PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

292 465

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1998 - 2476**

(22) Přihlášeno: **10.02.1997**

(30) Právo přednosti:

09.02.1996	**US**	**1996/599226**
25.11.1996	**US**	**1996/031476**

(40) Zveřejněno: **11.11.1998**
(Věstník č. 11/1998)

(47) Uděleno: **31.07.2003**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **17.09.2003**
(Věstník č. 9/2003)

(86) PCT číslo: **PCT/US97/02219**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/029131**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.[7]:

C 07 K 16/24
C 12 N 15/13
C 12 N 15/64
C 12 N 5/10
C 12 N 1/21
A 61 K 39/395
G 01 N 33/68

(73) Majitel patentu:

ABBOTT LABORATORIES (BERMUDA) LTD.,
Hamilton, BM;

(72) Původce vynálezu:

Salfeld Jochen G., North Grafton, MA, US;
Allen Deborah J., London, GB;
Kaymakcalan Zehra, Westboro, MA, US;
Labkovsky Boris, Framingham, MA, US;
Mankovich John A., Andover, MA, US;
McGuinness Brian T., Cambridge, GB;
Roberts Andrew J., Cambridge, GB;
Sakorafas Paul, Shrewsbury, MA, US;
Hoogenboom Hendricus R. J. M., Hasselt, BE;
Schoenhaut David, Clifton, NJ, US;
Vaughan Tristan J., Cambridge, GB;
White Michael, Framingham, MA, US;
Wilton Alison J., Cambridge, GB;

(74) Zástupce:

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

(54) Název vynálezu:

Lidské protilátky k lidskému TNFalfa

(57) Anotace:

Jsou popsány lidské protilátky, výhodně rekombinantní lidské protilátky, které se specificky váží na lidský faktor nekrosy nádorů α (TNFα). Tyto protilátky mají vysokou afinitu pro hTNFα (např. $K_d=10^{-8}$ M nebo menší), pomalou rychlost disociace pro hTNFα disociaci (např. $K_{off}=10^{-3}s^{-1}$ nebo menší) a neutralizují aktivitu hTNFα in vivo a in vitro. Protilátka podle předkládaného vynálezu může být kompletní protilátka nebo její antigen-vazebná část. Protilátky, nebo části protilátek, podle řešení jsou použitelné pro detekci hTNFα a pro inhibici hTNFα, například u lidských subjektů trpících onemocněním, u kterého je aktivita hTNFα škodlivá. Řešení také zahrnuje nukleové kyseliny, vektory a hostitelské buňky pro expresi rekombinantních lidských protilátek a způsoby pro syntézu rekombinantních lidských protilátek.

CZ 292465 B6

Lidské protilátky k lidskému TNFα

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká lidských protilátek k lidskému faktoru nekrosy nádorů α, TNFα. Dále se předkládaný vynález týká nukleových kyselin, vektorů a hostitelských buněk pro expresi rekombinantních lidských protilátek as způsobů pro syntézu rekombinantních lidských protilátek.

Dosavadní stav techniky

Faktor nekrosy nádorů α (TNFα) je cytokin produkovaný mnoha typy buněk, včetně monocytů a makrofágů, který byl původně identifikován díky jeho schopnosti indukovat nekrosu jistých typů nádorů u myší (viz například Old, L. (1985), Science 230: 630 až 632). Následně byl faktor nazývaný kachexin, asociovaný s kachexií, identifikován jako stejná molekula jako TNFα. Předpokládala se účast TNFα ve zprostředkování šoku (viz například Beutler, B a Cerami, A (1988) Annu. Rev. Biochem., 57: 505 až 518; Beutler, B a Cerami, A (1989) Annu. Rev. Immunol. 7: 625 až 655). Dále, předkládá se účast TNFα v patofyziologii mnoha dalších lidských onemocnění a poruch, včetně sepse, infekcí, autoimunitních onemocnění, rejekce transplantátu a reakce štěpu proti hostiteli (viz například Moeller, A. et al., Cytokine 2: 162 až 169 (1990); patent US 5 231 024, Moeller et al.; Evropská patentová přihláška publikační č. 260610 B1, Moeller, A. et al.; Vasilli, P. Annu, Rev. Immunol., 10: 411 až 452 (1992); Tracey, K.J. a Cerami, A. Annu. Rev. Med. 45: 491 až 503 (1994).

Vzhledem ke škodlivé úloze lidského TNFα (hTNFα) v mnoha lidských onemocněních byly navrženy terapeutické strategie pro inhibici nebo zrušení aktivity hTNFα. Konkrétně, byly navrženy protilátky, které se váží na a neutralizují hTNFα jako prostředek pro inhibici aktivity hTNFα. Jedněmi z prvních takových protilátek byly myší monoklonální protilátky (mAb), secernované hybridomy připravenými z lymfocytů myší imunizovaných hTNFα (voz například Hahn, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3814 až 3818 (1985); Liang, C. M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 137: 847 až 854 (1986); Hirai, M a et al., J. Immunol. Methods 96: 57 až 62 (1987); Fendly, B. M. et al., Hybridoma 6: 359 až 370 (1987); Moeller, A. et al., Cytokine 2: 162 až 169 (1990); patent US 5 231 024, Moeller et al., Evropská patentová přihláška publikační č. 186833 B1, Wallach, D.; Evropská patentová přihláška publikační č. 218868 A1, Old et al.; Evropská patentová přihláška publikační č. 260610 A1, Moeller et al.). Ačkoliv tyto myší anti–hTHFα protilátky často vykazovaly vysokou afinitu pro hTNFα (například $K_d \leq 10^{-9}$M) a byly schopné neutralizovat aktivitu hTHFα, jejich použití in vivo je omezeno problémy spojenými s podání myších protilátek lidem, jako je krátký poločas v séru, neschopnost spouštět určité lidské efektorové funkce a vyvolání nežádoucí imunitní odpovědi proti myším protilátkám u lidí („lidská anti–myší protilátka“ (HAMA) reakce).

Při pokusu o překonání těchto problémů spojených s úplnými myšími protilátkami u lidí byly myší anti–hTHFα protilátky geneticky zpracovány tak, aby byly více podobné lidským. Například, byly připraveny chimerické protilátky, ve kterých jsou variabilní regiony protilátkových řetězců odvozeny od myší a konstantní regiony protilátkových řetězců jsou odvozeny od lidí (Knight, D.M. et al., Mol. Immunol. 30: 1443 až 1453 (1993); PCT přihláška č. WO 92/16553 od Daddona, P.E. et al.). Dále byly také připraveny humanizované protilátky, ve kterých jsou hypervariabilní domény variabilních regionů protilátky odvozené od myší, ale zbytek variabilních regionů a konstantní regiony protilátky jsou lidské (PCT přihláška č. WO 92/11383, Adair, J.R. et al.). Nicméně, jelikož mají tyto chimerické a humanizované protilátky stále ještě nějaké myší sekvence, mohou stále vyvolat nežádoucí imunitní reakci, lidskou reakci proti chimerické protilátce (HACA), zejména pokud jsou podávány dlouhodobě, například v chronických indika-

cích, jako je revmatoidní artritida (viz například Elliot, M. J. et al. Lacencet 344: 1125 až 1127 (1994); Elliot, M. J. et al., Lancet 344: 1105 až 1110 (1994).

Výhodným inhibitorem hTNFα k myším mAb nebo jejich derivátům (například chimerickým nebo humanizovaným protilátkám) může být zcela lidská anti–hTNFα protilátka, protože takové agens by nemělo vyvolávat HAMA reakci, ani když bude užíváno dlouhodobě. Lidské monoklonální autoprotilátky proti hTHFα byly připraveny za použití lidské hybridomní techniky (Boyle, P. et al., Cell. Immunol. 152: 556 až 558, (1993); Boyle, P. et al., Cell. Immunol. 152: 569 až 581, (1993); Mezinárodní patentová přihláška publikační č. 614984 A2, Boyle et al.). Nicméně, u těchto od hybridomů odvozených monoklonálních autoprotilátek bylo popsáno, že mají afinitu k hTNFα, která je příliš nízká pro určení běžnými způsoby, nebyly schopné vázat se na solubilní hTNFα (viz Boyle et al., výše). Kromě toho, úspěch těchto hybridomních technik závisí na přirozené přítomnosti lymfocytů produkujících autoprotilátky specifické pro hTHFα v lidské periferní krvi. Některé studie detekovaly sérové autoprotilátky proti hTNFα u lidských subjektů (Fomsgaard, A. et al., Scand. J. Immunol. 30: 219 až 223 (1989); bendtzen, K. et al., Prog. Leukocyte Biol. 10B: 447 až 452 (1990), zatímco jiné nikoliv (Leusch, H–G, et al., J. Immunol. Methods 139: 145 – 147 (1991).

Alternativou k přirozeně se vyskytujícím lidským anti–hTNFα protilátkám by měla být rekombinantní hTNFα protilátka. Rekombinantní lidské protilátky, které váží hTNFα s relativně nízkou afinitou (tj. $K_d \approx 10^{-7}$ M) a rychlostí (tj. $K_{off} \approx 10^{-2}$ s^{-1}) byly popsány (Griffiths, A.D. et al., EMBO J., 12: 725 až 734 (1993)). Nicméně, vzhledem k jejich relativně rychlé disociační kinetice nejsou tyto protilátky vhodné pro terapeutické použití. Kromě toho, byla popsána rekombinantní lidská anti–hTNFα protilátka, která neutralizuje aktivitu hTNFα, ale dosti zvyšuje vazbu hTNFα na povrch buněk a zvyšuje internalizaci hTNFα, (Lidbury, A. et al., Biotechnol. Ther. 5: 27 až 45 (1994); PCT přihláška č. WO 92/03145 od Aston, R. et al.).

V souladu s tím stále existuje potřeba lidských protilátek, jako jsou rekombinantní lidské protilátky, které se váží na solubilní hTNFα s vysokou afinitou a které mají pomalou disociační kinetiku, a které mají kapacitu pro neutralizaci aktivity hTNFα, včetně cytotoxicity indukované hTNFα (in vitro a in vivo) a včetně aktivace buněk indukované hTNFα.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález poskytuje lidské protilátky, výhodně rekombinantní lidské protilátky, které se specificky vážu na lidský TNFα. Protilátky podle předkládaného vynálezu jsou charakterizovány vazbou na hTNFα s vysokou afinitou a pomalu disociační kinetikou a neutralizací aktivitu hTNFα, včetně cytotoxicity indukované hTNFα (in vitro a in vivo) a včetně aktivace buněk indukované hTNFα. Protilátky podle předkládaného vynálezu jsou dále charakterizovány vazbou na hTNFα, ale nikoli na hTNF]β (lymfotoxin) a tím, že mají schopnost vazby na TNFα od jiných primátů a TNFα od jiných zvířat, než jsou primáti, kromě vazby na lidský TNFα.

Protilátky podle předkládaného vynálezu mohou být kompletní (například IgG1 až IgG4 protilátky) nebo mohou být omezeny pouze na část vážící antigen (např. Fab, $F(ab')_2$ nebo scFv fragment). Nejvýhodnější rekombinantní protilátka podle předkládaného vynálezu, nazvaná D2E7, má CDR3 doménu lidského řetězce obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 3 a CDR3 doménu těžkého řetězce obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 4. Výhodně má D2E7 protilátka variabilní region lehkého řetězce (LCVR) obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 1 a variabilní region těžkého řetězce (HCVR) obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 2.

Předmětem vynálezu je izolovaná lidská protilátka, nebo její antigen–vazebná část, s těmito charakteristikami:

a. disociuje z lidského TNFα s rychlostní konstantou K_{off} 1 x $10^{-3}s^{-1}$ nebo menší, stanoveno povrchovou plazmovou rezonancí,

b. má CDR3 doménu lehkého řetězce obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 3, nebo sekvenci modifikovanou ze SEQ ID NO: 3 jednou substitucí alaninu v pozici 1, 4, 5, 7 nebo 8 nebo jednou až pěti konzervativními aminokyselinovými substitucemi v pozicích 1, 3, 4, 6, 7, 8 a/nebo 9,

c. má CDR3 doménu řetězce obsahující aminokyselinou sekvenci SEQ ID NO: 4, nebo sekvenci modifikovanou ze SEQ ID NO: 4 jednou substitucí alaninu v pozici 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 nebo 11 nebo jednou až pěti konzervativními aminokyselinovými substitucemi v pozicích 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 a/nebo 12.

Výhodné je, jestliže lidská protilátka, nebo její antigen vazebná část, podle vynálezu disociuje z lidského TNFα s K_d 1 x 10^{-8} M nebo nižší a rychlostní konstantou K_{off} 1 x 10^{-3} s^{-1} nebo menší, obojí stanoveno povrchovou plazmovou rezonancí, a neutralizuje cytotoxicitu lidského TNFα ve standardním in vitro L929 testu s IC_{50} 1 x 10^{-7} M nebo menší.

Protilátka přednostně neutralizuje cytotoxicitu lidského TNFα, ve standardním in vitro L929 testu s IC_{50} 1 x 10^{-8} M nebo menší, zejména 1 x 10^{-9} M nebo menší, nejlépe 1 x 10^{-10} M nebo menší.

Výhodně je protilátkou rekombinantní protilátka nebo její antigen–vazebná část.

Je výhodné, jestliže protilátka inhibuje lidským TNFα, indukovanou expresi ELAM–1 na endotelových buňkách lidské pupečníkové žíly.

Přednostně protilátka disociuje z lidského TNFα s rychlostní konstantou K_{off} 5 x $10^{-4}s^{-1}$ nebo menší, zejména 1 x 10^{-4} s^{-1} nebo menší.

Přednostní je podle vynálezu lidská protilátka, nebo její antigen–vazebná část, s variabilním regionem lehkého řetězce (LCVR) majícím CDR3 doménu obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 3, nebo modifikovanou ze SEQ ID NO: 3 jednou alaninovou substitucí v pozici 1, 4, 5, 7 nebo 8 a s variabilním regionem těžkého řetězce (HCVR) majícím CDR3 domému obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 4, nebo modifikovanou ze SEQ ID NO: 4 jednou alaninovou substitucí v pozici 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 nebo 11.

Výhodné je, jestliže LCVR má dále CDR2 doménu obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 5 a HCVR má dále CDR2 doménu obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 6.

Výhodně rovněž LCVR má dále CDR1 doménu obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 7 a HCVR má dále CDR1 doménu obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 8.

Přednostní je protilátka, nebo její antigen–vazebná část, s variabilním regionem lehkého řetězce (LCVR) obsahujícím aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 1 a s variabilním regionem těžkého řetězce (HCVR) obsahujícím aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 2.

Výhodná je protilátka, která má konstantní region těžkého řetězce IgG1, nebo která má konstantní region těžkého řetězce IgG4.

Výhodně je protilátko Fab fragment, zejména jednořetězcový Fv fragment.

přednostní je též protilátka, nebo její antigen–vazebná část, s variabilním regionem lehkého řetězce, (LCVR) majícím CDR3 doménu obsahující aminokyselinovou sekvenci vybranou ze skupiny skládající se z SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 nebo s variabilním regionem těžkého řetězce (HCVR) majícím CDR3 doménu obsahující aminokyselinovou sekvenci vybranou ze skupiny skládající se ze SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 a SEQ ID NO: 34.

Ve výhodném provedení je předmětem vynálezu rekombinantní lidská protilátka, nebo její antigen–vazebná část, která neutralizuje aktivitu lidského TNFα, ale ne aktivitu lidského TNFβ, a má výše uvedené identifikační charakteristiky.

Je výhodné, jestliže rekombinantní lidská protilátka také neutralizuje aktivitu šimpanzího TNFα a alespoň jednoho dalšího primátího TNFα vybraného ze skupiny skládající se z paviáního TNFα, kosmaního TNFα, TNFα makaka (cynomolgus) a TNFα makaka rhesus.

Výhodná je rekombinantní protilátka, která také neutralizuje aktivitu psího TNFα, a rovněž která také neutralizuje aktivitu prasečího TNFα.

Předmětem vynálezu je rovněž molekula nukleové kyseliny kódující protilátku nebo její antigen–vazebnou část podle vynálezu. Preferovaná nukleová kyselina podle vynálezu, kódující D2E7 LCVR, má nukleotidovou sekvenci ukázanou na obrázku 7 a SEQ ID NO: 36. Jiná preferovaná nukleová kyselina podle předkládaného vynálezu, kódující D2E7 HCVR, má nukleotidovou sekvenci ukázanou na obrázku 8 a SEQ ID NO: 37. Vynález také zahrnuje rekombinantní expresní vektor nesoucí nukleovou kyselinu kódující protilátky a hostitelskou buňku, do kterých může být takový vektor zaveden, stejně jako způsob produkce protilátek podle vynálezu kultivací hostitelských buněk podle vynálezu.

Dále vynález zahrnuje použití protilátky podle vynálezu pro výrobu léčiva pro léčbu onemocnění, při kterém je aktivita TNFα škodlivá. Onemocnění může být například sepse, autoimunitní onemocnění (například revmatoidní artritida, alergie, roztroušená skleróza, autoimunitní diabetes, autoimunitní uveitida a nefrotický syndrom), infekční onemocnění, malignita, rejekce transplantátu nebo reakce štěpu proti hostiteli, plicní onemocnění, onemocnění kostí, střevní onemocnění nebo onemocnění srdce.

Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1A a 1B ukazují aminokyselinové sekvence variabilního regionu lehkého řetězce D2E7 (D2E7 VL; též ukázáno v SEQ ID NO: 1), alanin–vyhledávací mutanty D2E7 VL (LD2E7*.A1, LD2E7*.A3, LD2E7*.A4, LD2E7*.A7 a LD2E7*.A8), variabilní region lehkého řetězce příbuzné protilátky 2SD4 (2SD4 VL; též ukázáno v SEQ ID NO: 9) a další variabilní regiony lehkého řetězce příbuzné k D2E7 (EP B12, VL10E4, VL100A9, VL100D2, VL10F4, LOE5, VLLOF9, VLLOF10, VLLOG7, VLLOG9, VLLOH1, VLLOH10, VL1B7, VL1C1, VL1C7, VL0.1F4, VL0.1H8, LOE7, LOE7.A a LOE7.T). Obrázek 1A ukazuje FR1, CDR1, FR2 a CDR2 domény. Obrázek 1B ukazuje FR3, CDR3 a FR4 domény. CDR1 („CDR L1“), CDR2 („CDR L2“) a CDR3 („CDR L3) domény lehkého řetězce jsou v rámečku.

Obrázky 2A a 2B ukazují aminokyselinové sekvence variabilního regionu těžkého řetězce D2E7 (D2E7 VH; též ukázáno v SEQ ID NO: 2), alanin–vyhledávací mutanty D2E7 VH (HD2E7*.A1,

HD2E7*.A2, HD2E7*.A3, HD2E7*.A4, HD2E7*.A5, HD2E7*.A6 HD2E7*.A7, HD2E7*.A8 a HD2E7*.A9), variabilní region těžkého řetězce příbuzné protilátky 2SD4 (2SD4 VH; též ukázáno v SEQ ID NO: 10) a další variabilní regiony těžkého řetězce příbuzné k D2E7 (VH1B11, VH1D8, VH1A11, HV1B12, VH1–D2, VH1E4, VH1F6, HV1G1, 3C–H2, VH1–D2.N a VH1–D2.Y). Obrázek 2A ukazuje FR1, CDR1, FR2 a CDR2 domény. Obrázek 2B ukazuje FR3, CDR3 a FR4 domény. CDR1 („CDRL1"), CDR2 („CDR L2") a CDR3 („CDR L3) domény těžkého řetězce jsou v rámečku.

Obrázek 3 je graf znázorňují inhibici TFNα indukované L929 cytotoxicity lidskou anti–hTNFα protilátkou D2E7, ve srovnání a myší anti–hTNFα protilátkou MAK 195.

Obrázek 4 je graf znázorňující inhibici rhTNFα vazby na hTNFα receptory na U–937 buňkách lidskou anti–hTNFα protilátkou D2E7, ve srovnání s myší anti–hTNFα protilátkou MAK 195.

Obrázek 5 je graf znázorňující inhibici TNFα–indukované exprese ELAM–1 na HUVEC lidskou anti–hTNFα protilátkou D2E7, ve srovnání s myší anti–hTNFα protilátkou MAK 195.

Obrázek 6 je sloupcový graf znázorňující ochranu před TNFα–indukovanou letalitou u D–galaktosaminem senzitizovaných myší podáním lidské anti–hTNFα protilátky D2E7 (černé sloupce), ve srovnání s myší anti–hTNFα protilátkou MAK 195 (šrafované sloupce).

Obrázek 7 ukazuje nukleotidovou sekvenci variabilního regionu lehkého řetězce D2E7, s předpokládanou aminokyselinovou sekvencí pod nukleotidovou sekvencí. CDR L1, CDR L2 a CDR L3 regiony jsou podtrženy.

Obrázek 8 ukazuje nukleotidovou sekvenci variabilního regionu těžkého řetězce D2E7, s předpokládanou aminokyselinovou sekvencí pod nukleotidovou sekvencí. CDR H1, CDR H2 a CDR H3 regiony jsou podtrženy.

Obrázek 9 je graf znázorňující účinek léčby D2E7 protilátkou na průměrnou velikost kloubu u Tg197 transgenních myší jako modelu polyartritidy.

Tento vynález se týká izolovaných lidských protilátek, nebo jejich antigen–vazebných částí, které se vážou na lidský TNFα s vysokou afinitou, nízkou rychlostí disociace a s vysokou neutralizační kapacitou. Různé aspekty vynálezu se týkají protilátek a protilátkových fragmentů a jejich farmaceutických přípravků, stejně jako nukleových kyselin, rekombinantních expresních vektorů a hostitelských buněk pro výrobu takových protilátek a fragmentů. Vynález také obsahuje způsoby použití protilátek podle předkládaného vynálezu pro detekci lidského TNFα nebo pro inhibici aktivity lidského TNFα, jak in vitro, tak in vivo.

Pro snadnější pochopení předkládaného vynálezu jsou nejprve definovány určité termíny.

Termín „lidský TNFα" (zkratka hTNFα, nebo jednoduše hTNFα), jak je zde použit, označuje lidský cytokin, který existuje jako 17 kDa secernovaná forma a 26 kDa membránová forma, jehož biologicky aktivní forma je složena z trimetru nekovalentně vázaných 17 kDa molekul. Struktur hTNFα je popsána dále v, například, Pennica, D. et al., Nature 312: 724 až 729, (1984); Davis, J. M. et al., Biochemistry 26: 1322 až 1326 (1987); a Jones E. Y. et al., Nature 338: 225 až 228 (1989). Termín lidský TNFα je míněn tak, že zahrnuje rekombinantní lidský TNFα (rhTNFα), který může být získán standardními rekombinantními expresními metodami nebo může být získán komerčně (R & D Systems, katalogové č. 210–TA, Minneapolis, MN).

Termín „protilátka", jak je zde použit, označuje imunoglobulinové molekuly složení ze čtyř polypeptidových řetězců, dvou těžkých (H) a dvou lehkých (L) řetězců mezi sebou spojených disulfidovou vazbou. Každý těžký řetězec je složen z variabilního regionu těžkého řetězce (zde

zkráceno jako HCVR nebo HV) a konstantního regionu těžkého řetězce. Konstantní region těžkého řetězce je složen ze tří domén, CH1, CH2 a CH3. Každý lehký řetězec je složen z variabilního regionu lehkého řetězce (zde zkráceno jako LCVR nebo VL) a konstantního regionu řetězce (zde zkráceno jako LCVR nebo VL) a konstantního regionu lehkého řetězce. Konstantní region lehkého řetězce je složen z jedné domény, CL. VH a VL regiony mohou být dále děleny na regiony hypervariability, které se nazývají komplementaritu určující regiony (CDR), mezi kterými jsou vmezeřeny regiony, které jsou více konzervované a nazývají se regiony pracovních rámečků (FR). Každý VH a VL se skládá ze tří CDR a čtyř FR, které jsou uspořádány z amino–konce v následujícím pořadí: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Termín „antigen–vazebná část" protilátky (nebo prostě „část protilátky") jak je zde použit, označuje jeden nebo více fragmentů protilátky, které si zachovávají schopnost specifické vazby na antigen (např. hTNFα). Bylo ukázáno, že funkce vazby antigenu protilátky může být prováděna fragmenty kompletní protilátky. Příklady vazebných fragmentů zahrnutých v termínu „antigen–vazebná část" protilátky zahrnují (i) Fab fragment, monovalentní fragment skládající se z VL, VH, Cl a CH1 domén; (ii) $F(ab')_2$ fragment, bivalentní fragment obsahující dva Fab fragmenty vázané disulfidovým můstkem v patentovém regionu; (iii) Fd fragment skládající se z VH a CH1 domén; (iv) Fv fragment skládající se z VL a VH domén jednoho ramena protilátky; (v) dAb fragment (Ward et al., Nature 641: 544 až 546 (1989)), který se skládá z VH domény; a (vi) izolovaný komplementaritu určující region (CDR). Dále, ačkoliv dvě domény Fv fragmentu, V1 a VH, jsou kódovány různými geny, mohou být za použití rekombinantních metod spojeny syntetickým linkerem, který umožňuje jejich výrobu jako jediného proteinu, ve kterém jsou VL a VH regiony spárovány za tvorby monovalentních molekul (známé jako jednořetězcové Fv (scFv); viz například bird et al Science 242: 423 až 426 (1988); a Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879 až 5883 (1988)). Takové jednořetězcové protilátky jsou také zahrnuty termínem „antigen–vazebná část" protilátky. Jiné formy jednořetězcových protilátek, jako jsou dialátky, jsou tímto termínem také obsaženy. dialátky jsou bivalentní, bispecifické protilátky, ve kterých jsou HV a VL domény exprimovány na jednom polypeptidovém řetězci, ale využívají linkeru, který je příliš krátký pro umožnění párování mezi dvěma doménami stejného řetězce, což nutí domény k párování s komplementárními doménami jiného řetězce a tak ke tvorbě dvou vazebných míst pro antigen (viz například hollinger, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444 až 6448 (1993); Poljak, R. J. et al., Structure 2: 1121 až 1123 (1994)).

Ještě dále může být protilátka nebo její antigen–vazebná část částí větších imunoadhezivních molekul, tvořených kovalentní nebo nekovalentní asociací protilátky nebo část protilátky s jedním nebo více proteiny nebo peptidy. Příklady takových imunoadhezních molekul zahrnují použití jaderného regionu streptavidinu pro tvorbu tetramerní scFv molekuly (Kipriyanov, S.M. et al., Human Antibodies and Hybridomes 6: 93 až 101 (1995)) a použití cysteinového zbytku, markerového peptidu a C–koncové polyhistidinové smyčky pro tvorbu bivalentních a biotinylových scFV molekul (Kipriyanov, S.M. et al., Mol. Immunol. 31: 1047 až 1058 (1994)). Části protilátky, jako jsou Fab a $F(ab')_2$ fragmenty, mohou být připraveny z celých protilátek za použití běžných technik, jako je štěpení celých protilátek papainem, resp. pepsinem. Kromě toho, protilátky, části protilátek a imunoadhezní molekuly mohou být získány za použití standardních rekombinantních DNA technik, jak je zde popsáno.

Termín „lidská protilátka", jak je zde použit, je míněn tak, že zahrnuje protilátky mající variabilní a konstantní regiony odvozené do lidských imunoglobulinových sekvencí zárodečné linie. Lidské protilátky podle předkládaného vynálezu mohou obsahovat aminokyselinové zbytky, které nejsou kódované lidskými imunoglobulinovými sekvencemi zárodečné linie (např. mutace zavedené náhodnou nebo místně řízenou mutagenezí in vitro nebo somatickou mutací in vivo), například v CDR a zejména v CDR3. Nicméně, termín „lidská protilátka" jak je zde použit, není míněn tak, aby zahrnoval protilátky, ve kterých byly CDR sekvence odvozené ze zárodečných linií jiných savčích druhů, jako jsou myši, přeneseny k sekvencím lidského pracovního rámečku.

Termín „rekombinantní lidská protilátka“, jak je zde použit, je míněn tak, že zahrnuje všechny protilátky, které jsou připraveny, exprimovány, vytvořeny nebo izolovány rekombinantními prostředky, jako jsou protilátky exprivované za použití rekombinantního expresního vektoru přeneseného do hostitelské buňky (toto je popsáno v části II, dále), protilátky izolované z rekombinantní, kombinastoriální knihovny lidských protilátek (toto je popsáno v části III, dále), protilátky izolované od zvířete (například od myši), která je transgenní pro lidské geny pro imunoglobuliny (viz například Taylor, L.D. et al., Nucl Acids Res. 20: 6287 až 6295 (1992)) nebo protilátky připravené, exprimované, vytvořené nebo izolované jakýmikoliv jinými prostředky obsahujícími sestřih sekvencí genů pro lidské imunoglobuliny s jinými DNA sekvencemi. Takové rekombinantní lidské protilátky mají variabilní a konstantní regiony odvozené od lidských imunoglobulinových sekvencí zárodečné linie. V určitých provedeních jsou, nicméně, takové rekombinantní lidské protilátky podrobeny jsou, nicméně, takové rekombinantní lidské protilátky podrobeny in vitro mutagenezi (nebo, pokud je použito zvíře transgenní pro lidské IgG sekvence, in vido somatické mutagenezi) a tak jsou aminokyselinové sekvence HV a VL regionů rekombinantních protilátek sekvence které, ačkoliv jsou odvozeny od a jsou příbuzné k lidským VH a VL sekvencím, nemusí přirozeně existovat v lidském protilátkovém zárodečném repertoáru in vivo.

„Izolovaná protilátka“ zde určuje protilátku, která je v podstatě prostá dalších protilátek majících jinou antigenní specifitu (například izolovaná protilátka, která specificky váže hTNFα, je v podstatě prostá protilátek, které specificky vážou antigeny jiné než hTNFα). Izolovaná protilátka, která specificky váže hTNFα může, nicméně, mít zkříženou reaktivitu s jinými antigeny, jako jsou molekuly TNFα z jiných druhů (toto je podrobněji probráno dále). Kromě toho, izolovaná protilátka je významně prostá dalšího buněčného materiálu a/nebo chemikálií.

„Neutralizační protilátka“, jak je zde použito, (nebo „protilátka, která neutralizuje aktivitu hTNFα“), označuje protilátku, jejíž vazba na hTNFα vede k inhibici biologické aktivity hTNFα. Tato inhibice biologické aktivity hTNFα může být hodnocena měřením jednoho nebo více indikátorů biologické aktivity hTNFα, jako je hTNFα–indukovaná cytotoxicita (jak in vitro, tak in vivo), hTNFα indukovaná buněčná aktivace a vazba hTNFα na receptory pro hTNFα. Tyto indikátory biologické aktivity hTNFα mohou být hodnoceny jedním nebo více z několika standardních testů známých z oboru (viz příklad 4). Výhodně je schopnost protilátky neutralizovat aktivitu hTNFα hodnocena inhibicí hTNFα–indukované cytotoxicity L929 buněk. Jako další nebo alternativní parametr aktivity hTNFα–indukovanou expresi ELAM–1 na HUVEC, jako míru hTNFα–indukované buněčné aktivace.

Termín „povrchová plazmonová rezonance“, jak je zde použit, označuje optický jev, který umožňuje analýzu biospecifických interakcí v reálném čase detekcí změn v koncentracích proteinů v biosenzorové matrici, například za použití BIAcore systému (Pharmacia Bosensor AB, Uppsala, Sweden a Piscataway, NJ). Pro další popis viz příklad 1 a Jonsson, U. et al., Ann. Biol. Clin 51: 19 až 26 (1993); Jonsson, U. et al., Biotechniques 11: 620 až 627 (1991); Johnson, B. et al., J. Mol. Recognit. 8: 125 až 131 (1995); a Johnson, B. et al., Anal. Biochem. 198: 268 až 277 (1991).

Termín „K_{off}“, jak je zde použit, označuje rychlostní konstantu pro disociaci protilátky z komplexu protilátka/antigen.

Termín „K_d“, jak je zde použit, označuje disociační konstantu pro určitou interakci antigen–protilátka.

Termín „molekula nukleové kyseliny“, jak je zde použit, zahrnuje DNA molekuly a RNA molekuly. Molekula nukleové kyseliny může být jednořetězcová nebo dvouřetězcová, ale výhodně to je dvouřetězcová DNA.

Termín „izolovaná molekula nukleové kyseliny", jak je zde použit v souvislosti s nukleovými kyselinami kódujícími protilátky nebo části protilátek (např. VH, VL, CDR3), které se vážou na hTNFα, označuje molekulu nukleové kyseliny, ve které jsou neuotidové sekvence kódující protilátku nebo části protilátky prosté jiných nukleotidových sekvencí kódujících protilátky nebo části protilátek, které se vážou na jiný antigen, než na hTNFα, kde tyto jiné sekvence mohou přirozené sousedit s nukleovou kyselinou v lidské genomové DNA. Tak, například. izolovaná nukleová kyselina podle předkládaného vynálezu kódující VH region anti–TNFα protilátky neobsahuje další sekvence kódující jiné VH regiony, které se vážou na antigeny jiné než TNFα.

Termín „vektor", jak je zde použit, označuje molekulu nukleové kyseliny schopnou transportu jiné nukleové kyseliny, na kterou je navázán. Jedním typem vektoru je „plazmid", což označuje cirkulární dvouřetězcovou DNA smyčku, do které mohou být ligovány další DNA segmenty. Jiným typem vektoru je virový vektor, ve kterém mohou být další DNA segmenty ligovány do virového genomu. Určité vektory jsou schopné autonomní replikace v hostitelské buňce, do které jsou vloženy (například bakteriální vektory mající bakteriální zdroj replikace a episomální savčí vektory). Další vektory (například neepisomální savčí vektory) mohou být integrovány do genomu hostitelské buňky po zavedení do hostitelské buňky a tak jsou replikovány spolu s genomem. Kromě toho, určité vektory jsou schopné řízení exprese genů, na které jsou navázány. Takové vektory jsou zde označovány jako „rekombinantní expresní vektory" (nebo jednoduše „expresní vektory"). Obecně, expresní vektory použitelné v rekombinantních DNA technikách jsou často ve formě plazmidů. V předkládané přihlášce, „plazmid" a „vektor" mohou být zaměnitelné, protože plazmid je nejběžněji používanou formou vektoru. Nicméně, vynález je míněn tak, že zahrnuje také jiné formy expresních vektorů, jako jsou virové vektory (například replikace – deficientní retroviry, adenoviry a adeno–asociované viry), které slouží ekvivalentní funkci.

Termín „rekombinantní hostitelská buňka" (nebo jednoduše „hostitelská buňka", jak je zde použit, označuje buňku, do které byl vložen rekombinantní expresní vektor. Mělo by být jasné, že tyto termíny označují nejenom určitou jednotlivou buňku, ale potomstvo takové buňky. Protože v dalších generacích může dojít k určitým modifikacím díky mutacím nebo vlivu prostředí, nemusí být takové potomstvo ve skutečnosti identické s rodičovskou buňkou, ale stále spadá do významu termínu „hostitelská buňka" jak je zde použit.

Různé aspekty vynálezu jsou dále podrobněji popsány v následujících sekcích.

I. Lidské protilátky, které se vážou na lidský TNFα

Tento vynález poskytuje izolované lidské protilátky, nebo jejich antigen–vazebné části, které se vážou na lidský TNFα s vysokou afinitou, nízkou rychlostní konstantou a vysokou neutralizační kapacitou. Vhodně jsou lidské protilátky podle předkládaného vynálezu rekombinantní, neutralizační lidské anti–hTNFα protilátky. Nejvýhodnější rekombinantní, neutralizační protilátky podle předkládaného vynálezu je zde určena D2E7 a má VL a VH sekvence jak jsou ukázány na obrázcích 1A, 1B a obrázcích 2A, 2B, v příslušném pořadí (aminokyselinová VL regionu D2E7 je také ukázána v SEQ ID NO: 1; aminokyselinová VH regionu D2E7 je také ukázána v SEQ ID NO: 2). Vazebné charakteristiky D2E7 ve srovnání s myší anti–hTNFα MAK 195 mAb, která vykazuje vysokou afinitu a pomalu disociační kinetiku a s další lidskou anti–hTNFα protilátkou se sekvencí příbuznou D2E7, 2SD4, jsou shrnuty níže:

Protilátka	K_{off} S^{-1}	K_{on} $M^{-1}S^{-1}$	K_d M	Stechiometrie
D2E7 IgG1	$8{,}81 \times 10^{-5}$	$1{,}91 \times 10^{5}$	$6{,}09 \times 10^{-10}$	1,2
2SD4 IgG4	$8{,}4 \times 10^{-3}$	$4{,}20 \times 10^{5}$	$2{,}00 \times 10^{-8}$	0,8
MAK 195 F $(ab')_2$	$8{,}70 \times 10^{-5}$	$1{,}90 \times 10^{5}$	$4{,}60 \times 10^{-10}$	1,4

D2E7 protilátka a příbuzné protilátky, také vykazují silnou kapacitu pro neutralizaci aktivity hTNFα, jak je hodnoceno několika in vitro a in vivo testy (viz příklad 4). Například, tyto protilátky neutralizují hTNFα–indukovanou cytotoxicitu L929 buněk s hodnotami IC_{50} v rozmezí od asi 10^{-7} M do asi 10^{-10} M. D2E7, pokud je exprivována jako kompletní IgG1 protilátka, neutralizuje hTNFα–indukovanou cytotoxicitu L929 buněk s IC_{50} asi 1,25 x 10^{-10} M. Navíc, neutralizační kapacita D2E7 je uchovávána, pokud je protilátka exprivována jako Fab, $F(ab')_2$ nebo scFv fragment. D2E7 také inhibuje TNFα–indukovanou buněčnou aktivaci, jak je měřena hTNFα–indukovanou ELAM expresí na HUVEC (IC_{50} = si 1,85 x 10^{-10} M), a vazbu hTNFα na receptory pro hTNFα na U–937 buňkách (IC_{50} = asi 1,56 x 10^{-10} M). S ohledem na poslední uvedené D2E7 inhibuje vazbu hTNFα jak na p55, tak na p75 receptory pro hTNFα. Kromě toho, protilátka inhibuje hTNFα–indukovanou letalitu in vivo u myší (ED_{50} = 1 – 2,5 μg/myš).

Co se týká vazebné specificity D2E7, tato protilátka se váže na lidský TNFα v různých formách, včetně solubilního hTNFα, transmembránového hTNFα a hTNFα navázaného na buněčné receptory. D2E7 se neváže specificky na jiné cytokiny, jako je lymfotoxin (TNFβ), IL–1α, IL–1β, IL–2, IL–4, IL–6, IL–8, IFNτ a TGF–β. Nicméně, D2E7 vykazuje zkrácenou reaktivitu s faktorem nekrosy nádorů z jiných druhů. Například, protilátka neutralizuje aktivitu alespoň pěti TNFα od jiných primátů (šimpanzího, paviáního, kosmaního, makaka (cynomolgus) a makaka rhesus) s přibližně stejnými hodnotami IC_{50} jako pro neutralizaci hTNFα, (viz příklad 4, sekce 4). D2E7 také neutralizuje aktivitu myšího TNFα, asi 1000–krát hůře, než lidského TNFα (viz příklad 4, sekce E). D2E7 se také váže na psí a prasečí TNFα.

V jednom aspektu se vynález týká D2E7 protilátek a částí protilátek a dalších lidských protilátek a částí protilátek se shodnými vlastnostmi jako má D2E7, tak, jako je vysoce afinitní vazba na hTNFα s pomalou disociační kinetikou a vysokou neutralizační kapacitou. V jednom provedení poskytuje vynález izolovanou lidskou protilátku, nebo její antigen–vazebnou část, která disociuje z lidského TNFα s K_d 1 x 10^{-8} M nebo nižší K_{off} rychlostní konstantou 1 x $10^{-3}s^{-1}$ nebo nižší, kde obě tyto hodnoty jsou určeny povrchovou plazmovou rezonancí, a která neutralizuje cytotoxicitu lidského TNFα ve standardním in vitro L929 testu s IC_{50} 1 x 10^{-7} M nebo nižší. Lépe, izolovaná lidská protilátka, nebo její antigen–vazebná část, disociuje z lidského TNFα s K_{off} 5 x $10^{-4}s^{-1}$ nebo nižší. Lépe, izolovaná lidská protilátka, nebo její antigen–vazebná část, neutralizuje cytotoxicitu lidského TNFα ve standardním in vitro L929 testu s IC_{50} 1 x 10^{-8} M nebo nižší, ještě lépe s IC_{50} 1 x 10^{-9} M nebo nižší, a nejlépe s IC_{50} 1 x 10^{-10} M nebo nižší. Ve výhodných provedeních je protilátka izolovaná lidská rekombinantní protilátka, nebo její antigen–vazebná část. V dalším výhodném provedení protilátka také neutralizuje TNFα–indukovanou buněčnou aktivaci, jak je hodnocena za použití standardního in vivo testu pro TNFα–indukovanou expresi ELAm–1 na endotelových buňkách lidské pupeční žíly (HUVEC).

Analýza povrchovou plazmovou rezonancí pro určení K_d a K_{off} může být provedena tak, jak je popsáno v příkladu 1. Standardní in vitro L929 test pro určení hodnot IC_{50} je popsán v příkladu 4, sekci A. Standardní in vitro test pro TNFα–indukovanou expresi ELAM–1 na endotelových buňkách lidské pupeční žíly (HUVEC) je popsán v příkladu 4, sekci C. Příklady rekombinantních lidských protilátek, které splňují výše uvedená kriteria kinetiky a neutralizace, zahrnují protilátky mající následující (VH/VL) páry, jejichž sekvence jsou ukázány na obrázcích 1A, B, 2A a 2B (viz také příklady 2, 3 a 4 pro analýzu kinetiky a neutralizace): (D2E7 VH/D2E7 VL); (HD2E7*.A1/D2E7 VL); (HD2E7*.A2/D2E7 VL); (HD2E7*.A3/D2E7 VL); (HC2E7*.A4/D2E7 VL); (HD2E7*.A5/D2E7 VL); (HD2E7*.A6/D2E7 VL); (HD2E7*.A7/D2E7 VL); (HD2E7*.A8/D2E7 VL); (HD2E7*.A9/D2E7 VL); (D2E7 VH/LD2E7*.A1); (D2E7 VH/LD2E7*.A4); (D2E7*.A9/LD2E7*.A1); (VH1–D2/LOE7); (VH1–D2.N/LOE7.T); (VH1–D2.Y/LOE7.A); (VH–D2.N/LOE7.A); (VH1–D2/EP B12); a (3C–H2/LOE7A).

V oboru je dobře známo, že CDR3 domény těžkého a lehkého řetězce protilátky mají významnou úlohu ve vazebné specificitě/afinitě protilátky pro antigenu. V souladu s tím, že jiném aspektu, se

vynález týká lidských protilátek, které mají pomalou disociační kinetiku pro asociaci s hTNFα a které mají CDR3 domény těžkého a lehkého řetězce, které jsou strukturálně identické nebo příbuzné k doménám D2E7. Jak je ukázáno v příkladu 3, pozice 9 D2E7 VL CDR3 může být obsazena Ala nebo Thr bez významného ovlivnění K_{off}. V souladu s tím konsensuální motiv pro D2E7 VL CDR3 obsahuje aminokyselinovou sekvenci: Q–R–Y–N–R–A–P–Y–(T/A) (SEQ ID NO: 3). Dále, pozici 12 D2E7 VL CDR může být obsazena Tyr nebo Asn bez významného ovlivnění K_{off}. V souladu s tím, konsensuální motiv pro D2E7 VL CDR3 obsahuje aminokyselinovou sekvenci: V–S–Y–L–S–T–A–S–S–L–D–(Y/N) (SEQ ID NO: 4). Kromě toho, jak je ukázáno v příkladu 2, CDR3 doména těžkých a lehkých řetězců D2E7 je vhodná pro substituce jedním alaninovým zbytkem (v pozicích 1, 4, 5, 7 nebo 8 ve VL CDR3 nebo v pozicích 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 nebo 11 ve VH CDR3) bez významného ovlivnění K_{off}. Ještě dále, odborníci v oboru ocení, že při dané přístupnosti D2E7 VL a VH CDR3 domén k substitucím alaninem mohou být možné substituce jiných aminokyselin v CDR3 doménách za zachování nízké rychlostní konstanty disociace protilátky, zejména substituce konzervativními aminokyselinami. „Konzervativní aminokyselinová substituce", jak je zde použito, je substituce, při které je jeden aminokyselinový zbytek nahrazen jiným aminokyselinovým zbytkem majícím podobný postranní řetězec. Rodiny aminokyselinových zbytků majících podobné postranní řetězce byly v oboru identifikovány a zahrnují bazické postranní řetězce (například lysin, artinin, histidin), kyselé postranní řetězce (například kyselina aspartová, kyselina glutamová), nenabité polární postranní řetezce (například glycin, asparagin, glutamin, serin, threonin, tyrosin, cystein), nepolární postranní řetězce (například alanin, valin, leucin, isoleucin, prolin, fenylalanin, methionin, tryptofan), beta–větvené postranní řetězce (například threonin, valin, izoleucin) a aromatické postranní řetězce (například threonin, valin, izoleucin) a aromatické postranní řetězce (například tyrosin, fenylalanin, tryptofan, histidin). Výhodně je provedeno ne více než pět konzervativních aminokyselinových substitucí v D2E7 VL a/nebo VH CDR3 doménách. Lépe je provedeno ne více než jedna až tři konzervativní aminokyselinové substituce v D2E7 VL a/nebo VH CDR3 doménách. Dále by neměly být provedeny konzervativní aminokyselinové substituce v aminokyselinových pozicích kritických pro vazbu na hTNFα. Jak je ukázáno na obrázku 3, pozice 2 a 5 D2E7 VL CDR3 a pozice 1 a 7 DE27 VH CDR3 se zdají být kritické pro interakci s hTNFα a proto by výhodně neměly být konzervativní aminokyselinové substituce uvedeny v těchto pozicích (ačkoliv alaninová substituce v pozici 5 D2E7 VL CDR3 je přijatelná, jak je popsáno výše).

V souladu s tím, v jiném provedení, poskytuje vynález izolovanou lidskou protilátku, nebo její antigen–vazebnou část, s následujícími charakteristikami:

a) disociuje z lidského TNFα s K_{off} rychlostní konstantou 1×10^{-3} s^{-1} nebo menší, jak je určeno povrchovou plazmovou rezonancí;

b) má CDR3 doménu lehkého řetězce obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 3, nebo sekvenci modifikovanou ze SEQ ID NO: 3 jednou substitucí alaninu v pozici 1, 4, 5, 7 nebo 8 nebo jednou až pěti konzervativními aminokyselinovými substitucemi v pozicích 1, 3, 4, 6, 7, 8 a/nebo 9.

c) má CDR3 doménu těžkého řetězce obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 4, nebo sekvenci modifikovanou ze SEQ ID NO: 4 jednou substitucí alaninu v pozici 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 nebo 11 nebo jednou až pěti konzervativními aminokyselinovými substitucemi v pozicích 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 a/nebo 12.

Lépe, protilátka, nebo její antigen–vazebná část, disociuje z lidského TNFα s K_{off} $5 \times 10^{-4} s^{-1}$ nebo menší. Ještě lépe, protilátka, nebo její antigen–vazebná část, disociuje z lidského TNFα s K_{off} $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ nebo menší.

V ještě jiném provedení poskytuje vynález izolovanou lidskou protilátku, nebo její antigen–vazebnou část, s variabilním regionem lehkého řetězce (LCVR) majícím CDR3 doménu

obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 3, nebo sekvenci modifikovanou ze SEQ ID NO: 3 jednou substitucí alaninu v pozici 1, 4, 5 nebo 8 a s variabilním regionem těžkého řetězce (HCVR) majícím CDR3 doménu obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 4, nebo sekvenci modifikovanou ze SEQ ID NO: jednou substitucí alaninu v pozici 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 nebo 11. Lépe, LCVR má dále CDR2 doménu obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 5 (tj. D2E7 VL CDR2) a HCVR má dále CDR2 doménu obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 6 (tj. D2E7 VH CDR2). Ještě lépe, LCVR má dále CDR1 doménu obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 7 (tj. D2E7 VL CDR1) a HCVR má dále CDR1 doménu obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 8 (tj. D2E7 VH CDR1). Regiony pracovního rámečku pro VL jsou výhodně z Vkappa1 lidské zárodečné rodiny, lépe z Vk genu A20 lidské zárodečné linie a nejlépe z D2E7 VL sekvencí pracovního rámečku pro VH jsou výhodně z V_H3 lidské zárodečné rodiny, lépe z VH genu DP–31 lidské zárodečné linie a nejlépe z D2E7 VH sekvencí pracovního rámečku ukázaných na obrázcích 2A a 2B.

V ještě jiném provedení poskytuje vynález izolovanou lidskou protilátku, nebo její antigen–vazebnou část, s variabilním regionem lehkého řetězce (LCVR) obsahujícím aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 1 (tj. D2E7 VL) a variabilní regionem těžkého řetězce (HCVR) obsahujícím aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 2 (tj. D2E7 VH). V určitých provedeních má protilátka konstantní region těžkého řetězce, jak je konstantní region IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM nebo IgD. Výhodně je konstantní region těžkého řetězce konstantní region těžkého řetězce IgG1 nebo konstantní region těžkého řetězce IgG4. Navíc, protilátka může obsahovat konstantní region lehkého řetězce, buď konstantní region kappa lehkého řetězce, nebo konstantní region lambda lehkého řetězce. Výhodně protilátka obsahuje konstantní region kappa lehkého řetězce. Alternativně, částí protilátky může být například Fab fragment nebo jednořetězcový Fv fragment.

V ještě jiných provedeních poskytuje vynález izolovanou lidskou protilátku, nebo její antigen–vazebnou část, mající s D2E7–příbuzné VL a VH CDR3 domény, například protilátky nebo jejich antigen–vazebné části, s variabilním regionem lehkého řetězce (LCVR) obsahujícím CDR3 doménu obsahující aminokyselinovou sekvenci vybranou ze skupiny skládající se z SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 a SEQ ID NO: 26 nebo s variabilní regionem těžkého řetězce (HCVR) obsahujícím CDR3 doménu obsahující aminokyselinovou sekvenci vybranou ze skupiny skládající se z SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 a SEQ ID NO: 35.

V ještě jiném provedení poskytuje vynález rekombinantní lidskou protilátku, nebo její antigen–vazebnou část, která neutralizuje aktivitu lidského TNFα, ale nikoli lidského TNFβ. Výhodně protilátka, nebo její antigen–vazebná část, neutralizuje také aktivitu šimpanzího TNFα a alespoň jednoho dalšího TNFα od primátů, který je vybrán ze skupiny skládající se z paviáního TNFα, kosmaního TNFα, makak (cynomolgus) TNFα a makak rhesus TNFα. Výhodně protilátka, nebo její antigen–vazebná část, neutralizuje lidský, šimpanzí a/nebo další primáti TNFα ve standardním in vitro L929 testu s IC_{50} 1 x 10^{-8} M nebo menší, lépe 1 x 10^{-9} M nebo menší a ještě lépe 5 x 10^{-10} M nebo menší. V jednom podprovedení protilátka také neutralizuje aktivitu psího TNFα, výhodně ve standardním in vitro L929 testu s IC_{50} 1 x 10^{-7} M nebo menší, lépe 1 x 10^{-8} M nebo menší a ještě lépe 5 x 10^{-9} M nebo menší. V jiném podprovedení protilátka také neutralizuje aktivitu prasečího TNFα, výhodně s IC_{50} 1 x 10^{-5}M nebo menší, lépe 1 x 10^{-6} M nebo menší a ještě lépe 5 x 10^{-7} M nebo menší. V ještě jiném podprovedení protilátka také neutralizuje aktivitu myšího TNFα, výhodně s IC_{50} 1 x 10^{-4} M nebo menší, lépe 1 x 10^{-5} M nebo menší a ještě lépe 5 x 10^{-6} M nebo menší.

Protilátka nebo část protilátky podle předkládaného vynálezu může být derivatizována nebo může být navázána na jinou funkční (například na jiný peptid nebo protein). V souladu s tím protilátky a části protilátek podle předkládaného vynálezu zahrnují derivatizované a jinak modifikované formy lidských anti–hTNFα protilátek zde popsané, včetně imunoadhezních molekul. Například, protilátka nebo část protilátky podle předkládaného vynálezu může být funkčně navázána (např. chemickou vazbou, genetickou fúzí, nekovalentní asociací nebo jinak) na jednu nebo více molekulových entit, jako je jiná protilátka (například, bispecifická protilátka nebo dialátka), detekovatelné činidlo, cytotoxické činidlo, farmaceutické činidlo a/nebo protein, nebo peptid, který může zprostředkovat asociaci protilátky nebo části protilátky s jinou molekulou (jako je jaderný region streptavidinu nebo polyhistidinová smyčka).

Jeden typ derivatizované protilátky je produkován zkrácenou vazbou mezi dvěma nebo více protilátkami (stejného nebo různého typu, například pro tvorbu bispecifických protilátek). Vhodná činidla způsobující zkříženou vazbu jsou tak, která jsou heterobifunkční a mají dvě různě reaktivní skupiny separované vhodnou vmezeřenou skupinou (například m–meleimidobenzoyl–N–hydroxysukcimid ester) nebo jsou homobifunkční (například disukcinimidilsuberat). Taková činidla je možno získat od Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

Použitelná detekovatelná činidla, se kterými může být protilátka nebo část protilátky vázána, zahrnují flurescentní sloučeniny. Příklady fluorescentních detekovatelných činidel zahrnují fluorescein, fluorescein isothiokyanat, rhodamin, 5–dimethylamin–1–naftalensulfonylchlorid, fykoerytrin a podobně. Protilátka může být také navázána na detekovatelné enzymy, jako je alkalická fosfatasa, křenová peroxidasa, glukosa–oxidasa a podobně. Pokud je protilátka navázána na detekovatelný enzym, pak je detekována přidáním dalších činidel, která enzym využívá pro produkci detekovatelného reakčního produktu. Například, když je jako detekovatelné činidlo použita křenová peroxidasa, pak přidání peroxidu vodíku diaminobenzidinu vede ke vzniku barevného produktu reakce, který je detekovatelný. Protilátka může být také navázána na biotin a detekována pomocí nepřímého měření vazby avidinu nebo streptavidinu.

II. Exprese protilátek

Protilátka, nebo část protilátky, podle předkládaného vynálezu, může být připravena rekombinantní expresí genů pro lehké a těžké řetězce imunoglobulinu v hostitelské buňce. Pro rekombinantní expresi protilátky je hostitelská buňka transfektována jedním nebo více rekombinantními expresními vektory nesoucími DNA fragmenty kódujícími lehké a těžké řetězce imunoglobulinové protilátky, takže lehké a těžké řetězce jsou exprivovány v hostitelské buňce a, výhodně, secernovány do média, ve kterém jsou hostitelské buňky kultivovány. Pro získání genů pro lehké a těžké řetězce protilátky, inkorporaci těchto genů do rekombinantních expresních vektorů a pro vložení vektorů do hostitelských buněk jsou použity standardní rekombinantní DNA metody, jako jsou ty, které jsou popsány v Sambrook, Fritsch a Maniatis (vyd), Molecular Clonint: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), Ausubel, F. M. et al. (vyd.) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, (1989), a patentu US 4 816 397 od Boss et al..

Pro expresi D2E7 a D2E7–příbuzných protilátek jsou nejprve získány DNA fragmenty kódující variabilní regiony lehkého a těžkého řetězce. Tyto DNA mohou být získána amplifikací a modifikací variabilních sekvencí lehkého a těžkého řetězce zárodečné linie za použití polymerasové řetězové rekce (PCR). DNA sekvence zárodečné linie pro geny pro variabilní regiony lehkého a těžkého řetězce jsou v oboru známé (viz například „Vbaze“ databáze sekvencí lidské zárodečné linid; viz též Kabat, E. A. et al., (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. vydání, U.S. Department of Health and Human Services, NIH publikace č. 91–3242; Tomlison, I.M. et al (1992), „The Repertoire of Human Germline V_H Sequences reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops“, J. Mol. Biol. 227: 776 až 798; a Cox., J. P. L. et al., (1994), „A Directory of Human Germline K_{kappa} Segments Reveals a Strong Bias in their Usage“, Eur. J. Immunol. 24: 827 až 836; jejichž obsah je zde uveden jako odkaz). Pro získání

DNA fragmentu kódujícího variabilní region těžkého řetězce D2E7, nebo D2E7 příbuzné protilátky je člen V_H3 rodiny lidských zárodečných VH genů amplifikován standardním PCR. Nejlépe je amplifikována DP–31 VH sekvence zárodečné linie. Pro získání DNA fragmentu kódujícího variabilní region lehkého řetězce, nebo D2E7 příbuzné protilátky je člen Vkapal rodiny lidských zárodečných VL genů amplifikován standardní PCR. Nejlépe je amplifikována A20 VL sekvence zárodečné linie. PCR primery vhodné pro použití při amplifikaci sekvencích DP–31 VH a A20 VL zárodečné linie mohou být navrženy na základě nukleotidových sekvencí popsaných v odkazech citovaných výše, za použití standardních metod.

Po získání VH a VL fragmentů zárodečné linie mohou být tyto sekvence mutovány tak, aby kódovaly D2E7 nebo D2E7–příbuzné aminokyselinové sekvence, které jsou zde popsány. Aminokyselinové sekvence kódované zárodečnými VH a VL DNA sekvencemi jsou nejprve srovnávány s D2E7 a D2E7–příbuznými VH a VL aminokyselinovými sekvencemi pro identifikaci aminokyselinových zbytků v D2E7 a D2E7–příbuzných sekvencích, které se liší od zárodečné linie. Potom jsou vhodné nukleotidy v zárodečné DNA sekvenci mutovány tak, aby mutovaná zárodečná sekvence kódovala D2E7 nebo D2E7–příbuznou aminokyselinovou sekvenci, za použití genetického kódu pro určení toho, které nukleotidové změny mají být provedeny. Mutageneze zárodečných sekvencí je provedena standardními metodami, jako je PCR–zprostředkovaná mutageneze (ve které jsou mutované nukleotidy inkorporovány do PCR primerů tak, že PCR produkt obsahuje mutace) nebo místně řízená mutageneze.

Kromě toho, mělo by být uvedeno, že pokud „zárodečné“ sekvence získané PCR amplifikací kódují aminokyselinové rozdíly v regionech pracovního rámečku vzhledem ke správné zárodečné konfiguraci (tj. odlišnosti v amplifikované sekvenci při srovnání se správnou zárodečnou sekvencí, například v důsledku somatických mutací), může být žádoucí změna těchto aminokyselinových odlišností zpět na správné zárodečné sekvence (tj. „zpětná mutace“ zbytků v pracovním rámečku na konfiguraci zárodečné sekvence).

Po získání DNA fragmentů kódujících D2E7 nebo D2E7–příbuzné Vh a VL segmenty (amplifikací nebo mutagensí ze zárodečných VH a VL genů, jak je popsáno výše), mohou být tyto DNA fragmenty dále upravovány standardními rekombinantními DNA technikami, například pro konverzi genů pro variabilní region na geny pro kompletní řetězec protilátky, ne geny pro Fab fragment nebo na geny pro scFv. Při těchto úpravách je VL– nebo VH– kódující DNA fragment operativně navázán na jiný DNA fragment kódující jiný protein, jako je konstantní region protilátky nebo flexibilní linker. Termín „operativně navázán“, jak je zde použit, znamená, že dva DNA fragmenty jsou spojeny tak, že aminokyselinová sekvence kódovaná dvěma DNA fragmenty zůstává v rámečku.

Izolovaná DNA kódující VH region může být přeměněna na kompletní gen pro těžký řetězec operativní vazbou VH–kódující DNA na jinou molekulu DNA kódující konstantní regiony těžkého řetězce (CH1, CH2 a CH3). Sekvence lidských genů pro konstantní regiony těžkého řetězce jsou v oboru známé (Kabat, E. A. et al., (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. vydání. U.S. Department of Health and Human Services, NIH publikace č. 91–3242) a DNA fragment obsahující tyto regiony mohou být získány standardní PCR amplifikací. Konstantní regiony těžkého řetězce mohou být konstantní regiony IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM nebo IgD, ale nejlépe to jsou konstantní regiony IgG1 nebo IgG4. Pro gen pro Fab fragment těžkého řetězce může být VH–kódující DNA operativně navázána na jinou DNA molekulu kódující pouze CH1 konstantní region těžkého řetězce.

Izolovaná DNA kódující VL region může být přeměněna na kompletní gen pro lehký řetězec operativní vazbou VL–kódující DNA na jinou molekulu DNA kódující konstantní region lehkého řetězce (CL). Sekvence lidských genů pro konstantní regiony lehkého řetězce jsou v oboru známé (Kabatm, E.a. et al., (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. vydání. U.S. Department of health and Human Services, NIH publikace č. 91–3242) a DNA fragmenty obsahující tyto regiony mohou být získány standardní PCR amplifikací. Konstantní region lehké-

ho řetězce může být konstantní region kappa nebo lambda, ale nejlépe to je konstantní region kappa.

Pro vytvoření scFV genu jsou VH– a VL– kódující DNA fragmenty Operativně navázány na jiný fragment kódující flexibilní linker, například kódující aminokyselinovou sekvenci $(Gly_4 - Ser)_3$ tak, že VL a VH sekvence mohou být exprimovány jako pokračující jednořetězcový protein, s VH a VL regiony spojenými flexibilním linkerem (viz například Bird et al., (1988) Science 242. 423 až 426; Houston et al. (1988) Proc. natl. Acad. Sci. USA 85: 5879 až 5883; McCafferty et al., Nature (1990) 348: 552 až 554).

Pro expresi protilátek nebo částí protilátek podle předkládaného vynálezu je DNA kódující částečné nebo úplné těžké a lehké řetězce, získaná jak je popsáno výše, insertována do expresních vektorů tak, že geny jsou operativně vázány na transkripční a translační kontrolní sekvence. V tomto ontexu termín „operativně vázány" znamená, že gen pro protilátku je ligován do takového vektoru tak, že transkripční a translační kontrolní sekvence ve vektoru slouží jako regulátory transkripce a translace genu pro protilátku. Expresní vektor a expresní kontrolní sekvence jsou vybrány tak, aby byly kompatibilní s expresí v použité hostitelské buňce. Gen pro lehký řetězec protilátky a gen pro těžký řetězec protilátky mohou být insertovány do jednotlivých vektorů, nebo, častěji, jsou oba geny insertovány do stejného expresního vektoru. Geny pro protilátku jsou insertovány do expresního vektoru standardními metodami (např. ligací komplementárních restrikčních míst na fragmentu genu pro protilátku a vektoru, nebo ligací tupých konců, pokud nejsou přítomna žádná restrikční místa). Před insercí D2E7 nebo D2E7–příbuzných sekvencí lehkých a těžkých řetězců může již expresní vektor nést sekvence pro konstantní region protilátky. Například, jeden přístup pro konversi D2E7 nebo D2E7–příbuzných VH a Vl sekvencí na geny pro kompletní protilátku je jejich inserce do expresního vektoru již kódujícího konstantní regiony lehkého a těžkého řetězce, v příslušném pořadí, takže VH segment je operativně vázán na CH segment ve vektoru a VL segment je operativně vázán na CL segment ve vektoru. Další nebo alternativní rekombinantní expresní vektory mohou kódovat signální peptid, který usnadňuje sekreci protilátkového řetězce z hostitelské buňky. Gen pro řetězec protilátky může být klonován do vektoru tak, že signální peptid je navázán v rámečku s amino–koncem genu pro řetězec protilátky. Signální peptidem může být imunoglobulinový signál peptid nebo heterologní signální peptid (tj. signální peptid z neimunoglobulinového proteinu).

Kromě genů pro řetězce protilátky mohou rekombinantní expresní vektory podle předkládaného vynálezu nést regulační sekvence, které kontrolují expresi genů pro řetězce protilátky v hostitelské buňce. Termín „regulační sekvence" zahrnuje promotory, enhancery a jiné expresní kontrolní elementy (například polyadenylační signály), které kontrolují transkripci a translaci genů pro řetězce protilátky. Takové regulační sekvence jsou popsány, například, v Goeddel: Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Odborníkům v oboru bude jasné, že vývoj expresního vektoru, včetně selekce regulačních sekvencí, může záviset na takových faktorech, jako je volba hostitelské buňky, která má být transformována, požadované hladině exprese proteinu, atd. Výhodné regulační sekvence pro expresi v savčí hostitelské buňce zahrnují virové elementy, které řídí vysokou hladinu proteinové exprese v savčích buňkách, jako jsou promotory a/nebo enhancery odvozené od cytomegaloviru (CMV) (jako CMV promotor/enhancer), Simian Virus 40 (SV40) (jako je SV40 promotor/-enzancer), adenoviru (například adenovirový hlavní pozdní promotor (AdMLP)) a od polyomaviru. Pro další popis virových regulačních elementů a jejich sekvencí viz například patent US 5 168 062 od Stinski, patent US 4 510 245 od Bell et al. a patent US 4 968 615 od Schaffner et al..

Kromě genů pro řetězce protilátek a regulačních sekvencí mohou rekombinantní expresní vektory podle předkládaného vynálezu nést další sekvence, jako jsou sekvence, které regulují replikaci vektoru v hostitelské buňce (například zdroje replikace) a geny pro selektovatelné markery. Gen pro selektovatelné marker usnadňuje selekci hostitelských buněk, do kterých byl vektor zaveden (viz například patent US 4 399 216, 4 634 665 a 5 179 017 od Axel et al.). Například, typicky

způsobuje selektovatelný markerový gen rezistenci hostitelské buňky, do které byl vektor zaveden, na léky, jako je G418, hygromycin nebo methotrexat. Výhodné geny pro selektovatelný marker zahrnují gen pro dihydrofolatreduktasu (DHFR) (pro použití u dhfr$^-$ hostitelských buněk se selekcí/amplifikací methotrexatem) a nebo gen (pro selekci G418).

Pro expresi těžkých a lehkých řetězců je expresní vektor(y) kódující těžké a lehké řetězce přenesen do hostitelských buněk standardními technikami. Různé formy termínu „transfekce" zahrnují širokou škálu technik běžně používaných pro vložení exogenní DNA do prokaryotických nebo eukaryotických hostitelských buněk, například elektroporaci, srážení fosforečnanem vápenatým, DEAE–dextranovou transfekci a podobně. Ačkoliv je teoreticky možné exprivovat protilátky podle předkládaného vynálezu jak v prokaryotických, tak v eukaryotických hostitelských buňkách, je exprese protilátek v eukaryotických buňkách, a zejména v savčích hostitelských buňkách, nejvíce preferována, jelikož takové eukaryotické buňky, a zejména savčí buňky, jsou s větší pravděpodobností než prokaryotické buňky schopny sestavit a secernovat řádně složenou a imunologicky aktivní protilátku. Prokaryotická exprese genů pro protilátky byla popsána jako neúčinná pro produkci větších množství aktivních protilátek (Boss, M. A. a Wood, C. R. (1985) Immunology Today 6: 12 až 13).

Výhodné savčí hostitelské buňky byly expresi rekombinantních protilátek podle předkládaného vynálezu zahrnují Ovariální buňky čínského křečka (CHO) (včetně dhfr$^-$ CHO buněk, které popisuje Urlaub a Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 až 4220, Použitých s DHFR selektovatelným markerem, například jak to popisuje R.J. Kaufman a P. A. Sharp (1982), Mol. Biol. 159: 601 až 621), NSO myelomové buňky, COS buňky a SP2 buňky. Když jsou rekombinantní expresní vektory kódující protilátkové geny vloženy do savčích hostitelských buněk, tak jsou protilátky produkovány kultivací hostitelských buněk po dobu dostatečnou pro expresi protilátky v hostitelských buňkách, nebo, lépe, pro sekreci protilátky do kultivačního média, ve kterém jsou hostitelské buňky kultivovány. Protilátky mohou být získány z kultivačního média za použití standardních metod pro přečištění proteinů.

Hostitelské buňky mohou být také použity pro produkci částí intaktních protilátek, jako jsou Fab fragmenty nebo scFv molekuly. Mělo by být jasné, že variace výše uvedeného postupu spadají do rozsahu předkládaného vynálezu. Například, může být žádoucí transfekce hostitelské buňky DNA kódující buď lehký řetězec, nebo těžký řetězec (ale ne oba) protilátky podle předkládaného vynálezu. Rekombinantní DNA technologie může být také použita pro odstranění některých nebo všech DNA kódujících jeden nebo oba z těžkých a lehkých řetězců, které nejsou nezbytné pro vazbu na hTNFα. Molekuly exprimované z takových zkrácených molekul DNA jsou také obsaženy v protilátkách podle předkládaného vynálezu. Kromě toho, mohou být produkovány bifunkční protilátky, ve kterých je jeden lehký a jeden těžký řetězce z protilátky podle předkládaného vynálezu a jiný těžký a lehký řetězec jsou specifické pro antigen jiný než hTNFα řízenou vazbou protilátky podle překládaného vynálezu s druhou protilátkou standardními metodami chemické zkřížené vazby.

Ve výhodném systému pro rekombinantní expresi protilátky nebo její antigen–vazebné části podle předkládaného vynálezu je rekombinantní expresní vektor kódující jak těžký řetězec protilátky, tak lehký řetězec protilátky zaveden do dhfr$^-$ CHO buněk transfekcí zprostředkovanou fosforečnanem vápenatým. V rekombinantním expresním vektoru jako geny pro lehké a těžké řetězce protilátky operativně navázány na enhancerové/promotorové regulační elementy (například odvozené od SV40, CMV, adenoviru a podobně, jako je CMV enhancerový/AdNLP promotorový regulační element nebo SV40 enhancerový/AdNLP promotorový regulační element) pro řízení vysokých hladin transkripce genů. Rekombinantní expresní vektor také nese DHRF gen, který umožňuje selekci CHO buněk, které byly transfektovány vektorem, za použití selekce/amplifikace methotraxatem. Selektované transformované hostitelské buňky jsou kultivovány pro umožnění exprese lehkých a těžkých řetězců protilátky a intaktní protilátka získána z kultivačního média. Standardní techniky molekulární biologie jsou použity pro přípravu rekom-

binantního expresního vektoru, transfekce hostitelských buněk, selekci transformantů, kultivaci hostitelských buněk a získání protilátky z kultivačního média.

Z pohledu dříve uvedeného se další aspekt vynálezu týká přípravků nukleových kyselin, vektorů a hostitelských buněk, které mohou být použity pro rekombinantní expresi protilátek a částí protilátek podle předkládaného vynálezu. Nukleotidová sekvence kódující variabilní region lehkého řetězce D2E7 je ukázána na obrázku 7 a v SEQ ID NO: 36. CDR1 doména LCVR obsahuje nukleotidy 70 – 102, CDR2 doména obsahuje nukleotidy 148 – 168 a CDR3 doména obsahuje nukleotidy 265 – 291. Nukleotidová sekvence kódující variabilní region těžkého řetězce D2E7 je ukázána na obrázku 8 a v SEQ ID NO: 37. CDR1 doména HCVR obsahuje nukleotidy 91 – 105, CDR2 doména obsahuje nukleotidy 148 – 198 a CDR3 doména obsahuje nukleotidy 295 – 330. Odborníkům v oboru bude jasné, že nukleotidové sekvence kódující D2E7–příbuzné protilátky nebo části protilátek (například CDR doménu, jako je CDR3 doména), mohou být odvozeny od nukleotidových sekvencí kódujících D2E7 LCVR a HCVR za použití genetického kódu a standardních technik molekulární biologie.

V jednom provedení poskytuje vynález izolovanou nukleovou kyselinu kódující CDR3 doménu lehkého řetězce obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 3 (tj. D2E7 VL CDR3), nebo sekvenci modifikovanou ze SEQ ID NO: 3 jednou substitucí alaninu v pozici 1, 4, 5, 6 nebo 8 a nebo pěti konzervativními aminokyselinami substitucemi v pozicích 1, 3, 4, 6, 7,8 a/nebo 9. Tato nukleová kyselina může kódovat pouze CDR3 region, nebo výhodněji, kdo je celý variabilní region lehkého řetězce protilátky (LCVR). Například, nukleová kyselina může kódovat LCVR mající CDR2 doména obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 5 (tj. D2E7 VL CDR2) a CDR1 doménu obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 7 (tj. D2E7 VL CDR1).

V jiném provedení poskytuje vynález izolovanou nukleovou kyselinu kódující CDR3 doménu těžkého řetězce obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 4 (tj. D2E7 VH CDR3), nebo sekvenci modifikovanou ze SEQ ID NO: 4 jednou substitucí alaninu v pozici 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 nebo 11 a nebo pěti konzervativními aminokyselinovými substitucemi v pozicích 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 a/nebo 12. Tato nukleová kyselina může kódovat pouze CDR3 region, nebo výhodněji, kóduje celý variabilní region těžkého řetězce protilátky (HCVR). Například, nukleová kyselina může kódovat HCVR mající CDR2 doménu obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 6 (tj. D2E7 VH CDR2) a CDR1 doménu obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 8 (tj. D2E7 VH CDR1).

V ještě jiném provedení vynález poskytuje izolované nukleové kyseliny kódující D2E7–příbuzné CDR3 domény, například obsahující aminokyselinové sekvence vybrané ze skupiny skládající se z: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 a SEQ ID NO: 35.

V ještě jiném provedení poskytuje vynález izolovanou nukleovou kyselinu kódující variabilní region lehkého řetězce protilátky obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 1 (tj. D2E7 LCVR). Výhodná nukleová kyselina obsahuje nukleotidovou sekvenci SEQ ID NO: 36, ačkoliv odborníkům v oboru bude jasné, že vzhledem k degeneraci genetického kódu mohou další nukleotidové sekvence kódovat aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 1. Nukleová kyselina může kódovat pouze LCVR, nebo může také kódovat konstantní region lehkého řetězce protilátky, operativně navázaný na LCVR. V jednom provedení je tato nukleová kyselina v rekombinantním expresním vektoru.

V ještě jiném provedení poskytuje vynález izolovanou nukleovou kyselinu kódující variabilní region těžkého řetězce protilátky obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 2 (tj. D2E7

HCVR). Výhodná nukleová kyselina obsahuje nukleotidovou sekvenci SEQ ID NO: 37, ačkoliv odborníkům v oboru bude jasné, že vzhledem k degeneraci genetického kódu mohou další nukleotidové sekvence kódovat aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 2. Nukleová kyselina může kódovat pouze HCVR, nebo může také kódovat konstantní region těžkého řetězce protilátky, operativně navázaný na HCVR. Například, nukleová kyselina může obsahovat konstantní region IgG1 nebo IgG4. V jednom provedení je také nukleová kyselina v rekombinantním expresním vektoru.

Vynález také poskytuje rekombinantní expresní vektory kódující jak lehký řetězec protilátky, tak těžký řetězec protilátky. Například, v jednom provedení, vynález poskytuje rekombinantní expresní vektor kódující:

a) lehký řetězec protilátky mající variabilní region obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 1 (tj. D2E7 LCVR); a

b) těžký řetězec protilátky mající variabilní region obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 2 (tj. D2E7 HCVR).

Vynález dále poskytuje hostitelské buňky, do kterých může být jeden nebo více z rekombinantních expresních vektorů podle předkládaného vynálezu zaveden. Vhodně je hostitelskou buňkou CHO buňka, NSO buňka nebo COS buňka.

Ještě dále vynález poskytuje způsob pro syntézu rekombinantní lidské protilátky podle předkládaného vynálezu kultivací hostitelských buněk podle předkládaného vynálezu ve vhodném kultivačním médiu do té doby, dokud není syntetizována rekombinantní lidská protilátka podle předkládaného vynálezu. Způsob může dále obsahovat izolaci rekombinantní lidské protilátky z kultivačního média.

III. Selekce rekombinantních lidských protilátek

Rekombinantní lidské protilátky podle předkládaného vynálezu jiné než D2E7 nebo D2E7–příbuzné protilátky zde popsané mohou být izolovány vyšetřením rekombinantní kombinatoriální knihovny protilátek, výhodně scFv fágové zobrazovací knihovny, připravené za použití lidské VH a VL cDNA připravených z mRNA odvozené od lidských lymfocytů. Způsoby pro přípravu a vyšetřování takových knihoven jsou v oboru známé. Kromě komerčně dostupných kitů pro generování fágových zobrazovacích knihoven (například Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, katalogové č. 27–9400–01; a Stratagene SurfZAP™ phage display kit, katalogové č. 240612), mohou být připraveny způsobů a činidel zejména vhodných pro použití při generování a vyšetřování protilátkových zobrazovacích knihoven nalezeny v, například, Ladner et al., Patent US 5 223 409; Kang et al., PCT přihláška WO 92/18619; Dower et al., PCT přihláška WO 91/17271; Winter et al., PCT přihláška WO 92/20791; Markland et al., PCT přihláška WO 92/15679; Breitling et al., PCT přihláška WO 93/01288; McCafferty et al., PCT přihláška WO 92/01047; Garrad et al., PCT přihláška Wo 92/09690; Fuchs et al., (1991), Bio/Technology 9. 1370 až 1372; Hay et al., (1992), Hum Antibod. Hybridomas 3: 81 až 85; Huse et al., (1989), Science 246: 1275 až 1281; McCafferty et al., Nature (1990), 348. 552 až 554; Griffiths et al (1993), EMBO J. 12: 725 až 734; Hawkins et al., (1992), J. Mol. Biol. 2226: 889 až 896; Clackson et al., (1991), nature 352: 624 až 628; Gram et al., (1992) Pnas 89: 3576 až 3580; Garrad et al., (1991) Bio/Technology 9. 1373 až 1377; Hoogenboom et al., (1991) Nuc. Acids Res. 19: 4133 až 4137; a Barbas et al., (1991) PNAS 88: 7978 až 7982.

Ve výhodném provedení, pro izolaci lidských protilátek s vysokou afinitou a nízkou rychlostní konstantou pro hTNFα je nejprve použita myší anti–hTNFα protilátka mající vysokou afinitu a nízkou rychlostní konstantu pro hTNFα (například MAK 195, jejíž hybridom má přírůstkové č. ECACC 87 050801) pro selekci sekvencí pro lidské těžké a lehké řetězce majících podobnou vazebnou aktivitu pro hTNFα, za použití epitopového imprintingu a řízené selekce, což jsou

metody, které popsal Hoogenboom et al., PCT přihláška WO 93/06213. Protilátkovou knihovnou použitou v této metodě jsou výhodně scFv knihovny připravené a vyšetřované jak je popsáno v McCafferty et al., PCT přihláška WO 92/01047, McCafferty et al., Nature (1990), 348: 552 až 554; Griffiths et al (1993), EMBO J. 12: 725 až 734. scFv protilátkové knihovny jsou výhodně vyšetřovány za použití rekombinantního lidského TNFα jako antigenu.

Po selekci počátečných lidských VH a VL segmentů jsou provedeny „smíchej a páruj" pokusy, ve kterých jsou různé páry počátečně vybraných VL a VH segmentů vyšetřovány na vazbu na hTNFα, pro selekci vybraných kombinací VL/VH párů. Kromě toho, pro další zvýšení afinity a/nebo snížení rychlostní konstanty pro vazbu na hTNFα mohou být Vl a VH segmenty výhodných VL/VH párů náhodně mutovány, výhodně v CDR3 regionu VH a/nebo VL, v procesu analogickém i in vivo procesu somatických mutací odpovědnému za afinitní dozrávání protilátek v průběhu přirozené imunitní odpovědi. Toto in vitro afinitní dozrávání může být provedeno amplifikací VH a VL regionů za použití PCR primerů komonementárních k VH CDR3 nebo VL CDR3, v příslušném pořadí, kdy primery jsou „napíchnuty" náhodnou směsí čtyř nukleotidových bází v určitých pozicích, takže vzniklé PCR produkty kódují VH a VL segmenty, ve kterých byly náhodné mutace vloženy do VH a/nebo Vl CDR3 regionů. Tyto náhodně mutované VH a VL segmenty mohou být znovu vyšetřovány na vazbu na hTNFα a mohou být vybrány sekvence, které vykazují nejvyšší afinitu a nejnižší rychlostní konstantu pro vazbu na hTNFα.

Aminokyselinové sekvence vybraných těžkých a lehkých řetězců protilátky mohou být srovnávány s aminokyselinovými sekvencemi zárodečných těžkých a lehkých řetězců. V případech, kdy se určité zbytky pracovních rámečků vybraných VL a/nebo VH řetězců liší od zárodečné konfigurace (například v důsledku somatické mutace imunoglobulinových genů použitých v přípravě fágové knihovny), může být žádoucí „zpětná mutace" změněných zbytků pracovního rámečku vybraných protilátek na zárodečnou konfiguraci (tj. změna aminokyselinové sekvence pracovního rámečku vybraných protilátek tak, aby byla stejná jako aminokyselinová sekvence pracovního rámečku v zárodečné linii). Takové „zpětné mutace" (nebo „germlining") zbytků pracovního rámečku může být provedena standardními metodami molekulární biologie pro zavedení specifických mutací (například místně řízenou mutagenezí; PCR–zprostředkovanou mutagenezí a podobně).

Po vyšetření a izolaci anti–hTNFα protilátky podle předkládaného vynálezu z rekombinantní imunoglobulinové zobrazovací knihovny může být nukleová kyselina kódující vybranou protilátku získána z zobrazovacího balíčku (například z fágového genomu) a může být subklonována do jiných expresních vektorů standardními rekombinantními DNA technikami. Pokud je to žádoucí, může být nukleová kyselina dále upravována za tvorby jiné formy protilátky podle předkládaného vynálezu (například může být navázána na nukleovou kyselinu kódující další imunoglobulinové domény, jako jsou další konstantní regiony). Pro expresi rekombinantní lidské protilátky izolované vyšetřováním kombinatoriální knihovny je DNA kódující protilátku klonována do rekombinantního expresního vektoru a vložena do savčích hostitelských buněk, jak bylo podrobněji popsáno v části II, výše.

IV. Farmaceutické přípravky a farmaceutické podání

Protilátky nebo části protilátek podle předkládaného vynálezu mohou být součástí farmaceutických přípravků vhodných pro podání subjektu. Typický farmaceutický přípravek obsahuje protilátku nebo část protilátky podle předkládaného vynálezu a farmaceuticky přijatelný nosič. Jak je zde použit, zahrnuje termín „farmaceuticky přijatelný nosič" jakákoliv rozpouštědla, dispersní média, potahy, antibakteriální a antimykotická činidla, izotonická činidla a činidla zpomalující absorpci a podobně, která jsou fyziologicky kompatibilní. Příklady farmaceuticky přijatelných nosičů zahrnují jeden nebo více z vody, salinického roztoku, fosfátem pufrovaného salinického roztoku, dextrosy, glycerolu, ethanolu a podobně, stejně jako jejich kombinace. V mnoha případech bude výhodné zahrnout do přípravku izotonická činidla, například cukry,

polyalkoholy jako je manitol, sorbitol, nebo chlorid sodný. Farmaceuticky přijatelné nosiče mohou dále obsahovat malá množství pomocných substancí jako jsou zvlhčující nebo emulzifikační činidla, konzervační činidla nebo pufry, která zvyšují poločas nebo účinnost protilátky nebo části protilátky.

Přípravky podle předkládaného vynálezu mohou být v různých formách. Tyto zahrnují, například, kapalné, semisolidní nebo solidní dávkové formy, jako jsou kapalné roztoky (například injikovatelné nebo infusibilní roztoky), disperse nebo suspense, tablety, pilulky, prášek, liposomy a čípky. Výhodná forma závisí na zamýšleném způsobu podání a terapeutické aplikaci. Typické preferované přípravky jsou ve formě injikovatelných nebo infusibilních roztoků, jako jsou přípravky, které se podobají přípravkům používaným pro pasivní imunizaci lidí jinými protilátkami. Výhodný způsob podání je parenterálně (například Intravenózně, subkutánně, intraperitoneálně, intramuskulárně), ve výhodném provedení je protilátka podána Intravenózní injekcí nebo infusí. V jiném výhodném provedení je protilátka podána intramuskulární nebo subkutánní injekcí.

Terapeutické přípravky musí typicky být sterilní a stabilní za podmínek výroby a skladování. Přípravek může být formulován jako roztok, mikroemulze, disperse, liposomový přípravek, nebo jiná řádná struktura vhodná ro vysokou koncentraci léčiva. Sterilní injikovatelné roztoky mohou být připraveny inkorporací aktivní sloučeniny (tj. protilátky nebo části protilátky) v požadovaném množství do vhodného rozpouštědla s jednou nebo s kombinací přísad vyjmenovaných výše, jak je potřeba, a potom filtrační sterilizací. Obecně, disperse jsou připraveny inkorporací aktivní sloučeniny do sterilního vehikula, které obsahuje základní dispersní médium a další požadované přísady z těch, které byly uvedeny výše. V případě sterilních prášků pro přípravu sterilních injikovatelných roztoků jsou výhodnými způsoby přípravy sušení vakuem a sublimace ze zmrazeného stavu, kterými se získá prášek aktivní složky plus jakékoliv další požadované přísady z jejich předem filtrovaného sterilního roztoku. Řádná tekutost roztoku může být udržována, například, použitím potahu jako je lecitin, udržováním požadované velikosti částic v případě disperse a použitím surfaktantu. Prolongovaná absorpce injikovatelných přípravků může být dosažena přidáním činidla zpomalujícího absorpci do přípravku, například solí monosteratu a želatiny.

Protilátky a části protilátek podle předkládaného vynálezu mohou být podány různými metodami známými v oboru, ačkoliv pro mnoho terapeutických aplikací je výhodnou cestou/způsobem podání Intravenózní injekce nebo infuse. Jak bude odborníkům v oboru jasné, cesta a/nebo způsobe podání se bude velmi lišit, v závislosti na požadovaném výsledku. V určitých provedeních může být aktivní sloučenina připravena s nosičem, který bude bránit rychlému uvolňování sloučeniny, tak, jako je tomu v přípravcích s kontrolovaným uvolňováním, včetně implantátů, transdermálních náplastí a mikroenkapsulovaných systémů pro podání. Mohou být použity biodegradovatelné, biokompatibilní polymery, jako jsou ethylenvinylacetat, polyanhydridy, polyglykolové kyseliny, kolagen, polyortoestery a polymléčná kyselina. Mnoho metod pro přípravu takových přípravků je patentováno nebo je odborníkům v oboru obecně známo. Viz například Sustained and Conntrolled Release drug Delivery Systems, J. R. Robinson, vyd., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

V některých provedeních může být protilátka nebo část protilátky podle předkládaného vynálezu podána orálně, například, s inertním ředidlem nebo s asimilovatelným poživatelným nosičem. Sloučenina (nebo další přísady, pokud jsou žádoucí), může být také obsažena v kapsli z měkké nebo tuhé želatiny, komprivovaná do tablet nebo přímo obsažena v dietě subjektu. Pro orální terapeutické podání může být sloučenina smísena s přísadami a použita ve formě tablet pro gastrointestinální podání, bukálních tablet, pastilek, kapslí, elixírů, suspenzí, sirupů, oplatek a podobně. Pro podání sloučenin podle předkládaného vynálezu jiným způsobem, než parenterálně, je nezbytné potáhnout sloučeninu, nebo podat sloučeninu současně s, materiálem, který zabrání její inaktivaci.

V přípravcích mohou být také obsaženy doplňkové aktivní sloučeniny. V některých provedeních je protilátka nebo část protilátky podle předkládaného vynálezu formulována spolu s a/nebo podána spolu s jedním nebo více dalších terapeutických činidel, která jsou užitečná při léčbě onemocnění, při kterých je aktivita TNFα poškozující. Například, anti-hTNFα protilátka nebo část protilátky podle předkládaného vynálezu může být formulována spolu s a/nebo podána spolu s jednou nebo s více dalšími protilátkami, které se vážou na jiné cíle (například protilátkami, které se vážou na jiné cytokiny, nebo které se vážou na buněčné povrchové molekuly), jedním nebo více cytokiny, solubilním recetorem pro TNFα (viz například PCT přihláška WO 94/06476) a/nebo s jedním nebo více chemickými činidly, které inhibují produkci nebo aktivitu hTNFα (jako jsou deriváty cykohexan-ylidenu jak je popisuje PCT přihláška WO 93/19751). Kromě toho, jedna nebo více protilátek podle předkládaného vynálezu může být použita v kombinaci s jedním nebo více uvedených terapeutických činidel. Takové kombinované terapii mohou výhodně používat nižších dávek podaného terapeutického činidla a tak je možné se vyhnout možné toxicitě nebo komplikacím spojeným s různými monoterapiemi.

Neomezující příklady terapeutických činidel pro léčbu revmatoidní artritidy, se kterými může být protilátka, nebo část protilátky, podle předkládaného vynálezu kombinována, zahrnují: nesteroidní protizánětlivá léčiva (NSAID); cytokiny potlačující protizánětlivá léčiva (CSAID); CDP-571/BAY-10-3356 (humanizovaná anti-TNFα protilátka; Celltech/Bayer); cA2 (chimerická anti-TNFα protilátka; Centocor); 75 kd TNFR-IgG (75 kD TNF-receptor - IgG fúzní protein; Immunex, viz Artritis & Rheumatism (1994), svazek 37: S295; J. Invest. Med. (1996), svazek 44. 235A); 55 kd TNFR-IgG (55 kD TNF-receptor - IgG fúzní protein, Hoffman-LaRoche); IDEC-CE9.1/SB 210396 (nedepletující primátizovaná anti-CD4 protilátka, IDEC/SmithKline, viz například Arthritis & Rheumatism (1995), svazek 38: S185); DAB 486-IL-2 a/nebo DAB 389-IL-2 (IL-2 fúzní proteiny, Seragen, viz například Arthritis & Rheumatism (1993), svazek 36: 1223), Anti-Tac (humanizovaná anti-IL-2Rα, Protein Design Labs/Roche); IL-4 (protizánětlivý cytokin, DNAX/Scherint); IL-10 (SCH 52000, rekombinantní IL-10, protizánětlivý cytokin, DNAX/Schering); agonisté IL-4, IL-10 a/nebo IL-4 (například agonistické protilátky); IL-1RA (receptorový antagonista UIL-1, Synergen/Amgen); TNF-bp/s-TNFR (solubilní TNF vazebný rotein, viz Arthritis & Rheumatism (1996), svazek 39, č. 9 (supplement), S284; Amer. J. Physiol. - heart and Circulatory Physiology (1995), svazek 268: str. 37 až 42); R973401 (inhibitor fosfodiesterasy typu IV, viz Arthritis & Rheumatism (1996), svazek 39, č. 9 (supplement), S282); MK-966 (COX-2 inhibitor, viz Arthritis & Rheumatism (1996), svazek 39, č. 9 (supplement), S81); Iloprost (viz Arthritis & Rheumatism (1996), svazek 39, č. 9 (supplement), S82); methotrexat; thalidomid (viz Arthritis & Rheumatism (1996), svazek 39, č. 9 (supplement), S282) a léky příbuzné thalidomidu (například Celgen); leflunomid (protizánětlivý a inhibitor cytokinů, viz Arthritis & Rheumatism (1996), svazek 39, č. 9 (supplement), S131); kyselina tranexamová (inhibitor aktivace plazminogenu, viz Arthritis & Rheumatism (1996), svazek 39, č. 9 (supplement), S284); T-614 (inhibito cytokinů, viz Arthritis & Rheumatism (1996), svazek 39, č. 9 (supplement, S282); prostaglandin E1 (viz Arthritis & Rheumatism (1996), svazek 39, č. 9 (supplement), S282); Tenidap (nesteroidní protizánětlivý lék, viz například Arthritis & Rheumatism (1996), svazek 39, č. 9 (supplement), S280); Naproxen (nesteroidní protizánětlivé léčivo, viz například Neuro Report (1996), svazek 7, str. 1209 až 1213); Meloxicam (nesteroidní protizánětlivé léčivo); Ibuprofen (nesteroidní protizánětlivé léčivo); Piroxicam (nesteroidní protizánětlivé léčivo); Diclofenac (nesteroidní protizánětlivé léčivo);, Indometacin (nesteroidní protizánětlivé léčivo); Sulfasalazin (viz například Arthritis & Rheumatism (1996), svazek 39, č. 9 (supplement, S281); Azethiprin (viz například Arthritis & Rheumatism (1996), svazek 39, č. 9 (suplement), ICE inhibitor (inhibitor enzymu interleukin-1β-konvertasy); zap-70 a/nebo lck inhibitor (inhibitor tyrosin kinasy zap-70 nebo lck); VEGF inhibitor a/nebo VEGF-R inhibitor (inhibitory růstového faktoru vaskulárních endotelových buněk nebo receptoru růstového faktoru vaskulárních endotelových buněk, inhibitory angiogenese); kortikoidní protizánětlivá léčiva (například SB203580); inhibitoryTNF-konvertasy; anti-IL-12 protilátky; interleukin 11 (viz například Arthritis & Rheumatism (1996), svazek 39, č. 9 (supplement), S296); interleukin-13

(viz například Arthritis & Rheumatism (1996), svazek 9, č. 9 (supplement), S308); interleukin–17 (viz například Arthritis & Rheumatism (1996), svazek 39, 4. 9 (supplement), S120); zlato, penicilamin; chlorokin; hydroxyclokin; chlorambucil; cyklofosfamid, cyklosporin; ozáření veškeré lymfatické tkáně; anti–thymocytární globulin; anti–CD–4 protilátky; CD5–toxiny; orálně podané peptidy nebo kolagen; lobenzarid dvojsodný; Cytokiny regulující činidla (CRA) HP228 a HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); ICAm–1 antisense fosforothioatové oligodeoxynukleotidy (ISIS 2302; Isis Pharmatical, Inc.); solubilní komplementový receptor 1 (TP10, T Cell sciences, Inc.); prednison; orgotein; glykosaminoglykan polysulfat; minocyklin; anti–IL–2R protilátky; mořské a botanické lipidy (mastné kyseliny z rym a rostlinných semen, viz například DeLucca et al. (1995), Rheum. Dis. Clin. North Am. 21: 759 – 777); auranofin; fenylbutazon; zileuton; kyselina mykofenolová (RS–61443); takrolimus (FK–506); sirolimus (rapamcin); amiprilon (therafektin); kladribin (2–chloredeoxyadenosin); a azeribin.

Neomezující příklady terapeutických činidel pro léčbu zánětlivých střevních onemocnění, se kterými může být protilátka, nebo část protilátky, podle předkládaného vynálezu kombinována, zahrnují: budenosid; epidermální růstový faktor; kortikosteroidy; cyklosporin; sulfasalazin; aminosalicylaty; 6–merkaptopurin; azathioprin; metronidazol; inhibitory lipooxygenasy; mesalamin; olsalazin; balsalazin; antioxidanty; inhibitory thromboxanu; antagonisté IL–1 receptoru; anti–IL–1β monoklonální protilátky; anti–IL–6 monoklonální protilátky; růstové faktory; inhibitory elastasy; pyridinyl–imidazolové sloučeniny; CDP–571/BAY–10–3356 (humanizovaná anti–TNFα protilátka; Celltech/Bayer); cA2 (chimerická anti–TNFα protilátka, Centocor); 75 kd TNFR–IgG (75 kD TNF–receptor – IgG fúzní protein, Immunex, vou Arthritis & Rheumatism (1994), svazek 37: S295; J. Invest. Med. (1996), svazek 44: 235A); 55 kd TNFR–IgG (55 kD TNF–receptor – IgG fúzní protein, Hoffmann–LaRoche); IL–10 (SCH 52000, Schering Plough); agonisté IL–4, IL–10 a/nebo IL–10 (SCH 52000, Schering Plough); atonisté IL–4, IL–10 a/nebo IL–4 (například agonistické protilátky), interleukin 11; proléčiva prenisolonu, dexamethasonu nebo budesonidu konjugovaná s glukuronidem nebo dextrinem; ICAM–1 antisense fosforothioatové oligodeoxykleotidy (ISIS 2302; Isis Pharmaceutical, Inc.); solubilní komplementový receptor 1 (TP10, T Cell Sciences, Inc.) mesalazin se zpomaleným uvolňováním; methotrexat; antagonisty destičkového aktivačního faktoru (PAF); ciprofloxacin a lignokain.

Neomezující příklady terapeutických činidel pro léčbu roztroušené sklerózy, se kterými může být protilátka nebo část protilátky podle předkládaného vynálezu kombinována, zahrnují: kortikosteroidy; prednisolon; methylprednisolon; azathioprin; cyklofosfamid; cyklosporin; methotrexat; 4–aminopyridin; tizanidin; interferon–β1a (Avonex™, Biogen); interferon–β1b (Betaseron™, Chiron/Berlex); Copylymer 1 (Cop–1, Copaxon™, Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); hyperbarický kyslík; Intravenózní imunoglobulin; kladribin; PDP–571/BAY–10–3356 (humanizovaná anti–TNFα protilátka; Celltech/Bayer); cA2 (chimerická anti–TNFα protilátka; Centocor); 75 kd TNFR–IgG (75 kD TNF–receptor – IgG fúzní protein, Immunex, viz Arthritis & Rheumatism (1994), svazek 37: S295; J. Invest. Med. (1996), svazek 44: 235A); 55kd TNFR–IgG (55 kD INF–receptor – IgG fúzní protein, Hoffmann–LaRoche); IL–10 (SCH 52000, Schering Plogh); agonisté IL–10, IL–4, IL–10 a/nebo IL–4 (například agonistické protilátky).

Neomezující příklady terapeutických činidel pro léčbu sepse, se kterými může být protilátka, nebo část protilátky, podle předkládaného vynálezu kombinovaná, zahrnují: hypertonické salinické roztoky, antibiotika; Intravenózní gamaglobulin; kontinuální hemofiltraci; karbapenemy (například meronem); antagonisty cytokinů jako je TNFα, IL–1β, IL–6 a/nebo IL–8; DP–571/BAY–10–3356 (humanizovaná anti–TNFα protilátka; Celltech/Bayer); cA2 (chimerická anti–TNF protilátka; Centocor); 75 kd TNRF–IgG (75 kd TNF–recetor – IgG fúzní protien, Immunex, viz Arthritis & Rheumatism (1994), svazek 37: S295; J. Invest. Med. (1996), svazek 44: 235A); 55 kd TNFR–IgG (55 kD TNF–receptor – IgG fúzní protien, Hoffmann–LaRoche); Cytokiny regulující činidla (CRA) HP228 a HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); SK&F 107647 (nízkomolekulární peptid, SmithKline Beecham); tetravalentní guanylhydrazon CNI–1493 (Picower Institute); inhibitor dráhy tkáňového faktoru (TFPI, Chiron); PHP (chemicky

modifikovaný hemoglobulin, APEX Bioscience); chelatační činidla železa a cheláty, včetně komplexu diethylentriaminpentaoctové kyseliny – železo (III) (DTPA iron (III), Molichem Medicines); lisofylin (syntetická malá molekula methylxantinu, Cell Therapeutics, Inc.); PGG–Glukan (β1,3 glukan rozpustný ve vodě, Alpha–Beta Technology) apoolipoprotein A–1 rekonstituovaný lipidy; chirální hydroxamové kyseliny (syntetická antibakteriální činidla, která inhibují biosyntézu lipidu A); protilátky proti endotoxinu; E5531 (syntetický anatagonista lipidu A, Eisai America, Inc.); $rBPI_{21}$ (rekombinantní N–koncový fragment lidského baktericidního/permeabilitu zvyšujícího proteinu); a syntetické anti–endotoxinové peptidy (SAEP, BiosYnth Research Laboratories).

Neomezující příklady terapeutických činidel pro léčbu syndromu respirační tísně dospělých (ARDS), se kterými může být protilátka, nebo část protilátky, podle předkládaného vynálezu kombinována, zahrnují, anti–IL–8 protilátky; surfaktantovou substituční terapii; CDP–571/BAY–10–3356 (humanizovaná anti–TNFα protilátka; Celltech/Bayer); cA2 (chimerická anti–TNFα protilátka; Centocor); 75 kD TNFR–IgG fúzní protein, Hoffmann–LaRoche).

Použití protilátek, nebo částí protilátek, podle předkládaného vynálezu v kombinaci s jinými terapeutickými činidly, je dále probíráno v části IV.

Farmaceutické přípravky podle předkládaného vynálezu mohou obsahovat „terapeuticky účinné množství" nebo „profylakticky účinné množství" protilátky nebo části protilátky podle předkládaného vynálezu. „Terapeuticky účinné množství" označuje množství, které je při nezbytných dávkách a době podávání účinné pro dosažení požadovaného terapeutického výsledku. Terapeuticky účinné množství protilátky nebo části protilátky se může velmi lišit podle faktorů jako je typ onemocnění, věk, pohlaví a hmotnost jedince, a podle schopnost protilátky nebo části protilátky vyvolat požadovanou odpověď u jedince. Terapeuticky účinné množství je také takové, u kterého jsou jakékoliv toxické nebo škodlivé účinky protilátky nebo části protilátky převáženy terapeuticky výhodnými účinky. „Profylakticky účinné množství" označuje množství, které je při nezbytných dávkách a době podávání účinné pro dosažení požadovaného profylaktického výsledku. Typicky, protože profylaktická dávka je použita u subjektu před onemocněním nebo v časných stadiích onemocnění, bude profylakticky účinné množství nižší než terapeuticky účinné množství.

Dávkové režimy mohou být upraveny tak, aby dávaly optimální požadovanou odpověď (například terapeutickou nebo profylaktickou odpověď). Například, může být podána jedna bolusová dávka, může být podáno několik rozdělených dávek za určitou dobu nebo může být dávka proporcionálně redukována nebo zvyšována podle terapeutické situace. Zejména výhodné je formulování parenterálních přípravků v jednotkové dávkové formě pro snadnost podání a pro uniformitu dávky. Dávková jednotková forma, jak je zde použito, označuje fyzikálně samostatnou jednotku jako unitární dávku pro savčí subjekty, které jsou léčeny; každá jednotka obsahuje předem určené množství aktivní sloučeniny vypočítané pro produkci požadovaného terapeutického účinku spolu s požadovaným farmaceutickým nosičem. Požadavky pro jednotkové dávkové formy podle předkládaného vynálezu jsou určovány a jsou přímo závislé na: (a) jedinečných charakteristikách aktivní sloučeniny a na určitém terapeutickém nebo profylaktickém výsledku, který má být dosažen, a (b) na omezení daných v oboru připravených takových aktivních sloučenin pro léčbu senzitivity u jedinců.

Příkladným, neomezujícím rozmezí pro terapeuticky nebo profylakticky účinné množství protilátky nebo části protilátky podle předkládaného vynálezu je 0,1 až 20 mg/kg, lépe 1 až 10 mg/kg. Mělo by být uvedeno, že hodnoty dávky se mohou velmi lišit, v závislosti na typu a závažnosti stavu, který je léčen. Mělo by být dále jasné, že pro jakýkoliv jednotlivý subjekt by měly být specifické režimy dávkovány upravovány podle potřeb jedince a podle profesionálních úvah osoby podávající přípravek nebo dohlížející na podání přípravku, a že dávky zde uvedené jsou pouze příkladné a neomezují rozsah nebo použití nárokovaného přípravku.

IV. Použití protilátek podle předkládaného vynálezu

Na základě své schopnosti vázat hTNFα mohou být anti–hTNFα anti–hTNFα protilátky nebo jejich části, použity pro detekci hTNFα (například v biologických vzorcích, jako je sérum nebo plazma), za použití běžných imunotestů, jako je enzymově vázaný imunosorbentní test (ELISA), radioimunotest (RIA) nebo tkáňová imunohistochemi. Vynález poskytuje způsob pro detekci hTNFα v biologických vzorcích, kde tento způsob obsahuje kontaktování biologického vzorku s protilátkou, nebo s částí protilátky, podle předkládaného vynálezu, a detekování buď protilátky (nebo části protilátky) navázané na hTNFα, nebo nenavázané protilátky (nebo části protilátky), a tím detekování hTNFα v biologickém vzorku. Protilátka je přímo nebo nepřímo značena detekovatelnou substancí pro usnadnění detekce navázané nebo nenavázané protilátky. Vhodné detekovatelné substance zahrnují různé enzymy, protetické skupiny, fluorescentní materiály, luminiscentní materiály a radioaktivní materiály. Příklady vhodných enzymů zahrnují křenovou peroxidasu, alkalickou fosfatasu, β–galaktosidasu, nebo acetylcholinesterasu; příklady vhodných komplexů protetických skupin zahrnují streptavidin/biotin a avidin/biotin; příklady vhodných fluorescentních materiálů zahrnují umbelliferon, fluorescein, fluorescein isothiokyanat, rhodamin, dichlorotriazinylamin fluorescein, dansylchloride nebo fykoerytrin; příklady luminiscentních materiálů zahrnují luminol; a příklady radioaktivních materiálů zahrnují ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S nebo ^{3}H.

Alternativně ke značení protilátky může být hTNFα testován v biologických tekutinách kompetičních imunotestem využívajícím rhTNFα standardů značených detekovatelnou substancí a neznačené anti–hTNFα standardy a anti–hTNFα protilátka kombinovány a je určeno množství značeného rhTNFα standardu navázaného na neznačenou protilátku. Množství hTNFα v biologickém vzorku je nepřímo úměrné množství značeného rhTNFα standardu navázaného na anti–hTNFα protilátku.

D2E7 protilátka podle předkládaného vynálezu může být také použita pro detekci TNFα od jiných druhů než od lidí, zejména pro určení TNFα od primátů (například šimpanzů, paviánů, kosmanů, makaků (cynomolgus) a makaků rhesus), prasat a myší, protože D2E7 se může vázat na TNFα od každého z těchto druhů (podrobně uvedeno v příkladu 4, sekci E).

Protilátka nebo části protilátky podle předkládaného vynálezu jsou schopné neutralizace aktivity hTNFα jak in vitro, tak in vivo (viz příklad 4). Kromě toho, alespoň některé z protilátek podle předkládaného vynálezu, jako je D2E7, mohou neutralizovat aktivitu TNFαz jiných druhů. V souladu s tím, protilátka nebo části protilátky podle předkládaného vynálezu mohou být použity pro inhibování aktivity TNFα, například v buněčné kultuře obsahující hTNFα, u lidí nebo u jiných savců majících TNFα, se kterým je protilátka podle předkládaného vynálezu reaktivní (například u šimpanzů, paviánů, kosmanů, makaků (cynomolgus) a makaků rhesus, prasat nebo myší). V jednom provedení poskytuje vynález způsob pro inhibici aktivity TNFα provedením kontaktu TNFα s protilátkou nebo částí protilátky podle předkládaného vynálezu tak, že aktivita TNFα je inhibována. Výhodně je TNFα lidský TNFα. Například, do buněčné kultury obsahující, nebo předpokládaně obsahující hTNFα může být přidána protilátka nebo části protilátky podle předkládaného vynálezu do kultivačního média pro inhibici aktivity hTNFα v kultuře.

V jiném provedení poskytuje vynález způsob pro inhibici aktivity TNFα u subjektu trpícího onemocněním, při kterém je aktivita TNFα škodlivá. Účast TNFα se předpokládá v patofyziologii mnoha onemocnění (viz například Moeler, A. et al., (1990), Cytokjine 2: 162 až 169; patent US 5 231 024 od Moeller et al.; Evropská patentová přihláška 260610 B1 od Moeller, A.). Vynález poskytuje způsob pro inhibici aktivity TNFα u subjektu trpícího takovým onemocněním, kde tento způsob obsahuje podání protilátky nebo části protilátky podle předkládaného vynálezu subjektu, takže je inhibována aktivita TNFα u subjektu. Výhodně je TNFα lidský TNFα a subjektem je člověk. Alternativně, subjektem může být savec exprimující TNFα, se

kterým je protilátka podle předkládaného vynálezu reaktivní. Ještě dalším subjektem může být savec, do kterého byl vložen hTNFα (například podáním hTNFα nebo expresí hTNFα transgenu). Protilátka podle předkládaného vynálezu může být podána člověku za terapeutickým účelem (dále uvedeno výše). Kromě toho, protilátka podle předkládaného vynálezu může být podána savcům jiným než lidem exprivujícím TNFα, se kterým je protilátka reaktivní (např. primátům nebo prasatům nebo myším) pro veterinární účely nebo jako zvířecí model lidského onemocnění. Z ohledem na dále uvedené jsou takové zvířecí modely užitečné pro hodnocení terapeutické účinnosti protilátek podle předkládaného vynález (například protestování dávek a načasování podávání).

Jak je zde použito, znamená termín „onemocnění, ve kterém je aktivita TNFα škodlivá" zahrnuje onemocnění nebo jiné poruchy, u kterých je přítomnost TNFα u subjektu trpícího onemocnění prokázaně nebo pravděpodobně odpovědná za patofyziologii onemocnění, nebo je faktorem, který zhoršuje onemocnění. Podle toho, onemocnění, při kterém je aktivita TNFα škodlivá je onemocnění, u kterého se předpokládá, že inhibice aktivity TNFα zmírní příznaky a/nebo progresi onemocnění. Takové onemocnění může být prokázáno, například, zvýšením koncentrace TNFα v biologických tekutinách subjektu trpícího onemocněním (například zvýšením koncentrace TNFα v séru, plazmě, synoviální tekutině atd. od subjektu), které může být detekováno, například, za využití anti–TNFα protilátky jak je popsáno výše. Existuje mnoho příkladů onemocnění, u kterých je aktivita TNFα škodlivá. Použití protilátek a částí protilátek podle překládaného vynálezu v léčbě jednotlivých onemocnění je popsáno podrobněji dále.

A. Sepse

Faktor nekrosy nádorů má stanovenou úlohu v patofyziologii sepse, s biologickými účinky, které zahrnují hypotensi, myokardiální supresi, syndrom propustnosti kapilár, organovou nekrosu, stimulaci uvolňování sekundárních mediátorů a aktivace kaskády srážení krve (viz například Moeler, A. et al., (1990), Cytokine 2: 162 až 169; patent US 5 231 02 4 od Moeller et al; Evropská patentová přihláška 260610 B1 od Moeller, A.; Tracey, K.J. a Cerami, A. (1994), Annu. Rev. Med. 45: 491 až 503; Russell, D. a Thompson, R.C. (1993) Curr. Opin. Biotech. 4: 714 až 721). V souladu s tím, lidské protilátky a části protilátek podle předkládaného vynálezu mohou být použity pro sepse v jakékoliv její klinické formě, včetně septickéh šoku, endotoxinového šoku, gram–negativní sepse a syndromu toxického šoku.

Kromě toho, pro léčbu sepse může být anti–hTNFα protilátka nebo část protilátky podle předkládaného vynálezu podána společně s jedním nebo více terapeutickými činidly, které mohou dále zmírňovat sepsi, jak je inhibitor interleukinu–1 (jak je popsán v PCT přihláška WO 92/16221 a WO 92/17583), cytokin interleukin–6 (viz například PCT přihlášku WO 93/11793) nebo antagonista destičkového aktivačního faktoru (viz například Evropská patentová přihláška EP 374 510). Další kombinované terapie pro léčbu sepse jsou podrobněji uvedeny v sekci III.

Kromě toho, ve výhodném provedení, anti–hTNFα protilátka nebo část protilátky podle předkládaného vynálezu je podány lidskému subjektu patřícímu do podskupiny septických pacientů majících v době léčby sérovou nebo plazmatickou koncentraci IL–6 vyšší než 500 pg/nl a lépe 1000 pg/ml (viz PCT přihláška č. WO 95/20978, Daum, L. et al.).

B. Autoimunitní onemocnění

Předpokládá se účast faktoru nekrosy nádorů v patofyziologii různých autoimunitních onemocnění. Například, TNFα se předpokládá při aktivaci tkáňového zánětu a předpokládá se, že způsobuje destrukci kloubů u revmatoidní artritidy, například Moeler, A. et al., (1990), Cytokine 2: 162 až 169; patent US 5 231 024, Moeller et al.; Evropská patentová přihláška 260610 B1, Moeller, A.; Tracey, K. J. a Cerami, A. výše; Arend, W.P. a Dayer, J. M. (1995) Arth. Rheum. 38: 151 až 160; Fava, R. A. et al. (1993) Clin. Exp. Immunol. 94, 261 až 266). TNFα se také předpokládá

v indukci smrti buněk Langerhansových ostrůvků a ve zprostředkování insulinové resistence u diabetu (viz například Tracey a Cerami, výše; PCT přihláška WO 94/08609). TNFα se také předpokládá ve zprostředkování cytotoxicity oligodendroglií a v indukci zánětlivých plaků u roztroušené sklerózy (viz například Tracey a Cerami, výše). V současnosti probíhá klinické testování chimerických a humanizovaných myších anti–hTNFα protilátek pro léčbu revmatoidní artritidy (viz například Eliott, M. J. et al., (1994) Lancet 344. 1125 až 1127; Elliott, M. J. et al., (1994) Lancet 344: 1105 až 1110; Rankin, E. C. et al., (1995) Br. J. Rheumatol. 34. 334 až 342).

Lidské protilátky a části protilátek podle předkládaného vynálezu mohou být použity pro léčbu autoimunitních onemocnění, zejména těch, které jsou asociované se zánětem, včetně revmatoidní artritidy, revmatoidní spondylitidy, osteoartritidy a dnové artritidy, alergie, roztroušené sklerózy, autoimunního diabetu, autoimunní uveitidy a nefrotického syndromu. Typicky je protilátka nebo část protilátky podána systémově, ačkoliv u některých onemocnění může být výhodné lokální podání protilátky nebo části protilátky do místa zánětu (například, lokální podání do kloubů v revmatoidní artritidy nebo lokální podání do diabetických vředů, samostatně nebo v kombinaci s cyklohexan–ylidenovými deriváty jak je popsáno v PCT přihlášce WO 93/19751). Protilátka nebo část protilátky podle předkládaného vynálezu může být také podána společně s jedním nebo více terapeutickými činidly užitečnými při léčbě autoimunitních onemocnění, jak je podrobněji uvedeno v sekci III.

C. Infekční onemocnění

Faktor nekrosy nádorů se předpokládá při zprostředkování biologických účinků u mnoha infekčních onemocnění. Například, TNFα se předpokládá při zprostředkování mozkového zánětu a kapilární trombózy a infarktu u malárie. TNFα se také předpokládá při zprostředkování mozkového zánětu, při indukci porušení hematoencefalické bariery, při spouštění syndromu septického šoku a při aktivaci venosního infarktu u meningitidy. TNFα se také předpokládá v indukci kachexie, stimulaci proliferace viru a při poškození centrálního nervového systému u syndromu získané imunodeficience (AIDS). V souladu s tím, protilátky a části protilátek podle předkládaného vynálezu mohou být použity při léčbě infekčních onemocnění, včetně bakteriální meninitidy (viz například Evropská patentová přihláška publik. EP 585 705), mozkové malárie, AIDS a AIDS – příbuzného komplexu (ARC) (viz například Evropská patentová přihláška publik. č. EP 230 574), stejně jako cytomegalovirové infekce sekundární po transplantaci (viz například Fietze, E. et al., (1994), Transplantation 58: 675 až 680). Protilátky a části protilátek podle předkládaného vynálezu mohou být také použity pro zmírnění příznaků spojených s infekčními onemocněními, včetně horečky a myalgie způsobené infekcí (jako je chřipka) a kachexie způsobené infekcí (například spojené s AIDS nebo ARC).

D. Transplantace

Předpokládá se, že faktor nekrosy nádorů je klíčovým mediátorem při rejekci alotransplantátu a reakci štěpu proti hostiteli (GVHD) a ve zprostředkování nežádoucích reakcí, které byly pozorovány, když byla krysí protilátka OKT3, namířena proti CD3 komplexu T receptoru, použita pro inhibici rejekce ledvinových transplantátů (viz například Eason, J. D. et al., (1995) Transplantation 59: 300 až 305; Suthanthiran, M. a Strom, T. B. (1994) New Engl. J. Med. 331: 365 až 375. V souladu s tím mohou být protilátky, nebo části protilátek, podle předkládaného vynálezu, použity pro inhibici rejekce transplantátu, včetně rejekce alotransplantátů a xenotransplantátů a k inhibici GVHD. Ačkoliv může být protilátka nebo část protilátky použita samostatně, výhodněji je použita v kombinaci s jedním nebo více činidly, která inhibují imunitní odpověď namířenou proti alotransplantátu nebo která inhibují GVHD. Například, v jednom provedení je protilátka nebo část protilátky podle předkládaného vynálezu použita v kombinaci s OKT3 pro inhibici reakcí indukovaných OKT3. V jiném provedení je protilátka nebo část protilátky podle předkládaného vynálezu použita v kombinaci s jednou nebo více protilátkami proti jiných cílům účastnících se v regulaci imunitní odpovědi, jako jsou povrchově buněčné molekuly CD25 (α–

receptor pro interleukin –2), CD11a (LFA–1), CD54 (ICAM–1), CD4, CD45, CD28/CTLA4, CD80 (B7–1) a/nebo CD86 (7–2). V ještě jiném provedení je protilátka nebo část protilátky podle předkládaného vynálezu použita v kombinaci s jedním nebo více imunosupresivními činidly, jako je cyklosporin A nebo FK506.

E. Malignity

Předpokládá se úloha faktoru nekrosy nádorů v indukci kachexie, stimulaci nádorového růstu, zvýšení metastatického potenciálu a ve zprostředkování cytotoxicity u malignit. V souladu s tím mohou být protilátky, nebo části protilátek, podle předkládaného vynálezu použity v léčbě malignit, v inhibici nádorového růstu a/nebo při zmírnění sekundární kachexie při malignitách. Protilátka, nebo část protilátky může být podána systémově nebo lokálně do místa nádoru.

F. Plicní onemocnění

Předpokládá se úloha faktoru nekrosy nádorů v patofyziologii syndromu respirační tísně dospělých (ARDS), a to ve stimulaci leukocytární–endotelové aktivace, v přímé cytotoxicitě na pneumocyty a v syndromu propustnosti kapilár. V souladu s tím mohou být protilátky, nebo části protilátek, podle předkládaného vynálezu použity v léčbě různých plicních onemocnění, včetně syndromu respirační tísně dospělých (viz například PCT přihláška WO 91/04054), šokové plíce, chronických zánětlivých onemocnění plic, plicní sarkoidy, plicní fibrosy a silikosy. Protilátka, nebo část protilátky, může být podána systémově nebo lokálně do plic, například ve formě aerosolu. Protilátka, nebo část protilátky, může být také podána s jedním nebo více terapeutickými činidly použitelnými u léčbě plicních onemocnění, jak je podrobněji uvedeno v sekci III.

G. Střevní onemocnění

Předpokládá se úloha faktoru nekrosy nádorů v patofyziologii zánětlivých střevních onemocnění (viz například Tracy, K. J. et al. (1986) Science 234: 470 až 474; Sun, X. M. et al., (1988), J. Clin. Invest. 81. 1328 až 1331; MacDonald, T.T. et. al., (1990) Clin. Exp. Immunol. 81: 301 až 305). Probíhá klinické testování chimerických myších anti–hTNFα protilátek pro léčbu Crohnovy nemoci (van Dullemen, H. M. et al., (1995), Gastroenterology 109: 129 až 135). Lidské protilátky, nebo části protilátek, podle předkládaného vynálezu, mohou být také použity pro léčbu střevních onemocnění, jako jsou idiopatické zánětlivé střevní onemocnění, které zahrnují dva syndromy: Crohnova nemoc a ulcerosní kolitidu. Protilátka, nebo část protilátky, může být také podána s jedním nebo více terapeutickými činidly použitelnými v léčbě střevních onemocnění, jak je podrobněji uvedeno v sekci III.

H. Onemocnění srdce

Protilátky, nebo části protilátek, podle předkládaného vynálezu, mohou být také použity pro léčbu různých onemocnění srdce, včetně srdeční ischemie (viz například Evropská patentová přihláška publikační EP 453 898) a srdeční insuficience (slabost srdečního svalu) (viz například PCT přihláška WO 94/20139).

I. Jiné

Protilátky, nebo části protilátek, podle předkládaného vynálezu, mohou být také použity pro léčbu různých dalších onemocnění, při kterých je aktivita TNFα škodlivá. Příklady dalších onemocnění, u kterých se předpokládá účast aktivity TNFα v patofyziologii, a které tak mohou být léčeny za použití protilátky nebo části protilátky podle předkládaného vynálezu, zahrnují zánětlivá onemocnění kostí a onemocnění kostí spojené s jejich resorpcí (viz například Bertolini, D. R. et al., (1986) Nature 319: 516 až 518; Konig, A. et al., (1988) J. Bone Moner. Res. 3: 621 až 627; Lerner, U.H. a Ohlin. A. (1993) J. Bone Miner. Res. 8: 147 až 155; a Shankar, G. a Stern, P. H. (1993) Bone 14: 871 až 876), hepatitidu, včetně alkoholové hepatitidy (viz například McClain,

C.J. a Cohen, D.A. (1989) hepatology 9: 349 až 351; Felver, M.E. et al. (1990) Alcohol. Clin. Exp. Res. 14: 255 až 259; a Hansen, J. et al. (1994) Hepatology 20: 461 až 474), virovou hepatitidu (Sheron, N. et al. (1991) J. Hepatol. 12: 241 až 245; a Hussain, M. J., et al. (1994), J. Clin. Pathol. 47: 1112 až 1115), a fulminantní hepatitidy; poruchy koagulace (viz například van der Poll, T. et al. (1990) N. Engl. J. Med. 322: 1622 až 162ý; a ven der Poll, T. et al. (1991) Prog. Clin. Biol. Resl 367: 55 až 60), popáleniny (viz například Giroir, B. P. et al. (1994) Am. J. Physiol. 267: H118 až 124; a Liu, X.S. et al. (1994) Burns 20: 40 až 44), reperfusní poškození (viz například Scales, W. E. et al. (1994), Am. J. Physiol. 267: G1122 až 1127; Serrick, C. et al. (1994) Transplantation 58: 1158 až 1162; a Yao, Y. M. et al. (1995) Resuscitation 29: 157 až 168), tvorbu keloidů (viz například McCauley, R. L. et al. (1992) J. Clin. Immunol. 12: 300 až 308); tvorbu jizernaté tkáně; pyrexii; onemocnění peroidontu; obezitu a radiační toxicitu.

Vynález je dále ilustrován následujícími příklady, které nejsou nijak omezující. Obsah všech referencí, patentů a publikovaných patentových přihlášek citovaných v této přihlášce je zde uveden jako odkaz.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Analýza kinetiky vazby lidských protilátek na hTNFα

Vazebné interakce – v reálném čase – mezi ligandem (biotinylovaným rekombinantním lidským TNFα (rhTNFα) imobilizovaným na biosenzorové matrici) a analytem (protilátkami v roztoku) byly měřeny povrchovou plazmonovou rezonancí (SPR) za použití BIAcore systému (Pharmacia Biosenzor, Piscataway, NJ). Systém využívá optických vlastností SPR pro detekci změn v koncentraci proteinů v dextranové biosenzorové matrici. Proteiny jsou kovalentně navázány na dextranovou matrici ve známých koncentracích. Protilátky jsou injikovány do dextranové matrice a specifická vazba mezi injikovanými protilátkami a imobilizovanými ligandy vede ke zvýšené koncentraci proteinů v matrici a tím ke změně SPR signálu. Tyto změny SPR signálu jsou zaznamenávány jako jednotky rezonance (RU) a jsou vyjádřeny v závislosti na čase na Y–ose sensorgramu.

Pro usnadnění imobilizace biotinylovaného rhTNFα na biosenzorovou matrici je spreptavidin kovalentně navázán přes volné aminokyseliny na dextranovou matrici nejprve aktivací karboxylových skupin matrice 100 mM N–hydroxysukcinimidu (NHS) a 400 mM N–ethyl–N'–(3–diethylaminopropyl)karbodiimidhydrochloridu (EDC). Potom je streptavidin injikován do aktivované matrice. Třicet pět mikrolitrů streptavidinu (25 μg/ml), ředěného v octanu sodném, pH 4,5, je injikováno do aktivovaného biosenzoru a volné aminy na proteinu jsou navázány přímo na aktivované inaktivovány injekcí 1 M ethanolaminu. Biosenzorové čipy s navázaným streptavidinem jsou také komerčně dostupné (Pharmacia BR–1000–16, Pharmacia Biosenzor, Piscataway, NJ).

Biotinylovaný rhTNFα byl připraven nejprve rozpuštěním 5,0 mg biotinu (N–hydroxysukcinimid ester D–biotinyl–epsilon–aminokapronové kyseliny; Boehringer Mannheim katalogové č. 1008 960) v 500 μl dimethylsulfoxidu pro výrobu roztoku 10 mg/ml. 10 μl biotinu se přidá na ml rhTNFα (při 2,65 mg/ml) pro získání molárního poměru 2:1 biotinu k rhTNFα. Reakce se jemně mísí a inkubuje se po dobu dvou hodin při pokojové teplotě ve tmě. PD-120 kolona, Sephadex G–25M (Pharmacia katalogové č. 17–0851–01) se ekvilibruje 25 ml chladného PBS a plní se 2 ml rhTNFα–biotin na kolonu. Kolona se eluuje 10 x 1 ml chladným PBS. Odeberou se frakce a odečítají se při OD_{280} (1,0 OD = 1,25 mg/ml). Vhodné frakce se shromáždí a skladují se při –80 °C do použití. Biotinylovaný rthTNFα je také komerčně dostupný (R & D Systems, katalogové č. FTA00, Minneapolis, MN).

Biotinylovaný rhTNFα, který má být imobilizován na matrici pomocí streptavidinu, se ředí v PBS nosném pufru (Gibco, katalogové č. 14190–144, Gibco BRL, Grand Island, NY) doplněném 0,05% (BIAcore) surfaktantem P20 (Pharmacia BR–1000–54, Pharmacia Biosenzor, Piscataway, NJ). Pro určení kapacity rhTNFα–specifických protilátek vázat se na imobilizovaný rhTNFα je proveden následujícím způsobem vazebný test. Aliquoty biotinylovaného rhTNFα (25 mM; 10 µl aliquoty) se injikují přes dextranovou matrici s navázaným steptavidinem rychlostí 0,5 µl/min. Před injekcí proteinu a ihned po se nechá přes každou průtokovou kyvetu projít PBS pufr samotný. Rozdíl v signálu mezi základním stavem a asi 30s po dokončení injekce biotinylovaného rhTNFα se bere jako hodnoty vazby (přibližně 500 RU). Měří se přímá rhTNFα–specifická protilátka vážící se na imobilizovaný biotinylovaný rhTNFα. Protilátky (20 µg/ml) se ředí v PBS nosném pufru a 25 µl aliquity se injikují přes matrici s imobilizovaným proteinem rychlostí 5 µl/min. Před injekcí protilátky a ihned po se nechá přes každou průtokovou kyvetu projít PBS pufr samotný. Rozdíl v signálu mezi základním stavem a signálem po dokončení injekce protilátky se bere jako hodnota vazby pro určitý vzorek. Biosenzorové matrice se regenerují 100 mM HCl před injekcí dalšího vzorku. Pro určení rychlosti disociace (K_{off}), rychlosti asociace (K_{on}), asociační konstanty (K_a) a disociační konstanty (K_d) byl použit BIAcore kinetic evaluation software (verze 2.1).

Reprezentativní výsledky vazby D2E7 (IgG4 kompletní protilátka) na biotinylovaný rhTNFα, ve srovnání s myší mAB MAK 195 ($F(ab')_2$ fragment), jsou ukázány v tabulce 1 dále.

Tabulka 1: Vazba D2E7 IgG4 nebo MAK 195 na biotinylovaný rhTNFα

Protilátka	(Ab), nM	rhTNFα vazba, RU	Ab, vazba RU	rhTNFα/AB	K_{off}, s^{-1} (průměr)
D2E7	267	373	1215	1,14	$8,45 \times 10^{-5}$
	133	420	1569	1,30	$5,42 \times 10^{-5}$
	67	434	1633	1,31	$4,75 \times 10^{-5}$
	33	450	1532	1,19	$4,46 \times 10^{-5}$
	17	460	1296	0,98	$3,47 \times 10^{-5}$
	8	486	936	0,67	$2,63 \times 10^{-5}$
	4	489	536	0,38	$2,17 \times 10^{-5}$
	2	470	244	0,18	$3,68 \times 10^{-5}$
					($4,38 \times 10^{-5}$)
MAK 195	400	375	881	1,20	$5,38 \times 10^{-5}$
	200	400	1080	1,38	$4,54 \times 10^{-5}$
	100	419	1141	1,39	$3,54 \times 10^{-5}$
	50	427	1106	1,32	$3,67 \times 10^{-5}$
	25	446	959	1,09	$4,41 \times 10^{-5}$
	13	464	708	0,78	$3,66 \times 10^{-5}$
	6	474	433	0,47	$7,37 \times 10^{-5}$
	3	451	231	0,26	$6,95 \times 10^{-5}$
					($4,94 \times 10^{-5}$)

Ve druhé sérii pokusů byly kvantitativně analyzovány molekulárně kinetické interakce mezi IgG1 kompletní D2E7 a biotinylovaným rhTNFα, za použití BIAcore technologie, jak je popsána výše, a byly odvozeny kinetické rychlostní konstanty, shrnuté dále v tabulkách 2, 3 a 4.

Tabulka 2: Určené disociační rychlostní konstanty interakcí mezi D2E7 a biotinylovaným rhTNFα

Pokus	K_d (s^{-1})
1	$9,58 \times 10^{-5}$
2	$9,26 \times 10^{-5}$
3	$7,60 \times 10^{-5}$
průměr	$8,81 \pm 1,06 \times 10^{-5}$

Tabulka 3: Určené asociační rychlostní konstanty interakcí mezi D2E7 a biotinylovaným rhTNFα

Pokus	K_a (M^{-1}, s^{-1})
1	$1,33 \times 10^5$
2	$1,05 \times 10^5$
3	$3,36 \times 10^5$
průměr	$1,91 \pm 1,26 \times 10^5$

Tabulka 4: Určené rychlostní a afinitní konstanty D2E7 a biotinylovaného rhTNFα

Pokus	K_a (M^{-1}, s^{-1})	K_d (s^{-1})	K_d (M)
1	$1{,}33 \times 10^5$	$9{,}58 \times 10^{-5}$	$7{,}20 \times 10^{-10}$
2	$1{,}05 \times 10^5$	$9{,}26 \times 10^{-5}$	$8{,}82 \times 10^{-10}$
3	$3{,}36 \times 10^5$	$7{,}60 \times 10^{-5}$	$2{,}26 \times 10^{-10}$
průměr	$1{,}91 \pm 1{,}26 \times 10^5$	$8{,}81 \pm 1{,}06 \times 10^{-5}$	$6{,}09 \pm 3{,}42 \times 10^{-10}$

Disociační a asociační rychlostní konstanty byly kalkulovány na základě analýzy disociačních a asociačních oblastí sensorgramů za použití BIA analysis softwaru. Pro interakce mezi D2E7 a biotinylovanou molekulou rtTNFα byly předpokládány běžné kinetiky chemických reakcí: kinetika nultého řádu pro disociaci a kinetika prvního řádu pro asociaci. Pro analýzu byly uvažovány interakce pouze mezi jedním ramenem bivalentní D2E7 protilátky a jednou jednotkou trimerického biotinylovaného rhTNFα, při vybírání molekulového modelu pro analýzu kinetiky. Byly provedeny tři nezávislé pokusy a výsledky byly analyzovány jednotlivě. Průměrná určená disociační konstanta (k_d) interakcí mezi D2E7 a biotinylovaným rhTNFα byla $8{,}18 \pm 1{,}06 \times 10^{-5}$ s^{-1} a průměrná určená asociační konstanta (k_a) byla $1{,}91 \pm 1{,}26 \times 10^5$ $M^{-1}s^{-1}$. Průměrná skutečná disociační konstanta (K_d) byla počítána podle vzorce $K_d = k_d/k_a$. Tak, průměrná K_d D2E7 protilátky pro rhTNFα odvozená z parametrů kinetiky byla $6{,}09 \pm 3{,}42 \times 10^{-10}$ M. Malé rozdíly v hodnotách kinetiky pro IgG1 formu D2E7 (uvedeno v tabulkách 2, 3, a 4) a IgG4 formu D2E7 (uvedeno v tabulce 1 a v příkladech 2 a 3) nejsou pravděpodobně rozdíly vycházející z přítomnosti buď IgG1, nebo IgG4 konstantního regionu, ale spíše je možné je přisoudit přesnějšímu měření koncentrace protilátky použitému pro analýzu kinetiky IgG1. V souladu s tím hodnoty kinetiky pro IgG1 formu D2E7 zde uvedené se považují za nejpřesnější parametry kinetiky pro D2E7 protilátku.

Příklad 2: Alanin vyhledávací mutageneze D2E7 CDR3 domén

Série mutací jednoho alaninu byly standardními metodami vloženy do CDR3 domén D2E7 VL a D2E7 VH regionů. Mutace v lehkém řetězce jsou zobrazeny na obrázku 1B (LD2E7*.A1, LD2E7*.A3, LD2E7*.A4, LD2E7*.A5, LD2E7*.A7 a LD2E7*.A8 mající alaninovou mutaci v pozici 1, 3, 4, 5, 7 nebo 8, v příslušném pořadí, D2E7 VL CDR3 domény). Mutace v těžkém řetězci jsou zobrazeny na obrázku 2B (HD2E7*.A1, HD2E7*.A2, HD2E7*.A3, HD2E7*.A4, HD2E7*.A5, HD2E7*.A6, HD2E7*.A7, HD2E7*.A8 a HD2E7*A9 mající alaninovou mutaci v pozici 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 nebo 11, v příslušném pořadí, D2E7 VH CDR3 domény). Kinetika rhTNFα interakcí s protilátkou složenou z přirozených D2E7 VL a VH byla srovnávána s kinetikou protilátek složených z 1) D2E7 VL přirozeného typu s alaninem substituovaným D2E7 VH; 2) D2E7 VHL přirozeného typu s alaninem substituovaným D2E7 VLH; nebo 3) alaninem substituovaného D2E7 VL s alaninem substituovaným D2E7 VH. Všechny protilátky byly testovány jako kompletní IgG4 molekuly.

Kinetika interakcí protilátek s rhTHFα byla určena povrchovou plazmonovou rezonancí jak je popsána v příkladu 1. K_{off} rychlosti pro různé VH/VL páry jsou shrnuty v tabulce 5.

Tabulka 5: Vazba D2E7 Alanin–vyhledávacích mutantů na biotinylovaný rhTNFα

VH	VL	$K_{off}(s^{-1})$
D2E7 VH	D2E7 VL	$9,65 \times 10^{-5}$
HD2E7*.A1	D2E7 VL	$1,4 \times 10^{-4}$
HD2E7*.A2	D2E7 VL	$4,6 \times 10^{-4}$
HD2E7*.A3	D2E7 VL	$8,15 \times 10^{-4}$
HD2E7*.A4	D2E7 VL	$1,8 \times 10^{-4}$
HD2E7*.A5	D2E7 VL	$2,35 \times 10^{-4}$
HD2E7*.A6	D2E7 VL	$2,9 \times 10^{-4}$
HD2E7*.A7	D2E7 VL	$1,0 \times 10^{-4}$
HD2E7*.A8	D2E7 VL	$3,1 \times 10^{-4}$
HD2E7*.A9	D2E7 VL	$8,1 \times 10^{-4}$
D2E7 VH	LD2E7*.A1	$6,6 \times 10^{-5}$
D2E7 VH	LD2E7*.A3	nedetekovatelné
D2E7 VH	LD2E7*.A4	$1,75 \times 10^{-4}$
D2E7 VH	LD2E7*.A5	$1,8 \times 10^{-4}$
D2E7 VH	LD2E7*.A7	$1,4 \times 10^{-4}$
D2E7 VH	LD2E7*.A8	$3,65 \times 10^{-4}$
HD2E7*.A9	LD2E7*.A1	$1,05 \times 10^{-4}$

Tyto výsledky ukazují, že většina z pozic v CDR3 doménách D2E7 VL a VH regionů je vhodná pro substituci jedním alaninovým zbytkem. Substituce jedním alaninovým zbytkem v pozici 1, 4, 5 nebo 7 D2E7 VL CDR3 domény nebo v pozici 2, 5, 6, 8, 9 nebo 10 D2E7 VH CDR3 domény neovlivňuje signifikantně rychlost disociace vazby na hTNFα oproti přirozené původní D2E7 protilátce. Substituce alaninu v pozici 8 D2E7 VL CDR3 nebo v pozici 3 D2E7 VH CDR3 dává 4–krát rychlejší K_{off} a alaninová substituce v pozici 4 nebo 11 D2E7 VH CDR3 dává 8–krát rychlejší K_{off}m což naznačuje, že tyto pozice jsou významnější pro vazbu na hTNFα. Nicméně, substituce jednoho alaninu v pozici 1, 4, 5, 7 nebo 8 D2E7 VL CDR3 domény nebo v pozici 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 nebo 11 D2E7 VH CD3 domény stále vede k anti–hTNFα protilátce mající K_{off} 1 x 10^{-3} s^{-1} nebo menší.

Příklad 3: Analýza vazby D2E7–příbuzných protilátek

Série protilátek příbuzných ve své sekvenci k D2E7 byla analyzována na svou vazbu na rhTNFα a byla srovnávána s D2E7, pomocí povrchové plazmonové rezonance jak byla popsána v příkladu 1. Aminokyselinové sekvence testovaných VL regionů jsou kázány na obrázcích 1A a 1B. Aminokyselinové sekvence testovaných VH regionů jsou ukázány na obrázcích 2A a 2B. K_{off} rychlosti pro různé páry VH/VL (jak je ukázáno ve sloupci formát, buď jako kompletní IgG1 nebo IgG4 protilátky, nebo jako scFv) jsou shrnuty v tabulce 6, dále.

Tabulka 6: Vazba D2E7–příbuzných protilátek na biotynylovaný rhTNFα

VH	VL	Formát	K_{off} (s^{-1})
D2E7	D2E7 Vl	IgG1/IgG4	$9,65 \times 10^{-5}$
VH1–D2	LOE7	IgG1/IgG4	$7,7 \times 10^{-3}$
VH–D2	LOE7	scFV	$4,6 \times 10^{-4}$
VH1–D2.N	LOE7.T	IgG4	$2,1 \times 10^{-5}$
VH1–D2.Y	LOE7.A	IgG4	$2,7 \times 10^{-5}$
VH1–D2.N	LOE7.A	IgG4	$3,2 \times 10^{-5}$
VH1–D2	EP B12	scFv	$8,0 \times 10^{-4}$
VH1–D2	2SD4 VL	scFv	$1,94 \times 10^{-3}$
3C–H2	LOE7	scFv	$1,5 \times 10^{-3}$
2SD4 VH	LOE7	scFv	$6,07 \times 10^{-3}$
2SD4 VH	2SD4 VL	scFv	$1,37 \times 10^{-2}$
VH1A11	2SD4 VL	scFv	$1,34 \times 10^{-2}$
VH1B12	2SD4 VL	scFv	$1,01 \times 10^{-2}$
VH1B11	2SD4 VL	scFv	$9,8 \times 10^{-3}$
VH1E4	2SD4 VL	scFv	$1,59 \times 10^{-2}$
VH1F6	2SD4 VL	scFv	$2,29 \times 10^{-2}$
VH1D8	2SD4 VL	scFv	$9,5 \times 10^{-3}$
VH1G1	2SD4 VL	scFv	$2,14 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	EP B12	scFv	$6,7 \times 10^{-3}$
2SD4 VH	VL10E4	scFv	$9,6 \times 10^{-3}$
2SD4 VH	VL100A9	scFv	$1,33 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VL100D2	scFv	$1,41 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VLLOE5	scFv	$1,11 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VLLOE5	scFv	$1,16 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VLLOF9	scFv	$6,09 \times 10^{-3}$
2SD4 VH	VLLOF10	scFv	$1,34 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VLLOG7	scFv	$1,56 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VLLOG9	scFv	$1,46 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VLLOH1	scFv	$1,17 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VLLOH10	scFv	$1,12 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VL1B7	scFv	$1,3 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VL1C1	scFv	$1,36 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VL1C7	scFv	$2,0 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VL0.1F4	scFv	$1,76 \times 10^{-2}$
2SD4 VH	VL0.1H8	scFv	$1,14 \times 10^{-2}$

Pomalé rychlosti disociace (tj. $K_{off} \leq 1 \times 10^{-4} s^{-1}$) pro kompletní protilátky (tj. IgG formát) mající VL vybraný z DE27, LOE7, LOE7.T a LOE7.A, kterém mají buď threonin, nebo alanin v pozici 9, naznačuje, že pozice 9 D2E7 VL CDR3 může být obsazena jedním z těchto dvou zbytků bez významného ovlivnění K_{off}. V souladu s tím, konsensuální motiv pro D2E7 VL CDR3 obsahuje aminokyselinovou sekvenci: Q–R–Y–N–R–A–P–Y–(T/A) (SEQ ID NO: 3). Dále, pomalé rychlosti disociace (tj. $K_{off} \leq 1 \times 10^{-4} s^{-1}$) pro protilátky mající VH vybraný z DE27, VH1.D2.N a VH1-D2.Y, které mají buď tyrosin, nebo asparagin v pozici 12, naznačuje, že pozice 12 D2E7 VH CDR3 může být obsazena jedním z těchto dvou zbytků bez významného ovlivnění K_{off}. V souladu s tím, konsensuálním motiv pro D2E7 VH CDR3 obsahuje aminokyselinovou sekvenci: V–S–Y–L–S–T–A–S–S–L–D–(Y/N) (SEQ ID NO: 4).

Výsledky ukázané v tabulce 6 ukazují, že v scFv formátu, protilátky obsahující 2SD4 Vl nebo VH CDR3 regiony vykazují rychlejší K_{off} (tj. $K_{off} \geq 1 \times 10^{-3} s^{-1}$) ve srovnání s protilátkami obsahujícími D2E7 VL nebo VH CDR3 region. Ve VL CDR3 se 2SD4 liší od D2E7 v pozicích 2, 5 a 9. Nicméně, jak bylo uvedeno výše, pozice 9 může být obsazena Ala (jak je tomu u 2SD4)

nebo Thr (jak je tomu u D2E7) bez významného ovlivnění K_{off}. Tak, srovnáním 2SD4 a D2E7 mohou být pozice 2 a 5 D2E7 VL CDR3, obě obsazené argininem, identifikovány jako kritické pro asociaci protilátky s hTNFα. Tyto zbytky mohou přímo účastnit jako kontaktní zbytky ve vazebném místě protilátky, nebo mohou být zásadní pro udržení architektury molekuly protilátky v tomto regionu. Vzhledem k významu pozice 2 akceleruje nahrazení Arg (v LOE7, která má stejný VL CDR3 jako D2E7) Lys (v EP B12) rychlost disociace dvakrát. Vzhledem k významu pozice 5 akceleruje nahrazení Arg (v D2E7) Ala (v LD2E7*.A5) B12) rychlost disociace dvakrát, jak je popsáno v příkladu 2. Kromě toho, bez argininů v pozicích 2 a 5 (v 2SD4) je rychlost disociace pětkrát rychlejší. Nicméně, mělo by být uvedeno, že ačkoliv je pozice 5 významná pro vylepšení vazby na hTNFα, může být změna v této pozici negována změnami v jiných pozicích, jako tomu je v VLLOE4, VLLOH1 a VLO.1H8.

Ve VH CDR3 se 2SD4 liší od D2E7 v pozicích 1, 7 a 12. Nicméně, jako bylo uvedeno výše, pozice 12 může být odsazeno Asn (jak je tomu u 2SD4) nebo Tyr (jak je tomu u D2E7) bez významného ovlivnění K_{off}. Tak, srovnání 2SD4 a D2E7 mohou být pozice 1 a 7 D2E7 VH CDR3 identifikovány jako kritické pro asociaci protilátky s hTNFα. Jak bylo uvedeno výše, tyto zbytky se mohou přímo účastnit jako kontaktní zbytky ve vazebném místě protilátky, nebo mohou být zásadní pro udržení architektury molekuly protilátky v tomto regionu. Obě pozice jsou významné pro vazbu na hTNFα, protože když je použita 3C–H2 VH CDR3 (která má změnu valinu na alanin v pozici 1 vzhledem k D2E7 VH CDR3), tak má scFv 3–krát rychlejší rychlost disociace, než když je použita D2E7 VH CDR3, ale tato rychlost disociace je stále čtyřikrát pomalejší, než když je použita S2D4 VH CDR3 (která má změnu v obou pozicích 1 a 7 vzhledem k D2E7 VH CDR3).

Příklad 4: Funkční aktivita D2E7

Pro vyšetření funkční aktivity D2E7 byla protilátka použita v několika testech pro měření schopnosti protilátky inhibovat aktivitu hTNFα, buď in vitro, nebo in vivo.

A. Neutralizace TNFα–indukované cytotoxicity u L929 buněk

Lidský rekombinantní TNFα (rhTNFα) způsobuje buněčnou cytotoxicitu u myších L929 buněk pro inkubační době 18 až 24 hodin. Lidské anti–hTNFα protilátky byly hodnoceny v L929 testech společnou inkubací protilátek s rhTNFα a buňkami následujícím způsobem. 96–jaková mikrotitrační plotna obsahující 100 µl anti–hTNFα Ab byla sériově ředěna 1/3 směrem dolů v plotně v dvojím provedení za použití RPMI média obsahující 10% fetální hovězí sérum (FBS). Padesát mikrolitrů rhTNFα bylo přidáno do konečné koncentrace 500 pg/ml do každé jamky. Plotny byly potom inkubovány po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Dále bylo přidáno 50 µl TNFα–senzitivních L929 myších fibroblastů v konečné koncentraci 5 x 10^{-4} buněk na jamku spolu s 1 µg/ml Aktinomycinu D. Kontroly obsahovaly médium plus buňky a rhTNFα plus buňky. Tyto kontroly, a TNFα standardní křivka, v rozmezí od 2 ng/ml do 8,2 pg/ml, byly použity pro určení kvality testu a pro získání okénka pro neutralizaci. Plotny byly potom inkubovány přes nos (18 až 24 hodin) při 37 °C v 5% CO_2.

100 µl média bylo odebráno z každé jamky a bylo přidáno 50 µl 5 mg/ml 3, (4,4–dimethyl-thiazol–2–yl)2,5–difenyl–tetrazolimbromidu (MTT; komerčně dostupný do Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) v PBS. Plotny byly potom inkubovány po dobu 4 hodin při 37 °C. Potom bylo přidáno do každé jamky 50 µl 20% dodecyl síranu sodného (SDS) a plotny byly inkubovány přes noc při 37 °C. Byla měřena optická hustota při 570/630 nm, křivky byly pro každý vzorek zapsány do grafu a hodnoty IC_{50} byly určeny standardními způsoby.

Reprezentativní výsledky pro lidské protilátky mající různé VH a VL páry, ve srovnání s myší MAK 195 mAb, jsou ukázány na obrázku 3 a v tabulce 7, dále.

Tabulka 7: Neutralizace TNFα–indukované L929 cytotoxicity

VH	VL	Struktura	IC_{50}, M
D2E7	D2E7	scFv	$1,1 \times 10^{-10}$
D2E7	D2E7	IgG4	$4,7 \times 10^{-11}$
2SD4	2SD4	scFv/IgG1/IgG4	$3,0 \times 10^{-7}$
S2D4	LOE7	scFv	$4,3 \times 10^{-8}$
VH1–D2	2SD4	scFv	$1,0 \times 10^{-8}$
VH1–D2	LOE7	scFv/IgG1/IgG4	$3,4 \times 10^{-10}$
VH1–D2.Y	LOE7.T	IgG4	$8,1 \times 10^{-11}$
VH1–D2.N	LOE7.T	IgG4	$1,3 \times 10^{-10}$
VH1–D2.Y	LOE7.A	IgG4	$2,8 \times 10^{-11}$
VH1–D2.N	LOE7.A	IgG4	$6,2 \times 10^{-11}$
MAK 195	MAK 195	scFv	$1,9 \times 10^{-8}$
MAK 195	MAK 195	$F(ab')_2$	$6,2 \times 10^{-11}$

Výsledky na obrázku 3 a v tabulce 7 ukazují, že D2E7 lidská anti–hTNFα protilátka, a různé D2E7–příbuzné protilátky, mohou neutralizovat TNFα–indukovanou L929 cytotoxicitu s kapacitou přibližně ekvivalentní kapacitě myší anti–hTNFα mAb MAK 195.

V jiné sérii pokusů byl atestována schopnost IgG1 formy D2E7 neutralizovat TNFα–indukovanou L929 cytotoxicitu způsobem, který byl popsán výše. Výsledky ze tří nezávislých pokusů a jejich průměr jsou shrnuty v tabulce 8, dále.

Tabulka 8: Neutralizace TNFα–indukované L929 cytotoxicity způsobená D2E7 IgG1.

Pokus	IC_{50} (M)
1	$1,26 \times 10^{-10}$
2	$1,33 \times 10^{-10}$
3	$1,15 \times 10^{-10}$
průměr	$1,25 \pm 0,01 \times 10^{-10}$

Tato série pokusů potvrdila, že D2E7, ve formě kompletního IgG1, neutralizuje TNFα–indukovanou L929 cytotoxicitu s průměrnou hodnotu IC_{50} (M), $1,25 \pm 0,01 \times 10^{-10}$.

B. Inhibice vazby TNFα na receptory pro TNFα na U–937 buňkách

Schopnost lidských anti–hTNFα protilátek inhibovat vazbu hTNFα na receptory pro hTNFα na povrchu buněk byla ošetřována za použití buněčné linie U–937 (ATCC č. CRL 1593), lidské histiocytární linie, která exprivuje receptory pro hTNFα. U–937 buňky byly kultivovány v RPMI 164é médiu doplněném 10% fetálním hovězím sérem (Hyclone A–1111, Hyclone Laboratorie, Logan, UT), L–glutaminem (4 nM), HEPES pufrovacím roztokem (10 mM), penicilinem (100 μg/ml) a streptomycinem (10 μg/ml). Pro vyšetření aktivity kompletních IgG protilátek byly U–937 buňky předem inkubovány s PBS doplněným 1 mg/ml lidského IgG (Sigma I–4506, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) po dobu 45 minut na ledu a potom byly buňky třikrát promyty vazebným pufrem. Pro test vazby na receptor byly U–937 buňky (5×10^6 buněk na jamku) inkubovány ve vazebném pufru (PBS doplněný 0,2% hovězím sérovým albuminem) v 96–jamkový mikrotitračních plotkách (Costar 3799, Costar Corp. Cambridge, MA), spolu s ^{125}I–značeným rhTNFα (3×10^{-10} M; 25 μCi/ml; získán od NEN Research Products,

Wilmington, DE), s nebo bez anti–hTNFα protilátek, v celkovém objemu 0,2 ml. Plotny byly inkubovány na ledu po dobu 1,5 hodiny. Potom byly 75 µl každého vzorku přenese do 1,0 ml testovacích trubiček (Sarsted 72.700, Sarsted Corp. Princeton, NJ) obsahujících dibutylftalat (Sigma D–2270, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) a dinonylftalat (ICN 210733, ICN, Irvine, CA). Testovací trubičky obsahovaly 300 µl směsi dibutylftalatu a dinonylftalatu, v objemovém poměru 2:1, v příslušném pořadí. Volný (tj. nenavázaný) ^{125}I–značený rhTNFα byl odstraněn mikrocentrifugací po dobu 5 minut. Potom byl konec každé testovací trubičky obsahující buněčnou peletu odstřižen za pomoci nůžek na trubičky (Bel–Art 210180001, Bel–Art Products, Pequannock, NJ). Buněčná peleta obsahovala ^{125}I–značený rhTNFα vázaný na p60 nebo p80 receptor pro TNFα, zatímco vodná fáze nad olejovou směsí obsahovala přebytek volného ^{125}I–značeného rhTNFα. Všechny buněčné pelety byly shromážděny v odečítací trubici (Falcon 2052, Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ) a odečítány ve scintilační komůrce.

Reprezentativní výsledky jsou ukázány na obrázku 4. Hodnota IC_{50} pro D2E7 inhibici vazby hTNFα na receptory pro hTNFα na U–937 buňkách je v těchto pokusech přibližně 3×10^{-10} M. Tyto výsledky ukazují, že D2E7 lidská anti–hTNFα protilátka inhibuje vazbu rhTNFα na receptory pro hTNFα na U–937 buňkách v koncentracích přibližně ekvivalentních koncentracím myší anti–hTNFα mAb MAK 195.

V jiné sérii pokusů byla testována schopnost IgG1 formy D2E7 inhibovat vazbu rhTNFα na receptory pro hTNFα na U–937 buňkách způsobem, který byl popsán výše. Výsledky ze tří nezávislých pokusů a jejich průměr jsou shrnuty v tabulce 9, dále.

Tabulka 9: Inhibice vazby na TNF receptor na U–937 buňkách způsobena D2E7 IgG1.

Pokus	IC_{50} (M)
1	$1{,}70 \times 10^{-10}$
2	$1{,}49 \times 10^{-10}$
3	$1{,}50 \times 10^{-10}$
průměr	$1{,}56 \pm 0{,}12 \times 10^{-10}$

Tato série pokusů potvrdila, že D2E7, ve formě kompletního IgG1, inhibuje vazbu na receptor pro TNF na U–937 buňkách s průměrnou hodnotu IC_{50} (M), $1{,}56 \pm 0{,}12 \times 10^{-10}$.

Pro výzkum inhibičního potenciálu D2E7 ve vazbě ^{125}I–rhTNFαvazby na jednotlivé p55 a p75 receptory byl proveden radioimunotest na pevné fázi. Pro měření IC_{50} hodnot D2E7 pro jednotlivé receptory pro FNT byly různé koncentrace protilátky inkubován s 3×10^{-10} koncentracemi ^{125}I–rhTNFα. Směs byla potom testována na separátních plotnách obsahujících buď p55, nebo p75 receptory pro TNF v závislosti na dávce. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 10, dále.

Tabulka 10: Inhibice vazby na TNF receptor pro p55 a p75 TNFR způsobená D2E7 IgG1

	IC_{50} (M)	
Reagens	p55 TNFR	p75 TNFR
D2E7	$1{,}47 \times 10^{-9}$	$1{,}26 \times 10^{-9}$
rhTNF	$2{,}31 \times 10^{-9}$	$2{,}70 \times 10^{-9}$

Inhibice vazby ^{125}I–rhTNF na p55 a p75 receptory na U–937 buňkách způsobená D2E7 sledovala jednoduchou esovitou křivku, což ukazuje na podobné IC_{50} hodnoty pro oba receptory. V radioimunotestu na pevné fázi (RIA) pro rekombinantní TNF receptory byly hodnoty IC_{50} pro inhibici vazby ^{125}I–rhTNF na p55 a p75 receptory způsobenou D2E7 vypočítány jako $1{,}47 \times 10^{-9}$ a $1{,}26 \times 10^{-9}$, v příslušném pořadí. Snížení hodnot IC_{50} v pevné fázi bylo pravděpodobně způso-

beno vyšší hustotou receptorů v RIA formátu, protože neznačený rhTNF také inhiboval se stejnými hodnotami IC_{50} . IC_{50} hodnoty pro inhibici vazby ^{125}I–rhTNF na p55 a p75 receptory podle neznačeného rhTNF byly 2,31 x 10^{-9} a 2, 70 x 10^{-9} M, v příslušném pořadí.

C. Inhibice ELAM–1 exprese na HUVEC

Endotelové buňky lidské pupečníkové žíly (HUVEC) mohou být indukovány k expresi leukocytové adhezní molekuly endotelových buněk 1 (ELAm–1) na svém povrchu ošetření rhTNFα, kde tyto molekuly mohou být detekovány reakcí HUVEC ošetřených rhTHFα s myší protilátkou proti lidské ELAM–1. Schopnost lidských anti–hTNFα protilátek inhibovat tuto TNFα–indukovanou expresi ELAM–1 a HUVEC byla vyšetřována následujícím způsobem: HUVEC (ATCC č. CRL 1730) byly umístěny v 96 jamkových plotnách (5 x 10^4 buněk na jamku) a byly inkubovány přes noc při 37 °C. Následující den byla v mikrotitrační plotně připravena sériová ředění lidské anti–hTNFα protilátky (1:10), počínaje 20 – 10 μg/ml protilátky. Zásobník roztok rhTNFα byl připraven v koncentraci 4,5 ng/ml, aliquoty rhTNFα byly přidány do každé jamky obsahující protilátku a obsahy jamek byly dobře promíchány. Kontroly obsahovaly médium samotné, médium plus anti–hTNFα protilátku a médium plus rhTNFα. HUVEC plotny byly vyndány z inkubace přes noc při 37 °C a médium bylo opatrně aspirováno z každé jamky. 200 μl směsi protilátka–rhTNFα byly přeneseno do každé jamky HUVEC ploten. HUVEC plotny byly dále inkubovány při 37 °C po dobu 4 hodin. Potom byla myší anti–ELAM–1 protilátka ředěna 1:1000 v RPMI. Médium v každé jamce HUVEC plotny bylo opatrně aspirováno, přidalo se 50 μl/jamku roztoku anti–ELAM–1 protilátky a HUVEC plotny se inkubovaly po dobu 60 minut při pokojové teplotě. Roztok ^{125}I–značené anti–myší Ig protilátky byl připraven v RPMI (přibližně 5000 cpm v 50 μl). Médium v každé jamce HUVEC ploten bylo opatrně aspirováno, jamky byly dvakrát promyty RPMI a do každé jamky se přidalo 50 μl roztoku ^{125}I–značeného anti–myšího Ig. Plotny byly inkubovány po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě a každá jakam byla potom promyta třikrát RPMI. Do každé jamky se přidalo se 180 μl 5% SDS pro lýzu buněk. Lyzák buněk z každé jamky se potom přenesl do zkumavky a byl odečítán ve scintilační komůrce.

Reprezentativní výsledky jsou ukázány na obrázku 5. IC_{50} hodnota pro D2E7 inhibici NTNFα–indukované exprese ELAM–1 na HUBEC je těchto pokusech přibližně 6 x 10^{-11} M. Tyto výsledky ukazují, že lidská anti–hTNFα protilátka D2E7 inhibuje hTNFα–indukovanou expresi ELAM–1 na HUVEC v koncentracích přibližně ekvivalentních koncentracím myší anti–hTNFα mAb MAK 195.

V jiné sérii pokusů byla testována schopnost IgG1 formy D2E7 inhibovat hTNFα–indukovanou expresi ELAm–1 na HUVEC způsobem, který byl popsán výše. Výsledky ze tří nezávislých pokusů a jejich průměr jsou shrnuty v tabulce 11, dále.

Tabulka 11: Inhibice TNFα–indukované exprese ELAm–1 na HUVEC způsobena D2E7 IgG1.

Pokus	IC_{50} (M)
1	1,95 x 10^{-10}
2	1,69 x 10^{-10}
3	1,90 x 10^{-10}
průměr	1,85 ± 0,14 x 10^{-14}

Tato série pokusů potvrdila, že D2E7, ve formě kompletního IgG1, inhibuje TNFα–indukovanou expresi ELAM–1 na HUVEC s průměrnou hodnotou IC_{50} (M) 1,85 ± 0,14 x 10^{-10}.

Neutralizační potenciál D2E7 IgG1 byl také testován pro rhTNFα indukovanou expresi dvou dalších adhezních molekul, ICAM–1 a VCAM–1. Protože rhTNF titrační křivka pro ICAM–1 expresi byla v 16 hodinách velmi podobná křivce pro ELAM–1 expresi, byly v testu neutralizace protilátkou použity stejné koncentrace rhTNF. HUVEC byly inkubovány s rhYNF za přítomnosti různých koncentrací D2E7 při 37 °C v CO_2 inkubátoru po dobu 16 hodin a exprese ICAM–1 byla měřena myší anti–ICAM–1 protilátkou následovanou ^{125}I–značenou ovčí anti–myší protilátkou. Byly provedeny dva nezávislé pokusy a byly vypočítány hodnoty IC_{50}. Nepříbuzná lidská IgG1 protilátka neinhibovala expresi ICAM–1.

Postup pro testování inhibice exprese VCAM–1 byl stejný jako postu pro expresi ELAM–1 s tou výjimkou, že místo anti–ELAM–1 MAb byla použita anti–VCAM–1 MAb. Byly provedeny tři nezávislé pokusy a byly vypočítány hodnoty IC_{50}. Nepříbuzná lidská IgG1 protilátka neinhibovala expresi VCAM–1.

Výsledky jsou shrnuty v tabulce 12, dále.

Tabulka 12: Inhibice exprese ICAM–1 a VCAM–1 způsobená D2E7 IgG1.

Inhibice ICAM–1		Inhibice VCAM–1	
Pokus	IC_{50} (M)	Pokus	IC_{50} (M)
1	$1{,}84 \times 10^{-10}$	1	$1{,}03 \times 10^{-10}$
2	$2{,}49 \times 10^{-10}$	2	$9{,}26 \times 10^{-11}$
3		3	$1{,}06 \times 10^{-10}$
průměr	$2{,}17 \pm 0{,}46 \times 10^{-10}$	průměr	$1{,}01 \pm 0{,}01 \times 10^{-10}$

Tyto pokusy ukazují, že ošetření endotelových buněk primární lidské pupečníkové žíly rhTNF vede k optimální expresi adhezním molekul: ELAM–1 a VCAM–1 ve čtvrté hodině a k maximálnímu zvýšení exprese ICAM–1 v 16 hodině. D2E7 byla schopná inhibovat expresi tří adhezních molekul způsobem závislým na dávce. Hodnoty IC_{50} pro inhibici ELAM–1, ICAM–1 a VCAM–1 byly $1{,}85 \times 10^{-10}$, $2{,}17 \times 10^{-10}$ a $1{,}01 \times 10^{-10}$ M, v příslušném pořadí. Tyto hodnoty jsou velmi podobné, což ukazuje na podobné požadavky pro dávku rhTNF aktivačního signálu pro indukci exprese ELAM–1, ICAM–1 a VCAM–1. Je zajímavé, že D2E7 byla podobně účinná v delším testu inhibice exprese ICAM–1. Test inhibice ICAM–1 vyžaduje 16 hodinovou společnou inkubaci rhTNF a D2E7 s HUVEC, oproti 4 hodinám nutným pro test inhibice ELAM–1 a VCAM–1. Protože má D2E7 pomalou rychlost disociace pro rhTNF je představitelné, že během 16 hodinové inkubační doby zde nebyla signifikantní kompetice TNF receptorů na HUVEC.

D. In vivo neutralizace hTNFα

Tři různé in vivo systémy byly použity pro demonstraci toho, že D2E7 je účinná v inhibici aktivity hTNFα in vivo.

1. Inhibice letality inkubované TNF u D–galaktosaminem senzitizovaných myší.

Injekce rekombinantního lidského TNFα (rhTNFα) myším semitizovaným D–galaktosaminem způsobuje letalitu během 24 hodin. Činidla neutralizující TNFα brání letiště v tomto modelu. Pro vyšetření schopnosti lidských anti–hTNFα protilátek neutralizovat hTNFα in vivo v tomto modelu byly C57B1/6 myším injikovány různé koncentrace D2E7 IgG1, nebo kontrolní protein, v PBS intraperitoneálně (i.p.). Myším byl o 30 hodin později podán 1 μg rhTNFα a 20 mg D–galaktosaminu v PBS i.p. a pozorování myší bylo provedeno o 24 hodin později. Toto množství rhTNFα a D–galaktosaminu bylo předem určeno pro dosažení 80 až 90% letality u těchto myší.

Reprezentativní výsledky, znázorněné jako sloupcový graf % přežívání versus koncentrace protilátky, jsou ukázány na obrázku 6. Černé sloupce představují D2E7, zatímco šrafované sloupce představují MAK 195. Injekce 2,5 až 25 μg D2E7 protilátky na myš chrání zvířata před TNFα–indukovanou letalitou. Hodnota ED_{50} je přibližně 1 až 2,5 μg/myš. Pozitivní kontrolní protilátka, MAK 195, byla podobná ve své protektivní schopnosti. Injekce D2E7 za absence rhTNFα neměla na myš žádné škodlivé účinky. Injekce nespecifické lidské IgG protilátky nezpůsobovala žádnou ochranu před TNFα–indukovanou letalitou.

Ve druhém pokusu bylo 49 myší rozděleno do 7 stejných skupin. Každá skupina dostala různé dávky D2E7 třicet minut před podáním LD_{80} dávky směsi rhTNF/D–galaktosaminu (1 μg rhTNF a 20 mg D–galaktosaminu na myš). Kontrolní skupina č. 7 dostala normální lidskou IgG1 kappa protilátku v dávce 25 μg/myš. Myši byly vyšetřovány o 24 hodin později. Přežívání pro každou skupinu je shrnuto v tabulce 13.

Tabulka 13: 24 hodinové přežívání po podání D2E7

Skupina	Přežívání (živé/celkem)	Přežívání (%)
1 (bez protilátky)	0/7	0
2 (1 μg)	1/7	14
3 (2,6 μg)	5/7	71
4 (5,2 μg)	6/7	86
5 (26 μg; bez rhTNF)	7/7	100
7 (25 μg Hu IgG1)	1/7	14

2. Inhibice pyrexie u králíků indukované TNF

Byla vyšetřována účinnost D2E7 v inhibici rhTNF indukované pyretické odpovědi u králíků. Skupině tří samic NZW králíků, každá o hmotnosti přibližně 2,5 kg, byla podána injekčně D2E7, rhTNF a imunitní komplexy D2E7 a rhTNF. Termistorovou sondou byla měřena rektální teplota na Kayeově snímači teplot každou minutu po dobu přibližně 4 hodin. Rekombinantní lidský TNF v salinickém roztoku, injikovaný v koncentraci 5 μg/kg, zvyšoval teplotu o více než 0,4 °C v asi 45 minutě po injekci. Přípravek protilátky samotné, v salinickém roztoku v dávce 138 μg/kg, nezvyšoval teplotu u králíků do 140 minuty po podání. Ve všech dalších pokusech byla D2E7 nebo kontrolní činidlo (lidský IgG1 nebo salinické vehikulum) podána injekčně i.v. králíkům a potom následovala po 15 minutách injekce rhTNF v salinickém roztoku v dávce 5 μg/kg i.v. Reprezentativní výsledky z několika pokusů jsou shrnuty v tabulce 14, dále.

Tabulka 14. DE27 zprostředkovaná inhibice pyrexie indukované rhTNF u králíků

	Vzestup teploty* °C			Molární poměr	Vrcholná teplota
dávka D2E7 (μg/kg)	rhTNF	rhTNF+D2E7	% inhibice**	D2E7: rhTNF	minuty po rhTNF
14	0,53	0,25	53	1	60
24	0,43	0,13	70	1,6	40
48	0,53	0,03	94	3,3	50
137	0,53	0,00	100	9,5	60
792	0,80	0,00	100	55	60

* = Vrcholná teplota
** = % inhibice = (1– (vzestup teploty s rh TNF a D2E7/vzestup teploty s rhTNF samotným)) x 100

Intravenózní předošetření D2E7 v dávce 14 μg/kg částečně inhibovalo pyrotenní odpověď ve srovnání s králíky ošetřenými samotným salinickým roztokem. D2E7 podaná v dávce 137 μg/kg zcela potlačila pyrogenní odpověď na rhTNF ve stejném pokusu. Ve druhém pokus D2E7 podaná v dávce 24 μg/kg také částečně potlačovala pyrogenní odpověď, ve srovnání s králíky ošetřenými pouze salinickým roztokem. Molární poměr D2E7 k rhTNF byl v tomto pokusu 1/6:1. Ve třetím pokusu zcela potlačována D2E7 injikovaná i.v. v dávce 48 μg/kg (molární poměr D2E7:rhTNF = 3,3:1) pyrogenní odpověď, ve srovnání s králíky ošetřenými kontrolním lidským IgG1 v salinickém roztoku v dávce 30 μg/kg. V posledním pokusu, králíci ošetření D2E7 (792 μg/kg) ve velmi vysokém molárním poměru k rhTNF (55:1) nevykazovali jakékoliv zvýšení teploty během 4 hodin pozorování. Ošetření králíků imunitními komplexy generovanými ze směsi D2E7 a rhTNF inkubované po dobu 1 hodiny při 37 °C v molárním poměru 55:1, bez následného podání rhTNF, také nevyvolalo jakýkoliv vzestup teploty ve stejném pokusu.

3. Prevence polyartritidy u Tg197 transgenních myší

Účinek D2E7 na vývoj onemocnění byl zkoumán v transgenním myším modelu artritidy. Byly vyvinuty transgenní myši (Tg197), které exprivují lidský přirozený TNF (modifikovaný ve 3' regionu za kódující sekvencí) a u těchto myší se vyvíjela chronická polyartritida se 100% incidencí ve věku 4 až 7 týdnů (pro další popis Tg197 modelu polyartritidy viz EMBO J. (1991) 10: 4025 – 4031).

Transgenní zvířata byla identifikována PCR ve věku 3 dní. Vrhy transgenních myší byly rozděleny do šesti skupin. Léčebné protokoly pro šest skupin byly následující: Skupina 1 = bez léčby; Skupina 2 = salinický roztok (vehikulum); skupina 3 = D2E7 v dávce 1,5 μg/g; skupina 4 = D2E7 v dávce 15 μg/g; skupina 5 = D2E7 v dávce 30 μg/g; a Skupina 6 = IgG1 kontrola v dávce 30 μg/g. Do studie byly vzaty také vrhy netransgenních myší a sloužily jako kontroly (Skupina 7 = netransgenní; bez léčby). Každá skupina dostávala tři injekce za týden i.p. ukázané léčby. Injekce probíhaly po dobu 10 týdnů. Každý týden byly pro každé zvíře zaznamenávány makroskopické změny v morfologii kloubů. V 10 týdnech byly myši utraceny a tkáň byla uchovávána ve formalinu. Bylo provedeno mikroskopické vyšetření tkáně.

U každé myši byl na začátku každého týdne zaznamenána hmotnost v gramech. Ve stejnou dobu bylo také provedeno měření velikosti kloubů (v mm), jako měření závažnosti onemocnění. Velikost kloubů byla určena jako průměr tří měření na kotníku pravé tlapky za použití mikrometru. Artritické skóre bylo zaznamenáváno týdně následujícím způsobem: 0 = žádná artritida (normální vzhled a flexe); + = mírná artritida (deformace kloubu); ++ = střední artritida (otok, deformace kloubu) a +++ = těžká artritida (detekována ankylosa při flexi a závažná porucha hybnosti). Na základě barvení řezů kloubu haematoxylinem/oesinem bylo stanoveno histopatologické skóre: 0 = bez detekovatelného onemocnění; 1 = proliferace synoviální membrány; 2 = těžké ztluštění synoviální membrány; 3 = destrukce chrupavky a erose kosti.

Účinek ošetření D2E7 na průměrnou velikost kloubu Tg197 transgenních artritických myší je ukázán graficky na obrázku 9. Histopatologické a artritické skóre Tg197 transgenních myší, ve věku 11 týdnů, je uvedeno v tabulce 15, dále.

Tabulka 15: Účinek D2E7 na histopatologické a artritické skóre u Tg197 myší

Skupina	Léčba	Histopatologické skóre	Artritické skóre
1	žádná	3 (7/7)	+++ (7/7)
2	salin. roztok	3 (8/8)	+++ (8/8)
6	IgG1 kontrola	3 (9/9)	+++ (7/9)
3	D2E7 1,5 μg/g	0 (6/8)	0 (8/8)
4	D2E7 15 μg/g	0 (7/8)	0 (8/8)
5	D2E7 30 μg/g	0 (8/8)	0 (8/8)

Tento pokus ukazuje, že D2E7 protilátka má výrazné pozitivní účinky na transgenní myši exprimující přirozený lidský TNF (Tg197) bez přítomnosti artritidy na konci studované doby.

E. DE27 neutralizace TNFα od jiných druhů

Vazebná specificita D2E7 byla vyšetřována měřením její schopnosti neutralizovat faktor nekrosy nádorů od jiných druhů primátů a od myší, za použití testu L929 cytoxicity (jak je popsán v příkladu 4, sekci A, výše). Výsledky jsou shrnuty v tabulce 16, dále.

Tabulka 16: Schopnost D2E7 neutralizovat TNF od jiných druhů v L929 testu

TNFα*	Zdroj	IC_{50} pro D2E7 neutralizaci (M)**
člověk	Rekombinantní	$7{,}8 \times 10^{-11}$
šimpanz	LPS–stimulované PBMC	$5{,}5 \times 10^{-11}$
pavián	rekombinantní	$6{,}0 \times 10^{-11}$
kosman	LPS–stimulované PBMC	$4{,}0 \times 10^{-10}$
makak (cynomolgus)	LPS–stimulované PBMC	$8{,}0 \times 10^{-11}$
makak rhesus	LPS–stimulované PBMC	$3{,}0 \times 10^{-11}$
pes	LPS–stimulované PBMC	$2{,}2 \times 10^{-10}$
prase	rekombinantní	$1{,}0 \times 10^{-7}$
myš	rekombinantní	$> 1{,}0 \times 10^{-7}$

Výsledky v tabulce 16 ukazují, že D2E7 může neutralizovat aktivitu pěti primátích TNFα přibližně stejně jako lidského TNFα a, navíc, může neutralizovat aktivitu psího TNFα (přibližně desetkrát méně než lidského TNFα) a prasečího a myšího TNFα (přibližně 1000–krát méně než lidského TNFα). Kromě toho, vazba D2E7 na rhTNFα ve fázi roztoku nebyla inhibována dalšími cytokiny, jako je lyfotoxin (TNFβ), IL–1α, IL–1β, IL–2, IL–4, IL–6, IL–8, IFNτ a TGFβ, což ukazuje, že D2E7 je velmi specifická pro svůj ligand TNFα.

F. Chybění uvolňování cytokinů lidskou plnou krví inkubovanou s D2E7

V tomto příkladu byla vyšetřována schopnost D2E7 inkubovat, samostatně, sekreci cytokinů nebo exprexi povrchových molekul na normálních buňkách lidské krve. D2E7 byla inkubována s ředěnou plnou krví od tří různých normálních dárců v různých koncentracích po dobu 24 hodin. LPS pozitivní kontrola byla provedena ve stejnou dobu, v koncentraci předem určené pro stimulaci sekrece cytokinů, imunokompetentními buňkami. Byly získány supernatanty a byly testovány v panelu deseti solubilních cytokinů, receptorů a adhezních molekul v ELISA kitu: IL–1α, IL–1β, antagonista IL–1 receptoru, IL–6, IL–8, TNFα, solubilní TNF receptor I, solubilní TNF receptor II, solubilní ICAM–1 a solubilní E–selektin. Žádná signifikantní množství cytokinů nebo povrchových buněčných molekul nebyla měřena v důsledku společné inkubace D2E7 protilátky, v koncentraci 343 μg/ml. Kontrolní kultury bez přidání protilátky také nevykazovaly žádná měřitelná množství cytokinů, zatímco LPS–kontrola vykazovala zvýšené hladiny v rozmezí mnoha pikogramů až nanogramů. Tyto výsledky ukazují, že D2E7 neindukuje sekreci cytokinů

nebo povrchových buněčných proteinů buňkami plné krve nad normální hladinu v kulturách ex vivo.

Částí předkládané přihlášky je připojený seznam sekvencí, jehož obsah je shrnut v následující tabulce:

SEQ ID NO:	Řetězec protilátky	Region	Typ sekvence
1	D2E7	VL	aminokyselina
2	D2E7	VH	aminokyselina
3	D2E7	VL CDR3	aminokyselina
4	D2E7	VL CDR3	aminokyselina
5	D2E7	VL CDR2	aminokyselina
6	D2E7	VH CDR2	aminokyselina
7	D2E7	VL CDR1	aminokyselina
8	D2E7	VH CDR1	aminokyselina
9	2SD4	VL	aminokyselina
10	2SD4	VH	aminokyselina
11	2SE4	VL CDR3	aminokyselina
12	EP B12	VL CDR3	aminokyselina
13	VL10E4	VL CDR3	aminokyselina
14	VL100A9	VL CDR3	aminokyselina
15	VLL100D2	VL CDR3	aminokyselina
16	VLL0F4	VL CDR3	aminokyselina
17	LOE5	VL CDR3	aminokyselina
18	VLLOG7	VL CDR3	aminokyselina
19	VLLOG9	VL CDR3	aminokyselina
20	VLLOH1	VL CDR3	aminokyselina
21	VLLOH10	VL CDR3	aminokyselina
22	VL1B7	VL CDR3	aminokyselina
23	VL1C1	VL CDR3	aminokyselina
24	VL0.1F4	VL CDR3	aminokyselina
25	VL0.1H8	VL CDR3	aminokyselina
26	LOE7.A	VL CDR3	aminokyselina
27	2SD4	VH CDR3	aminokyselina
28	VH1B11	VH CDR3	aminokyselina
29	VH1D8	VH CDR3	aminokyselina
30	VH1A11	VH CDR3	aminokyselina
31	VH1B12	VH CDR3	aminokyselina
32	VH1E4	VH CDR3	aminokyselina
33	VH1F6	VH CDR3	aminokyselina
34	3C–H2	VH CDR3	aminokyselina
35	VH1–D2.N	VH CDR3	aminokyselina
36	D2E7	VL	nukleová kyselina
37	D2E7	VH	nukleová kyselina

Odborníci v oboru poznají, nebo budou schopni zjistit běžným experimentováním nebo ekvivalentů specifických provedení vynálezu, která jsou zde popsána. Takové ekvivalenty jsou zahrnuty následujícími patentovými nároky.

Seznam sekvencí:

(1) Obecné informace:

(i) Přihlašovatel:

(A) Jméno: BASF Aktiengesellschaft
(B) Ulice: Carl–Bosch Str. 38
(C) Město: 67056 Ludwigshafen
(D) Země: Rheinladn–Pfalz
(E) Stát: Německá Spolková Republika

(ii) Název vynálezu: Lidské protilátky k lidskému TNFα

(iii) Počet sekvencí: 37

(iv) Adresa pro korespondenci

(A) Adresa: Lahive & Cocfield
(B) Ulice: 60 State Street, suite 510
(C) Město: Boston
(D) Stát: Massachusetts
(E) Země: USA
(F) ZIP: 02109–1875

(v) Počítačová čtecí forma:

(A) Typ média: Floppy disk
(B) Počítač: IBM PC kompatibilní
(C) Operační systém: PC–DOS/MS–DOS
(D) Software: PatentIn Release # 1.0, verse # 1.25

(vi) Údaje o současné přihlášce:

(A) Číslo přihlášky:
(B) Datum podání:
(C) Klasifikace:

(vii) Předchozí data přihlášky:

(A) Číslo přihlášky: US 08/599226
(B) Datum podání: 9. 2. 1996
(C) Klasifikace:

(vii) Předchozí data přihlášky

(A) Číslo přihlášky: US 60/031476
(B) Datum podání: 25. 11. 1996
(C) Klasifikace:

(viii) Zástupce/agent – informace

(A) Jméno: DeConti, Giulio A., Jr.
(B) Registrační číslo: 31503
(C) Reference/číslo rejstříku: BB1–043CPPC

(ix) Telekomunikační informace:

(A) Telefon: (617)227–7400
(B) Telefax: (617)227–5941

(2) Informace pro SEQ ID NO: 1:

(i) Charakteristiky sekvence:

(A) Délka: 107 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 1:

```
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 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
            20                  25                  30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 2:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 121 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 2:

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

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

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

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

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

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

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

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

(2) Informace pro SEQ ID NO: 3:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 9 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(ix) Vlastnosti:

(A) Jméno/klíč: modifikované místo
(B) Umístění: 9
(C) Jiné informace: /"Xaa je Thr nebo Ala"

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 3:

```
Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Xaa
1               5
```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 4:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 12 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(ix) Vlastnosti:

(A) Jméno/klíč: modifikované místo
(B) Umístění: 12
(C) Jiné informace: /"Xaa je Thr nebo Ala"

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 4:

```
Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Xaa
1               5                   10
```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 5:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 7 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 5:

```
Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1               5
```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 6:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 17 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 6:

```
Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Glu
1               5                  10                  15

Gly
```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 7:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 11 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 7:

```
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala
1               5                  10
```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 8:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 5 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 8:

```
Asp Tyr Ala Met His
1               5
```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 9:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 107 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 9:

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

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

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

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

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr
                85                  90                  95

Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 10:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 121 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 10:

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

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

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

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Glu Gly Arg Phe Ala Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Leu Tyr
65                  70                  75                  80

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

Thr Lys Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asn Trp Gly
            100                 105                 110

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

(2) Informace pro SEQ ID NO: 11:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 9 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 11:

```
Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Ala
1               5
```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 12:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 9 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 12:

Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala
1 5

(2) Informace pro SEQ ID NO: 13:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 9 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 13:

Gln Lys Tyr Gln Arg Ala Pro Tyr Thr
1 5

(2) Informace pro SEQ ID NO: 14:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 9 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 14:

Gln Lys Tyr Ser Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

(2) Informace pro SEQ ID NO: 15:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 9 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 15:

```
Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Thr
1               5
```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 16:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 9 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 16:

```
Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr
1               5
```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 17:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 9 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 17:

```
Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Tyr
1               5
```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 18:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 9 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 18:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Asn
1 5

(2) Informace pro SEQ ID NO: 19:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 9 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 19:

Gln Lys Tyr Thr Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

(2) Informace pro SEQ ID NO: 20:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 9 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 20:

Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Asn
1 5

(2) Informace pro SEQ ID NO: 21:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 9 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 21:

```
Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Ala Tyr Ser
1               5
```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 22:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 9 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 22:

```
Gln Gln Tyr Asn Ser Ala Pro Asp Thr
1               5
```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 23:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 9 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 23:

```
Gln Lys Tyr Asn Ser Asp Pro Tyr Thr
1               5
```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 24:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 9 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 24:

```
Gln Lys Tyr Ile Ser Ala Pro Tyr Thr
1               5
```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 25:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 9 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 25:

```
Gln Lys Tyr Asn Arg Pro Pro Tyr Thr
1               5
```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 26:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 9 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 26:

```
Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala
1               5
```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 27:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 12 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 27:

```
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asn
1               5                   10
```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 28:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 12 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 28:

```
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Lys
1               5                   10
```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 29:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 12 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 29:

```
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Tyr
1               5                   10
```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 30:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 12 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 30:

```
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asp
1               5                   10
```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 31:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 12 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 31:

```
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Phe Ser Leu Asp Tyr
1               5                   10
```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 32:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 12 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 32:

```
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu His Tyr
1               5                   10
```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 33:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 12 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 33:

```
Ala Ser Phe Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Glu Tyr
1               5                   10
```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 34:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 12 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 34:

```
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Glu Tyr
1               5                   10
```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 35:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 12 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 35:

```
Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Asn
1               5                  10
```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 36:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 321 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Řetězec: dvojitý
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 36:

```
GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGGGA CAGAGTCACC    60

ATCACTTGTC GGGCAAGTCA GGGCATCAGA AATTACTTAG CCTGGTATCA GCAAAAACCA   120

GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGCT GCATCCACTT TGCAATCAGG GGTCCCATCT   180

CGGTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTACAGCCT   240

GAAGATGTTG CAACTTATTA CTGTCAAAGG TATAACCGTG CACCGTATAC TTTTGGCCAG   300

GGGACCAAGG TGGAAATCAA A                                             321
```

(2) Informace pro SEQ ID NO: 37:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 363 párů bází
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Řetězec: dvojitý
(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: cDNA

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 37:

```
GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CCGGCAGGTC CCTGAGACTC   60

TCCTGTGCGG CCTCTGGATT CACCTTTGAT GATTATGCCA TGCACTGGGT CCGGCAAGCT  120

CCAGGGAAGG GCCTGGAATG GGTCTCAGCT ATCACTTGGA ATAGTGGTCA CATAGACTAT  180

GCGGACTCTG TGGAGGGCCG ATTCACCATC TCCAGAGACA ACGCCAAGAA CTCCCTGTAT  240

CTGCAAATGA ACAGTCTGAG AGCTGAGGAT ACGGCCGTAT ATTACTGTGC GAAAGTCTCG  300

TACCTTAGCA CCGCGTCCTC CCTTGACTAT TGGGGCCAAG GTACCCTGGT CACCGTCTCG  360

AGT                                                                363
```

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Izolovaná lidská protilátka, nebo její antigen–vazebná část, s těmito charakteristikami:

   a. disociuje z lidského TNFα s rychlostní konstantou K_{off} 1 x $10^{-3}s^{-1}$ nebo menší, stanoveno povrchovou plazmonovou rezonancí,

   b. má CDR3 doménu lehkého řetězce obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 3, nebo sekvenci modifikovanou ze SEQ ID NO: 3 jednou substitucí alaninu v pozici 1, 4, 5, 7 nebo 8 nebo jednou až pěti konzervativními aminokyselinovými substitucemi v pozicích 1, 3, 4, 6, 7, 8 a/nebo 9,

   c. má CDR3 doménu těžkého řetězce obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 4, nebo sekvenci modifikovanou ze SEQ ID NO: 4 jednou substitucí alaninu v pozici 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 nebo 11 nebo jednou až pěti konzervativními aminokyselinovými substitucemi v pozicích 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 a/nebo 12.

2. Izolovaná lidská protilátka, nebo její antigen–vazebná část, podle nároku 1, která disociuje z lidského TNFα s K_d 1 x 10^{-8} M nebo nižší a rychlostní konstantou K_{off} 1 x 10^{-3} s^{-1} nebo menší, obojí stanoveno povrchovou plazmovou rezonancí, a neutralizuje cytotoxicitu lidského TNFα ve standardním in vitro L929 testu s IC_{50} 1 x 10^{-7} M nebo menší.

3. Izolovaná lidská protilátka, nebo její antigen–vazebná část, podle nároku 2, která neutralizuje cytotoxicitu lidského TNFα ve standardním in vitro L929 testu s IC_{50} 1 x 10^{-8} M nebo menší.

4. Izolovaná lidská protilátka, nebo její antigen–vazebná část, podle nároku 2, která neutralizuje cytotoxicitu lidského TNFα ve standardním in vitro L929 testu s IC_{50} 1 x 10^{-9} M nebo menší.

5. Izolovaná lidská protilátka, nebo její antigen–vazebná část, podle nároku 2, která neutralizuje cytotoxicitu lidského TNFα ve standardním in vitro L929 testu s IC_{50} 1 x 10^{-10} M nebo menší.

6. Izolovaná lidská protilátka, nebo její antigen–vazebná část, podle nároku 2, kterou je rekombinantní protilátka nebo její antigen–vazebná část.

7. Izolovaná lidská protilátka, nebo její antigen–vazebná část, podle nároku 2, která inhibuje lidským TNFα indukovanou expresi ELAM–1 na endotelových buňkách lidské pupečníkové žíly.

8. Izolovaná lidská protilátka podle nároku 1 nebo 2, nebo její antigen–vazebná část, která disociuje z lidského TNFα s rychlostní konstantou K_{off} $5 \times 10^{-4} s^{-1}$ nebo menší.

9. Izolovaná lidská protilátka podle nároku 1 nebo 2, nebo její antigen vazebná část, která disociuje z lidského TNFα s rychlostní konstantou K_{off} $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ nebo menší.

10. Izolovaná lidská protilátka, nebo její antigen–vazebná část, podle nároku 1, s variabilním regionem lehkého řetězce (LCVR) majícím CDR3 doménu obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 3, nebo sekvenci modifikovanou ze SEQ ID NO: 3 jednou alaninovou substitucí v pozici 1, 4, 5, 7 nebo 8 a s variabilním regionem těžkého řetězce HCVR majícím CDR3 doménu obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 4, nebo modifikovanou ze SEQ ID NO: 4 jednou alaninovou substitucí v pozici 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 nebo 11.

11. Izolovaná lidská protilátka, nebo její antigen–vazebná část, podle nároku 10, kde LCVR má dále CDR2 doménu obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 5 a HCVR má dále CDR 2 doménu obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 6.

12. Izolovaná lidská protilátka, nebo její antigen–vazebná část, podle nároku 11, kde LCVR má dále CDR1 doménu obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 7 a HCVR má dále CDR1 doménu obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 8.

13. Izolovaná lidská protilátka, nebo její antigen–vazebná část, podle nároku 1, s variabilním regionem lehkého řetězce (LCVR) obsahujícím aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 1 a s variabilním regionem těžkého řetězce (HCVR) obsahujícím aminokyselinou sekvenci SEQ ID NO: 2.

14. Izolovaná lidská protilátka podle nároku 13, která má konstantní region těžkého řetězce IgG1.

15. Izolovaná lidská protilátka podle nároku 13, která má konstantní region těžkého řetězce IgG4.

16. Izolovaná lidská protilátka podle nároku 13, kterou je Fab fragment.

17. Izolovaná lidská protilátka podle nároku 13, kterou je jednořetězcový Fv fragment.

18. Izolovaná lidská protilátka, nebo její antigen–vazebná část, podle nároku 1, s variabilním regionem lehkého řetězce LCVR majícím CDR3 doménu obsahující aminokyselinovou sekvenci vybranou ze skupiny skládající se z SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 nebo s variabilním regionem těžkého řetězce (HCVR) majících CDR3 doménu obsahující aminokyselinovou sekvenci vybranou ze skupiny skládající se ze SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 a SEQ ID NO: 34.

19. Rekombinantní lidská protilátka, nebo její antigen–vazebná část, která neutralizuje aktivitu lidského TNFα, ale ne aktivitu lidského TNFβ, a má identifikační charakteristiky protilátky podle kteréhokoli z nároků 1 až 18.

20. Rekombinantní lidská protilátka, nebo její antigen–vazebná část, podle nároku 19, která také neutralizuje aktivitu šimpanzího TNFα a alespoň jednoho dalšího primátího TNFα vybraného ze skupiny skládající se z paviáního TNFα, kosmaního TNFα, TNFα makaka (cynomolgus) a TNFα makaka rhesus.

21. Rekombinantní lidská protilátka, nebo její antigen–vazebná část, podle nároku 20, která také neutralizuje aktivitu psího TNFα.

22. Rekombinantní lidská protilátka, nebo její antigen–vazebná část, podle nároku 20, která také neutralizuje aktivitu prasečího TNFα.

23. Izolovaná nukleová kyselina kódující lehký řetězec protilátky podle nároku 1, kde CDR3 doména obsahuje aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 3, nebo sekvenci modifikovanou ze SEQ ID NO: 3 jednou alaninovou substituci v pozici 1, 4, 5, 7 nebo 8 nebo jednou až pěti konzervativními aminokyselinovými substitucemi v pozicích 1, 3, 4, 6, 7, 8 a/nebo 9.

24. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 23, která kóduje variabilní region lehkého řetězce LCVR protilátky.

25. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 24, kde CDR2 doména LCVR protilátky obsahuje aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 5.

26. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 25, kde CDR1 doména LCVR protilátky obsahuje aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 7.

27. Izolovaná nukleová kyselina kódující těžký řetězec protilátky podle nároku 1, kde CDR3 doména obsahuje aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 4, nebo modifikovanou ze SEQ ID NO: 4 jednou alaninovou substitucí v pozici 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 nebo 11 nebo jednou až pěti konzervativními aminokyselinovými substitucemi v pozicích 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 a/nebo 12.

28. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 27, která kóduje variabilní region těžkého řetězce HCVR protilátky.

29. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 28, kde CDR2 doména HCVR protilátky obsahuje aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 6.

30. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 29, kde CDR1 doména HCVR protilátky obsahuje aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 8.

31. Izolovaná nukleová kyselina kódující lehký nebo těžký řetězec protilátky podle nároku 1, kde CDR3 doména obsahuje aminokyselinovou sekvenci vybranou ze skupiny skládající se z:

c) SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 11–26 lehkého řetězce,

d) SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 27–34 těžkého řetězce.

32. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 24, kde variabilní region lehkého řetězce protilátky obsahuje aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 1.

33. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 32, která kóduje variabilní region lehkého řetězce protilátky a konstantní region lehkého řetězce protilátky.

34. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 33, která je v rekombinantním expresním vektoru.

35. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 28, kde variabilní region těžkého řetězce protilátky obsahuje aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 2.

36. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 35, která kóduje variabilní region těžkého řetězce protilátky a konstantní region těžkého řetězce protilátky.

37. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 36, kde konstantní regionem těžkého řetězce protilátky je konstantní region IgG1.

38. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 36, kde konstantní regionem těžkého řetězce protilátky je konstantní region IgG4.

39. Izolovaná nukleová kyselina podle nároku 37, která je v rekombinantním expresním vektoru.

40. Rekombinantní expresní vektor kódující:

a) lehký řetězec protilátky mající variabilní region obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 1.

b) těžký řetězec protilátky mající variabilní region obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 2.

41. Hostitelská buňka, do které byl vložen rekombinantní expresní vektor podle nároku 40.

42. Způsob syntézy lidské protilátky, která se váže na lidský TNFα, podle nároku 13, **vyznačující se tím**, že zahrnuje kultivaci hostitelské buňky podle nároku 41 v kultivačním médiu, dokud není lidská protilátka, která se váže na lidský TNFα, syntetizována buňkou.

43. Farmaceutický přípravek, **vyznačující se tím**, že zahrnuje protilátku, nebo její antigen vazebnou část, podle kteréhokoli z nároků 1 až 22 a farmaceuticky přijatelný nosič.

44. Farmaceutický přípravek podle nároku 43, **vyznačující se tím**, že dále zahrnuje alespoň jedno další terapeutické činidlo pro léčbu onemocnění, při kterém je aktivita TNFα škodlivá.

45. Použití protilátky nebo její antigen–vazebné části podle kteréhokoli z nároků 1 až 22 pro výrobu léčiva pro léčbu onemocnění, při kterém je aktivita TNFα škodlivá.

46. Použití podle nároku 45, kde onemocněním je sepse.

47. Použití podle nároku 45, kde onemocnění je autoimunitní onemocnění.

48. Použití podle nároku 45, kde autoimunitní onemocnění je vybráno ze skupiny skládající se z revmatoidní artritidy, revmatoidní spondylitidy, osteoartritidy a dravé artritidy.

49. Použití podle nároku 45, kde autoimunitní onemocnění je vybráno ze skupiny skládající se z alergie, roztroušené sklerózy, autoimunitního diabetu, autoimunitní uveitidy a nefrotického syndromu.

50. Použití podle nároku 45, kde onemocnění je infekční onemocnění.

51. Použití podle nároku 45, kde onemocnění je rejekce transplantátu nebo reakce štěpu proti hostiteli.

52. Použití podle nároku 45, kde onemocnění je malignita.

53. Použita podle nároku 45, kde onemocnění je plicní onemocnění.

54. Použití podle nároku 45, kde onemocnění je střevní onemocnění.

55. Použití podle nároku 45, kde onemocnění je srdeční onemocnění.

56. Použití podle nároku 45, kde onemocnění je vybráno ze skupiny skládající se ze zánětlivých onemocnění kostí, resorpčních onemocnění kostí, alkoholické hepatitidy, virové hepatitidy, fulminantní hepatitidy, poruch koagulace, popálenin, reperfusního poškození, tvorby keloidů, tvorby jizevnaté tkáně, pyrexie, onemocnění periodontu, obezity a radiační toxicity.

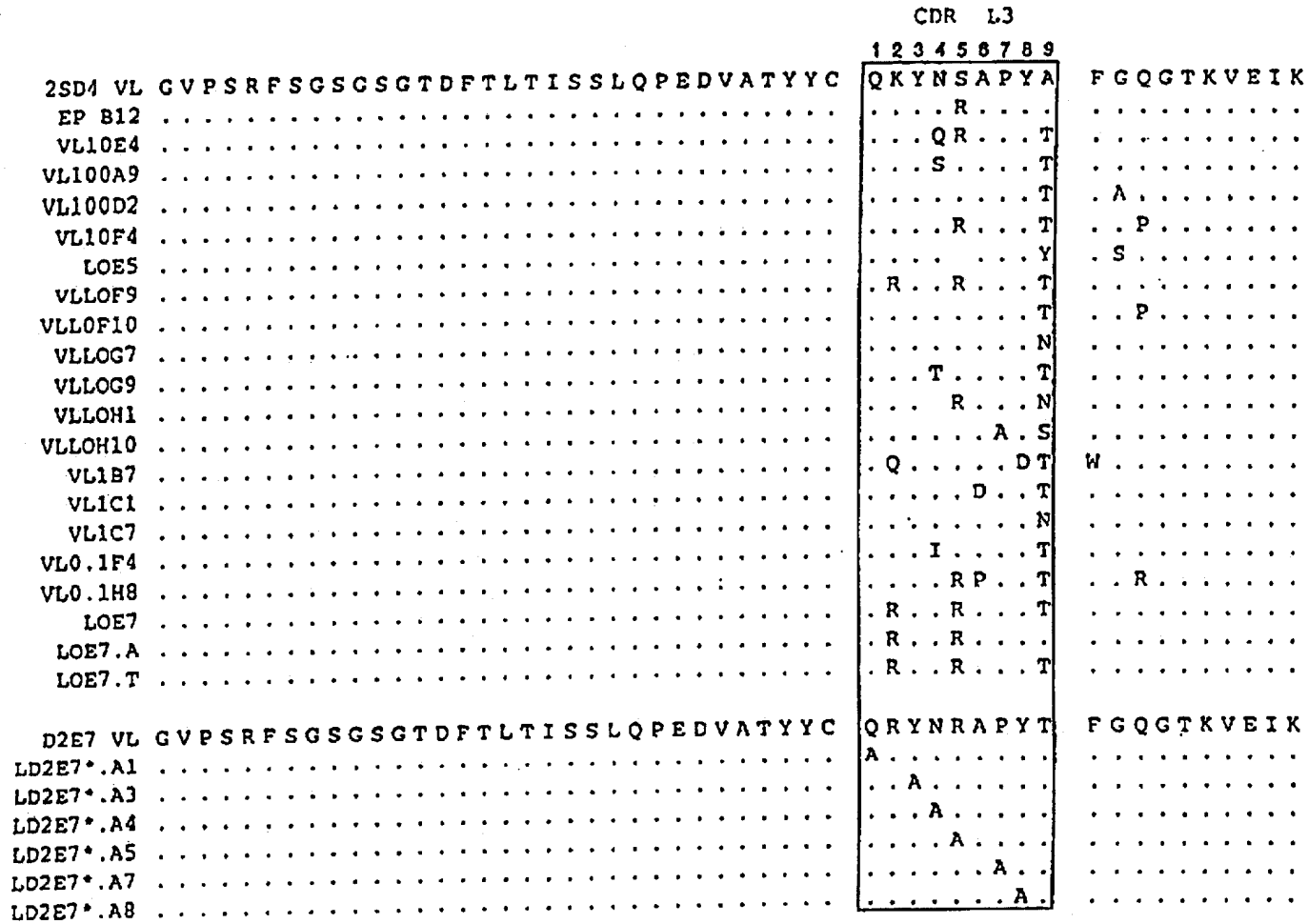
57. Protilátka nebo její antigen vazebná část podle kteréhokoli v nároků 1 až 22 pro použití v terapii.

58. Protilátka nebo její antigen vazebná část podle kteréhokoliv z nároků 1 až 22 v kombinaci s alespoň jedním dalším terapeutickým činidlem pro použití při léčbě onemocnění, při kterém je aktivita TNFα škodlivá.

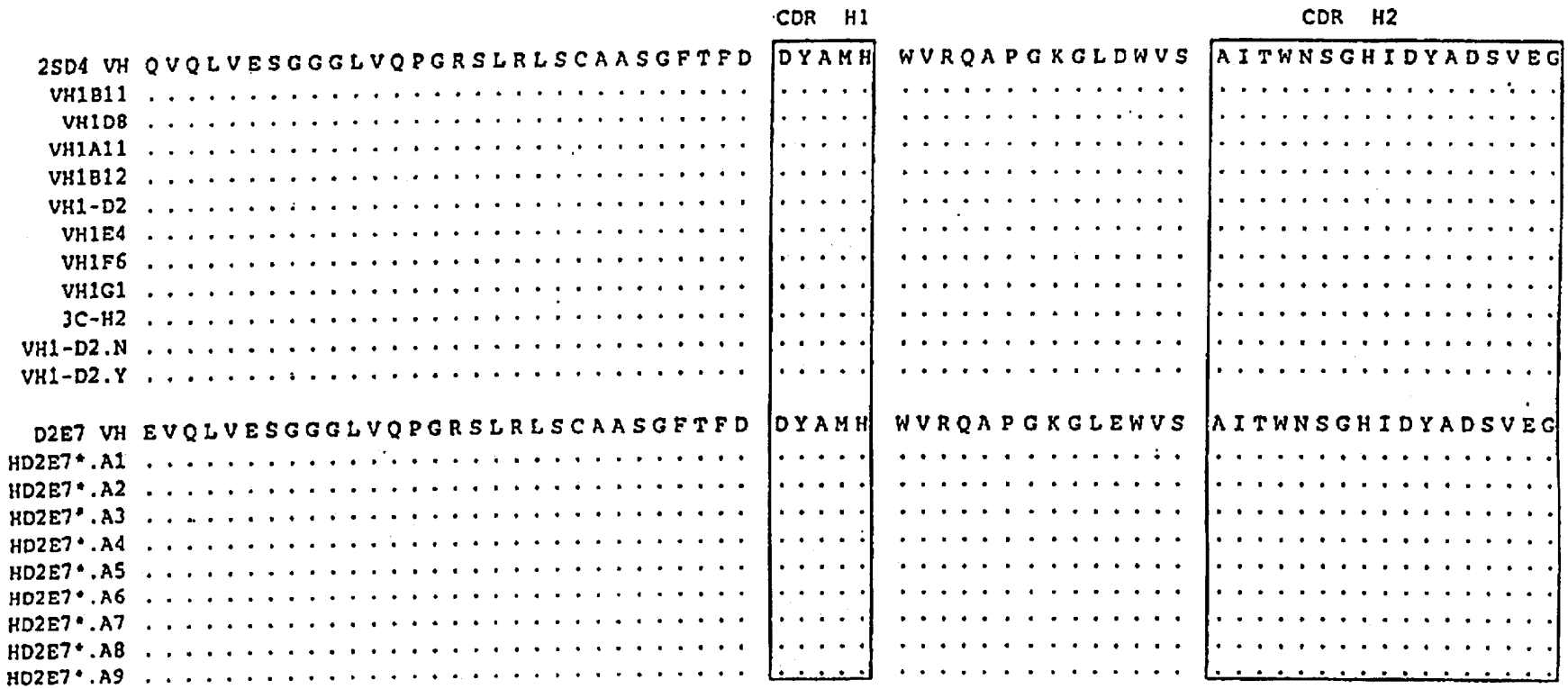
11 výkresů

		CDR L1		CDR L2
2SD4 VL	D I Q M T Q S P S S L S A S I G D R V T I T C	R A S Q G I R N Y L A	W Y Q Q K P G K A P K L L I Y	A A S T L Q S
EP B12	....	....	....	....
VL10E4	....	....	....	....
VL100A9	....	....	....	....
VL100D2	....	....	....	....
VL10F4	....	....	....	....
LOE5	....	....	....	....
VLLOF9	....	....	....	....
VLLOF10	....	....	....	....
VLLOG7	....	....	....	....
VLLOG9	....	....	....	....
VLLOH1	....	....	....	....
VLLOH10	....	....	....	....
VL1B7	....	....	....	....
VL1C1	....	....	....	....
VL1C7	....	....	....	....
VL0.1F4	....	....	....	....
VL0.1H8	....	....	....	....
LOE7	....	....	....	....
LOE7.A	....	....	....	....
LOE7.T	....	....	....	....
D2E7 VL	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C	R A S Q G I R N Y L A	W Y Q Q K P G K A P K L L I Y	A A S T L Q S
LD2E7*.A1	....	....	....	....
LD2E7*.A3	....	....	....	....
LD2E7*.A4	....	....	....	....
LD2E7*.A5	....	....	....	....
LD2E7*.A7	....	....	....	....
LD2E7*.A8	....	....	....	....

Obr. 1A

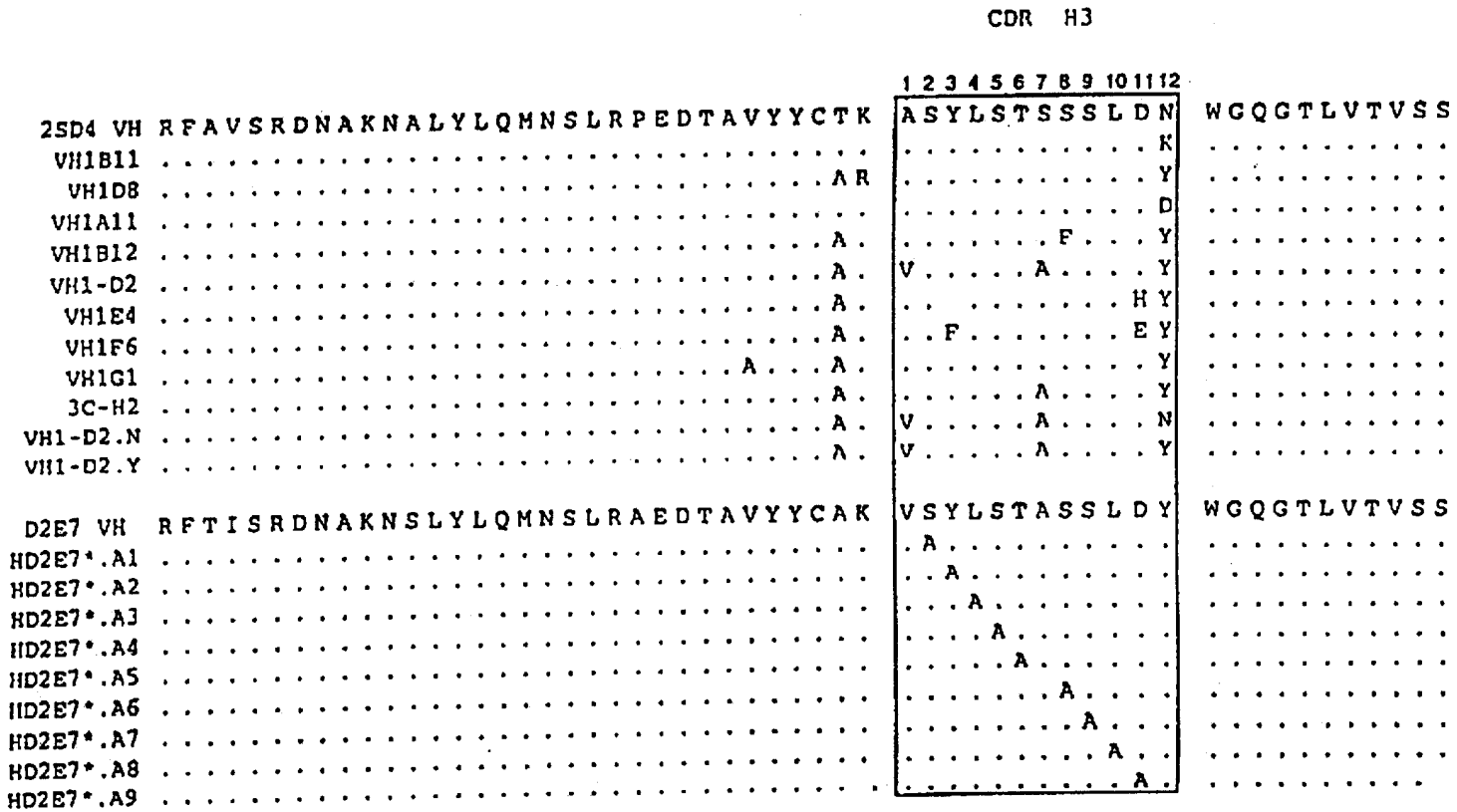

CDR L3
1 2 3 4 5 6 7 8 9
2SD4 VL GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC QKYNSAPYA FGQGTKVEIK
EP B12 . . . . R . . . .
VL10E4 . . . Q R . . . T
VL100A9 . . . S . . . T
VL100D2 . . . . . T . A . . . . .
VL10F4 . . . . R . . . T . . P . . . . .
LOE5 . . . . . Y . S . . . . .
VLLOF9 . R . . R . . . T
VLLOF10 . . . . . T . . P . . . . .
VLLOG7 . . . . . N
VLLOG9 . . . T . . . . T
VLLOH1 . . . R . . . N
VLLOH10 . . . . . A . S
VL1B7 . Q . . . . . D T W . . . . . .
VL1C1 . . . . . D . . T
VL1C7 . . . . . N
VL0.1F4 . . . I . . . T
VL0.1H8 . . . . R P . . T . . R . . . . .
LOE7 . R . . R . . . T
LOE7.A . R . . R . . . .
LOE7.T . R . . R . . . T
D2E7 VL GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC QRYNRAPYT FGQGTKVEIK
LD2E7*.A1 A
LD2E7*.A3 . . A
LD2E7*.A4 . . . A
LD2E7*.A5 . . . . A
LD2E7*.A7 . . . . . A . .
LD2E7*.A8 . . . . . A .

Obr. 1B



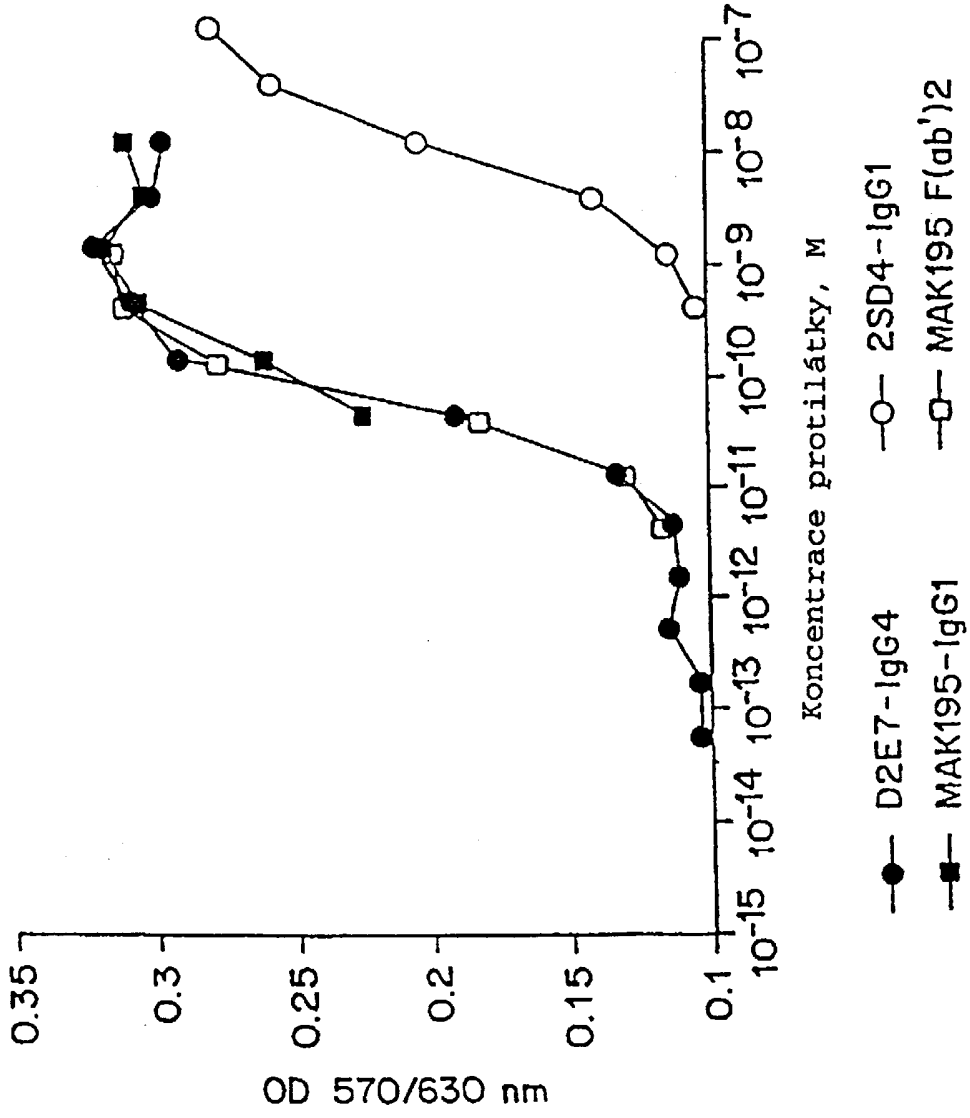
Obr. 2A

CZ 292465 B6

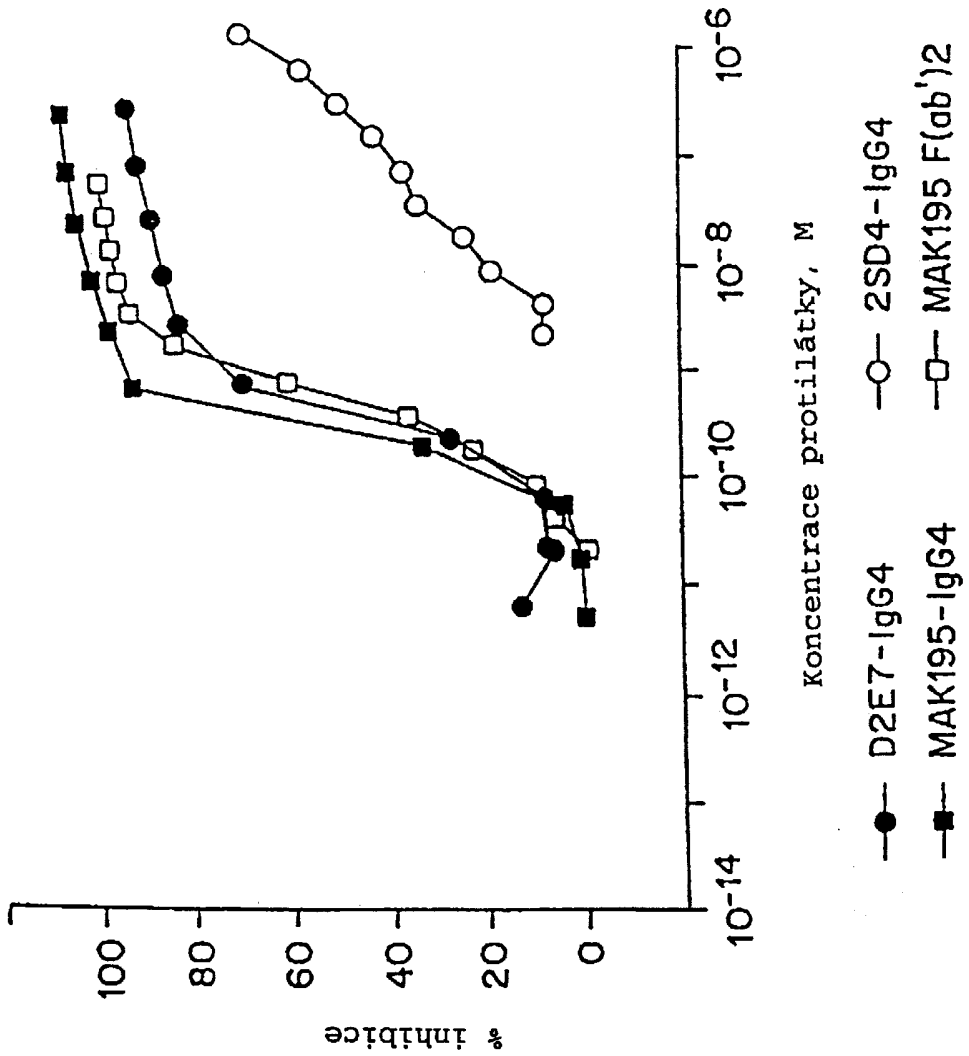

CDR H3
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
2SD4 VH RFAVSRDNAKNALYLQMNSLRPEDTAVYYCTK ASYLSTSSSLDN WGQGTLVTVSS
VH1B11 K
VH1D8 AR Y
VH1A11 D
VH1B12 A F Y
VH1-D2 A V A Y
VH1E4 A H Y
VH1F6 A F E Y
VH1G1 A A Y
3C-H2 A A Y
VH1-D2.N A V A N
VH1-D2.Y A V A Y
D2E7 VH RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK VSYLSTASSLDY WGQGTLVTVSS
HD2E7*.A1 A
HD2E7*.A2 A
HD2E7*.A3 A
HD2E7*.A4 A
HD2E7*.A5 A
HD2E7*.A6 A
HD2E7*.A7 A
HD2E7*.A8 A
HD2E7*.A9 A

Obr. 2B

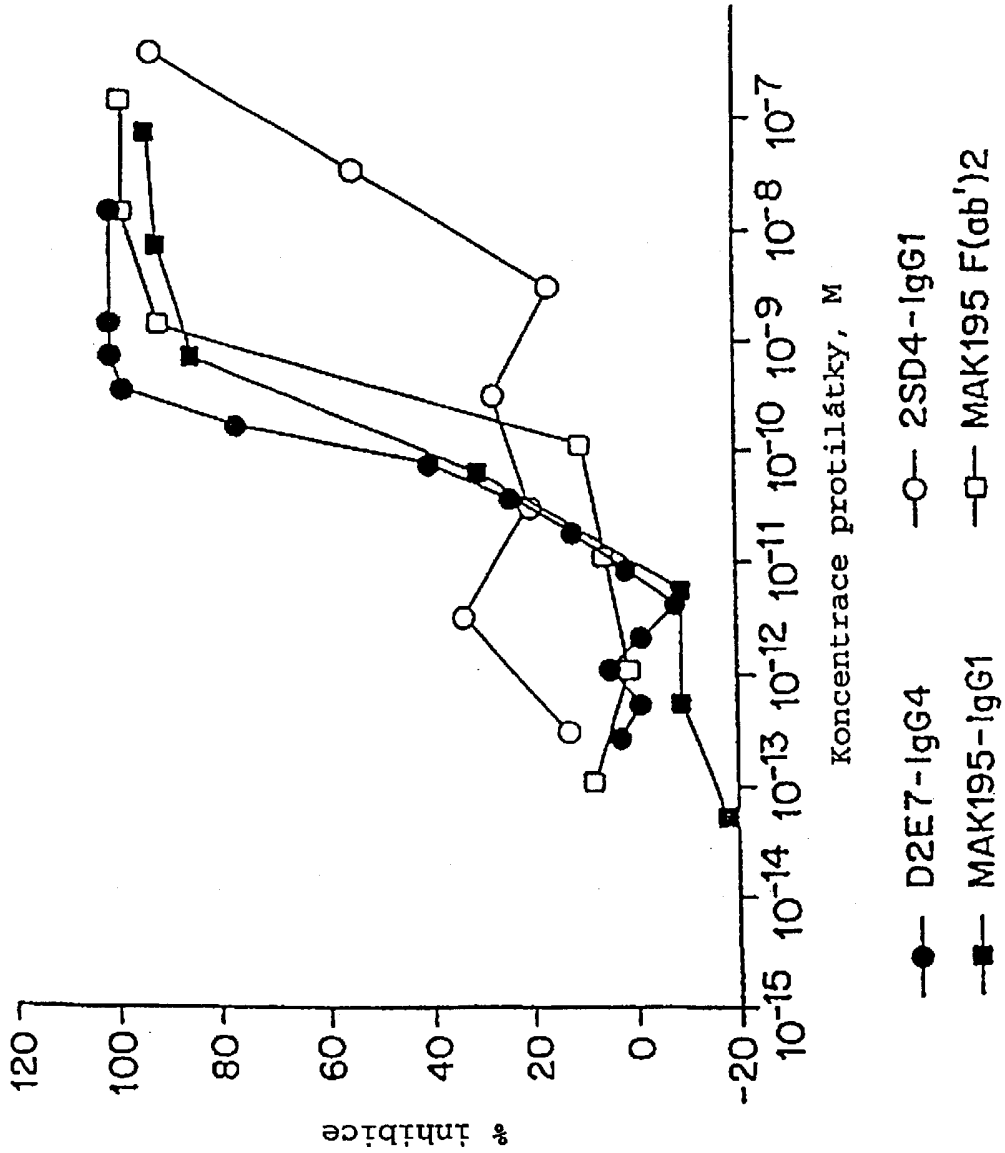
Obr. 3

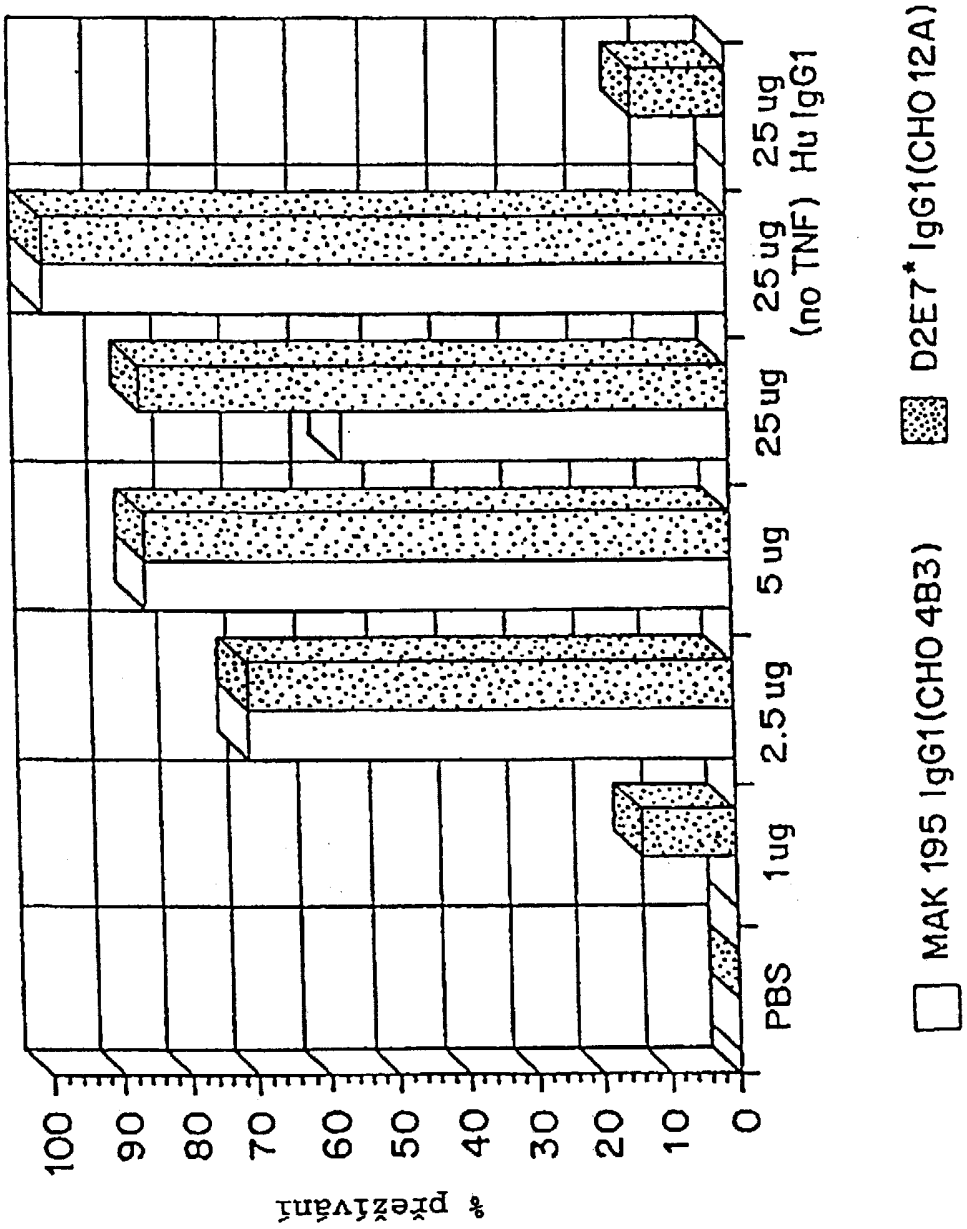

OD 570/630 nm
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
10⁻¹⁵ 10⁻¹⁴ 10⁻¹³ 10⁻¹² 10⁻¹¹ 10⁻¹⁰ 10⁻⁹ 10⁻⁸ 10⁻⁷
Koncentrace protilátky, M
D2E7-IgG4
2SD4-IgG1
MAK195-IgG1
MAK195 F(ab')2

Obr. 4


% inhibice
100
80
60
40
20
0
10-14
10-12
10-10
10-8
10-6
Koncentrace protilátky, M
D2E7-IgG4
2SD4-IgG4
MAK195-IgG4
MAK195 F(ab')2

Obr. 5


% inhibice
120
100
80
60
40
20
0
-20
10^{-15} 10^{-14} 10^{-13} 10^{-12} 10^{-11} 10^{-10} 10^{-9} 10^{-8} 10^{-7}
Koncentrace protilátky, M
D2E7-IgG4
2SD4-IgG1
MAK195-IgG1
MAK195 F(ab')2


% preživání
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
PBS
1 ug
2.5 ug
5 ug
25 ug
25 ug (no TNF)
25 ug Hu IgG1
MAK 195 IgG1(CHO 4B3)
D2E7* IgG1(CHO 12A)

Obr. 6

D2E7 VL

```
GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA
 D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V

                                                CDR L1
GGG GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCA AGT CAG GGC ATC AGA
 G   D   R   V   T   I   T   C   R   A   S   Q   G   I   R

AAT TAC TTA GCC TGG TAT CAG CAA AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG
 N   Y   L   A   W   Y   Q   Q   K   P   G   K   A   P   K

                                CDR L2
CTC CTG ATC TAT GCT GCA TCC ACT TTG CAA TCA GGG GTC CCA TCT
 L   L   I   Y   A   A   S   T   L   Q   S   G   V   P   S

CGG TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC
 R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F   T   L   T   I

AGC AGC CTA CAG CCT GAA GAT GTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA AGG
 S   S   L   Q   P   E   D   V   A   T   Y   Y   C   Q   R

   CDR L3
TAT AAC CGT GCA CCG TAT ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG GTG GAA
 Y   N   R   A   P   Y   T   F   G   Q   G   T   K   V   E

ATC AAA
 I   K
```

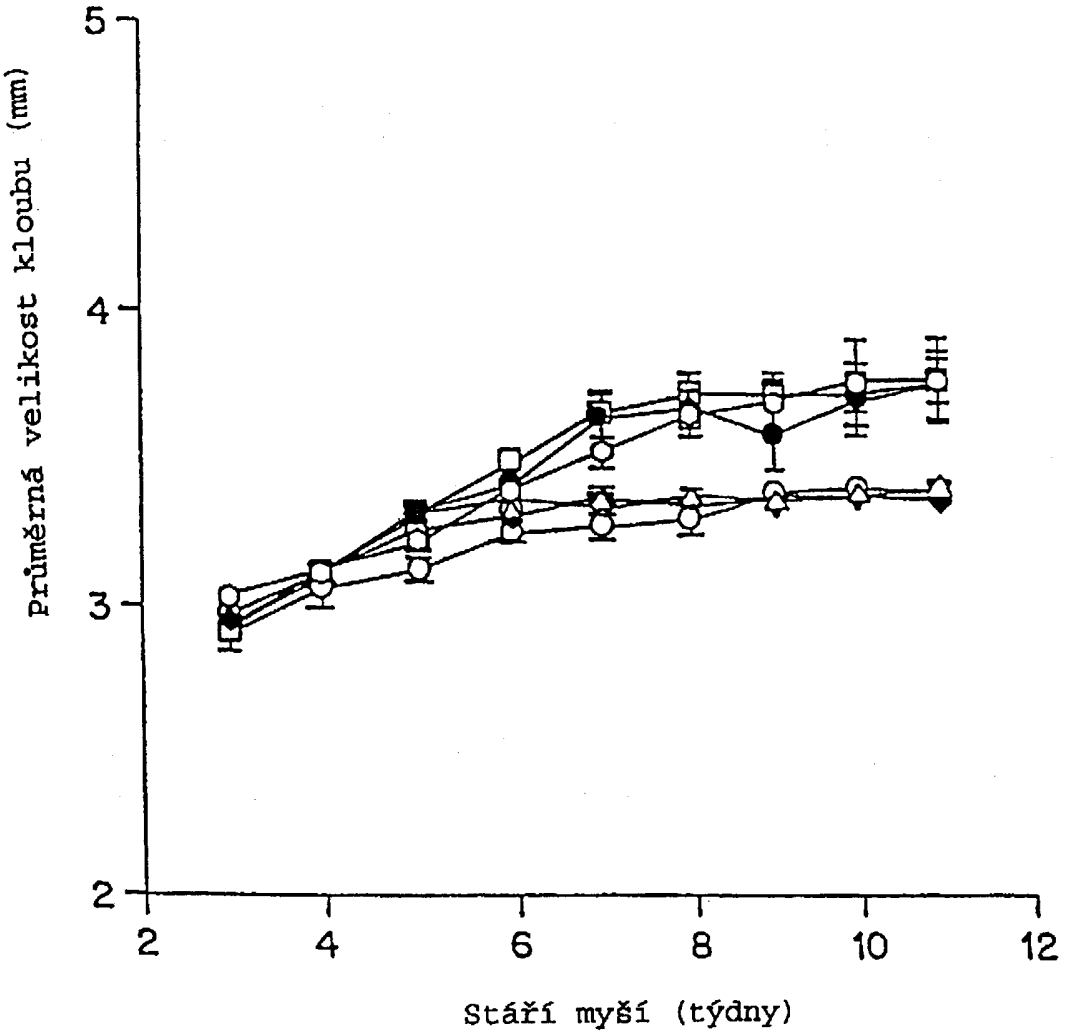
Obr. 7

D2E7 VH

```
GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCC GGC
 E   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   L   V   Q   P   G

AGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCG GCC TCT GGA TTC ACC TTT GAT
 R   S   L   R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   D

        CDR H1
GAT TAT GCC ATG CAC TGG GTC CGG CAA GCT CCA GGG AAG GGC CTG
 D   Y   A   M   H   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L

                                        CDR H2
GAA TGG GTC TCA GCT ATC ACT TGG AAT AGT GGT CAC ATA GAC TAT
 E   W   V   S   A   I   T   W   N   S   G   H   I   D   Y

GCG GAC TCT GTG GAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC
 A   D   S   V   E   G   R   F   T   I   S   R   D   N   A

AAG AAC TCC CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT CTG AGA GCT GAG GAT
 K   N   S   L   Y   L   Q   M   N   S   L   R   A   E   D

                                                CDR H3
ACG GCC GTA TAT TAC TGT GCG AAA GTC TCG TAC CTT AGC ACC GCG
 T   A   V   Y   Y   C   A   K   V   S   Y   L   S   T   A

TCC TCC CTT GAC TAT TGG GGC CAA GGT ACC CTG GTC ACC GTC TCG
 S   S   L   D   Y   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S

AGT
 S
```

Obr. 8

Obr. 9



Konec dokumentu