Asn Phe His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
225 230 235 240

Thr Leu Thr Val Ser Ser  
245

<210> 130  
<211> 221  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Тандемные вариабельные домены легкой цепи DVD-Ig к ИЛ-1  
альфа/бета

<400> 130

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

Glu Lys Val Thr Ile Arg Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Val Asp  
20 25 30

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Pro Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Ser Gln Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Val Phe Ile Ile Glu Asn Met Leu Ser  
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Arg Phe Met Ser Thr Ser Val  
115 120 125

Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr  
130 135 140

Asn Ile Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Ala Leu  
145 150 155 160

Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr  
165 170 175

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln  
180 185 190

Ser Val Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Thr Arg Tyr Pro  
 195 200 205

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 210 215 220

<210> 131  
 <211> 253  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Тандемные переменные домены тяжелой цепи DVD-Ig к ИЛ-1  
 альфа/бета

<400> 131

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Leu Asn Ile Lys Asp Thr  
 20 25 30

Tyr Met His Trp Leu Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ala Lys Tyr Asp Pro Arg Phe  
 50 55 60

Leu Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Asp Gly Asn Phe His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 115 120 125

Leu Ala Pro Gln Val His Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala  
 130 135 140

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu  
 145 150 155 160

Thr Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu  
 165 170 175

Glu Trp Leu Gly Leu Ile Trp Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Ser  
 180 185 190

Pro Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Arg Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln  
 195 200 205

Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Val Tyr  
 210 215 220

Tyr Cys Ala Lys Gln Arg Thr Leu Trp Gly Tyr Asp Leu Tyr Gly Met  
 225 230 235 240

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 245 250

<210> 132  
 <211> 228  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Тандемные вариабельные домены легкой цепи DVD-Ig к ИЛ-1  
 альфа/бета

<400> 132

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Arg Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn  
 20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser  
 65 70 75 80

Val Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Thr Arg Tyr Pro Leu  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Glu Thr Thr Val Thr Gln Ser Pro  
 115 120 125

Ala Ser Leu Ser Met Ala Ile Gly Glu Lys Val Thr Ile Arg Cys Ile

130 135 140

Thr Ser Thr Asp Ile Asp Val Asp Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
 145 150 155 160

Gly Glu Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Gln Gly Asn Thr Leu Arg Pro  
 165 170 175

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Val  
 180 185 190

Phe Ile Ile Glu Asn Met Leu Ser Glu Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys  
 195 200 205

Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu  
 210 215 220

Glu Leu Lys Arg  
 225

<210> 133  
 <211> 253  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Тандемные переменные домены тяжелой цепи DVD-Ig к ИЛ-1  
 альфа/бета

<400> 133

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr  
 20 25 30

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

Gly Leu Ile Trp Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Ser Pro Leu Lys  
 50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Arg Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
 65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95

Lys Gln Arg Thr Leu Trp Gly Tyr Asp Leu Tyr Gly Met Asp Tyr Trp  
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
 115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala  
 130 135 140

Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser  
 145 150 155 160

Gly Leu Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Leu Lys Gln Arg Pro  
 165 170 175

Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn  
 180 185 190

Ala Lys Tyr Asp Pro Arg Phe Leu Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp  
 195 200 205

Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu  
 210 215 220

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asp Gly Asn Phe His Phe  
 225 230 235 240

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 245 250

<210> 134  
 <211> 228  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Тандемные вариабельные домены легкой цепи DVD-Ig к ИЛ-1  
 альфа/бета

<400> 134

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

Glu Lys Val Thr Ile Arg Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Val Asp  
 20 25 30

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Pro Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Ser Gln Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Val Phe Ile Ile Glu Asn Met Leu Ser  
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln  
115 120 125

Arg Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys  
130 135 140

Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Ile Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
145 150 155 160

Gly Gln Ser Pro Arg Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser  
165 170 175

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
180 185 190

Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser Val Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys  
195 200 205

Gln Gln Tyr Thr Arg Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu  
210 215 220

Glu Ile Lys Arg  
225

<210> 135  
<211> 238  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Тандемные переменные домены тяжелой цепи DVD-Ig к ИЛ-1  
альфа/бета

<400> 135

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr  
20 25 30

RU 2563830 C2

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

Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr Leu Tyr Ser Gln Lys Phe  
 50 55 60

Lys Asp Thr Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

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

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly  
 115 120 125

Pro Glu Leu Val Lys Thr Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala  
 130 135 140

Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ser  
 145 150 155 160

His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly  
 165 170 175

Phe Thr Ser Tyr Asn Pro Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Val  
 180 185 190

Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Ile Gln Phe Ser Arg Leu Thr Ser  
 195 200 205

Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Thr  
 210 215 220

Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 225 230 235

<210> 136  
 <211> 219  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Тандемные переменные домены легкой цепи DVD-Ig к ИЛ-1  
 альфа/бета

<400> 136

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly



<400> 137

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr  
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Phe Thr Ser Tyr Asn Pro Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Ile Gln Phe Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Thr Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Gln Val Gln Leu  
115 120 125

Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu  
130 135 140

Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Trp Met Asn Trp  
145 150 155 160

Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp  
165 170 175

Pro Tyr Asp Ser Glu Thr Leu Tyr Ser Gln Lys Phe Lys Asp Thr Ala  
180 185 190

Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser  
195 200 205

Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly  
210 215 220

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
225 230 235

<210> 138

<211> 219

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тандемные вариабельные домены легкой цепи DVD-Ig к ИЛ-1 альфа/бета

<400> 138

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

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

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Val Ser Arg Met Glu Ala Glu  
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
100 105 110

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly  
115 120 125

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met  
130 135 140

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
145 150 155 160

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
165 170 175

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu  
180 185 190

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Tyr Thr  
195 200 205

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys Arg  
210 215

<210> 139  
 <211> 245  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Тандемные переменные домены тяжелой цепи DVD-Ig к ИЛ-1 альфа/бета  
  
 <400> 139  
  
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
  
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr  
 20 25 30  
  
 Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
  
 Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr Leu Tyr Ser Gln Lys Phe  
 50 55 60  
  
 Lys Asp Thr Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
  
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
  
 Ala Arg Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val  
 100 105 110  
  
 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Glu  
 115 120 125  
  
 Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Thr Gly Thr Ser  
 130 135 140  
  
 Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Tyr  
 145 150 155 160  
  
 Met His Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly  
 165 170 175  
  
 Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Phe Thr Ser Tyr Asn Pro Lys Phe Lys  
 180 185 190  
  
 Gly Lys Ala Thr Phe Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Ile  
 195 200 205

RU 2 563 830 C2

Gln Phe Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 210 215 220

Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Thr Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 225 230 235 240

Leu Thr Val Ser Ser  
 245

<210> 140  
 <211> 227  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Тандемные переменные домены легкой цепи DVD-Ig к ИЛ-1  
 альфа/бета

<400> 140

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met  
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
 35 40 45

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu  
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Tyr Thr  
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
 100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala  
 115 120 125

Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala  
 130 135 140

Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ala  
 145 150 155 160

Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val

165 170 175  
 Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr  
 180 185 190  
 Val Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 195 200 205  
 Arg Ser Thr Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
 210 215 220  
 Lys Arg Arg  
 225  
 <210> 141  
 <211> 245  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Тандемные вариабельные домены тяжелой цепи DVD-Ig к ИЛ-1  
 альфа/бета  
 <400> 141  
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Thr Gly Thr  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Phe Thr Ser Tyr Asn Pro Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Ile Gln Phe Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Thr Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 115 120 125  
 Leu Ala Pro Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg  
 130 135 140

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
145 150 155 160

Thr Thr Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu  
165 170 175

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr Leu Tyr Ser  
180 185 190

Gln Lys Phe Lys Asp Thr Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser  
195 200 205

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
225 230 235 240

Leu Thr Val Ser Ser  
245

<210> 142

<211> 227

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тандемные вариабельные домены легкой цепи DVD-Ig к ИЛ-1 альфа/бета

<400> 142

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

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

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Val Ser Arg Met Glu Ala Glu  
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
 100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala  
 115 120 125

Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala  
 130 135 140

Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser  
 145 150 155 160

Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val  
 165 170 175

Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr  
 180 185 190

Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 195 200 205

Trp Asn Ser Asn Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met  
 210 215 220

Lys Arg Arg  
 225

<210> 143  
 <211> 249  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Тандемные вариабельные домены тяжелой цепи DVD-Ig к мИЛ-1  
 альфа/бета

<400> 143

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

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

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Tyr Ile Ile Pro Tyr Asn Asp Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60

RU 2 563 830 C2

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Arg Asn Glu Tyr Tyr Gly Ser Ser Phe Phe Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser  
115 120 125

Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gln Val Ile Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly  
130 135 140

Ile Leu Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly  
145 150 155 160

Phe Ser Leu Ser Thr Tyr Gly Thr Ala Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro  
165 170 175

Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala Gln Ile Gly Ser Asp Asp Arg  
180 185 190

Lys Leu Tyr Asn Pro Phe Leu Lys Ser Arg Ile Thr Leu Ser Glu Asp  
195 200 205

Thr Ser Asn Ser Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Glu  
210 215 220

Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Asn Gly Val Met Glu Tyr Trp Gly  
225 230 235 240

Leu Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
245

<210> 144  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> переменный домен тяжелой цепи 10G11

<400> 144

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

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

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Tyr Ile Ile Pro Tyr Asn Asp Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Arg Asn Glu Tyr Tyr Gly Ser Ser Phe Phe Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 145  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> вариабельный домен тяжелой цепи 9H10

<400> 145

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr  
 20 25 30

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

Trp Leu Ala Gln Ile Gly Ser Asp Asp Arg Lys Leu Tyr Asn Pro Phe  
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Ile Thr Leu Ser Glu Asp Thr Ser Asn Ser Gln Val  
 65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Asn Gly Val Met Glu Tyr Trp Gly Leu Gly Thr Ser Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser  
115

<210> 146  
<211> 330  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 146

Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly  
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu  
50 55 60

Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile  
65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys  
85 90 95

Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys  
100 105 110

Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro  
115 120 125

Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys  
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp  
145 150 155 160

Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg  
165 170 175

Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln  
180 185 190

His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn  
195 200 205

Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly

RU 2 563 830 C2

210 215 220

Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu  
 225 230 235 240

Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met  
 245 250 255

Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu  
 260 265 270

Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe  
 275 280 285

Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn  
 290 295 300

Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr  
 305 310 315 320

Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 147  
 <211> 228  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Тандемные вариабельные домены легкой цепи DVD-Ig к мИЛ-1  
 альфа/бета

<400> 147

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Gly Ser Gly Ile Leu His Asn Tyr  
 20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val  
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Phe  
 85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala  
 100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro  
 115 120 125

Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys  
 130 135 140

Ala Ser Gln Ser Val Asn His Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Met Pro  
 145 150 155 160

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

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr  
 180 185 190

Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys  
 195 200 205

Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu  
 210 215 220

Glu Ile Lys Arg  
 225

<210> 148  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> переменный домен легкой цепи 10G11

<400> 148

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Gly Ser Gly Ile Leu His Asn Tyr  
 20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val  
 35 40 45

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

RU 2 563 830 C2

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Phe  
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 149

<211> 108

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> переменный домен легкой цепи 9H10

<400> 149

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asn His Asp  
20 25 30

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

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

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala  
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 150

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 150

Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln  
1 5 10 15

Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr  
20 25 30

RU 2563830 C2

Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln  
 35 40 45

Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 50 55 60

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

His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro  
 85 90 95

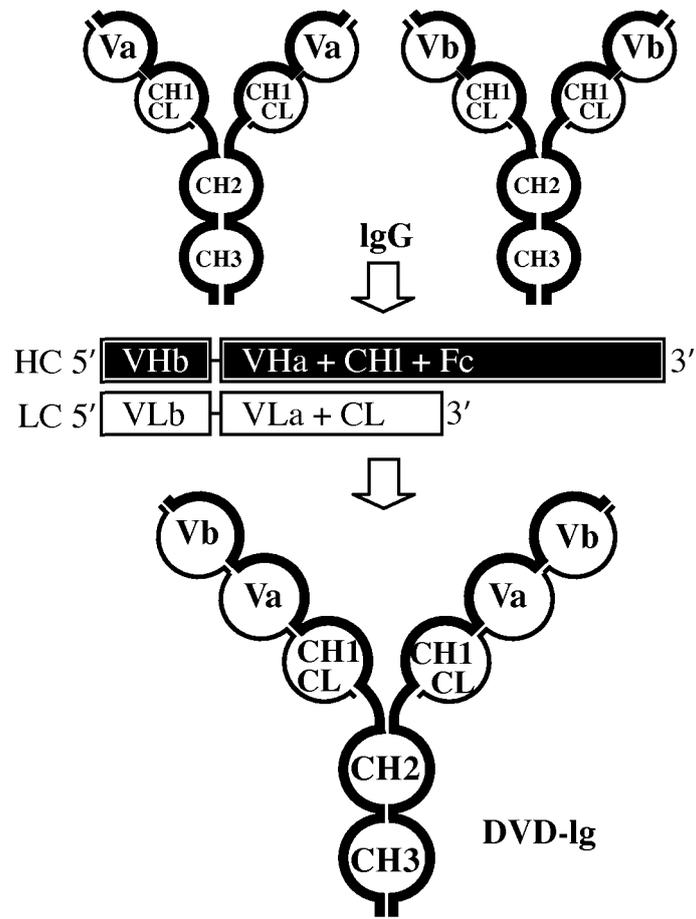
Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
 100 105

<210> 151  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

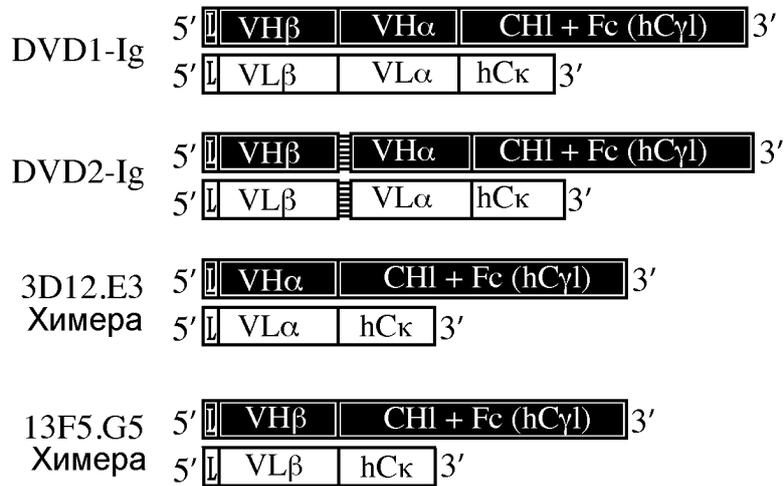
<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(9)  
 <223> Хаа может являться любой аминокислотой

<400> 151

Cys Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа  
 1 5

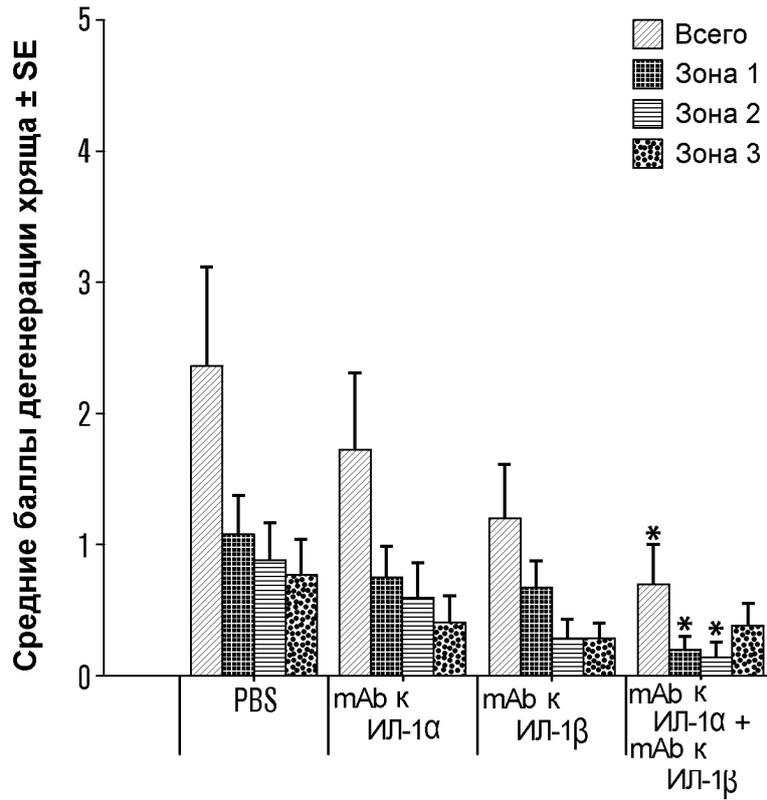


Фиг. 1А



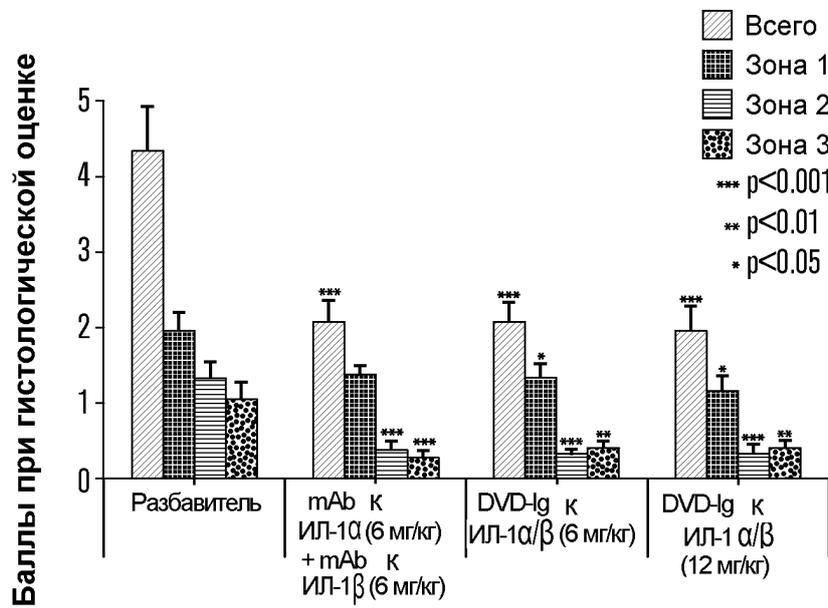
Фиг. 1В

**Дегенерация хряща по зонам -  
медиальный мыщелок большеберцовой кости**

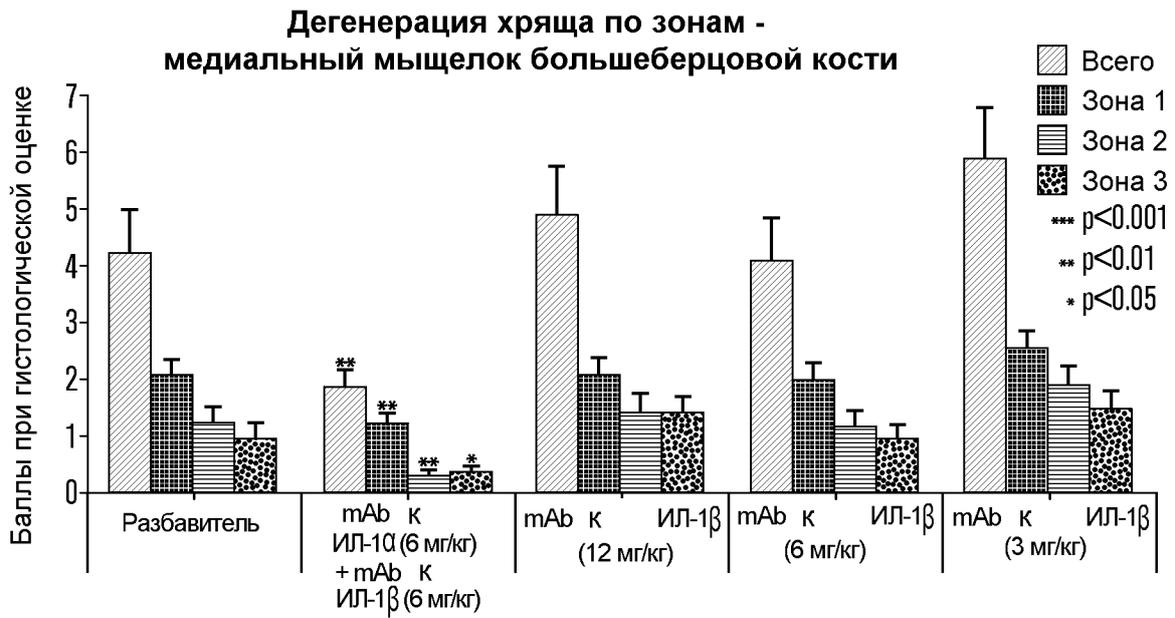


**Фиг. 2**

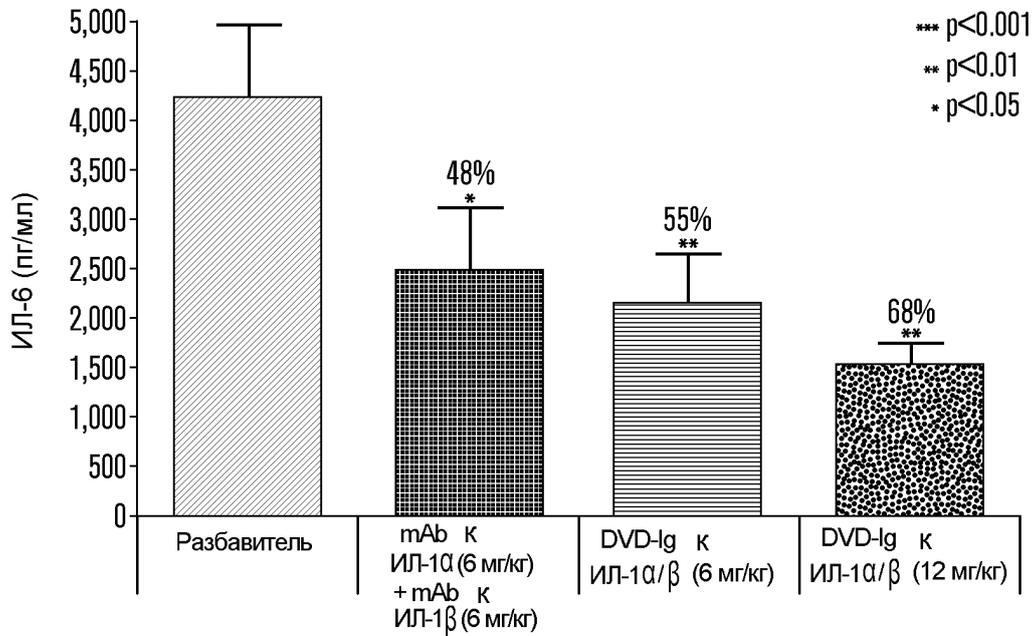
**Дегенерация хряща по зонам -  
медиальный мыщелок большеберцовой кости**



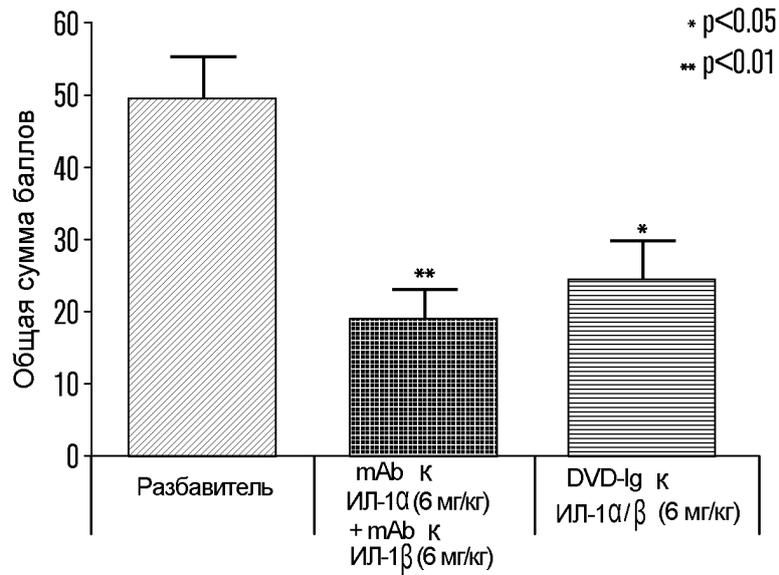
**Фиг. 3**



Фиг. 4

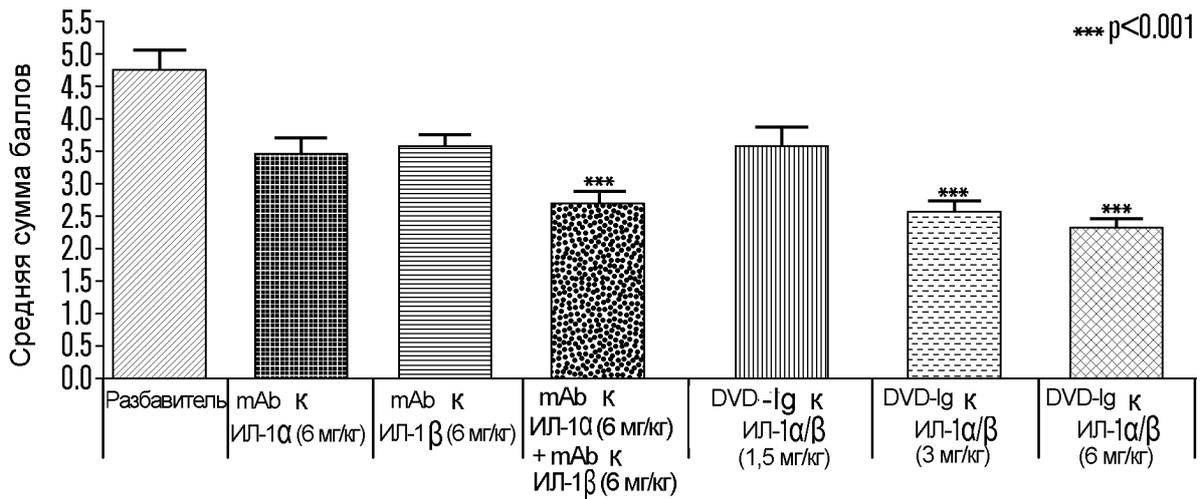


Фиг. 5



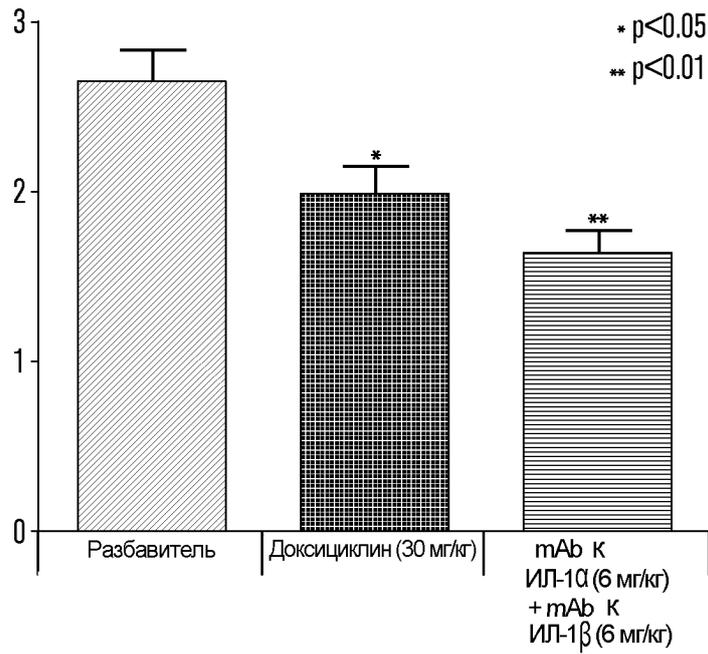
Фиг. 6

Лечение комбинацией mAb к ИЛ-1α/β или DVD-Ig к ИЛ-1α/β ингибирует дегенерацию хряща

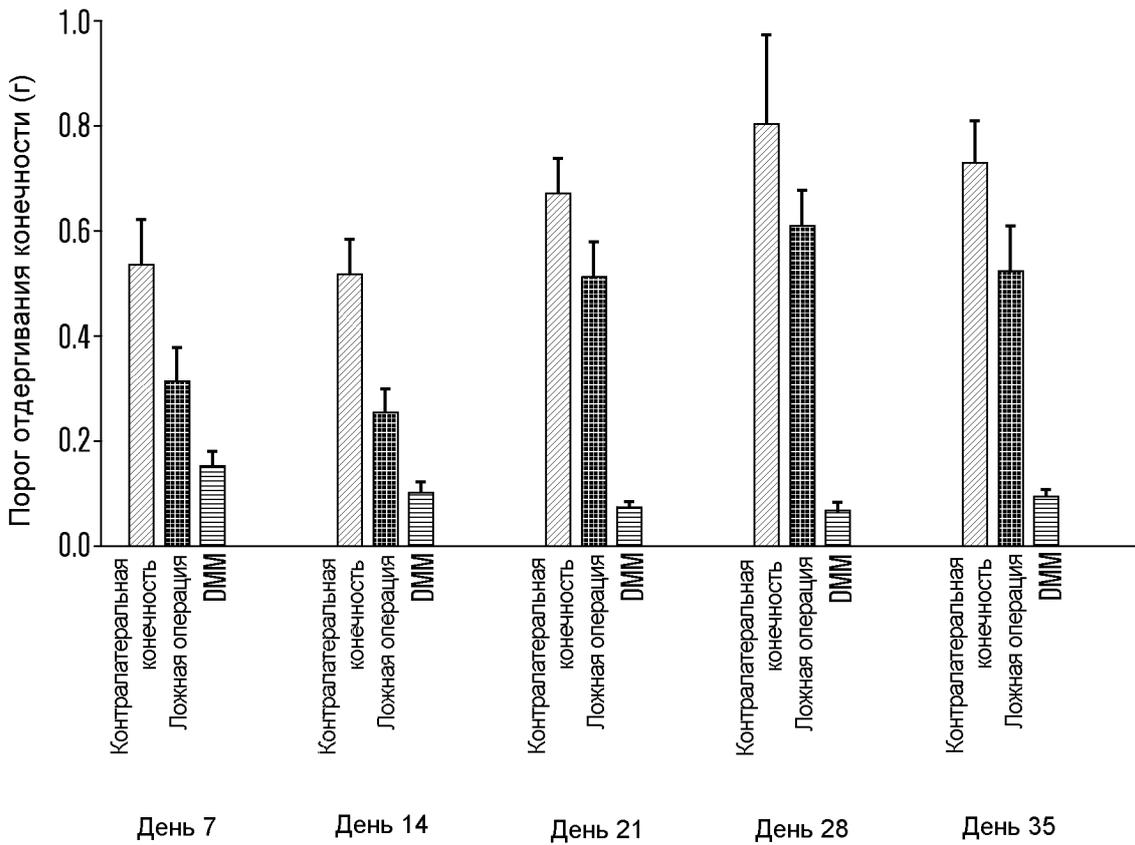


Фиг. 7

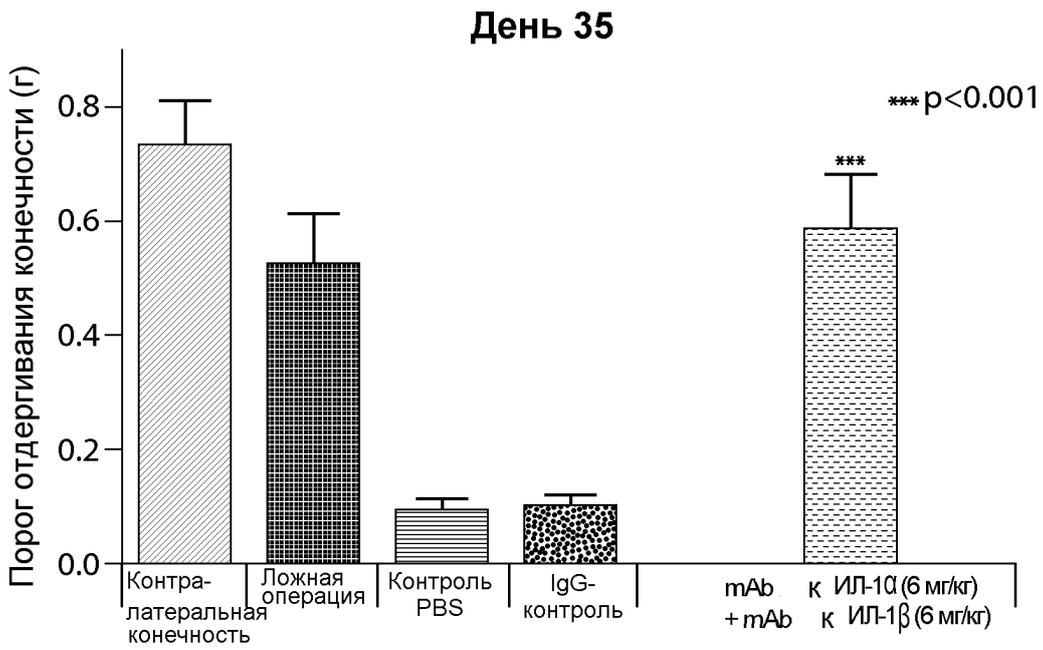
Лечение комбинацией mAb к ИЛ-1 $\alpha/\beta$  или доксициклином ингибирует дегенерацию хряща



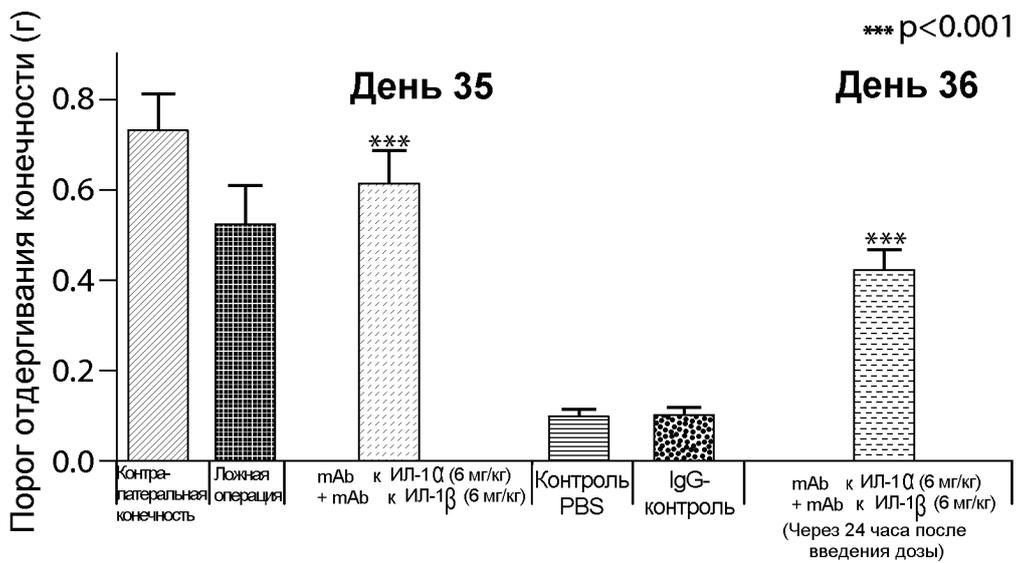
Фиг. 8



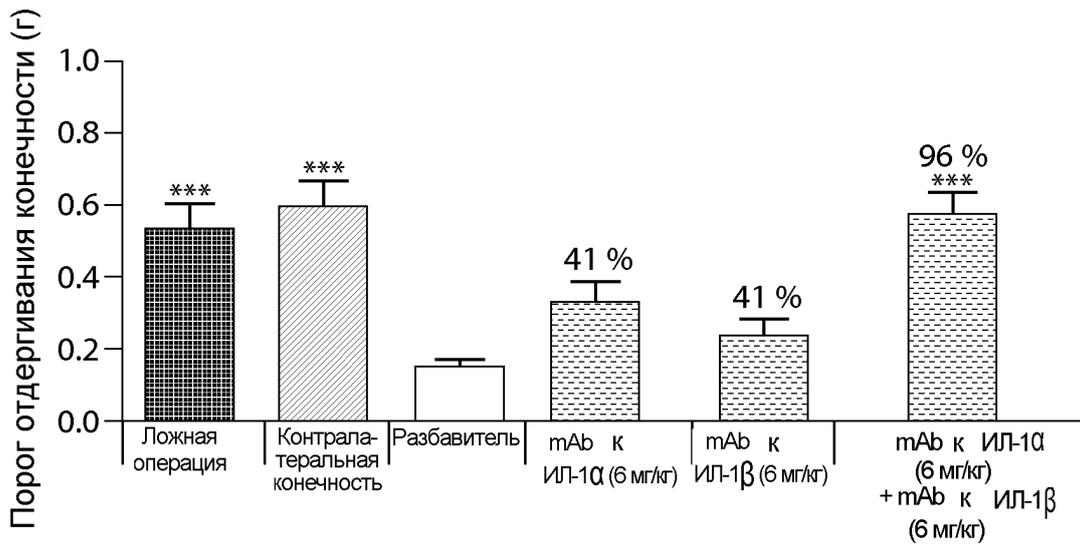
Фиг. 9



Фиг. 10

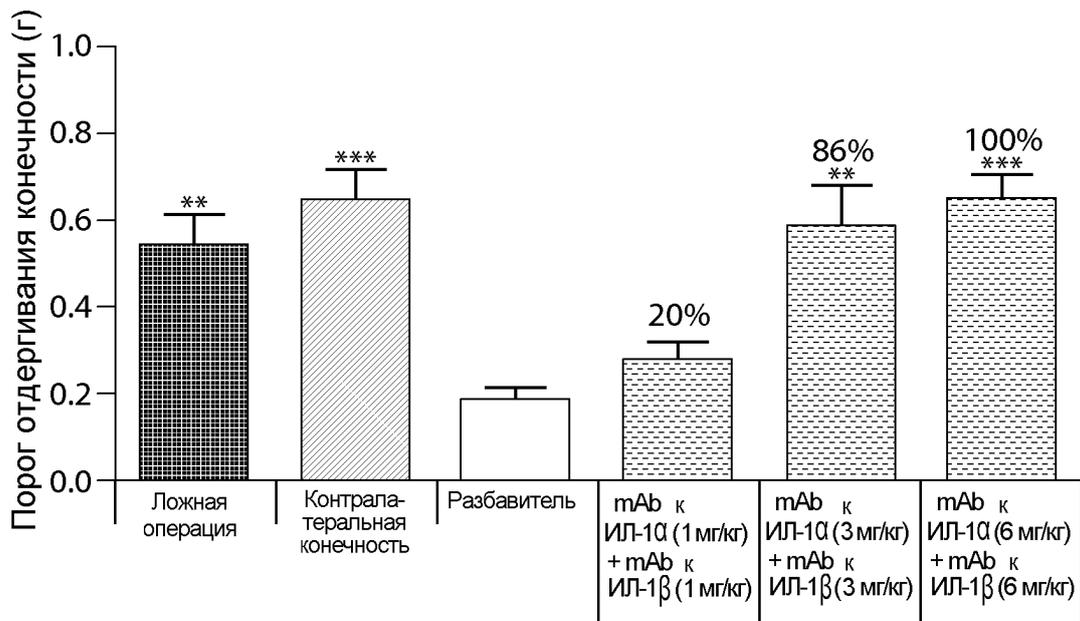


Фиг. 11

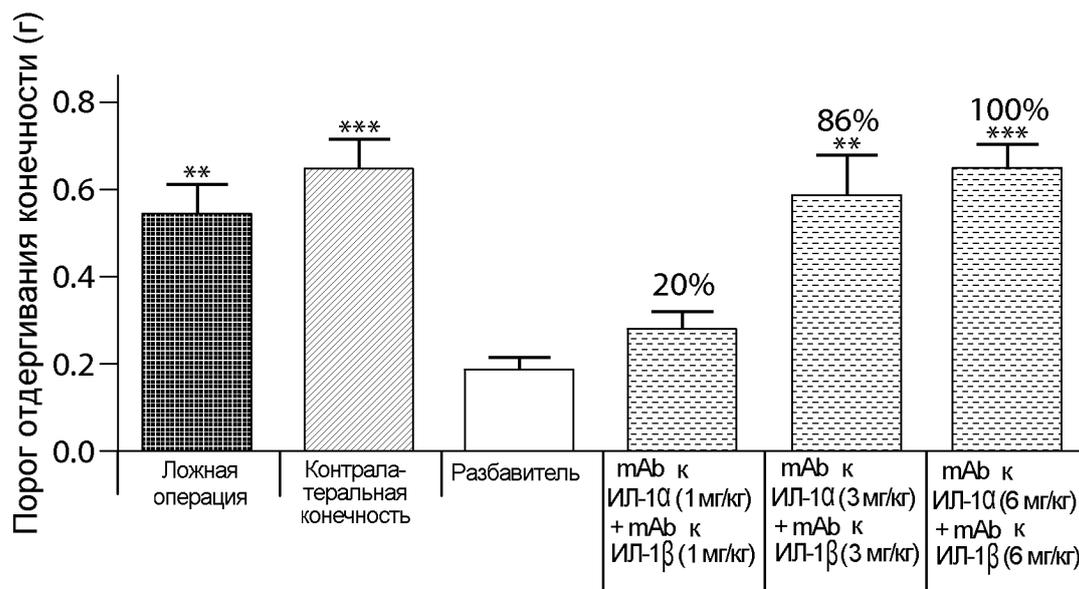


Фиг. 12

Альгезирующие эффекты комбинации mAb к ИЛ-1α/β на модели дестабилизации медиального мениска

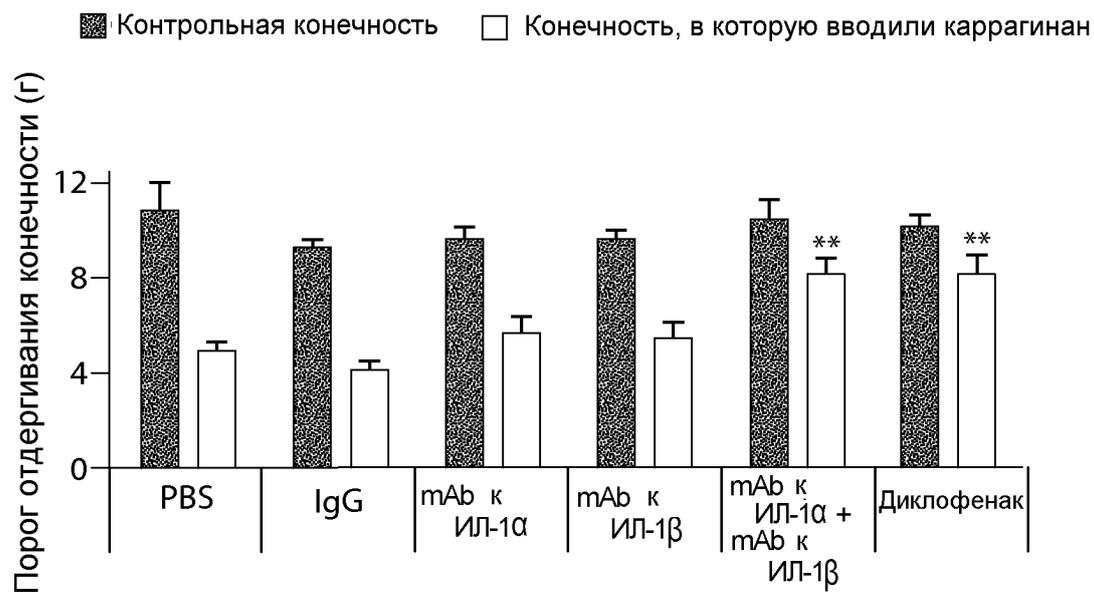


Фиг. 13



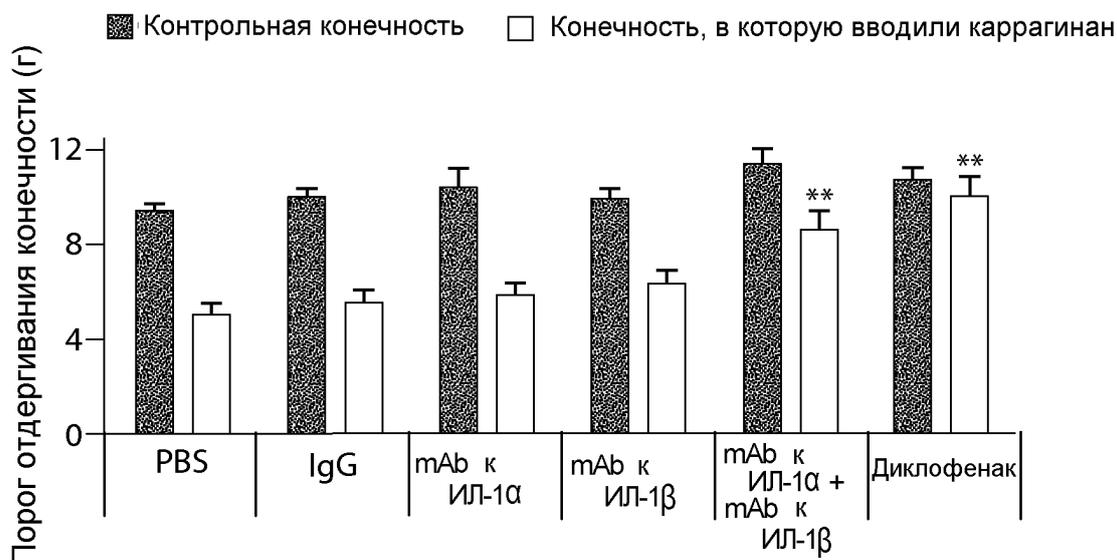
Фиг. 14

Каррагинановая модель  
48 часов



Фиг. 15 А

**Каррагинановая модель  
96 часов**



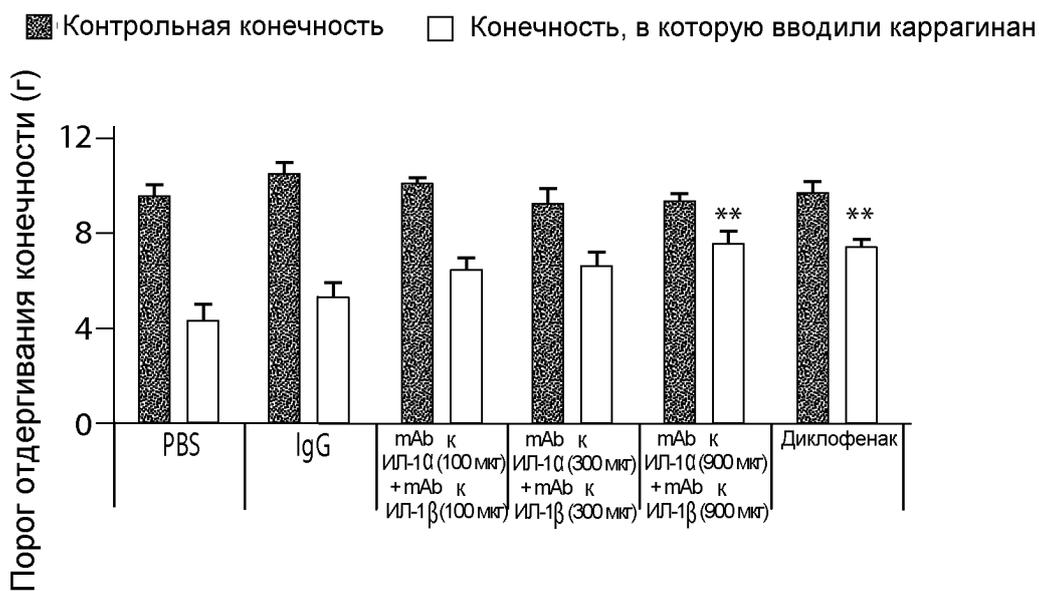
**Фиг. 15В**

**Каррагинановая модель  
48 часов**



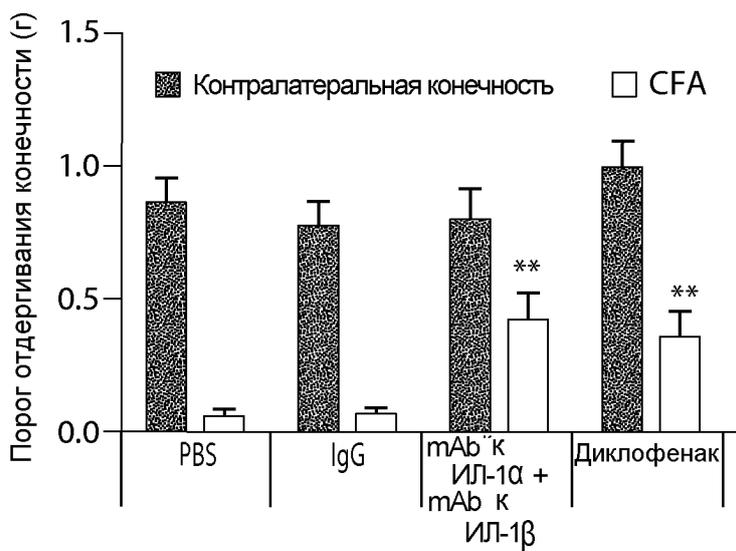
**Фиг. 16А**

**Каррагинановая модель  
96 часов**

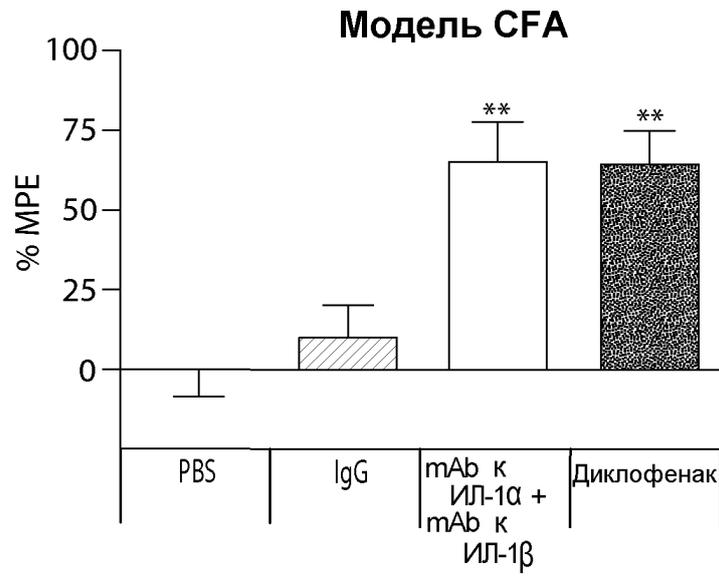


Фиг. 16В

**Модель CFA**



Фиг. 17А



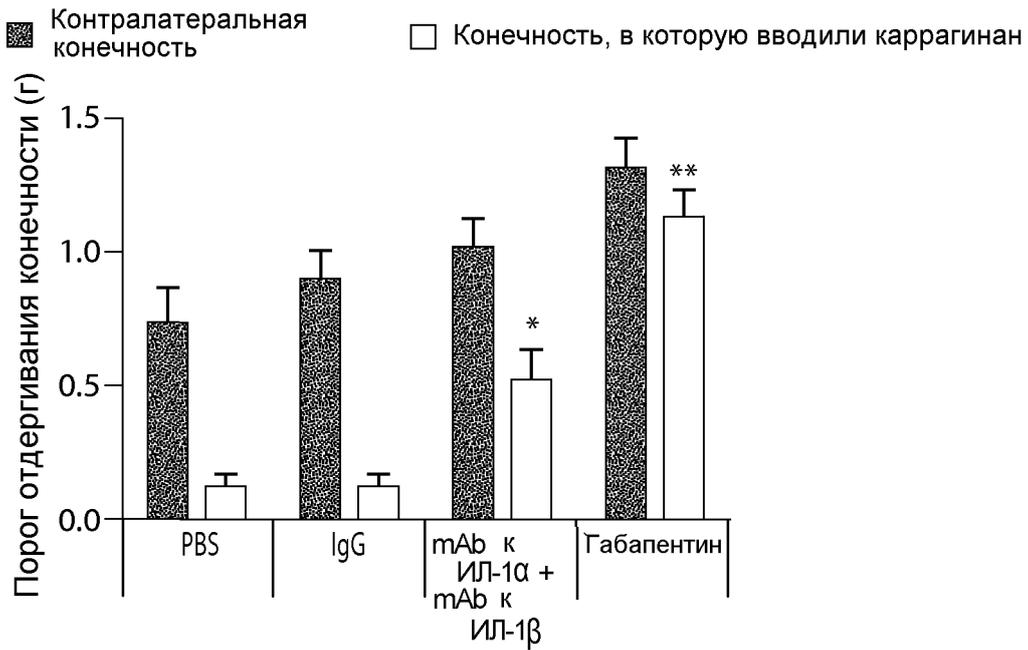
Фиг. 17В

### Модель SNL 24 часа



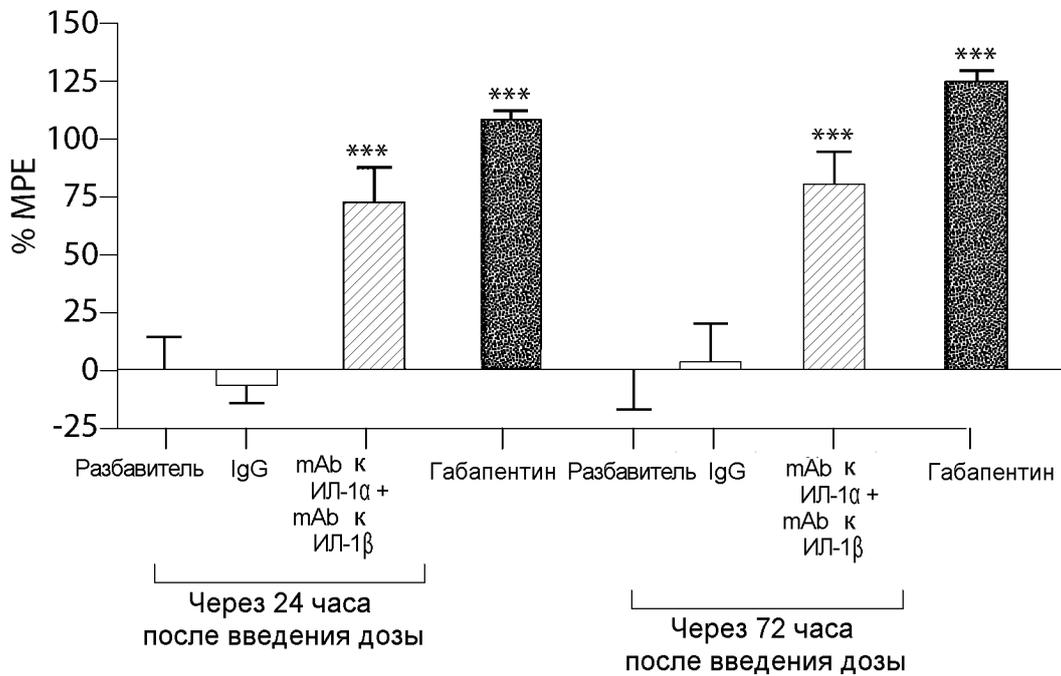
Фиг. 18А

**Модель SNL  
72 часа**



**Фиг. 18В**

**Эффекты лечения комбинацией mAb к ИЛ-1α и mAb к ИЛ-1β в модели SNL**



**Фиг. 19**