

(19) C2 (11) 81743 (13) UA

(98) ТОВ "А.Пригоф та Партнери", а/с 384, м. Київ, 01034

(85) 2003-03-07

(74) Портна Людмила Семенівна, (UA)

(45) [2008-02-11]

(43) [2003-06-16]

(24) 2008-02-11

(22) 2001-08-07

(12) Патент України (на 20 р.)

(21) 2003021152

(46) 2021-08-18

(86) 2001-08-07 PCT/US01/24785

(30) 60/223,360 2000-08-07 US 60/236,826 2000-09-29 US 09/920,137 2001-08-01 US

(54) МОНОКЛОНАЛЬНЕ АНТИТІЛО ЛЮДИНИ, ЩО СПЕЦИФІЧНО ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ З ФАКТОРОМ НЕКРОЗУ ПУХЛИН АЛЬФА (ФНП a), ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ, ЩО ЙОГО МІСТИТЬ, ТА СПОСІБ ЛІКУВАННЯ РЕВМАТ ОЇДНОГО АРТРИТУ МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО ЧЕЛОВЕКА, КОТОРОЕ СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЕТСЯ С ФАКТОРОМ НЕКРОЗ А ОПУХОЛЕЙ АЛЬФА (ФНПa), ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, КОТОРАЯ ЕГО СОДЕРЖИ Т, И СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY WHICH SPECIFICALLY BINDS TUMOR N ECROSIS FACTOR ALFA (TNFa), PHARMACEUTICAL MIXTURE CONTAINING THEREOF, AN D METHOD FOR TREATING ARTHRITIS

(56) WO A1 9729131, 14.08.1997. 2 US A 5654407, 05.08.1997. 2 Michael J. Mendez et al.:"Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice"/ NATURE GENETICS, vol. 15, no. 2, February 1997 (1997-02), page s 146-156, XP002067603. 3 WO A 9633735, 31.10.1996. 2 S. Stephens et al.:"Comprehensive pharmacokinetics of a humanized antibody a nd analysis of residual anti-idiotypic responses". IMMUNOLOGY, vol. 85, no. 4, August 1995 (1995-08), pages 668-674, XP000881488. 3 S. Siegel et al.:"The mouse/human chimeric monoclonal antibody cA2 neutralizes TNF in vitro and protects transgenic mice from ca chexia and TNF lethality in vivo". CYТОКИНЕ, vol. 7, no. 1, January 1995 (1995-01), pages 15-25, XP000990566. 3 E. Rankin et al.:" The therapeutic effects of an engineered human anti-tumour necrosis factor alpha antibody (CDP571) in rheumatoid arthritis". BRIT I SH JOURNAL OF RHEUMATOLOGY, vol. 34, no. 4, April 1995 (1995-04), pages 334-342, XP000674590. 3 WO A 9109967, 11.07.1991. 2 US A 5 698419, 16.12.1997. 2 EP A 0525570, 03.02.1993. 2

(71) US ЦЕНТОКОР, ІНК. US ЦЕНТОКОР, ІНК. US CENTOKOR, INC.

(72) US Гилес-Комар Джілл US Гилес-Комар Джілл US GILES-KOMAR JILL US Найт Девід М. US Найт Девид М. US Кніг ht David M. US Хевнер Джордж US Хэвнэр Джордж US HEAVNER GEORGE US Скеллон Бернард US Скеллон Бернард US Scall on Bernard US Шили Девід US Шили Девид US Shealy David

(73) US ЯНССЕН БІОТЕХ, ІНК.

Изобретение принадлежит к моноклональному антителу человека, которое специфически связывается с фактором некроза опухолей альфа (ФНП α), изолированной нуклеиновой кислоты, которая его кодирует, способа продуцирования, фармацевтической композиции, которая содержит антитело и способа лечения ревматоидного артрита с помощью указанной фармацевтической композиции.

Винахід належить до моноклонального антитіла людини, що специфічно зв'язується з фактором некрозу пухлин альфа (ФНП α), ізольованої нуклеїнової кислоти, що його кодує, способу продукування, фармацевтичної композиції, яка містить антитіло, та способу лікування ревматоїдного артриту за допомогою вказаної фармацевтичної композиції.

The invention relates to the human monoclonal antibody which specifically binds tumor necrosis factor alfa (TNF α), isolated nucleic acid coding it, a method for production, pharmaceutical mixture containing antibody, and a method for treating arthritis by means of mentioned pharmaceutical mixture.

1. Моноклональне антитіло людини, що специфічно зв'язується з фактором некрозу пухлин альфа (ФНП α) та містить варіабельний регіон, який включає варіабельний регіон важкого ланцюга з амінокислотною послідовністю SEQ ID

NO: 7 та варіабельний регіон легкого ланцюга з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 8.

2. Антитіло за пунктом 1, визначене як TNV148.

3. Ізольована нуклеїнова кислота, що кодує антитіло за пунктом 1.

4. Вектор ізольованої нуклеїнової кислоти, що містить ізольовану нуклеїнову кислоту за пунктом 3.

5. Прокаріотична або еукаріотична клітина хазяїна, що містить ізольовану нуклеїнову кислоту за пунктом 3.

6. Спосіб продукування антитіла за п. 1, який включає трансляцію нуклеїнової кислоти за пунктом 3 в умовах, що дозволяють експресію вказаного антитіла.

7. Фармацевтична композиція, яка містить антитіло за пунктом 1 та принаймні один фармацевтично прийнятний носій чи розчинник.

8. Спосіб лікування ревматоїдного артриту у людини чи тварини, що включає призначення композиції за пунктом 7 у кількості, ефективній для інгібування ФНП α у людин чи тварин.

9. Спосіб за пунктом 8, у якому вказана ефективна кількість становить 0,001-500 мг/кілограм.

10. Спосіб за пунктом 8, у якому вказане призначення є принаймні одним із способів призначення, вибраним з парентерального, підшкірного, внутрішньом'язового або внутрішнього.

Ця заявка частково ґрунтується, і має пріоритет за попередніми [заявками US 60/223,360 від 7 серпня 2000 року та US 60/236,826 від 29 вересня 2000 року], що включені тут за посиланнями.

Даний винахід відноситься до антитіл, включаючи специфічні частини та варіанти, які є специфічними, принаймні, за одним білком фактора некрозу пухлин альфа (ФНП) або його фрагментом, а також відноситься до нуклеїнових кислот, що кодують такі анти-ФНП антитіла, додаткових нуклеїнових кислот, векторів, клітин господаря та до способів виробництва і їхнього використання, включаючи терапевтичні препарати, призначення та пристрої.

ФНП альфа є розчинним гомотримером білкової субодиниці 17кДа [Smith et al., J. Biol. Chem. 262: 6951-6954 (1987)]. Також існує мембранно-зв'язуюча форма-попередник ФНП вагою 26кДа [Kriegler et al., Cell 53: 45-53 (1988)]. Для огляду по ФНП, [див. Beutler et al., Nature 320: 584 (1986); Old, Science 230:630 (1986); та Le et al., Lab. Invest. 56:234 (1987)].

Клітини, що не є моноцитами або макрофагами, також продукують ФНП альфа. Наприклад, людські немоноцитні пухлинні клітинні лінії продукують ФНП альфа [Rubin et al., J. Exp. Med. 164: 1350 (1986); Spriggs et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 6563 (1987)]. Т-лімфоцити CD4+ і CD8+ периферичної крові та деякі культивовані Т- і В-клітинні лінії [Cuturi et al., J. Exp. Med. 165: 1581 (1987); Sung et al., J. Exp. Med. 168: 1539 (1988); Turner et al., Eur. J. Immunol. 17: 1807-1814 (1987)] також продукують ФНП альфа.

ФНП альфа спричиняє прозапальні дії, які призводять до тканинних пошкоджень, таких як дегенерація хрящів та кісток [Saklatvala, Nature 322: 547-549 (1986); Bertolini, Nature 319: 516-518 (1986)], індукція молекул адгезії, включаючи прокоагулянтний вплив на судинні ендотеліальні клітини [Pober et al., J. Immunol. 136: 1680 (1986)], збільшення агрегації нейтрофілів та лімфоцитів [Pober et al., J. Immunol. 138: 3319 (1987)] та стимуляція вивільнення тромбоцитарного активуючого фактору з макрофагів, нейтрофілів та судинних ендотеліальних клітин [Camussi et al., J. Exp. Med. 166: 1390 (1987)].

Останні дані пов'язують ФНП альфа з інфекціями [Cerami et al., Immunol. Today 9: 28 (1988)], імунними розладами, неопластичними патологіями [Oliff et al., Cell 50:555 (1987)], аутоімунними патологіями та патологічними реакціями відторгнення трансплантату [Piguet et al., J. Exp. Med. 166: 1280 (1987)]. Взаємозв'язок ФНП альфа з раком та інфекційними патологіями є часто залежним від катаболічного стану господаря. Пацієнти з раком страждають на втрату ваги, що зазвичай поєднується з анорексією.

Екстенсивне виснаження, яке поєднується з раком та іншими захворюваннями відоме як "кахексія" [Kern et al., J. Parent. Enter. Nutr. 12: 286-298 (1988)]. Кахексія включає прогресуюче зменшення ваги, анорексію та стійке зменшення безжирової маси тіла у відповідь на ріст злоякісної пухлини. Кахектичний стан призводить до більшої ракової смертності та захворюваності. Існують дані, що ФНП альфа залучений у розвиток кахексії при раку, інфекційній патології та інших катаболічних станах [див., напр., Beutler and Cerami, Ann. Rev. Immunol. 7: 625-655 (1989)].

Вважається, що ФНП альфа відіграє центральну роль при грам-негативному сепсисі та ендотоксичному шоці [Michie et al., Br. J. Surg. 76: 670-671 (1989); Debets et al., Second Vienna Shock Forum, p. 463-466 (1989); Simpson et al., Crit. Care Clin. 5: 27-47 (1989)], включаючи лихоманку, слабкість, анорексію та кахексію. Ендотоксин потужно активує моноцитарну/макрофагальну продукцію та секрецію ФНП альфа та інших цитокінів [Kornbluth et al., J. Immunol. 137: 2585-2591 (1986)]. ФНП альфа та інші цитокіни моноцитарного походження опосередковують метаболічні та нейрогормональні відповіді на ендотоксин [Michie et al., New Engl. J. Med. 318: 1481-1486 (1988)]. Введення ендотоксину людям-добровольцям призводить до гострого захворювання з грипо-подібними симптомами, включаючи лихоманку, тахікардію, підвищений рівень метаболізму та вивільнення стресових гормонів [Revhaug et al., Arch. Surg. 123: 162-170 (1988)]. Циркулюючий ФНП альфа підвищений у пацієнтів з грам-негативним сепсисом [Waage et al., Lancet 1: 355-357 (1987); Hammerle et al., Second Vienna Shock Forum, p.715-718 (1989); Debets et al., Crit. Care Med. 17: 489-497 (1989); Calandra et al., J. Infect. Dis. 161: 982-987 (1990)].

Отже, ФНП альфа має значення при запальних захворюваннях, аутоімунних захворюваннях, вірусних, бактеріальних та паразитарних інфекціях, злоякісних та/або нейродегенеративних захворюваннях та є важливою мішенню для специфічної біологічної терапії при таких захворюваннях, як ревматоїдний артрит та хвороба Крона. Повідомлялося про позитивні впливи у відкритих дослідженнях з химеричними моноклональними антитілами до ФНП альфа (сА2) з пригніченням запалення та з вдалим повторним лікуванням після рецидиву ревматоїдного артриту [Elliott et al., Arthritis Rheum. 36: 1681-1690 (1993); та Elliott et al., Lancet 344: 1125-1127 (1994)] та при хворобі Крона [Van Dullemen et al., Gastroenterology 109: 129-135 (1995)]. Також повідомлялося про позитивні результати в рандомізованому, подвійному-сліпому, плацебо-контрольованому дослідженні з використанням сА2 при ревматоїдному артриті при пригніченні запалення [Elliott et al., Lancet 344: 1105-1110 (1994)]. Антитіла до "модуляторної" речовини, яка називається кахексії (пізніше була визначена як ідентична до ФНП) були запатентовані [Cerami et al. (ЕРО патента публікація 0212489, 4 березня, 1987)]. Такі антитіла були визначені як корисні при діагностичних імуноаналізах та при лікуванні шоку при бактеріальній інфекції. [Rubin et al. (ЕРО патентна публікація 0218868, 22 квітня, 1987)] виявили моноклональні антитіла до людського ФНП, гібридоми, що секретують такі антитіла, способи виробництва таких антитіл та використання таких антитіл при імуноаналізах ФНП. [Yone et al. (ЕРО патентна публікація 0288088, 26 жовтня, 1988)] виявили анти-ФНП антитіла, включаючи мАТ, та їхнє використання у імуноаналізах захворювань, зокрема хвороби Кавасакі та бактеріальної інфекції. Було встановлено, що рідини організму пацієнтів з хворобою Кавасакі (гострий фебрильний слизовошкірний лімфатичновузловий синдром немовлят; [Kawasaki, T., Allergy 16: 178 (1967); Kawasaki, T., Shonika (Pediatrics) 26: 935 (1985)]) містять підвищені рівні ФНП, які пов'язані з прогресуванням захворювання.

Інші дослідники описали мАТ специфічні для рекомбінантного людського ФНП, які мають нейтралізуючу дію in vitro [Liang, C-M. Et al. (Biochem. Biophys. Res. Comm. 137: 847-854 (1986); Meager, A. et al., Hybridoma 6: 305-311 (1987); Fendly et al., Hybridoma 6: 359-369 (1987); Bringman, T.S. et al., Hybridoma 6: 489-507 (1987); Hirai, M. et al., J. Immunol. Meth. 96: 57-62 (1987); Moller, A. et al. (Cytokine 2:162-169 (1990))]. Деякі ці мАТ використовувалися для картування епітопів людського ФНП та розробки імуноферментних аналізів [Friendly et

al., supra; Hirai et al., supra; Moller et al., supra] та для допомоги в очищенні рекомбінантного ФНП [Bringman et al., supra]. Однак, ці дослідження не надають підґрунтя для продукування антитіл, що нейтралізують ФНП, які можуть бути використані для діагностики *in vivo* або для терапевтичного використання у людей, внаслідок імунногеності, браку специфічності та/або фармацевтичної прийнятності.

Було показано, що у свавців нейтралізуюча антисыворотка або мАт до ФНП є відмінними від таких у людей, що не дає можливість запобігти фізіологічним змінам та смерті після введення летальної дози при експериментальній ендотоксемії та бактеремії. Цей ефект було показано, напр., у в аналізах смертності гризунів та у системах моделі патологій приматів [Mathison, J.C. et al., J. Clin. Invest. 81: 1925-1937 (1988); Beutler, B. et al., Science 229: 869-871 (1985); Tracey, K.J. et al., Nature 330: 662-664 (1987); Shimamoto, Y. et al., Immunol. Lett. 17: 311-318 (1988); Silva, A.T. et al., J. Infect. Dis. 162: 421-427 (1990); Opal, S.M. et al., J. Infect. Dis. 161: 1148-1152 (1990); Hinshaw, L.B. et al., Circ. Shock 30: 279-292 (1990)].

Можливі місця рецепторного зв'язування лФНП було виявлено [Eск та Sprang J. Biol. Chem. 264(29), 17595-17605 (1989)], які ідентифікували місця рецепторного зв'язування ФНП-а, в якості таких, що містять амінокислоти 11-13, 37-42, 49-57 та 155-157. [Заявка РСТ WO91/02078 (дата пріоритету 7 серпня, 1989)] описує ліганд ФНП, який може зв'язувати моноклональні антитіла, що мають такі епітопи: принаймні один з 1-20, 56-77 та 108-127; принаймні два з 1-20, 56-77, 108-127 та 138-149; всі з 1-18 та 108-128; всі з 56-79, 110-127 та 135- або 136-155; всі з 1-30, 117-128 та 141-153; всі з 1-26, 117-128 та 141-153; всі з 22-40, 49-96 або -97, 110-127 та 136-153; всі з 12-22, 36-45, 96-105 та 132-157; всі з 1-20 та 76-90; всі з 22-40, 69-97, 105-128 та 135-155; всі з 22-31 та 146-157; всі з 22-40 та 49-98; принаймні один з 22-40, 49-98 та 69-97, обидва з 22-40 та 70-87.

Нелюдські, від свавців, химеричні, поліклональні (напр., антисывороткові) та/або моноклональні антитіла (мАт) та фрагменти (напр., їхні продукти протеолітичного розщеплення або злиття білків) є потенційними терапевтичними агентами, що досліджувалися в деяких випадках для лікування певних захворювань. Однак, такі антитіла або фрагменти можуть викликати імунну відповідь при призначенні людям. Така імунна відповідь може призвести до імуннокомплексного-опосередкованого кліренса антитіл або фрагментів з кровообігу, та робить повторне введення неприйнятним при лікуванні, таким чином зменшуючи лікувальний позитивний вплив у пацієнта та обмежуючи повторне призначення антитіл або фрагментів. Наприклад, повторне призначення антитіл або фрагментів, що містять нелюдські частини, може призвести до сывороткової хвороби та/або анафілаксії. Для того, щоб уникнути цих та інших проблем, було застосовано декілька підходів для зменшення імунногеності таких антитіл та їхніх частин, включаючи химеризацію та гуманізацію, як це добре відомо у даній галузі. Ці та інші підходи, однак, все ще призводять до певної імунногеності антитіл або фрагментів, низької афіності, низької спорідненості або до проблем з клітинною культурою, зростанням, продукцією та/або низьким виходом. Отже, такі антитіла або фрагменти можуть бути менш, ніж ідеальними для виробництва чи використання в якості лікувальних протеїнів.

Відповідно, є потреба у розробці анти-ФНП антитіл або фрагментів, що можуть подолати одну з цих проблем, а також у покращенні щодо відомих антитіл або їхніх фрагментів.

Даний винахід описує ізольовані отримані у людей, приматів, гризунів, свавців химеричні, гуманізовані та/або ДВР-трансплантовані анти-ФНП антитіла, імунноглобуліни, продукти розщеплення та інші їхні специфічні частини і варіанти, а також препарати анти-ФНП антитіл, кодуєчі або додаткові нуклеїнові кислоти, вектори, клітини господаря, препарати, формулювання, пристрої, трансгенні тварини, трансгенні рослини та способи їхнього виробництва і використання, як це описано і уможливлено тут, в комбінації з тим, що відомо в даній галузі.

В даному винаході також представлено принаймні одне ізольоване анти-ФНП антитіло, як тут описано. До антитіл, згідно даного винаходу, належать будь-які білки або пептид-вміщуючі молекули, що складаються принаймні з частини імунноглобулінової молекули, такої як, але не обмежуючись, принаймні один допоміжний визначальний регіон (ДВР) важких або легких ланцюгів або їхня ліганд-зв'язуюча частина, важко- або легколанцюговий варіабельний регіон, важко- або легколанцюговий постійний регіон, каркасний регіон, або будь-яка їхня частина, що можуть бути включені до складу антитіла в даному винаході. Антитіло винаходу може включати або походити від будь-якого свавця, такого як, але не обмежуючись, людина, миша, кріль, шур, гризун, примат або будь-яка їхня комбінація, і таке подібне.

Даний винахід описує в одному аспекті молекули ізольованих нуклеїнових кислот, що складають шляхом сполучення або гібридування полінуклеотиди, котрі кодуєчі специфічні анти-ФНП антитіла, які складаються принаймні з однієї специфічної їхньої послідовності, домена, частини або варіанта. Даний винахід окрім того описує рекомбінантні вектори, що містять вищезгадані молекули нуклеїнових кислот анти-ФНП антитіл, клітини господаря, що містять такі нуклеїнові кислоти та/або рекомбінантні вектори, а також способи виробництва та/або використання таких нуклеїнових кислот антитіл, векторів та/або клітин господаря.

Принаймні одне антитіло винаходу зв'язується з принаймні одним визначеним епітопом специфічним до принаймні одного ФНП білка, субодиниці, фрагмента, частини або будь-якої їхньої комбінації. Принаймні один епітоп може містити принаймні один регіон, що зв'язує антитіло, котрий складається з принаймні однієї частини вищезгаданого білка, епітоп якого переважно складається з принаймні 1-5 амінокислот принаймні однієї такої частини, такої як, але не обмежуючись, принаймні один функціональний, позаклітинний, розчинний, гідрофільний, зовнішній або цитоплазматичний домен вищезгаданого білка або будь-якої їхня частина.

Принаймні одне антитіло може додатково складатися з принаймні однієї певної частини принаймні одного допоміжного визначального регіону (ДВР) (напр., ДВР1, ДВР2 або ДВР3 важко- або легколанцюгового варіабельного регіону) та/або принаймні одного постійного або варіабельного каркасного регіону або будь-якої їхньої частини. Принаймні одна амінокислотна послідовність антитіла може окрім того містити додатково принаймні одну певну заміну, вставку або вилучення, як це описано тут або як це відомо в даній галузі.

Даний винахід також описує принаймні одне ізольоване анти-ФНП антитіло, як це описано, де антитіло має принаймні одну дію, таку як, але не обмежуючись, пригнічення ФНП-індукованої молекул клітинної адгезії,

пригнічення зв'язування ФНП з рецептором, покращення артритичного балу у мишинній моделі (див., напр., Приклади 3-7). Анти-ФНП антитіло може таким чином бути перевірене на відповідну дію згідно з відомими методами такими як, але не обмежуючись, принаймні одна біологічна дія щодо білка ФНП.

Даний винахід окрім того описує принаймні одне ФНП анти-ідіотипне антитіло до принаймні одного ФНП антитіла даного винаходу. Анти-ідіотипне антитіло включає будь-які білки або пептид-вміщуючі молекули, що складаються з принаймні частини імунноглобулінової молекули, такої як, але не обмежуючись, принаймні один допоміжний визначальний регіон (ДВР) важкого або легкого ланцюга або їхньої ліганд-зв'язуючої частини, важколанцюгового або легколанцюгового варіабельного регіону, важколанцюгового або легколанцюгового постійного регіону, каркасного регіону або будь-якої їхньої частини, що можуть бути включені до антитіла даного винаходу. Антитіло винаходу може включати або походити від ссавців таких як, але не обмежуючись, людина, миша, кірпі, щури, гризуни, примати та інші.

Даний винахід описує в одному аспекті молекули ізольованих нуклеїнових кислот, що складають шляхом сполучення або гібридизування полінуклеотиди, котрі кодують принаймні одне анти-ФНП анти-ідіотипне антитіло, які складаються принаймні з однієї специфічної їхньої послідовності, домена, частини або варіанта. Даний винахід окрім того описує рекомбінантні вектори, що містять вищезгадані молекули нуклеїнових кислот анти-ідіотипного антитіла до ФНП, клітини господаря, що містять такі нуклеїнові кислоти та/або рекомбінантні вектори, а також способи виробництва та/або використання таких нуклеїнових кислот антитіл, векторів та/або клітин господаря.

Даний винахід також описує принаймні один спосіб експресії принаймні одного анти-ФНП антитіла або анти-ідіотипного антитіла до ФНП в клітині господаря, що складається з культивування клітин господаря, як описано тут, за умов коли принаймні одне анти-ФНП антитіло виділяється у кількостях, що можна визначити та/або відновити.

Даний винахід також описує принаймні одну композицію, що складається з (а) нуклеїнових кислот, що кодують ізольоване анти-ФНП антитіло, та/або антитіла, що описується тут; та (б) належного носія або розчинника. Носій або розчинник може додатково бути фармацевтично прийнятним згідно з відомими носіями або розчинниками. Композиція може окрім того складатися з принаймні одного додаткового компонента, білка або суміші.

Даний винахід окрім того описує принаймні методику або склад одного анти-ФНП антитіла для введення терапевтично ефективної кількості для модуляції або лікування принаймні одного стану, залежного принаймні від ФНП, у клітинах, тканинах, органах, тваринах або пацієнтах та/або до, після або під час відповідного стану, як це відомо в даній галузі та/або описано тут.

Даний винахід також описує принаймні одну композицію, пристрій та/або спосіб доставки терапевтично або профілактично ефективної кількості принаймні одного анти-ФНП антитіла, згідно з даним винаходом.

Даний винахід окрім того описує спосіб або склад принаймні одного анти-ФНП антитіла для діагностики принаймні одного стану в клітині, тканині, органі, тварині або пацієнтах, залежного від ФНП, та/або до, після або під час залежного стану, що відомі в даній галузі та/або описується тут.

Даний винахід окрім того описує принаймні одну композицію, пристрій та/або спосіб введення для діагностики принаймні одного анти-ФНП антитіла, згідно з даним винаходом.

Опис креслень

На Фіг.1 показано графічне зображення, де продемонстровано аналіз здатності мАТ ФНП у верхньому шарі центрифугата клітин гібридами щодо пригнічення зв'язування ФНПУ з рекомбінантним рецептором до ФНП. Різноманітні кількості верхнього шару центрифугату клітин гібридами, що містять відомі кількості мАТ TNV були преінкубовані з фіксованими концентраціями (5нг/мл) ¹²⁵I-міченого ФНПУ. Суміш було перенесено до 96-луноквих пластин Optiplates, які були попередньо покриті р55-sf2, рекомбінантний рецептор до ФНП/зливний протеїн IgG. Кількість ФНПУ, що зв'язується з рецептором р55 за присутності мАТ, визначалася після відмивання нез'язаного матеріала та підрахунку з використанням гамма-лічильника. Хоча в цих експериментах було перевірено вісім зразків мАТ до TNV, для спрощення три мАТ, які як було показано за допомогою аналізу послідовності ДНК, є ідентичними до одного з інших мАТ до TNV (див. Розділ 5.2.2), не показані тут. Кожний зразок досліджувався двічі. Представлені результати є відображенням двох незалежних експериментів.

На Фіг.2 показано послідовності ДНК важколанцюгових варіабельних регіонів мАТ до TNV. Бактеріальний ген показаний тут є геном DP-46. "TNVs" вказує, що показана послідовність є послідовністю TNV14, TNV15, TNV148 та TNV196. Перші три нуклеотиди послідовності TNV визначають ініціацію трансляції кодона Met. Крапки на послідовності гена мАТ до TNV вказують, що нуклеотид є таким самим, як і в бактеріальній послідовності. Перші 19 нуклеотидів (підкреслено) послідовності TNV відповідають олігонуклеотиду, що використовується для PCR-послиення варіабельного регіону. Амінокислотна трансляція (однобуквенні скорочення) розпочинається з материнського мАТ, що показано тільки для бактеріального гена. Три домени ДВР у бактеріальній амінокислотній трансляції помічені жирним шрифтом та підкресленням. Лінії позначені TNV148(B) вказують, що показана послідовність належить як до TNV148, так і до TNV148B. Проміжки у послідовності бактеріальної ДНК (ДВР3) є наслідком відсутності даних або відсутності наявності у бактеріальному гені. Важкі ланцюги мАТ до TNV використовують об'єднувальний регіон 16.

На Фіг.3 показано послідовності ДНК легколанцюгового варіабельного регіону мАТ до TNV. Представлений бактеріальний ген є репрезентативним представником родини Vg/38K людських каппа генів бактеріального варіабельного регіону. Крапки на послідовності гена мАТ до TNV вказують, що нуклеотид є таким самим як і в бактеріальній послідовності. Перші 16 нуклеотидів (підкреслено) послідовності TNV відповідають олігонуклеотиду, що використовується для PCR-посилення варіабельного регіону. Амінокислотна трансляція материнського мАТ (однобуквенне скорочення) показана тільки для бактеріального гена. Три домени ДВР у бактеріальній амінокислотній трансляції помічені жирним шрифтом та підкресленням. Лінії позначені TNV148(B) вказують, що показана послідовність належить як до TNV148, так і до TNV148B. Проміжки у послідовності бактеріальної ДНК (ДВР3) є наслідком відсутності даних або відсутності наявності у

бактеріальному гені. Легкі ланцюги мАт до TNV використовують об'єднувальний регіон 13.

На Фіг.4 показано виведені амінокислотні послідовності важколанцюгових варіабельних регіонів мАт до TNV. Показані амінокислотні послідовності (однобуквенні скорочення) були виведені з послідовності ДНК, що визначена як з неклонованих продуктів PCR, так і клонованих продуктів PCR. Показані амінокислотні послідовності розділені на домени секреторної сигнальної послідовності (сигнал), каркасного (К) та допоміжного визначального регіону (ДВР). Амінокислотна послідовність для бактеріального гена DP-46 показана зверху лінії для кожного домена. Точки показують, що амінокислоти мАт до TNV є ідентичними для бактеріального гена. TNV148(B) указує, що показана послідовність належить як до TNV148, так і до TNV148B. "TNVs" указує, що показана послідовність належить до всіх мАт до TNV, якщо тільки не показано іншу послідовність. Переривчаста лінія бактеріальної послідовності (ДВР3) вказує, що послідовності невідомі або не існують у бактеріальному гені.

На Фіг.5 показано виведені амінокислотні послідовності легколанцюгового варіабельного регіону мАт TNV. Показані амінокислотні послідовності (однобуквенні скорочення) були виведені з послідовності ДНК, що визначена як з неклонованих продуктів PCR, так і клонованих продуктів PCR. Показані амінокислотні послідовності розділені на домени секреторної сигнальної послідовності (сигнал), каркасного (К) та допоміжного визначального регіону (ДВР). Амінокислотна послідовність для бактеріального гена DP-46 показана зверху лінії для кожного домена. Точки показують, що амінокислоти мАт до TNV є ідентичними для бактеріального гена. TNV148(B) указує, що показана послідовність належить як до TNV148, так і до TNV148B. "All" означає, що показана послідовність належить до TNV14, TNV15, TNV148, TNV148B та TNV186.

На Фіг.6 показано схематичні ілюстрації плазмід експресії важких та легких ланцюгів, що використовуються для виробництва rTNV148B-експресуючих клітин С466. p1783 є важколанцюговою плазмідною, а p1776 - легколанцюговою плазмідною. Кодуючі домени варіабельного та постійного регіону rTNV148B показані у вигляді чорних квадратів. Імунноглобулінові полпшувачі в інтронах J-C показані сірими квадратами. Показані значущі обмежувальні сайти. Плазміді показані у такій орієнтації, що транскрипція генів Ат відбувається за годинниковою стрілкою. Плазміда p1783 є довжиною 19,53 kb, а плазміда p1776 є довжиною 15,06 kb. Відомі повні нуклеотидні послідовності обох плазмід. Кодуюча послідовність варіабельного регіону p1783 може бути легко замінена іншою послідовністю важколанцюгового варіабельного регіону за допомогою заміни обмежуючого фрагменту BsiWI/BstWI. Кодуюча послідовність варіабельного регіону у p1776 може бути замінена іншою послідовністю варіабельного регіону за допомогою заміни обмежуючого фрагменту Sall/AflII.

На Фіг.7 показано графічне зображення аналізу кривих росту п'яти клітинних ліній, що продукують rTNV148B. Культури започатковувалися на день 0 за допомогою висівання клітин у колби Т75 в середовище I5Q+МНХ для створення густини життєздатних клітин $1,0 \times 10^5$ клітин/мл у об'ємі 30мл. Клітинні культури, що використовувалися в цих дослідженнях перебували у безперервній культурі з моменту виконання трансфекції та субклонування. У подальші дні, клітини з колб Т були ретельно ресуспендовані та було відібрано кількість культури, що кратна 0,3мл. Дослідження кривих росту були припинені, коли кількість клітин зменшилася менше $1,5 \times 10^5$ клітин/мл. Кількість живих клітин у зразку визначалася за допомогою виключення типаном синім, а решта зберігалася для пізнішого визначення концентрації мАт. Для людського IgG було виконано аналіз ELISA у всіх збірках у одномоментно.

На Фіг.8 показано графічне зображення порівняння швидкостей росту клітин за наявності різноманітних концентрацій МНХ селекції. Клітинні субклони С466А та С466В було розморожено у середовищі без МНХ (IMDM, 5% FBS, 2mM глютаміна) та культивовані протягом двох додаткових днів. Обидві клітинні культури були розподілені на три культури, що не містять МНХ, або містять 0,2X МНХ або 1X МНХ. Через один день, у свіжі колби Т75 було посіяно культури з початковою густиною 1×10^5 клітин/мл і клітини підраховувалися з 24 годинним інтервалом протягом одного тижня. Подвоєний час протягом перших 5 діб підраховувався з використанням формули у SOP PD32.025 і це показано над стовпчиками.

На Фіг.9 показано графічне відображення стабільності іпродукції мАт протягом часу від двох клітинних ліній, що продукують rTNV148B. Клітинні субклони, які перебували у безперервній культурі з моменту виконання трансфекції та субклонування, використовувалися для початку довготривалих серійних культур у 24-лункових культуральних чашах. Клітини культивувалися у середовищі I5Q з та без МНХ селекції. Клітини були поступово пересаджені за допомогою розділення культур кожні 4-6 днів для підтримання нових життєздатних культур, тоді як попереднім культурам було дозволено послаблюватися. Взірці поверхневого шару центрифугату послаблених клітин були отримані відразу по послабленні культур та збережені до моменту визначення концентрації мАт. Для людського IgG було виконано аналіз ELISA у всіх збірках у одномоментно.

На Фіг.10 показані зміни ваги у мишиній моделі артриту миші Tg 197 у відповідь на анти-ФНП антитіла даного винаходу у порівнянні з контролем у Прикладі 4. Приблизно на 4-му тижні життя досліджувані миші Tg197 були розподілені, залежно від статі та ваги тіла, в одну з 9 груп лікування та їм було введено за допомогою одноразового інтраперитонеального болюса Dulbecco's PBS (D-PBS) або анти-ФНП антитіло даного винаходу (TNV14, TNV148 або TNV196) у дозі 1мг/кг або 10мг/кг. Коли вага була проаналізована як зміна від моменту до введення дози, у тварин, яким було введено 10мг/кг сА2, спостерігали достовірно більший набір ваги, ніж у D-PBS-пролікованих тварин протягом дослідження. Цей набір ваги був значним на тижні 3-7. Тварини проліковані 10мг/кг TNV148 також досягли значного набору ваги на 7-му тижні дослідження.

На Фіг.11А-С показано прогресування важкості захворювання ґрунтуючись на артритичному індексі, як представлено у Прикладі 4. Артритичний індекс (AI) групи, де вводилося 10мг/кг сА2, був меншим, аніж у контрольній групі D-PBS починаючи з тижня 3 та продовжував залишатися таким протягом решти часу дослідження (тиждень 7). Тварини проліковані 1мг/кг TNV14 та тварини проліковані 1мг/кг сА2 не показали значущого зменшення AI після тижня 3 при порівнянні з групою лікування D-PBS. Не було значущих відмінностей між групами лікування 10мг/кг, при порівнянні один з одним у однакових дозах (10мг/кг сА2 у порівнянні з 10мг/кг TNV14,148 та 196). Коли порівнювалися групи лікування 1мг/кг, в групі 1мг/кг TNV148

спостерігалось значно менший AI, ніж при 1мг/кг сА2 на тижнях 3, 4 та 7. У групі 1мг/кг TNV148 було також достовірно менший AI, ніж у групі, що лікувалася 1мг/кг TNV14 на тижнях 3 і 4. Хоча TNV196 показав значне зменшення AI аж до тижня 6 дослідження (при порівнянні з групою лікування D-PBS), TNV148 було єдиним лікуванням у дозі 1мг/кг, що залишалось значущим при завершенні дослідження.

На Фіг.12 показано зміни ваги мишинної моделі артрита миші Tg 197 у відповідь на анти-ФНП антитіла даного винаходу при порівнянні з контролем у Прикладі 5. Приблизно на 4-му тижні життя досліджуванні миші Tg 197 були розподілені, базуючись на: статті та вазі тіла, в одну з 8 груп лікування та їм вводився інтраперитонеальний болюс контрольної речовини (D-PBS) або антитіла (TNV14, TNV148) у дозі 3мг/кг (тиждень 0). Ін'єкції було повторено у всіх тварин на тижнях 1, 2, 3 та 4. Групи 1-6 оцінювалися щодо ефективності досліджуваного препарату. Сивороткові взірці, отримані від тварин у групах 7 та 8 оцінювалися щодо індукції імунної відповіді та фармакокінетичного кліренса TNV14 або TNV148 на тижнях 2, 3 та 4.

Графіки на Фіг.13A-C відображають прогресування тяжкості захворювання в Прикладі 5 з артритичного індекса. Артритичний індекс групи, що лікувалася 10мг/кг сА2, був достовірно меншим, ніж у контрольній групі D-PBS, починаючи з тижня 2 та залишаючись таким протягом решти періода дослідження (тиждень 5). Тварини, яким вводилося 1мг/кг або 3мг/кг сА2, та тварини, яким вводилося 3мг/кг TNV14 не досягли якогось-небудь значущого зменшення AI у будь-який період часу протягом дослідження у порівнянні з контрольною групою d-PBS. У тварин, яким вводилося 3мг/кг TNV148, спостерігалось значне зменшення у порівнянні з групою, що лікувалася d-PBS, починаючи з тижня 3 і триваючи до тижня 5. У тварин, яким вводилося 10мг/кг сА2, спостерігалось значне зменшення AI при порівнянні з меншими дозами (1мг/кг та 3мг/кг) сА2 на тижнях 4 і 5 дослідження і він також був достовірно меншим, аніж у тих тварин, що лікувалися TNV14 на тижнях 3-5. Хоча між будь-якими групами лікування дозою 3мг/кг не спостерігалось достовірних відмінностей, AI для тварин, яким вводилося 3мг/кг TNV14, був достовірно вищим у деякі часові проміжки, ніж при 10мг/кг, тоді як у тварин, яким вводилося TNV148, не було суттєвих відмінностей від тварин, яким вводилося 10мг/кг сА2.

На Фіг.14 показано зміни ваги у мишинній моделі артриту мишей Tg 197 у відповідь на анти-ФНП антитіла даного винаходу у порівнянні з контролем у Прикладі 6. Приблизно на 4-му тижні життя досліджуванні миші Tg 197 були розподілені, базуючись на статті та вазі тіла, в одну з 6 груп лікування та їм вводився інтраперитонеальний болюс антитіла (сА2 або TNV148) в дозах 3мг/кг або 5мг/кг. В цьому дослідженні використовувалися D-PBS та 10мг/кг сА2 у контрольних групах.

На Фіг.15 відображено прогресування важкості захворювання, ґрунтуючись на артритичному індексі, як це представлено у Прикладі 6. У всіх групах лікування спостерігався певний рівень захисту у ранні строки при застосуванні 5мг/кг сА2 та 5мг/кг TNV148, що було продемонстровано достовірним зменшенням AI на тижнях 1-3 та достовірним зменшенням на тижні 2 у всіх групах лікування. Пізніше у дослідженні у тварин, які вводили 5мг/кг сА2, спостерігався певний рівень захисту, з достовірним зменшенням на тижнях 4, 6 та 7. Низькі дози (3мг/кг) як сА2, так і TNV148, показали достовірне зменшення на 6-му і у всіх групах лікування на 7-му тижні. У жодній з груп лікування не підтримувалося достовірне зменшення наприкінці дослідження (тиждень 8). Не було достовірних відмінностей між будь-якими групами лікування (за винятком контрольної групи з введенням сольового розчину) у будь-який часовий проміжок.

На Фіг.16 показано зміни ваги у мишинній моделі артриту мишей Tg 197 у відповідь на анти-ФНП антитіла даного винаходу у порівнянні з контролем у Прикладі 7. Для порівняння ефективності одноразового інтраперитонеального введення TNV148 (отриманого з клітин гібридами) та rTNV148B (отриманого з трансфікованих клітин). Приблизно на 4-му тижні життя досліджуванні миші Tg197 були розподілені, базуючись на статті та вазі тіла, в одну з 9 груп лікування та їм вводився одноразовий болюс Dulbecco's PBS (D-PBS) або антитіла (TNV148, rTNV148B) у дозі 1мг/кг.

На Фіг.17 відображено прогресування важкості захворювання базуючись на артритичному індексі, як це представлено у Прикладі 7. У групі лікування 10мг/кг сА2 артритичний індекс був меншим, ніж у контрольній групі D-PBS, починаючи з тижня 4 та утримуючись протягом решти періоду дослідження (тиждень 8). В обох групах лікування TNV148 і 1мг/кг сА2 було показано достовірне зменшення AI на тижні 4. Хоча попереднє дослідження (P-099-017) продемонструвало, що TNV148 був дещо ефективнішим при зменшенні Артритичного Індексу після одноразового інтраперитонеального болюса 1мг/кг, це дослідження показало, що AI в обох групах лікування різними версіями TNV був дещо більшим. Хоча (за винятком тижня 6) в групі лікування 1мг/кг сА2 не було достовірного підвищення при порівнянні з групою 10мг/кг сА2 та групою лікування TNV148 були достовірно вищими на тижнях 7 та 8, не спостерігалось суттєвих відмінностей у AI між групами 1мг/кг сА2, 1мг/кг TNV148 та 1мг/кг TNV148B у будь-який часовий проміжок дослідження.

Даний винахід описує ізольовані, рекомбінантні та/або синтетичні отримані у людей, приматів, гризунів, ссавців химеричні, гуманізовані та/або ДВР-трансплантовані анти-ФНП антитіла та їхні ФНП анти-ідіотипні антитіла, а також препарати та молекули кодуєчих нуклеїнових кислот, що складаються з принаймні одного полінуклеотида, який кодує принаймні одне анти-ФНП антитіло або анти-ідіотипне антитіло. Даний винахід окрім того включає, але не обмежується, способи виробництва та використання таких нуклеїнових кислот та антитіл і анти-ідіотипних антитіл, включаючи діагностичні та терапевтичні композиції, способи та пристрої.

Терміни "анти-фактор некрозу пухлини альфа антитіло", "анти-ФНП антитіло"/"частина анти-ФНП антитіла" або "фрагмент анти-ФНП антитіла" та/або "варіант анти-ФНП антитіла" тощо, які тут використовуються, включають будь-який протеїн чи пептид, що містять молекулу, яка складається з принаймні частини імунноглобулінової молекули, такої як, але не обмежуючись, принаймні складається принаймні з частини імунноглобулінової молекули, таких як, але не тільки, принаймні один допоміжний визначальний регіон (ДВР) важкого або легкого ланцюга або їх ліганд-зв'язуючу частину, варіабельний регіон важкого ланцюга або легкого ланцюга, постійний регіон важкого ланцюга або легкого ланцюга, каркасний регіон або будь-яку їх частину, або принаймні одну частину рецептора ФНП або зв'язуючого протеїна, які можуть бути включені в антитіло даного винаходу. Такі антитіла можуть також окрім того додатково впливати на специфічні ліганди, такі як, але не обмежуючись, де антитіла модулюють, зменшують, збільшують, антагонізують, агонізують, послаблюють, блокують, пригнічують та/або взаємодіють принаймні з однією дією чи зв'язуванням

ФНП або з дією чи зв'язуванням рецептора ФНП, *in vitro*, *in situ* та/або *in vivo*. В якості необмежувачого прикладу, відповідне анти-ФНП антитіло, певна частина або варіант даного винаходу можуть зв'язувати принаймні один ФНП або його певну частину, варіант або домен. Відповідне анти-ФНП, певна частина або варіант можуть також додатково впливати принаймні на одну дію або функцію ФНП, такі як, але не обмежуючись, синтез РНК, ДНК або протеїнів, вивільнення ФНП, передача інформації рецептором ФНП, розщеплення мембранного ФНП, дія ФНП, продукція та/або синтез ФНП. Термін "антитіло" окрім того вживається щодо антитіл, їх фрагментів травлення, певних частин та варіантів, включаючи міметики антитіл або складові частини антитіл, що нагадують структуру та/або функцію антитіла або його певного фрагмента чи частини, включаючи одно-ланцюгові антитіла та їх фрагменти. Функціональні фрагменти включають антиген-зв'язуючі фрагменти, що зв'язують ФНП ссавців. Наприклад, фрагменти антитіл, що спроможні зв'язуватись з ФНП або його частиною, включаючи, але не обмежуючись, Fab (напр., при папаїновому травленні), Fab' (напр., при пепсиновому травленні та частковій редукції) і F(ab')₂ (напр., при пепсиновому травленні), fabc (напр., при плазміновому травленні), pFc' (напр., при пепсиновому або плазміновому травленні), Fd (напр., при пепсиновому травленні, частковій редукції та агрегації), Fv або scFv (напр., методики молекулярної біології) фрагменти, описуються винаходом (див. напр., Colligan, Immunology, вище).

Такі фрагменти можуть бути вироблені при ензиматичному розщепленні або за допомогою рекомбінантних методик, що відомі в даній галузі та/або описуються тут. Антитіла також можуть бути вироблені в різноманітних обмежених формах, з використанням генів антитіл, у котрих один або більше зупиняючих кодонів були вставлені до природнього зупиняючого локуса. Наприклад, комбінація гена кодуєчого частину важкого ланцюга F(ab')₂ може бути розроблена з включенням ДНК послідовності, що кодує домен C_H1 та/або поворотний регіон важкого ланцюга. Різноманітні частини антитіл можуть сполучатися хімічно за допомогою традиційних методик або можуть готуватися в якості прилеглого протеїна з використанням методик генетичної інженерії.

Термін "людське антитіло", що використовується тут, відноситься до антитіла, в якому в значному ступені кожна частина протеїна (напр., ДВР, каркасний, C_L, C_H домен (напр., C_H1, C_H2, C_H3), поворот (V_L, V_H)) є переважно неімуногенними у людей, з тільки незначними змінами або варіаціями послідовності. Так само, антитіла визначені як такі, що отримані від приматів (мави, бабуїни, шимпанзе тощо), гризунів (миші, щури, кролі, гвінейські свинки, хом'ячки тощо) та від інших ссавців означають антитіла, що специфічні для таких видів, підвидів, підродин, родин. Окрім того, химеричні антитіла включають будь-яку комбінацію вищеописаного. Такі зміни або варіації додатково і переважно зберігають або зменшують імуногенність щодо немодифікованих антитіл у людей або інших видів. Отже, людські антитіла відрізняються від химеричних або гуманізованих антитіл. Наголошується, що людські антитіла можуть продукуватися тваринами або прокаріотичними чи еукаріотичними клітинами, що спроможні експресувати функціонально змінений ген людського імуноглобулін (напр., важкий ланцюг та/або легкий ланцюг). Окрім того, коли людське антитіло є одно-ланцюговим антитілом, воно може включати зв'язуючий пептид, що не виявляється у нативних людських антитілах. Наприклад, Fv може включати зв'язуючий пептид, такий як від 2 до приблизно 8 гліцинових або інших амінокислотних залишків, який з'єднує варіабельний регіон важкого ланцюга і варіабельний регіон легкого ланцюга. Такий зв'язуючий пептид вважається людського походження.

Біспецифічні, гетероспецифічні, гетерокон'югантні або однакові антитіла також можуть використовуватися, якщо вони є моноклональними, переважно людськими або гуманізованими антитілами, що мають зв'язуючі характеристики для принаймні двох різних антигенів. В даному випадку, одна зі зв'язувальних особливостей стосується принаймні одного протеїна ФНП, а інша - будь-якого іншого антигена. Способи виробництва біспецифічних антитіл відомі в даній галузі. Традиційно, рекомбінантна продукція біспецифічних антитіл ґрунтувалася на ко-експресії двох імуноглобулінових важколанцюгових-легколанцюгових пар, де два важкі ланцюги мають різні особливості [Milstein and Cuello, Nature 305: 537 (1983)]. Через випадковий розподіл імуноглобулінових важких і легких ланцюгів, ці гібридами (квадроми) продукували потенційну суміш 10 різних молекул антитіл, серед яких тільки одна мала правильну біспецифічну структуру. Очищення правильної молекули, яке зазвичай проводиться за допомогою хроматографічних етапів афіності, є досить складним, і рівень виходу продукту низький. Такі процедури описані, [напр., в WO 93/08829, Патенти США №№6210668, 6193967, 6106833, 6060285, 6037453, 6010902, 5989530, 5959084, 5959083, 5932448, 5833985, 5821333, 5807706, 5643759, 5601819, 5582996, 5496549, 4676980, WO 91/00360, WO 92/00373, EP 03089, Traunecker et al., EMBO J. 10: 3655 (1991), Suresh et al., Methods in Enzymology 121: 210 (1986)], кожний з них тут повністю включено у посиланнях.

Анти-ФНП антитіла (також називаються ФНП антитілами) використані в методиках та препаратах даного винаходу можуть також додатково характеризуватися високою афіністю зв'язування з ФНП та додатково чи переважно мати низьку токсичність. Зокрема, антитіло, певний фрагмент або варіант винаходу, де індивідуальні компоненти, такі як варіабельний регіон, постійний регіон та каркас, індивідуально та/або у поєднанні, додатково та переважно мають низьку імуногенність, використовуються в даному винаході. Антитіла, що можуть бути використані у винаході додатково характеризуються їхньою здатністю виликовувати пацієнтів на тривалий період з вимірюваним полегшенням симптоматики і низькою та/або прийнятною токсичністю. Низька або прийнятна імуногенність та/або висока афіність, а також інші відповідні властивості, можуть робити свій внесок у досягнення терапевтичного результату. "Низька імуногенність" тут визначається як зростаючі достовірні НАНА, НАСА або НАМА відповіді у менш, ніж 75%, або бажано менше, ніж 50% пацієнтів, що лікуються, та/або зростаючі низькі титри у лікованих пацієнтів (менше, ніж приблизно 300, бажано менше, ніж приблизно 100, що вимірюється за допомогою імуноферментного аналізу на подвійний антиген) ([Elliott et al, Lancet 344: 1125-1127 (1994)], цілком включено тут у посилання).

Використання

Ізольовані нуклеїнові кислоти даного винаходу можуть використовуватися для виробництва принаймні одного анти-ФНП антитіла або його певних варіантів, які можуть використовуватися для вимірювання або впливу у клітинах, тканинах, органах або тваринах (включаючи ссавців і людей) для діагностики,

моніторингування, модулювання, лікування, полегшення, для допомоги у попередженні виникнення або зменшення симптоматики принаймні одного стану, залежного від ФНП, обраного з, але не обмежуючись, принаймні одного імунного порушення або захворювання, серцево-судинного розладу або захворювання, інфекційного, злякисного та/або неврологічного розладу або захворювання.

Такий спосіб може включати введення ефективної кількості композиції або фармацевтичного препарату, що включає принаймні одне анти-ФНП антитіло, в клітину, тканину, орган, тварину або пацієнта для потреб модуляції, лікування, полегшення, профілактики або зменшення симптоматики, впливів чи механізмів. Ефективна кількість може включати приблизно від 0,001 до 500мг/кг на шприца (напр., болус), багаторазова або постійне введення чи досягнення сировоткової концентрації 0,01-5000μг/мл на шприц, багаторазове або постійне введення, або будь-яке ефективний діапазон чи значення, як це зроблено і описано з використанням відомих способів, як це описано тут або відомо з відповідних джерел.

Цитування

Всі публікації або патенти, що цитуються тут, повністю включені тут у посилання наскільки вони відображають стан проблеми на час представлення винаходу та/або надають опис та уможливають даний винахід. Публікації стосуються будь-яких наукових або патентних публікацій або будь-якої іншої доступної інформації у будь-якому медіа-форматі, включаючи всі записані, електронні чи друковані формати. Наступні посилання є цілком включеними тут у посиланнях: [Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001)].

Антитіла даного винаходу

Принаймні одне анти-ФНП антитіло даного винаходу може бути додатково вироблене за допомогою клітинної лінії, змішаної клітинної лінії, безсмертних клітин або клональної популяції безсмертних клітин, як це відомо науці. [Див., напр., Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001)], кожне джерело повністю вказується тут у посиланнях.

Людські антитіла, що є специфічними для людських ФНП протеїнів або їхніх фрагментів, можуть реагувати з певними імунногенами антигенами, такими як ізолюваний та/або ФНП протеїн або його частина (включаючи синтетичні молекули, такі як синтетичні пептиди). Інші специфічні або загальні антитіла ссавців також можуть так само реагувати. Підготовка імунногенних антигенів та виробництво моноклональних антитіл може бути проведена з використанням будь-яких належних методик.

В одному підході гібридома виробляється за допомогою поєднання відповідної лінії безсмертних клітин (напр., лінія мієломних клітин таких як, але не тільки, Sp2/0, Sp2/0-AG14, NSO, NS1, NS2, AE-1, L.5, >243, P3X63Ag8.653, Sp2 SA3, Sp2 MA1, Sp2 SS1, Sp2 SA5, U937, MLA 144, ACT IV, MOLT4, DA-1, JURKAT, WEHI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMIWA, NEURO 2A тощо, або гетеромієломи, їхні продукти поєднання, або будь-які клітини або поєднальні клітини, що від них походять, або будь-які відповідні клітинні лінії, як це відомо в даній галузі. [Див., напр., www.atcc.org, www.lifetech.com] тощо, з клітинами, що продукують антитіла, такі як, але не тільки, ізолювані або клоновані клітини селезінки, клітини периферичної крові, лімфи, мигдаликів або інші клітини, що містять імунні чи В-клітини, або інші клітини, що експресують важкий або легкий ланцюг постійної або варіабельної або каркасної або ДВР послідовності, або такі як ендогенні чи гетерогенні нуклеїнові кислоти, або такі як рекомбінантні чи ендогенні, вірусні, бактеріальні, водоростеві, прокариотичні, амфібіальні, комашині, рептилієві, рибні, отримані від ссавців, гризунів, кінські, овечі, козліні, баранячі, приматові, еукаріотичні, геномні ДНК, цДНК, рДНК, мітохондріальні ДНК або РНК, хлоропластна ДНК або РНК, hpРНК, mРНК, tРНК, одинарного, подвійного або потрійного скручення, гібридизовані тощо або будь-яка їхня комбінація. [Див., напр., Ausubel, вище, та Colligan, Immunology, вище, розділ 2], повністю включено тут у посиланнях.

Клітини, що продукують антитіла, можуть також бути отримані з периферичної крові або, бажано, з селезінки чи лімфатичних вузлів, людей або інших відповідних тварин, що були імунізовані зацікавленими антигенами. Будь-які інші відповідні клітини господаря також можуть використовуватися для експресії гетерологічних або ендогенних нуклеїнових кислот, що кодують антитіла, певні їхні фрагменти або частини даного винаходу. Зливні клітини (гібридоми) або рекомбінантні клітини можуть бути ізолювані з використанням певних станів культури або інших відповідних відомих способів та клонуватися при обмеженому розведенні або сортуванні клітин, або іншими відомими способами. Клітини, які продукують антитіла с бажаною специфічністю можуть бути відібрані при відповідному аналізі (напр., ELISA).

Можуть використовуватися інші відповідні способи продукування або ізоляції антитіл необхідної специфічності, включаючи, але не обмежуючись, способами, що відбирають рекомбінантні антитіла з пептидної або протеїнової бібліотеки (напр., але не обмежуючись, бібліотеки бактеріофагів, рибосом, олігонуклеотидів, РНК, цДНК тощо; напр., доступні у Cambridge Technologies, Cambridgeshire, UK; MorphoSys, Martinsreid/Planegg, DE; Biovation, Aberdeen, Scotland, UK; Biolnvent, Lund, Sweden; Dyax Corp., Enzon, Afrymax/Biosite; Xoma, Berkeley, CA; Ixsys. [Див., напр., EP 368,684, PCT/GB91/01134; PCT/GB92/01755; PCT/GB92/002240; PCT/GB92/00883; PCT/GB93/00605; US 08/350260(5/12/94); PCT/GB94/01422; PCT/GB94/02662; PCT/GB97/01835; (CAT/MRC); WO 90/14443; WO 90/14424; WO 90/14430; PCT/US94/1234; WO 92/18619], WO 96/07754; (Scripps); EP 614 989 (MorphoSys); WO 95/16027 (Biolnvent); WO 88/06630; WO 90/3809 (Dyax); US 4,704,692 (Enzon); PCT/US91/02989 (Afrymax); WO 89/06283; EP 371 998; EP 550 400; (Хота); EP 229 046; PCT/US91/07149 (Ixsys)]; або стохастично згенеровані пептиди чи протеїни - [US 5723323, 5763192, 5814476, 5817483, 584514, 5976862, WO 86/05803, EP 590 689] (Ixsys, тепер Applied Molecular Evolution (AME), кожний повністю включений тут в якості посилання) або, що залежать від імунізації

трансгенних тварин (напр., миші SCID, [Nguyen et al., Microbiol. Immunol. 41: 901-907 (1997); Sandhu et al., Crit. Rev. Biotechnol. 16: 95-118 (1996); Eren et al., Immunol. 93: 154-161 (1998)], кожна повністю включена тут у посиланнях, а також у відповідних патентах і застосуваннях), що спроможні продукувати асортимент людських антитіл, як це відомо науці та/або описано тут. Такі методики включають, але не обмежуються, виявлення рибосом [Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 4937-4942 (May 1997); Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 14130-14135 (Nov. 1998)]; методи однієї клітини, що продукує антитіла (напр., метод антитіл відібраних лімфоцитів ("SLAM") [патент США №5,627,052, Wen et al., J. Immunol. 17: 887-892 (1987); Babcock et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7843-7848 (1996)]); гелева мікрокраплинна і потокова цитометрія [Powell et al., Biotechnol. 8: 333-337 (1990); One Cell Systems, Cambridge, MA; Gray et al., J. Imm. Meth. 182: 155-163 (1995); Kenny et al., Bio/Technol. 13: 787-790 (1995)]; вибір В-клітин [Steenbakkers et al., Molec. Biol. Reports 19: 125-134 (1994); Jonak et al., Progress Biotech, Vol.5, In Vitro Immunization in Hybridoma Technology, Borrebaeck, ed., Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Netherlands (1988)].

Методи інженерингу та гуманізації нелюдських та людських антитіл також можуть використовуватися і вони є добре відомими науці. Загалом, гуманізовані або модифіковані антитіла мають один або більше амінокислотний залишок, що походить з джерела, яке є нелюдським, напр., але не обмежуючись, від мишей, щурів, кролів, приматів або інших ссавців. Ці людські амінокислотні залишки часто називаються як "імпортовані" залишки, які зазвичай отримуються з "імпортованих" варіабельних, постійних або інших доменів відомої людської послідовності. Відомі послідовності Ig людини описано, [напр., www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html, www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; www.public.iastate.edu/~pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab; www.path.cam.ac.uk/~mrc7/mikeimages.html; www.antibodyresource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html; www.immunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/~hcenter/index.html; www.biotech.ufl.edu/~hcl/; www.pebio.com/pa/340913/340913.html; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.m.ehime-u.ac.jp/~yasuhito/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html; www.biotech.ufl.edu/~fccl/protocol.html; www.isac-net.org/sites_geo.html; aximtl.imt.uni-marburg.de/~rek/AEPStart.html; baserv.uci.kun.nl/~jraats/links1.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/; www.mrc-cpe.carn.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; www.unizh.ch/~honegger/AHOseminar/Slide01.html; www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/caewg.htm; www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stataim.html; www.biosci.missouri.edu/smithgip/index.html; www.cryst.bioc.cam.ac.uk/~frnolina/Web-pages/Pept/spottech.html; www.jerini.de/fr_products.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983)], все повністю включено тут у посиланнях.

Такі імпортовані послідовності можуть використовуватися для зменшення імунногенності або зменшення, покращення чи модифікування зв'язування, афінності, швидкості зв'язування, швидкості звільнення, специфічності, часу напівжиття або будь-яких інших відповідних характеристик, що відомі науці. Загалом частина або всі нелюдські чи людські ДВР послідовності зберігаються, тоді як нелюдські послідовності варіабельних та постійних регіонів замінюються людськими або іншими амінокислотами. Антитіла також можуть бути додатково гуманізовані зі збереженням високої афінності до антигенів та інших сприятливих біологічних властивостей. Для досягнення цієї мети, гуманізовані антитіла можуть додатково приготовлені за допомогою процесу аналізу батьківської послідовності та різноманітних концептуальних гуманізованих продуктів з використанням тривимірних моделей батьківських та гуманізованих послідовностей. Тривимірні імунноглобулінові моделі є широкодоступними і добре знайомі тим, хто володіє цією проблемою. Доступні комп'ютерні програми, які ілюструють і демонструють можливі тривимірні конформаційні структури обраних можливих імунноглобулінових послідовностей. Вивчення цих зображень дозволяє аналізувати ймовірну роль залишків у функціонуванні можливих імунноглобулінових послідовностей, тобто, проводити аналіз залишків, що впливають на здатність можливих імунноглобулінів зв'язуватися з їхніми антигенами. За такого методу, можуть бути відібрані FR залишки і скомбіновані з узгодженими та імпортованими послідовностями, таким чином, щоб досягти бажаних характеристик антитіла, таких як підвищена афінність до цільового антигена(ів). Загалом, ДВР залишки є безпосередньої найбільш істотно залученими до впливу на антигенне зв'язування. Гуманізація або інженеринг антитіл даного винаходу може бути виконана з використанням будь-якого відомого методу, таких як, але не тільки, що описані у [Winter (Jones et al, Nature 321:522 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323 (1988); Verhoyen et al., Science 239:1534 (1988)), Simset et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chotnia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 4285 (1992); Presta et al., JImmunol. 151: 2623 (1993), патент США №№:5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5,766886, 5714352, 6204023, 6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539, 4816567, PCT/; US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO 90/14443, WO 90/14424, WO 90/14430, EP 229246], всі включені тут у посиланнях, включаючи цитовані там посилання.

Анти-ФНП антитіло також може бути згенеровано за допомогою імунізації трансгенних тварин (напр., мишей, щурів, хом'ячків, нелюдських приматів тощо) спроможних продукувати набір людських антитіл, як це описано тут та/або відомо науці. Клітини, що продукують людські анти-ФНП атитіла можуть бути ізольовані з таких тварин і приведені до стану безсмертя з використанням відповідних методів, такі як описані тут методи.

Трансгенні миші, що можуть виробляти набір людських антитіл, які зв'язуються з людськими антигенами, можуть продукуватися за допомогою відомих методів (напр, але не обмежуючись, [патенти США №№:5,770,428, 5,569,825, 5,545,806, 5,625,126, 5,625,825, 5,633,425, 5,661,016 та 5,789,650 опубліковані Lonberg et al; Jakobovits et al. WO 98/50433, Jakobovits et al. WO 98/24893, Lonberg et al. WO 98/24884, Lonberg et al. WO 97/13852, Lonberg et al. WO 94/25585, Kucherlapate et al. WO 96/34096, Kucherlapate et al. EP 0463

151 Bl, Kucherlapate et al. EP 0710 719 A1, Surani et al. Патент США №5,545,807, Bruggemann et al. EP 0438 474 Bl, Lonberg et al. EP 0814 259 A2, Lonberg et al. GB 2 272 440 A, Lonberg et al. Nature 368: 856-859 (1994), Taylor et al, Immunol. 6(4) 579-591 (1994), Green et al, Nature Genetics 7: 13-21 (1994), Mendez et al, Nature Genetics 15: 146-156 (1997), Taylor et al, Nucleic Acids Research 20(23): 6287-6295 (1992), Tuailon et al, Proc Natl Acad Sci USA 90(8) 3720-3724 (1993), Lonberg et al, Int Rev Immunol 13(1): 65-93 (1995) та Fishwald et al, Nat Biotechnol 14(7): 845-851 (1996)], кожен з яких повністю включений тут у посиланнях). Загалом, ці миші мають принаймні один трансген, що містить ДНК від принаймні одного людського імунноглобулінового локуса, що функціонально переналаштований або який може проходити функціональне переналаштування. Ендогенні імунноглобулінові локуси у таких мишей можуть бути порушені або видалені для того, щоб прибрати здатність тварин продукувати антитіла, що кодуються ендогенними генами.

Скринінг антитіл для специфічного зв'язування з однаковими протеїнами або фрагментами можуть бути переконливо виконаним з використанням бібліотек зображень пептидів. Цей метод включає перегляд великих колекцій пептидів з метою виявлення тих, що мають бажану функцію або структуру. Скринінг антитіл в бібліотеках зображень пептидів добре відомий науці. Зображені пептиди послідовності можуть бути завдовжки від 3 до 5000 або більше амінокислот, часто завдовжки 5-100 амінокислот, і досить часто від приблизно 8 до 25 амінокислот завдовжки. До того ж було описано методи безпосереднього хімічного синтезу для створення бібліотек пептидів, декілька методів рекомбінантної ДНК. Один з них включає зображення пептидної послідовності на поверхні бактеріофага або клітини. Кожний бактеріофаг або клітина містять нуклеотидну послідовність, що кодує окрему зображену пептидну послідовність. Такі методи описані [в патентних публікаціях РСТ №№91/17271, 91/18980, 91/19818 та 93/08278]. Інші системи для генерації бібліотек пептидів мають властивості як хімічного синтезу, так і рекомбінантних методик. [Див., патентні публікації РСТ №№92/05258, 92/14843 та 96/19256. Див. також, патенти США №№5,658,754; та 5,643,768]. Бібліотеки пептидних зображень, вектори та скринінгові набори є комерційно доступними від таких постачальників, як Invitrogen (Carlsbad, CA) та Cambridge antibody Technologies (Cambridgeshire, UK). [Див., напр., патенти США №№4704692, 4939666, 4946778, 5260203, 5455030, 5518889, 5534621, 5656730, 5763733, 5767260, 5856456, що належать Enzon; 5223409, 5403484, 5571698, 5837500, що належать Duax, 5427908, 5580717, що належать Afymax; 5885793, що належать Cambridge antibody Technologies; 5750373, що належать Genentech, 5618920, 5595898, 5576195, 5698435, 5693493, 5698417, що належать Хома, Colligan, вище; Ausubel, вище; або Sambrook], вище, кожен з патентів та публікацій повністю включені тут у посиланнях.

Антитіла даного винаходу можуть також бути виготовлені з використанням нуклеїнових кислот, що кодують принаймні одне анти-подвійне антитіло, у трансгенних тваринах або ссавців, таких як кози, корови, коні, вівці тощо, що продукують такі антитіла в їхньому молоці. Такі тварини можуть бути отримані з використанням відомих методик. Див., напр., але не обмежуючись, [патенти США №№5,827,690; 5,849,992; 4,873,316; 5,849,992; 5,994,616; 5,565,362; 5,304,489] тощо, кожен з котрих повністю включений тут у посиланнях.

Антитіла даного винаходу можуть бути додатково вироблені з використанням нуклеїнових кислот, що кодують принаймні одне анти-ФНП антитіло, у трансгенних рослинах та культивованих клітинах рослин (напр., але не обмежуючись, тютюн і кукурудза), що продукують такі антитіла, певні частини або варіанти в частинах рослин або їхніх культивованих клітинах. В якості одного з прикладів, листки трансгенного тютюна виробляють рекомбінантні протеїни успішно використовувалися для отримання великих кількостей рекомбінантних протеїнів, напр., при використанні індукованих промоторів. [Див., напр., Cramer et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 240: 95-118 (1999)] і цитовані там посилання. Також, трансгенна кукурудза використовувалася для вироблення протеїнів ссавців в комерційних кількостях продукції, з біологічними діями, що еквівалентні тим, що продукуються в інших рекомбінантних системах або очищені з природних джерел. [Див., напр., Hood et al., Adv. Exp. Med. Biol. 464: 127-147 (1999)] та цитовані там посилання. Антитіла також виготовлялися у великих кількостях з насіння трансгенних рослин, включаючи фрагменти антитіл, такі як одноланцюгові антитіла (scFv's), включаючи насіння тютюна та клубні картоплі. Отже, антитіла даного винаходу можуть також продукуватися з використанням трансгенних рослин, згідно з відомими методиками. [Див. також, напр., Fischer et al., Biotechnol. Appl. Biochem. 30: 99-108 (Oct., 1999), Ma et al., Trends Biotechnol. 13: 522-7 (1995); Ma et al., Plant Physiol. 109: 341-6 (1995); Whitelam et al., Biochem. Soc. Trans. 22: 940-944 (1994)]; і цитовані тут поєднання. Див., також загалом експресію антитіл рослинами, але не тільки. Кожне з вищенаведених посилань повністю включене тут у посиланнях.

Антитіла винаходу можуть зв'язувати людський ФНП з широким спектром афіності (K_D). При бажаному поєднанні принаймні одне людське МАТ даного винаходу може додатково зв'язувати людський ФНП з високою афіністю. Наприклад, людське МАТ може зв'язувати людський ФНП з K_D , що дорівнює або менше, ніж приблизно $10^{-7}M$, таким як, але не тільки, 0,1-9,9 (або будь-який спектр чи значення там) $\times 10^{-7}$, 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} , або з будь-яким спектром або значенням.

Афіність антитіла або спорідненість антитіла до антигену може бути визначена експериментально з використанням будь-якого відповідного методу. [Див., наприклад, Berzofsky, et al., "Antibody-Antigen Interactions", в Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, NY (1984); Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company: New York, NY (1992)]; та методи описані тут). Вимірювана афіність окремої взаємодії антитіло-антиген може змінюватися, якщо вимірювання проводиться в різних умовах (напр., концентрація солі, рН). Отже, вимірювання афіності та інших антиген-зв'язуючих параметрів (напр., K_D , K_a , K_d) переважно виконується стандартизованим розведеннями антитіла та антигена і стандартизованим буфером, таким як описаний тут буфер.

Молекули нуклеїнових кислот

При використанні наданої тут інформації, такої як кодуєча послідовність нуклеотидів з принаймні 70-100% прилеглими амінокислотами принаймні одного з SEQ ID NOS:1,2,3,4,5,6,7,8, певних фрагментів, варіантів або їхніх консенсусних послідовностей або депозитних векторів, що містять принаймні одну з цих послідовностей, молекула нуклеїнової кислоти даного винаходу, що кодує принаймні одне анти-ФНП антитіло, може бути отримана при використанні описаних тут методик або так, як це відомо в даній галузі.

Молекули нуклеїнових кислот даного винаходу можуть бути у формі РНК, такої як мРНК, hnРНК, тРНК або у будь-якій іншій формі, або у формі ДНК, включаючи, але не обмежуючись, цДНК та геномну ДНК, що отримані клонуванням або вироблені синтетично, або будь-які їхні комбінації. ДНК може бути три-ниткова, подвійно-ниткова або одно-ниткова або будь-які їхні комбінації. Будь-яка частина принаймні однієї нитки ДНК або РНК може бути кодуючою ниткою, що також відома як чутлива нитка, або може бути некодуючою ниткою, що також називається античутливою ниткою.

Ізольовані нуклеїновоокислотні молекули даного винаходу можуть включати нуклеїновоокислотні молекули, що складаються з каркасу відкритого читання (КВЧ), додатково з одним або більше інтронами, напр., але не обмежуючись, принаймні з однією певною частиною ДВР, в якості ДВР1, ДВР2 та/або ДВР3 принаймні одного важкого ланцюга (напр., SEQ ID NOS:13) або легкого ланцюга (напр., SEQ ID NOS:4-6); нуклеїновоокислотні молекули, що містять кодуючу послідовність для анти-ФНП антитіла або варіабельного регіона (напр., SEQ ID NOS:7,8); і нуклеїновоокислотні молекули, які містять нуклеотидну послідовність, що істотно відрізняється від тих, що описані вище, але які, внаслідок дегенерації генетичного коду, все ще кодують принаймні одне анти-ФНП антитіло, як це описано тут та/або відомо в даній галузі. Звісно, генетичний код є добревідомим в даній галузі. Отже, для того, хто має достатні знання в даній ділянці, буде рутинним отримати такі дегенеративні нуклеїновоокислотні варіанти, що кодують специфічні анти-ФНП антитіла даного винаходу. Див., напр., Ausubel, et al., вище, і такі нуклеїновоокислотні варіанти включені в даний винахід. Один з прикладів ізольованих нуклеїновоокислотних молекул даного винаходу включає SEQ ID NOS:10,11,12,13,14,15, що відповідають деяким прикладам нуклеїновоокислотного кодування, відповідно, HC ДВР1, HC ДВР2, HC ДВР3, LC ДВР1, LC ДВР2, LC ДВР3, варіабельний регіон HC та варіабельний регіон LC.

В іншому аспекті, винахід описує ізольовані нуклеїновоокислотні молекули, що кодують анти-ФНП антитіло, і які мають амінокислотну послідовність, що кодується нуклеїновою кислотою, яка міститься в плазмідах, що відкладені в якості визначених назв клонів

і ATCC Deposit №№

, відповідно, депоновані від

Як тут вказується, нуклеїнові кислотні молекули даного винаходу, які містять нуклеїновоокислотне кодування анти-ФНП антитіла, можуть включати, але не обмежуватись, ті, що самі по собі кодують амінокислотну послідовність фрагменту антитіла; кодуючу послідовність для всього антитіла або його частини; кодуючу послідовність для антитіла, фрагмента або частини, а також додаткові послідовності, такі як кодуюча послідовність принаймні одного сигнального лідера або зливної пептида, з або без вищезгаданих додаткових кодуючих послідовностей, таких як принаймні один інтрон, разом з додатковими, некодуючими послідовностями, включаючи, але не обмежуючись, некодуючі 5' та 3' послідовності, такі як транскрибовані, нерозширофані послідовності, що відіграють роль у транскрипції, обробці мРНК, включаючи сигнали склеювання та поліаденіляції (наприклад -рибосомне зв'язування та стабілізація мРНК); додаткова кодуюча послідовність, що кодує додаткові амінокислоти, такі як ті, що забезпечують додаткові властивості. Отже, послідовність, кодуюча антитіло може бути поєднана з маркером послідовності, таким як послідовність, кодуюча пептид, що покращує очищення зливної антитіла, яка містить фрагмент або частину антитіла.

Полінуклеотида, що селективно гібридизовані до полінуклеотида як це описано тут

Даний винахід описує ізольовані нуклеїнові кислоти, що гібридизовані за допомогою селективної гібридизації до полінуклеотидів, описаних тут. Отже, полінуклеотида даного впровадження можуть бути використані для ізоляції, визначення та/або квантифікації нуклеїнових кислот, що містять такі полінуклеотида. Наприклад, полінуклеотида даного винаходу можуть бути використані для ідентифікації, ізолювання або посилення часткових чи повномасштабних клонів у депонованій бібліотеці. В деяких впровадженнях, полінуклеотида є геномними або цДНК послідовностями ізольованими або якимось іншим чином допоміжними щодо цДНК з бібліотеки нуклеїнових кислот людей або ссавців.

Бажано, щоб бібліотека цДНК містила принаймні 80% послідовностей повної довжини, краще принаймні 85% або 90% послідовностей повної довжини, і ще краще - 95% послідовностей повної довжини. Бібліотеки цДНК можуть бути нормалізовані для підвищення репрезентативності рідкісних випадків. Низька або помірна строгість умов гібридизації типово, але не ексклюзивно, застосовується з послідовностями, що мають знижену ідентичність послідовності відносно допоміжних послідовностей. Умови помірної або високої строгості можуть додатково застосовуватися для послідовностей більшої ідентичності. Умови низької строгості дозволяють селективно гібридизувати послідовності, що мають приблизно 70% ідентичності послідовності, і можуть застосовуватися для визначення ортологічних або паралогічних послідовностей.

Додатково, полінуклеотида даного винаходу кодують принаймні частину антитіла, що кодується полінуклеотидами, які описані тут. Полінуклеотида даного винаходу включають послідовності нуклеїнових кислот, що можуть застосовуватися для селективної гібридизації до полінуклеотидів кодуючих антитіло даного винаходу. Див., напр., Ausubel, вище; Colligan, вище, кожний повністю включений тут у посиланнях.

Конструкція нуклеїнових кислот

Ізольовані нуклеїнові кислоти даного винаходу можуть бути вироблені з використанням (а) рекомбінантних методів, (б) синтетичних методик, (с) методик очищення або їхньої комбінації, що добре відомі науці.

Нуклеїнові кислоти можуть включати послідовності на додаток до полінуклеотида даного винаходу. Наприклад, мульти-клонуючий сайт, що містить один або більше ендонуклеазний обмежувальний сайт, може бути вставлений в нуклеїнову кислоту для допомоги в ізоляції полінуклеотида. Також, трансльовані послідовності можуть бути вставлені для допомоги в ізоляції трансльованого полінуклеотида даного винаходу. Наприклад, гекса-гістидинова маркерна послідовність надає зручний спосіб очищення протеїнів даного винаходу. Нуклеїнова кислота даного винаходу - за винятком кодуючої послідовності - додатково є вектором, адаптером або поєднувачем для клонування та/або експресії полінуклеотида даного винаходу.

Додаткові послідовності можуть бути додані до таких послідовностей клонування та/або експресії для оптимізації їхньої функції в клонуванні та/або експресії, для допомоги в ізоляції полінуклеотида або для покращення введення полінуклеотида в клітину. Використання клонуваних векторів, експресованих векторів та поєднувачів добре відомо науці. (Див., напр., Ausubel, вище; або Sambrook, вище).

Рекомбінантні методи конструювання нуклеїнових кислот

Склад ізольованих нуклеїнових кислот даного винаходу, таких як РНК, цДНК, геномна ДНК або будь-які їхні комбінації, можуть бути отримані з біологічних джерел з використанням будь-якої кількості методик клонування відомих тим, хто є фахівцем в цій галузі. В деяких впровадженнях, олігонуклеотидні зразки, що селективно гібридизуються, за строгих умов, до полінуклеотидів даного винаходу використовуються для ідентифікації бажаної послідовності в цДНК та геномних бібліотеках, що добре відомо тим, хто є фахівцем в цій галузі (Див., напр., Ausubel, вище; або Sambrook, вище).

Методи скринінгу та ізоляції нуклеїнових кислот

Бібліотеки цДНК або геномні бібліотеки можуть бути переглянуті з використанням зразків, що ґрунтуються на послідовності полінуклеотида даного винаходу, таких як описані тут. Зразки можуть використовуватися для гібридизації з послідовностями геномної ДНК або цДНК для ізоляції гомологічних генів в тому ж чи різних організмах. Ті, хто є фахівцями в даній галузі, усвідомлюють, що в аналізах можуть застосовуватися різноманітні ступені жорсткості гібридизації. Якщо умови гібридизації стають більш жорсткими, то мусить бути більший ступінь доповнюваності між зразком та цілпо для виникнення дуплексного утворення. Ступінь жорсткості може контролюватися одним або декількома факторами температури, іонної сили, рН та наявності частково денатуруючого розчинника, такого як формамід. Наприклад, жорсткість гібридизації зручно змінювати змінюючи полярність розчину реактанта, наприклад, за допомогою маніпулювання концентрацією формаміда у межах від 0% до 50%. Ступінь доповнюваності (ідентичність послідовності), що потрібна для визначеного зв'язування, буде варіювати згідно з жорсткістю гібридизаційних засобів та/або засобів відмивання.

Методи посилення РНК або ДНК добре відомі в науці і можуть використовуватися згідно з даним винаходом без неналежного експериментування, ґрунтуючись на керівництвах, що представлені тут.

Відомі методи посилення ДНК або РНК включають, але не обмежуються, полімеразну ланцюгову реакцію (PCR) та відповідні процеси посилення [див., напр., патент США №№4,683,195, 4,683,202, 4,800,159, 4,965,188, що належать Mullis et al; 4,795,699 та 4,921,794], що належать Tabor, et al; 5,142,033, що належить Innis; 5,122,464, що належить Wilson, et al.; 5,091,310, що належить Innis; 5,066,584, що належить Gyllensten, et al; 4,889,818, що належить Gelfand, et al; 4,994,370, що належить Silver, et al; 4,766,067, що належить Biswas; 4,656,136, що належить Ringold) та РНК-медійоване посилення, що використовує анти-чутливу РНК для цільової послідовності, в якості шаблону для синтезу подвійно-ланцюгової ДНК [патент США №5,130,238], що належить Malek, et al, під торговою назвою NASBA), повний зміст посилань яких включений тут у посиланнях (Див., напр., Ausubel, вище; або Sambrook, вище).

Наприклад, технологія полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) може використовуватися для посилення послідовності полінуклеотидів даного винаходу та залежних генів безпосередньо з бібліотек геномної ДНК або цДНК. ПЛР та інші методи посилення *in vitro* також можуть бути корисними, наприклад, для клонування послідовностей нуклеїнових кислот, що кодують протези, які будуть експресовані, для виробництва нуклеїнових кислот для використання в якості зразків для визначення наявності бажаних мРНК у зразках, для послідовності нуклеїнових кислот або для інших цілей. Приклади методик, яких достатньо, щоб скерувати осіб, котрі мають відповідні навички, у методиках посилення *in vitro* знаходяться у Berger, вище, [Sambrook, вище та Ausubel, вище, а також Mullis, et al., патент США №4,683,202 (1987); та Innis, et al., PCR Protocols A Guide to Methods and Applications, Eds., Academic Press Inc., San Diego, CA (1990)]. Комерційно доступні набори для геномного PCR посилення є відомими науці. Див., напр., Advantage-GC Genomic PCR Kit (Clontech). Додатково, напр., протеїн T4 гену 32 (Boehringer Mannheim) може використовуватися для покращення виходу продуктів довгої ПЛР.

Синтетичні методи конструювання нуклеїнових кислот

Ізольовані нуклеїнові кислоти даного винаходу також можуть бути підготовленими безпосереднім хімічним синтезом за допомогою відомих методів (див., напр., Ausubel, et al., вище). Хімічний синтез загалом продукує одно-нитковий олігонуклеотид, який може бути конвертований в дво-ниткову ДНК за допомогою гібридизації з допоміжною послідовністю або за допомогою полімеризації з ДНК полімеразою з використанням однієї нитки в якості шаблону. Ті, хто мають відповідну кваліфікацію в цій галузі, розуміють, що в той час як хімічний синтез ДНК може бути обмеженим до послідовностей з приблизно 100 або більше основ, довші послідовності можуть бути отримані за допомогою зв'язування коротших послідовностей.

Касети рекомбінантної експресії

Даний винахід у подальшому описує касети рекомбінантної експресії, що містять нуклеїнову кислоту даного винаходу. Послідовність нуклеїнової кислоти даного винаходу, наприклад цДНК або геномна послідовність, що кодує антитіло даного винаходу, може використовуватися для конструювання касети рекомбінантної експресії, що може впроваджуватися безпосередньо в принаймні одну бажану клітину господаря. Касета рекомбінантної експресії зазвичай містить полінуклеотид даного винаходу, що реально зв'язаний з транскрипційними ініціюючими регуляторними послідовностями, що спрямовують транскрипцію полінуклеотида в заплановану клітину господаря. Обидва гетерологічні та негетерологічні (тобто, ендогенні) промотери можуть застосовуватися для безпосередньої експресії нуклеїнових кислот даного винаходу.

В деяких впровадженнях, ізольовані нуклеїнові кислоти, що слугують як промотери, покращувачі або інші елементи можуть впроваджуватися у відповідну позицію (вище, нижче або в інтрон) негетерологічної форми полінуклеотида даного винаходу, для того щоб зменшувати або збільшувати експресію полінуклеотида даного винаходу. Наприклад, ендогенні промотери можуть бути змінені *in vivo* або *in vitro* за допомогою мутації, видалення та/або заміни.

Вектори та клітини господаря

Даний винахід також стосується векторів, що включають ізольовані нуклеїновокислотні молекули даного винаходу, клітин господаря, що є модифіковані з рекомбінантними векторами методами генетичної інженерії, та методи продукції принаймні одного анти-ФНП антитіла за допомогою рекомбінантних методик, що відомі науці. Див., напр., Sambrook, et al., вище; Ausubel, et al., вище, кожні з них внесена тут у посиланнях.

Полінуклеотиди можуть бути додатково поєднаними з вектором, що містить відібраний маркер для проникнення в господаря. Загалом, плазмідний вектор вводиться в преципітат, такий як кальцієвий фосфатний преципітат, або в комплекс із зарядженим ліпідом. Якщо вектор є вірусом, то він може бути спактованим *in vitro* з використанням відповідних ліній пакувальних клітин і потім можуть бути перетворені в клітини господаря.

ДНК вставка має бути реально поєднана з належним промотером. Конструкція експресії в подальшому міститиме обмежувальні сайти для ініціації транскрипції, припинення та, в транскрибованому регіоні, рибосом-зв'язуюче місце для трансляції. Кодуюча частина зрілих транскриптів експресується за допомогою конструкцій, що бажано має включати кодон, який ініціює трансляцію, на початку і припиняючий кодон (напр., UAA, UGA або UAG), який належно розташований в кінці мРНК, яка має бути трансльована, при перевазі UAA та UAG для клітинної експресії у ссавців чи еукаріот.

Вектори експресії бажано, але не обов'язково, мають включати принаймні один обраний маркер. Такі маркери включають, напр., але не обмежуються, метотрексат (MTX), дигідрофолат редуктазу [DHFR, патент США №№4,399,216; 4,634,665; 4,656,134; 4,956,288; 5,149,636; 5,179,017], резистентність по ампіциліну, неомицину (G418), мікофенолової кислоті або глютамін синтетази [GS, патент США №№5,122,464; 5,770,359; 5,827,739] для еукаріотичних клітинних культур та тетрациклін- або ампіцилін-резистентні гени для культивування в *E.coli* та інших бактеріях або прокаріотах (вищенаведені патенти повністю включено тут у посиланнях). Відповідні культурні середовища і умови для вищеписаних клітин господаря відомі науці. Відповідні вектори є знайомими для кваліфікованих фахівців. Введення векторної конструкції у клітину господаря може бути здійснено за допомогою трансфекції фосфатом кальцію, DEAE-декстран-медіованою трансфекцією, катіонною ліпідно-медіованою трансфекцією, електропорацією, трансдукцією, інфікуванням або іншими відомими методами. Такі методи описані в роботах, таких як [Sambrook, вище, розділи 1-4 та 16-18; Ausubel, вище, розділи 1, 9,13,15,16].

Принаймні одне антитіло даного винаходу може бути експресоване у модифікованій формі, такий як зливний протеїн, і може включати не тільки сигнали секреції, але також додаткові гетерологічні функціональні регіони. Наприклад, регіон додаткових амінокислот, зокрема заряджені амінокислоти, може додаватися до N-закінчення антитіла для покращення стабільності та персистенції в клітині господаря, під час очищення або під час подальшого захоплення і зберігання. Також, пептидні молекули можуть додаватися до антитіла даного винаходу для поліпшення очищення. Такі регіони можуть прибиратися до остаточного приготування антитіла або принаймні одного його фрагмента. Такі методи описані у багатьох стандартних лабораторних керівництвах, таких як [Sambrook, вище, розділи 17.29-17.42 та 18.1-18.74; Ausubel, вище, розділи 16,17 та 18].

Ті, хто мають належні навички в цій галузі, знають численні системи експресії, що доступні для експресії нуклеїнової кислоти, яка кодує протеїн даного винаходу.

Альтернативно, нуклеїнові кислоти даного винаходу можуть експресуватися в клітині господаря за допомогою вмикання (маніпуляційно) і клітині господаря, що містить ендогенну ДНК, яка кодує антитіло даного винаходу. Такі методи добре відомі науці, напр., як це описано [в патенті США №№5,580,734, 5,641,670, 5,733,746 та 5,733,761], що повністю включені тут у вигляді посилань.

Ілюстрацією клітинних культур, що є корисними для продукування антитіл, певних їхніх частин або варіантів, є клітини ссавців. Системи клітин ссавців часто бувають в формі моношарових клітин, хоча суспензії або біореактори клітин ссавців також можуть використовуватися. Наукою розроблено багато належних ліній клітин господаря спроможних експресувати інтактні глікозильовані протеїни, і вони включають клітинні лінії COS-1 (напр., ATCC CRL 1650), COS-7 (напр., ATCC CRL-1651), HEK293, BHK21 (напр., ATCC CRL-10), CHO (напр., ATCC CRL 1610) та BSC-1 (напр., ATCC CRL-26), клітини Cos-7, клітини CHO, клітини her G2, клітини P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14, 293, клітини HeLa тощо, які доступні від, наприклад, American Type Culture Collection, Manassas, Va (www.atcc.org). Бажані клітини господаря включають клітини лімфоїдного походження, такі як клітини мієломи і лімфоми. Зокрема бажаними клітинами господаря є клітини P3X63Ag8.653 (ATCC Accession Number CRL-1851) та клітини SP2/0-Ag14 (ATCC Accession Number CRL-1851). В окремих бажаних впровадженнях рекомбінантною клітинами є клітини P3X63Ag8.653 або SP2/0-Ag14.

Вектори експресії для цих клітин можуть включати одну або більше з наступних послідовностей контролю експресії, таких як, але не обмежуючись походженням реплікації; промоутер (напр., пізній або ранній промоутер SV40, промоутер CMV [патент США №№5,168,062; 5,385,839], промоутер HSV tk, промоутер pgk (фосфогліцерат кіназа), промоутер EF-1 альфа [патент США №5,266,491], принаймні один людський імінноглобуліновий промоутер; сайта покращувача та/або інформаційної обробки, такі як рибосомо-зв'язуючі сайти, поліаденілаційні сайти (напр., додатковий сайт SV40 великого T Ag полі A) та транскрипційні припиняючі послідовності. Див., напр., Ausubel et al., вище; Sambrook, et al., вище. Інші клітини корисні для продукування нуклеїнових кислот або протеїнів даного винаходу відомі та/або доступні, наприклад, від American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas (www.atcc.org) або інших відомих чи комерційних джерел.

Коли використовуються еукаріотичні клітини господаря, то поліаденілаційні або припиняючі послідовностей контролю зазвичай включені до вектора. Прикладом припиняючої послідовності є поліаденілаційна послідовність з гена коров'ячого гормону роста. Послідовності для акуратного зклеювання транскриптів також можуть бути включеними. Прикладом зклеєної послідовності є інтрон VP1 з SV40 [Sprague, et al., *J.Virol.* 45: 773-781 (1983)]. Додатково, генні послідовності для контролю реплікації в клітинах господаря можуть бути включеними до вектора, як це відомо в даній галузі.

Очищення антитіла

Анти-ФНП антитіло може бути відновлене і очищене з культур рекомбінантних клітин добровідомими

методами включаючи, але не обмежуючись, очищення протеїном А, преципітація амонію сульфатом або етанолом, кислотна екстракція, аніонна або катіонна обміна хроматографія, фосфоцелюлозна хроматографія, хроматорграфія гідрофобічної взаємодії, афінна хроматорграфія, гідроксилапатитна хроматографія та лектинова хроматографія. Високовиробничка рідинна хроматографія ("HPLC") також може використовуватися для очищення. [Див., напр., Colligan, Current Protocols in Immunology, або Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001), напр., розділи 1, 4, 6, 8, 9, 10], кожний з яких включений тут у посиланнях.

Антитіла даного винаходу включають природні очищені продукти, продукти хімічного синтезу та продукти, що вироблені за допомогою рекомбінантних методик, з еукаріотичних господарів, включаючи, наприклад, клітини дріжджів, вищих рослин, комах та ссавців. Залежно від використаного господаря в процедурах рекомбінантної продукції, антитіло даного винаходу може бути глікозильоване або може бути неглікозильоване, надається перевага глікозильованому. Такі методи описані в багатьох стандартних лабораторних керівництвах, таких як Sambrook, вище, розділи 17.37-17.42; Ausubel, вище, розділи 10,12, 13, 16,18 та 20, Colligan, Protein Science, вище, розділи 12-14, всі вони повністю включені тут у посиланнях.

Анти-ФНП антитіла

Ізольовані антитіла даного винаходу складаються з описаних тут амінокислотних послідовностей антитіла, що кодується будь-яким відповідним полінуклеотидом, або будь-яке ізольоване і приготовлене антитіло. Бажано, щоб людське антитіло або антиген-зв'язуючий фрагмент зв'язував людський ФНП та, таким чином частково або суттєво нейтралізував принаймні одну біологічну дію протеїна. Антитіло або певна його частина чи варіант, що частково і переважно істотно нейтралізує принаймні одну біологічну дію принаймні одного ФНП протеїна або фрагмента може зв'язувати протеїн або фрагмент і таким чином пригнічувати дію, що медіюється через зв'язування ФНП з рецептором ФНП або через інші ФНП-залежні або медійовані механізми. Термін "нейтралізуюче антитіло", що використовується тут, відноситься до антитіла, яке може пригнічувати ФНП-залежну активність на приблизно 10-120%, бажано на принаймні приблизно 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% або більше залежно від аналізу. Спроможність анти-ФНП антитіл пригнічувати ФНП-залежну активність переважно оцінюється за допомогою аналізу принаймні одного відповідного ФНП протеїна або рецептора, як це описано тут та/або як це відомо в даній галузі. Людське антитіло винаходу може бути будь-якого класу (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD тощо) або ізотипу і може містити каппа або лямбда легкі ланцюги. В одному впровадженні, людське антитіло містить важкий ланцюг або певний фрагмент IgG, наприклад, принаймні один ізотип IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4. Антитіла цього типу можуть бути приготовлені за допомогою застосування трансгенних мишей або інших трансгенних нелюдських ссавців, що містять трансгени принаймні одного людського легкого ланцюга (напр., IgG, IgA та IgM (напр., $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$), як це описано тут та/або як це відомо науці. В іншому впровадженні, анти-людське ФНП людське антитіло містить важкий ланцюг IgG1 та легкий ланцюг IgG1.

Принаймні одне антитіло винаходу зв'язує принаймні один певний епітоп специфічний до принаймні одного ФНП протеїна, субодиниці, фрагмента, частини або будь-якої комбінації. Принаймні один епітоп може містити принаймні один антитіло-зв'язуючий регіон, що містить принаймні одну частину вищезгаданого протеїну, епітоп котрого переважно складається з принаймні однієї позаклітинної, розчинної, гідрофільної, зовнішньої або цитоплазматичної частини вищезгаданого протеїна. Принаймні один певний епітоп може містити будь-яку комбінацію принаймні однієї амінокислотної послідовності з принаймні 1-3 амінокислот до повної певної частини прилеглих амінокислот SEQ ID NOS:9,16 або 17.

Загалом, людське антитіло або антитіло-зв'язуючий фрагмент даного винаходу міститиме антиген-зв'язуючий регіон, що має принаймні один людський допоміжний визначальний регіон (ДВР1, ДВР2 та ДВР3) або варіант принаймні одного важко ланцюгового варіабельного регіону та принаймні один людський допоміжний визначальний регіон (ДВР1, ДВР2 та ДВР3) або варіант принаймні одного легколанцюгового варіабельного регіону. В якості одного з прикладів, антитіло або антиген-зв'язуюча частина або варіант може містити принаймні один важколанцюговий ДВР3, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3 та/або легколанцюговий ДВР3, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:6. В окремому впровадженні, антитіло або антиген-зв'язуючий фрагмент можуть мати антиген-зв'язуючий регіон, що містить принаймні частину принаймні одного важколанцюгового ДВР (тобто, ДВР1, ДВР2 та/або ДВР3), що мають амінокислотну послідовність, яка відповідає ДВР 1, 2 та/або 3 (напр., SEQ ID NOS: 1, 2 та/або 3). В іншому окремому впровадженні, антитіло або антиген-зв'язуюча частина або варіант можуть мати антиген-зв'язуючий регіон, що містить принаймні частину принаймні одного легколанцюгового ДВР (тобто, ДВР1, ДВР2 та/або ДВР3), який має амінокислотну послідовність, що відповідає ДВР 1, 2 та/або 3 (напр., SEQ ID NOS: 4, 5 та/або 6). У виділеному впровадженні три важколанцюгових ДВР та три легколанцюгових ДВР антитіла або антиген-зв'язуючого фрагмента мають амінокислотну послідовність відповідних ДВР принаймні одного з Mat Gen095, Gen0101, CNT095, C372A, як це описано тут. Такі антитіла можуть бути виготовлені за допомогою хімічного з'єднання з різноманітними частинами (напр., ДВР, каркас) антитіла з використанням традиційних методик, за допомогою приготування і експресування (тобто, однієї або більше) нуклеїновокислотної молекули, що кодує антитіло з використанням традиційних методик технології рекомбінантної ДНК або за допомогою використання будь-яких інших належних методів.

Анти-ФНП антитіло може містити принаймні один важко- або легколанцюговий варіабельний регіон, що має визначену амінокислотну послідовність. Наприклад, у виділеному впровадженні, анти-ФНП антитіло містить принаймні один з принаймні одного важколанцюгового варіабельного регіону, що додатково може мати амінокислотну послідовність SEQ ID №7 та/або принаймні один легколанцюговий варіабельний регіон, що може додатково мати амінокислотну послідовність SEQ ID №8. Антитіла, що зв'язують людський ФНП та, що містять певний важко- або легколанцюговий варіабельний регіон, можуть бути приготовлені з використанням належних методів, таких як бактеріофагова проява [Katsube, Y., et al., Int J Mol Med, 1(5): 863-868 (1998)] або методів, що використовують трансгенні тварин, які відомі в науці та/або описані тут. Наприклад, трансгенні миші, що містять функціонально переналаштований людський імунноглобуліновий

важколанцюговий трансген та трансген, який містить ДНК з людського імунноглобулінового легколанцюгового локуса, що може проходити функціональне переналаштування, можуть бути імуннізовані людським ФНП або його фрагментом для запуску продукції антитіл. При бажанні, клітини продукуючі антитіла можуть бути ізольовані та можуть бути приготовлені гібридами або інші безсмертні клітини, що продукують антитіла, як це описано тут та/або відомо в науці. Альтернативно, антитіло, певна частина або варіант можуть експресуватися з використанням кодуєчих нуклеїнових кислот або їх частин в належній клітині господаря.

Винахід також відноситься до антитіл, антиген-зв'язуючих фрагментів, імунноглобулінових ланцюгів та ДВР, що містять амінокислоти в послідовності, яка є практично такою ж, як і амінокислотна послідовність, описана тут. Бажано, щоб антитіла або антиген-зв'язуючі фрагменти та антитіла, які містять такі ланцюги або ДВР, могли зв'язувати людський ФНП з високою афінією (напр., K_D менше або дорівнює приблизно $10^{-9}M$). Амінокислотна послідовність, що є практично такою ж, як і послідовність описана тут, містить консервативні амінокислотні заміни, а також амінокислотні видалення та/або вставки. Консервативною амінокислотою заміною називається заміна першої амінокислоти другою амінокислотою, що має хімічні та/або фізичні властивості (напр., заряд, структуру, полярність, гідрофобність/гідрофільність), які є такими ж, як і у першій амінокислоті. Консервативні заміни включають заміну однієї амінокислоти іншою в таких групах: лізин (K), аргінін (R) та гістидин (H); аспартат (D) і глутамат (E); аспаригін (N), глутамін (Q), серин (S), треонін (T), тирозин (Y), K, R, H, D та E; аланін (A), валін (V), лейцин (L), ізолейцин (I), пролін (P), фенілаланін (F), триптофан (W), метіонін (M), цистеїн (C) та гліцин (G); F, W та Y; C, S та T.

Коди амінокислот

Амінокислоти, що складають анти-ФНП антитіла даного винаходу, часто скорочуються у вигляді аббревіатури. Амінокислотні позначення можуть бути сформовані з позначень амінокислот у вигляді однобуквенного коду, їх трибуквенного коду, імені або тринуклеотидного кодону, так як це часто робиться в наукових роботах [див. Alberts, B., et al., *Molecular Biology of The Cell*, Third Ed., Garland Publishing, Inc., New York, 1994]:

ОДНОБУКВЕНИЙ КОД	ТРИБУКВЕНИЙ КОД	НАЗВА	ТРИНУКЛЕОТИДНИЙ КОДОН(И)
A	Ala	Аланін	GCA, GCC, GCG, GCU
C	Cys	Цистеїн	UGC, UGU
D	Asp	Аспартова кислота	GAC, GAU
E	Glu	Глутамова кислота	GAA, GAG
F	Phe	Фенілаланін	UUC, UUU
G	Gly	Гліцин	GGA, GGC, GGG, GGU
H	His	Гістидин	CAC, CAU
I	Ile	Ізолейцин	AUA, AUC, AUU
K	Lys	Лізин	AAA, AAG
L	Leu	Лейцин	UUA, UUG, CUA, CUC, CUG, CUU
M	Met	Метіонін	AUG
N	Asn	Аспарагін	AAC, AAU
P	Pro	Пролін	CCA, CCC, CCG, CCU
Q	Gln	Глутамін	CAA, CAG
R	Arg	Аргінін	AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, CGU
S	Ser	Серин	AGC, AGU, UCA, UCC, UCG, UCU
T	Thr	Треонін	ACA, ACC, ACG, ACU
V	Val	Валін	GUA, GUC, GUG, GUU
W	Trp	Триптофан	UGG
Y	Tyr	Тирозин	UAC, UAU

Анти-ФНП антитіло даного винаходу може включати одну або більше амінокислотну заміну, видалення або додавання, або внаслідок природної мутації або людських маніпуляцій, як це визначено тут.

Звісно, кількість амінокислотних заміни залежатиме від багатьох факторів, включаючи ті, що описані вище. Взагалі кажучи, кількість амінокислотних заміни, вставок або видалень для будь-якого даного ФНП антитіла буде не більше, ніж 40, 30, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, такою як 1-30 або будь-який діапазон чи значення, як вказано тут.

Амінокислоти в анти-ФНП антитілі даного винаходу, що є обов'язковими для функції, можна ідентифікувати за допомогою методів, що відомі в даній галузі, таких як спрямований мутагенез чи аланін-скануючий мутагенез [напр., Ausubel, вище, розділ 8, 15; Cunningham and Wells, *Science* 244: 1081-1085 (1989)]. Остання процедура включає тільки аланінову мутацію кожного залишку молекули. Результуючі мутантні молекули потім перевіряються на біологічну дію, таку як, але не обмежуючись, принаймні одна нейтралізуюча дія щодо ФНП. Місця, що є критичними для зв'язування антитіла, можуть також бути ідентифіковані за допомогою структурного аналізу, такого як кристалізація, ядерно-магнітний резонанс або фотоафінне мічення [Smith, et al., *J. Mol. Biol.* 224: 899-904 (1992) та de Vos, et al., *Science* 255:306-312(1992)].

Анти-ФНП антитіла даного винаходу можуть включати, але не обмежуючись, принаймні одну частину, послідовність або комбінацію, обрану з 5 до всіх прилеглих амінокислот принаймні одного SEQ ID №:1, 2, 3, 4,

5, 6.

Анти-ФНП антитіло може також додатково містити поліпептид з принаймні однієї з 70-100% прилеглих амінокислот принаймні однієї SEQ ID №:7, 8.

В одному впровадженні, амінокислотна послідовність імунноглобулінового ланцюга або його частини (напр., варіабельний регіон, ДВР) має приблизно 70-100% ідентичність (напр., 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 або будь-який діапазон або значення) до амінокислотної послідовності відповідного ланцюга принаймні одного з SEQ ID №№7, 8. Наприклад, амінокислотна послідовність важколанцюгового ДВР може порівнюватися з SEQ ID №7. Бажано, щоб 70-100% амінокислотна ідентичність (тобто, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 або будь-який діапазон чи значення) визначалися за допомогою належного комп'ютерного алгоритма, як це відомо науці.

Показові послідовності важколанцюгових та легколанцюгових варіабельних регіонів забезпечені в SEQ ID №№7, 8. Антитіла даного винаходу або його певні варіанти можуть містити будь-яку кількість прилеглих амінокислотних залишків з антитіла даного винаходу, де кількість вибирається з групи цілих чисел, що складаються з 10-100% кількості прилеглих залишків в анти-ФНП антитілі. Додатково, ця послідовність прилеглих амінокислот є завдовжки в принаймні приблизно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250 або більше амінокислот, або будь-який діапазон чи значення. Далі, кількість таких послідовностей може бути будь-яким цілим числом обраним з групи чисел від 1 до 20, таких як принаймні 2, 3, 4 або 5.

Як зрозуміло фахівцям в даній галузі, даний винахід включає принаймні одне біологічно активне антитіло даного винаходу. Біологічно активні антитіла мають певну активність на рівні 20%, 30% або 40%, та бажано принаймні 50%, 60% або 70% та ще бажаніше принаймні 80%, 90% або 95-100% від активності природного (несинтетичного), ендогенного і відомого антитіла. Методи аналізу та заходи визначення ферментної активності та субстратної специфічності добре відомі тим, хто має відповідну кваліфікацію в даній галузі науки.

В іншому аспекті, винахід стосується людських антитіл та антиген-зв'язуючих фрагментів, як це описано тут, які модифікуються за допомогою ковалентного приєднання органічних молекул. Така модифікація може продукувати антитіло або антиген-зв'язуючий фрагмент з поліпшеними фармакокінетичними властивостями (напр., збільшений сировотковий час півжиття *in vivo*). Органічна молекула може бути лінійною або розгалуженою гідрофільною полімерною групою, жирнокислотною групою або жирнокислотною ефірною групою. В окремому впровадженні, гідрофільна полімерна група може мати молекулярну вагу приблизно від 800 до приблизно 120000 Дальтон і може бути поліалкангліколем (напр., поліетиленгліколь (PEG), поліпропіленгліколь (PPG)), карбогідратним полімером, амінокислотним полімером або полівініловим піролідом, а жирнокислотні або жирнокислотні ефірні групи можуть містити від приблизно 8 до приблизно 40 атомів вуглецю.

Модифіковані антитіла та антиген-зв'язуючі фрагменти винаходу можуть містити одну або більше органічних молекул, що є ковалентно зв'язаними, прямо або непрямо, з антитілом. Кожна органічна молекула, що зв'язана з антитілом або антиген-зв'язуючим фрагментом винаходу може незалежно бути гідрофільною полімерною групою, жирнокислотною групою або жирнокислотною ефірною групою. Термін, що тут використовується, "жирна кислота" охоплює монокарбоксильні кислоти і дикарбоксильні кислоти. "Гідрофільна полімерна група", в якості терміну, що використовується тут, відноситься до органічного полімера, що є більш розчинним у воді, ніж в октані. Отже, антитіло модифіковане ковалентним приєднанням полілізіна охоплюється винаходом. Гідрофільні полімери, що підходять для модифікації антитіл винаходу, можуть бути лінійними або розгалуженими і включати, наприклад, поліалкалінгліколи (напр., PEG, монометокси-поліетиленгліколь (mPEG), PPG тощо), карбогідрати (напр., декстран, целюлоза, олігосахариди, полісахариди тощо), полімери гідрофільних амінокислот (напр., полілізин, поліаргінин, поліаспартат тощо), поліакаліноксиди (напр., поліетиленоксид, поліпропіленоксид тощо) та полівініл піролідон. Бажано, щоб гідрофільний полімер, який модифікує антитіло винаходу, мав молекулярну масу від приблизно 800 до 150000 Дальтон, в якості окремої молекули. Наприклад може використовуватися PEG5000 і PEG20000, де нижній індекс є середньою молекулярною вагою полімера в Дальтонах. Гідрофільна полімерна група може бути замінена від 1 до 6 алкільними, жирнокислотними та жирнокислотно ефірними групами. Гідрофільні полімери, що замінені жирнокислотною або жирнокислотно ефірною групою, можуть бути приготовлені за допомогою застосування належних методів. Наприклад, полімер, що містить амінну групу може бути зпареним з карбоксилатом жирної кислоти або жирнокислотного ефіру та активованим карбоксилатом (напр., активований за допомогою N,N-карбоніл діімідазола) на жирній кислоті або ефірі жирної кислоти може бути зпареним з гідроксильною групою на полімері.

Жирні кислоти та ефіри жирної кислоти, які підходять для модифікації антитіл винаходу, можуть бути сатуровані або можуть містити одну або більше одиницю несатурації. Жирні кислоти, що підходять для модифікації антитіл винаходу, включають, наприклад, п-додекаонат (C₁₂, лаурат), п-тетрадекаонат (C₁₄, мирістат), п-октадекаонат (C₁₈, стеарат), п-ейкозаноат (C₂₀, арахідат), п-докозаноат (C₂₂, бегенат), п-триаконтаноат (C₃₀), п-тетрактаноат (C₄₀), цис-Δ⁹-октадекааноат (C₁₈, олеат), всі цис-Δ^{5,8,11,14}-ейкозатетраеноат (C₂₀, арахідонат), октанедіоїєва кислота, тетрадеканедіоїєва кислота, октадеканедіоїєва кислота тощо. Відповідні ефіри жирних кислот включають моноефіри дикарбоксильних кислот, що містять лінійну або розгалужену нижню алкілову групу. Нижня алкілова група може містити від 1 до приблизно 12, бажано від 1 до 6, атомів вуглецю.

Модифіковані людські антитіла та антиген-зв'язуючі фрагменти можуть бути приготовлені з використанням належних методів, таких як реакція з одним або більше модифікованим агентом. "Модифікований агент", в якості використовуваного тут терміну, стосується належної органічної групи (напр., гідрофільний полімер, жирна кислота, ефір жирної кислоти), що містить активуючу групу. "Активуюча група" є хімічною молекулою або функціональною групою, що може, за певних умов, реагувати з другою хімічною групою, таким чином формуючи ковалентний зв'язок між модифікуючим агентом та другою хімічною групою. Наприклад, аміно-

реактивні активуючі групи включають електрофільні групи, такі як тозилат, мезилат, гало (хлоро, бромо, фторо, йодо), N-гідроксисукцинімідолові ефіри (NHS) тощо. Активуючі групи, що можуть реагувати з тіолами, включають, наприклад, малеїмід, йодоацетил, акрилоліль, піридил дисульфід, тіол 5-тіол-2-нітробензоєвої кислоти (TNB-тіол) тощо. Альдегідна функціональна група може бути зв'язана з аміно- або гідрозид-вміщуючими молекулами, а азидна група може реагувати з тривалентною фосфорною групою для формування фосфорамідатних або фосфорімідинових зв'язків. Належні методи для введення активуючих груп в молекулу відомі науці [див. наприклад, Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996)]. Активуюча група може бути зв'язана безпосередньо з органічною групою (напр., гідрофільний полімер, жирна кислота, ефір жирної кислоти) або через зв'язуючу молекулу, наприклад дивалентну групу C₁-C₁₂, де один або більше атомів вуглецю можуть бути замінені гетеро атомом, таким як кисень, азот, або сірка. Належні зв'язуючі молекули включають, наприклад, тетраетиленгліколь, -(CH₂)₃-, -NH-(CH₂)₆-NH-, -(CH₂)₂-NH та -CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH-NH-. Модифікуючі агенти, що містять зв'язуючу молекулу, можуть бути виготовлені, наприклад, за допомогою реакції моно-Вос-алкілдіаміна (напр., моно-Вос-етилендіаміна, моно-Вос-діаміногексана) з жирною кислотою за присутності 1-етил-3-(3-диетиламінопропіл) карбодіміда (EDC) для формування амідного зв'язку між жирним аміном та карбоксилатом жирної кислоти. Захисна група Вос може бути видалена з продукту за допомогою обробки трифторацетовою кислотою (TFA), що впливає на первинний амін, який може бути зв'язаний з іншим карбоксилатом, як це описано, або може реагувати з малеїмовим ангідридом, а результатом є продукт циклізується для продукування активованого малеїмідового похідного жирної кислоти. [Див. наприклад, Thompson, et al, WO 92/16221], повний виклад якого вміщено тут у посиланнях.

Модифіковані антитіла винаходу можуть бути виготовлені за допомогою реакції людського антитіла або антиген-зв'язуючого фрагмента з модифікуючим агентом. Наприклад, органічні молекули можуть бути зв'язані з антитілом у несайтоспецифічним спосіб за допомогою застосування амін-реактивного модифікуючого агента, наприклад, NHS ефіру PEG. Модифіковані людські антитіла або антиген-зв'язуючі фрагменти можуть також бути виготовлені за допомогою зменшення дисульфідних зв'язків (напр., міжланцюгові дисульфідні зв'язки) антитіла або антиген-зв'язуючого фрагмента. Редуковане антитіло або антиген-зв'язуючий фрагмент може потім реагувати з тіол-реактивним модифікуючим агентом для вироблення модифікованого антитіла винаходу. Модифіковані людські антитіла та антиген-зв'язуючі фрагменти, що містять органічну молекулу, яка може бути зв'язана зі специфічними місцями антитіла даного винаходу, може бути приготовлене з використанням належних методів, таких як реверсивний протеоліз [Fisch et al, *Bioconjugate Chem.*, 3: 147-153 (1992); Werlen et al, *Bioconjugate Chem.*, 5: 411-417 (1994); Kumaran et al, *Protein Sci.* 6(10): 2233-2241 (1997); Itoh et al, *Bioorg. Chem.*, 24(1): 59-68 (1996); Capellas et al, *Biotechnol. Bioeng.*, 56(4): 456-463 (1997)] та методи описані в Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996)].

Анти-ідіотипних антитіла до препаратів анти-ФНП антитіл

На додаток до моноклональних та химеричних анти-ФНП антитіл, даний винахід також стосується анти-ідіотипічного (анти-Ід) антитіла специфічних до антитіл винаходу. Анти-Ід антитіло є антитілом, яке розпізнає унікальні детермінанти, що загалом пов'язані з антиген-зв'язуючим регіоном іншого антитіла. Анти-Ід можуть бути вироблені за допомогою імунізації тварин такого ж виду та генетичного типу (напр., миші), як і ті, що є джерелом Ід антитіла, антитілом або його ДВР-вміщуючим регіоном. Імунізована тварина розпізнає та відповідає на ідіотипічні детермінанти імунізуючого антитіла і продукує анти-Ід антитіло. Анти-Ід антитіло може також використовуватися в якості "імуногена" для індукції імунної відповіді у ще однієї тварини, продукуючи так зване анти-анти-Ід антитіло.

Препарати анти-ФНП антитіла

Даний винахід також описує препарат принаймні одного анти-ФНП антитіла, що містить принаймні одне, принаймні два, принаймні три, принаймні чотири, принаймні п'ять, принаймні шість або більше анти-ФНП антитіл, як це описано тут та/або відомо в галузях науки, що описують неприродно виниклі складі, суміші або форми. Такі препарати містять неприродно виниклі складі, що містять принаймні 1 або 2 повної довжини, C-та/або N-термінально видалені варіанти, домени, фрагменти або певні варіанти амінокислотної послідовності анти-ФНП антитіла, що обрана з групи, яка містить 70-100% прилеглих амінокислот SEQ ID №№:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 або певні їхні фрагменти, домени чи антитіла. Бажано, щоб препарат анти-ФНП антитіла включав принаймні 1 або 2 повної довжини фрагменти, домени або варіанти принаймні однієї ДВР- або LDR-вміщуючої частини послідовності анти-ФНП антитіла з 70-100% SEQ ID №№:1, 2, 3, 4, 5, 6 або їхні певні фрагменти, домени чи варіанти. Подальші бажані композиції вміщують 40-99% принаймні одного з 70-100% SEQ ID №№:1,2, 3,4, 5, 6 або певних їхніх фрагментів, доменів чи варіантів. Такі відсотки складу є за вагою, об'ємом, концентрацією, молярністю або молярністю такими ж як рідкі або сухі розчини, суміші, суспензії або колоїди, як це відомо науці або описано тут.

Препарат анти-ФНП антитіла даного винаходу може містити принаймні одне з будь-якої відповідної та ефективної кількості складу або фармацевтичного препарату, що містить принаймні одне анти-ФНП антитіло до клітини, тканини, органу, тварини або пацієнта при потребі такої модуляції, лікування або терапії, що далі додатково містить принаймні одне обране з принаймні одного антагоніста ФНП (напр., але не тільки, антитіло або фрагмент антитіла до ФНП, розчинний рецептор або його фрагмент до ФНП, їхні зливної протеїни або малу молекулу антагоніста ФНП), антиревматичного препарату (напр., метотрексат, ауранофін, ауротіоглюкоза, азатіопрін, етанерсепт, натрієвий тіомалат золота, сульфат гідроксихлорохіна, лефлуномід, сульфасалазин), м'язового релаксанта, наркотика, нестероїдного протизапального препарату (НПЗП), анальгетика, анестетика, седативного, місцевого анестетика, нервово-м'язового блокатора, антимікробного препарату (напр., аміноглікозид, антигрибковий препарат, антипаразитарний препарат, антивірусний препарат, карбапенем, цефалоспорин, фторхінолон, макролід, пеніцилін, сульфонамід, тетрациклін, інші антимікробні препарати), антипсоріатичного препарату, кортикостероїда, анаболічного стероїда, діабетичних препаратів, мінералів, харчових додатків, тиреоїдних препаратів, вітамінів, гормонів, що регулюють обмін кальцію, антидіарейних, пратикашльових, антиеметиків, противиражкових препаратів, послаблюючих, антикоагулянтів, еритропоетину

(напр., епоетин альфа), філграстима (напр., G-CSF, Нейподжен), сарграмостиму (напр., GM-CSF, Лейкін), імунізації, імуносупресивного засобу (напр., базиликсимаб, циклоспорин, даклізумаб), гормону роста, гормоно-замісної терапії, модулятора естрогенових рецепторів, мудріатичних, циклоплегічних, алкілюючих засобів, антиметаболітиків, інгібіторів мітозу, радіоізотопних засобів, антидепресантів, антиміанічних препаратів, антипсихотиків, анксиолітиків, снодійних, симпатоміметиків, стимуляторів, донезепілу, такрину, астматичних препаратів, бета-агоністів, інгаляційних стероїдів, інгібіторів лейкотриєну, метилксантину, кромоліну, адреналіну або аналогу, дорнази альфа (Пульмозим), цитокіна або цитокінового антагоніста або антитіла. Необмежуючі приклади таких цитокінів включають, але не обмежуються, будь-які антитіла до IL-1 - IL-23. Відповідні дози добре відомі в науці. [Див., напр., Wells et al., eds., *Pharmacotherapy Handbook*, 2nd Edition, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000); PDR *Pharmacopoeia*, Tarascon Pocket *Pharmacopoeia* 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000)], посилання з кожної з цих робіт повністю включені тут у посиланнях.

Такі анти-пухлинні та анти-інфекційні препарати можуть також включати токсинові молекули, що поєднані, пов'язанні, сполучені або призначаються разом з принаймні одним антитілом даного винаходу. Токсин може додатково селективно знищувати патологічні клітини або тканини. Патологічна клітина може бути раковою або іншою клітиною. Такі токсини можуть бути, але не тільки, очищеними або рекомбінантними токсинами або фрагментами токсинів, що містять принаймні один функціональний цитотоксичний домен або токсин, напр., обраний принаймні з одного з наступного - рицин, дифтерійний токсин, зміїний токсин або бактеріальний токсин. Термін токсин також включає як ендотоксини, так і екзотоксини, що виробляються будь-якими природно виниклими, мутантними або рекомбінантними бактеріями чи вірусами, які можуть спричинити будь-який патологічний стан у людей та інших ссавців, включаючи токсиновий шок, що може призвести до смерті. Такі токсини можуть включати, але не обмежуючись, ентеротоксигенний тепло-лабільний ентеротоксин *E.coli* (LT), тепло-стійкий ентеротоксин (ST), цитотоксин *Shigella*, ентеротоксини *Aeromonas*, токсин токсичного шокowego синдрому - 1 (TSST-1), ентеротоксин стафілококовий типу А (SEA), В (SEB) або С (SEC), стрептококові ентеротоксини тощо. Такі бактерії включають, але не обмежуються, штами родів ентеротоксигенних *E.coli* (ETEC), ентерогеморрагічних *E.coli* (напр., штами серотипу O157:H7), стафілококові штами (напр., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes*), штами *Shigella* (напр., *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* та *Shigella sonnei*), штами *Salmonella* (напр., *Salmonella typhi*, *Salmonella cholerae-suis*, *Salmonella enteritidis*), штами *Clostridium* (напр., *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum*), штами *Campylobacter* (напр., *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter fetus*), штами *Helicobacter* (напр., *Helicobacter pylori*), штами *Aeromonas* (напр., *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*), *pleisomonas shigelloides*, *Yersina enterocolitica*, штами *Vibrios* (напр., *Vibrios cholerae*, *Vibrios parahemolyticus*), штами *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Streptococci*. [Див., напр., Stein, ed., *INTERNAL MEDICINE*, 3rd ed., pp.1-13, Little, Brown and Co., Boston, (1990); Evans et al., eds., *Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control*, 2^d Ed., pp.239-254, Plenum Medical Book Co., New York (1991); Mandell et al., *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 3^d Ed., Churchill Livingstone, New York (1990); Berkow et al., eds., *The Merck Manual*, 16th edition, Merck and Co., Rahway, N.J., 1992; Wood et al., *FEMS Microbiology Immunology*, 76: 121-134 (1991); Marrack et al., *Science*, 248 :705-711 (1990)], список посилань котрих повністю відображено тут у посиланнях.

Компоненти, препарати або комбінації анти-ФНП антитіла даного винаходу можуть окрім того містити принаймні один з будь-якої відповідної допоміжної речовини, такої як, але не тільки, розчинник, зв'язувач, стабілізатор, буфери, солі, ліпофільні розчинники, консерванти, ад'юванти тощо. Надається перевага фармацевтично прийнятним допоміжним речовинам. Деякі з прикладів та методів приготування таких стерильних розчинів добре відомі науці, такі як, але не обмежуючись, у [Gennaro, Ed., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition, Mack Publishing Co. (Easton, PA) 1990]. Фармацевтично прийнятні носії можуть бути рутинно обиратися серед тих, що відповідають способу введення, розчинності та/або стабільності анти-ФНП антитіла, фрагмента або варіанта складу, як це добре відомо в науці або описано тут.

Фармацевтичні добавки корисні у даному препараті включають, але не обмежуються, протеїни, пептиди, амінокислоти, ліпіди та карбогідрати (напр., цукри, включаючи моносахариди, ді-, три-, тетра та олігосахариди; похідні цукрів такі як алдитоли, алдонієві кислоти, естерифіковані цукри тощо; і полісахариди або полімери цукрів), які можуть бути присутніми самостійно чи в комбінації, що містить одне або в комбінації 1-99,99% за вагою або об'ємом. Типові протеїни включають сиворотковий альбумін, такі як людський сиворотковий альбумін (HSA), рекомбінантний людський альбумін (rHA), желатин, казеїн тощо. Репрезентативні компоненти амінокислот/антитіла, які також функціонують в буферних станах, включають аланін, гліцин, аргінін, бетаїн, гістидин, глютамову кислоту, аспартову кислоту, цистеїн, лізин, лейцин, ізолейцин, валін, метіонин, фенілаланін, аспартам тощо. Однією з бажаних амінокислот є гліцин.

Карбогідрати, що підходять до використання в даному винаході включають, наприклад, моносахариди, такі як фруктоза, мальтоза, галактоза, глюкоза, D-маноза, сорбоза тощо; дисахариди, такі як лактоза, сахароза, трегалоза, целобіоза тощо; полісахариди, такі як рафіноза, мелезитоза, мальтодекстрини, декстрини, крохмалі тощо; та алдитоли, такі як маннітол, ксилітол, мальтитол, лактитол, ксилітол сорбітол (глюцитол), міоїнозитол тощо. Бажаними карбогідратами для використання в даному винаході є манітол, трегалоза та рафіноза.

Препарати анти-ФНП антитіла також можуть включати буфер або рН-коригуючий агент; зазвичай, буфером є сіль, що виготовлена з органічної кислоти або луга. Репрезентативні буфери включають органічні кислотні солі, такі як солі лимонної кислоти, аскорбінової кислоти, глюконієвої кислоти, карбонієвої кислоти, тартарової кислоти, сукцинової кислоти, ацетової кислоти або фталієвої кислоти; Tris, трометаміна гідрохлорид або фосфатні буфери. Бажаними буферами для використання в даному винаході в даних складах є солі органічних кислот, такі як цитрат.

Додатково, препарати анти-ФНП антитіла винаходу можуть включати полімерні добавки, такі як полівінілпіролідони, фіколи (полімерний цукор), декстрини (напр., циклодекстрини, такі як 2-гідроксипропіл-β-

циклодекстрин), поліетилен гліколі, ароматичні засоби, антимікробні засоби, посолоджувачі, антиоксиданти, антистатичні засоби, сурфактанти (напр., полісорбати, такі як "TWEEN 20" та "TWEEN 80"), ліпіди (напр., фосфоліпіди, жирні кислоти), стероїди (напр., холестерин) та хелатні засоби (напр., ЕДТА).

Ці та інші фармацевтичні добавки, що підходять до використання в складах анти-ФНП антитіла, частинах або варіантах, згідно з винаходом є відомими в науці, напр., як це наводиться у ["Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19th ed., Williams & Williams, (1995) та у "Physician's Desk Reference", 52nd ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998)], що повністю вміщені тут у посиланнях. Бажаними носіями є карбогідрати (напр., сахариди та альдитоли) та буфери (напр., цитрат) або полімерні засоби.

Склад

Як зазначалося вище, винахід описує стабільні склади, які переважно містять фосфатний буфер з фізіологічним розчином або обраною сіллю, а також консервуючі розчини та склади, що містять консервант, а також консервуючі склади багаторазового використання для фармацевтичного чи ветеринарного використання, що містять принаймні одне анти-ФНП антитіло або додатково обрані речовини з групи, що складається з одного фенола, *m*-крезола, *p*-крезола, *o*-крезола, хлорокрезола, бензил алкоголя, нітрита фенілртуті, феноксиетанола, формальдегіда, хлоробутанола, магнія хлориду (напр., гексагідрат), алкілпарабена (метил, етил, пропіл, бутіл тощо), бензалконія хлориду, бензетоніума хлориду, натрія дегідроацетата та тримеросала або їх суміші у водному розчиннику. Може використовуватися будь-яка відповідна концентрація або суміш, як це відомо в науці, такі як 0,001-5%, або будь-який діапазон чи значення у вказаних межах, такі як, але не обмежуючись, 0,001, 0,003, 0,005, 0,009, 0,01, 0,02, 0,03, 0,05, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,3, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, або будь-які діапазони або значення у вказаних межах. Деякі приклади включають, без консервантів, 0,1-2% *m*-крезол (напр., 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,9, 1,0%), 0,1-3% бензил алкоголь (напр., 0,5, 0,9, 1,1, 1,5, 1,9, 2,0, 2,5%), 0,001-0,5% тимеросал (напр., 0,005, 0,01, 0,001-2,0% фенол (напр., 0,05, 0,25, 0,28, 0,5, 0,9, 1,0%), 0,0005-1,0% алкілпарабен(и) (напр., 0,00075, 0,0009, 0,001, 0,002, 0,005, 0,0075, 0,009, 0,01, 0,02, 0,05, 0,075, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,75, 0,9, 1,0%) тощо.

Як вказувалося вище, винахід описує предмети виробництва, що містять пакувальні матеріали та принаймні одну ампулу, що містить розчин принаймні одного анти-ФНП антитіла з відповідним буфером та/або консервантами, додатково у водному розчиннику, де вказаний пакувальний матеріал містить позначку, що вказує, що такий розчин може зберігатися протягом періоду 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 40, 48, 54, 60, 66, 72 і більше годин. Даний винахід окрім того містить предмети виробництва, що містять пакувальні матеріали, першу ампулу, яка містить принаймні одне ліофілізоване анти-ФНП антитіло та другу ампулу, що містить водний розчинник відповідного буфера або консерванта, де вказаний пакувальний матеріал містить позначку, яка інструктує пацієнта розчинити принаймні одне анти-ФНП антитіло у водному розчиннику для утворення розчину, що може зберігатися протягом періоду 24 годин або більше.

Принаймні одне анти-ФНП антитіло використовуване згідно з даним винаходом може вироблятися за допомогою рекомбінантних заходів, включаючи клітини ссавців та трансгенні препарати, або можуть бути очищені з інших біологічних джерел, як це описано тут або відомо в науці.

Діапазон принаймні одного анти-ФНП антитіла в продукті даного винаходу включає кількості, що утворюються при розведенні, якщо в вологій/сухій системі, концентрації від приблизно 1,0μг/мл до приблизно 1000μг/мл, хоча нижчі чи вищі концентрації також використовуються і залежать від способу планованого введення, напр., склади розчинів відрізнятимуться від трансдермальних пластрів, легеневих, трансслизових або осмотичних чи мікропомпових методів.

Бажано, щоб водні розчинники додатково містили фармацевтично прийнятні консерванти. Бажані консерванти включають ті, що обираються з групи, яка складається з фенола, *m*-крезола, *p*-крезола, *o*-крезола, хлорокрезола, бензил алкоголя, алкілпарабена (метил, етил, пропіл, бутіл тощо), бензалконіума хлориду, бензетоніума хлориду, натрію дегідроацетата і тимезорала або їхніх сумішей. Концентрація консерванта, що використовується в даному складі є такою, яка достатня для антимікробного ефекту. Такі концентрації залежать від обраного консерванта та добре визначаються підготовленими фахівцями.

Інші добавки, напр., ізотонічні засоби, буфери, антиоксиданти, покращуючі консерванти, можуть додатково і бажано додаватися у розчинник. Ізотонічний засіб, такий як гліцерин, часто використовуються у відомих концентраціях. Бажано додавати фізіологічно толерований буфер для забезпечення поліпшеного контролю рН. Склади можуть покривати широкий спектр рН, такий як від рН4 до приблизно рН10, а бажаний діапазон становить від приблизно рН5 до приблизно рН9, а найбільш бажаний діапазон становить від приблизно рН6,8 до приблизно 7,8. Бажані буфери включають фосфатні буфери, найбажаніше натрія фосфат, зокрема фосфатний буферний фізіологічний розчин (PBS).

Інші добавки, такі як фармацевтично прийнятні розчинники по типу Tween 20 (поліоксиетилен (20) сорбітан монолаурат), Tween 40 (поліоксиетилен (20) сорбітан монопальмітат), Tween 80 (поліоксиетилен поліоксипропілен блоковані кополімери) та PEG (поліетилен гліколь) або неіонні сурфактанти, такі як полісорбат 20 або 80 або полуксамер 184 чи 188, полілі Pluronic®, інші блоковані ко-полімери та хелатори, такі як EDTA та EGTA можуть додатково додаватися до складів для зменшення агрегації. Ці добавки зокрема корисні, якщо для введення засобу використовується помпа або пластиковий контейнер. Наявність фармацевтично прийнятного сурфактанта зменшує схильність протеїнів до агрегації.

Препарати даного винаходу можуть бути приготовлені за допомогою процесу, який містить принаймні одне анти-ФНП антитіло та консервант обраний з групи, яка складається з фенола, *m*-крезола, *p*-крезола, *o*-крезола, хлорокрезола, бензил алкоголя, алкілпарабена (метил, етил, пропіл, бутіл тощо), бензалконіума хлориду, бензетоніума хлориду, натрію дегідроацетата і тимезорала або їхніх сумішей у водному розчиннику. Змішування принаймні одного анти-ФНП антитіла та консерванта у водному розчиннику виконується з використанням стандартних процедур розчинення та змішування. Для приготування відповідного препарату, наприклад, відміряна кількість принаймні одного анти-ФНП антитіла в буферному розчині комбінується з бажаним консервантом в кількості, що достатня для забезпечення бажаних концентрацій протеїна та

консерванту. Варіації цього процесу можуть визначатися тим, хто є фахівцем у цій галузі. Наприклад, порядок додавання компонентів, чи додаються додаткові засоби, температура та рН при яких готується препарат, всі ці фактори можуть бути оптимізовані по використовуваним концентрації та засобам введення.

Заявлені препарати можуть надаватися пацієнтам у вигляді чистих розчинів або в якості двох ампул, що містять ампулу ліофілізованого принаймні одного анти-ФНП антитіла, яке розчиняється в другій ампулі, що містить воду, консервант та/або добавки, бажано фосфатний буфер та/або фізіологічний розчин і обрану сіль, у водному розчиннику. Як одна ампула з розчином, так і дві ампули, що потребують розчинення, можуть використовуватися багато разів та можуть бути достатнім для одноразового чи багаторазового циклів лікування пацієнта та, отже, можуть забезпечити зручніший режим лікування, ніж натепер доступні.

Дані заявлені предмети виробництва є корисними для призначення протягом періоду від негайного до 24-годинного або більше. Відповідно, дані заявлені предмети виробництва надають значні переваги пацієнтові. Препарати винаходу можуть додатково безпечно зберігатися при температурах від приблизно 2 до приблизно 40°C та утримувати біологічну дію протеїну на тривалі періоди часу, отже, дозволяють вказувати на пакувальних показниках, що розчин може зберігатися та/або використовуватися протягом періоду 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 або 96 годин чи більше. Якщо використано консервуючий розчинник, такі позначки можуть включати використання до 1-12 місяців, половини, півтора та/або двох років.

Розчини принаймні одного анти-ФНП антитіла в винаході можуть бути приготовані за допомогою процесу, що містить змішування принаймні одного антитіла у водному розчиннику. Змішування здійснюється з використанням традиційних процедур розчинення та змішування. Для приготування належного розчинника, наприклад, вимірювана кількість принаймні одного антитіла у воді або буфері комбінується в кількостях, що достатні для забезпечення бажаних концентрацій протеїну та додатково консерванту або буфера. Варіації цього процесу можуть визначатися тим, хто є фахівцем у цій галузі. Наприклад, порядок додавання компонентів, чи додаються додаткові засоби, температура та рН при яких готується препарат, всі ці фактори можуть бути оптимізовані по використовуваним концентрації та засобам введення.

Заявлені препарати можуть надаватися пацієнтам у вигляді чистих розчинів або в якості двох ампул, що містять ампулу ліофілізованого принаймні одного анти-ФНП антитіла, яке розчиняється в другій ампулі, що містить воду, консервант та/або добавки, бажано фосфатний буфер та/або фізіологічний розчин і обрану сіль, у водному розчиннику. Як одна ампула з розчином, так і дві ампули, що потребують розчинення, можуть використовуватися багато разів та можуть бути достатнім для одноразового чи багаторазового циклів лікування пацієнта та, отже, можуть забезпечити зручніший режим лікування, ніж натепер доступні.

Заявлені продукти можуть бути надані пацієнтам безпосередньо через забезпечення аптек, клінік або інших таких інституцій та закладів чистими розчинами або подвійними ампулами, що складаються з ампули з ліофілізованого принаймні одного анти-ФНП антитіла, яке розчиняється за допомогою другої ампули, що містить водний розчин. Чистий розчин у даному випадку може бути розміром до одного літра або навіть більше, що забезпечує великий резервуар з якого можуть одноразово чи багаторазово відбиратися менші частини розчину принаймні одного антитіла для перенесення у менші ампули та забезпечення аптек чи клінік для їхніх покупців та/або пацієнтів.

Визнані пристрої, що містять ці одноампульні системи включають такі ручко-інжекторні пристрої для введення розчину, як BD Pens, BD Autojector®, Humaject®, NovoPen®, B-D®Pen, AutoPen® та OptiPen®, GenotropinPen®, Genotronorm Pen®, Humatro Pen®, Reco-Pen®, Roferon Pen®, Biojector®, iject®, J-tip Needle-Free Injector®, Intraject®, Medi-Ject®, напр. такі як розроблені або створені Becton Dickenson (Franklin Lakes, NJ, www.bectondickenson.com). Disetronic (Burgdorf, Швейцарія, www.disetronic.com: Bioject, Портленд, Operon (www.bioject.com): National Medical Products, Weston Medical (Пітерборо, UK, www.weston-medical.com). Medic-Ject Corp (Міннеаполіс, MN, www.mediject.com). Визнані пристрої, що містять подвійно-ампульну систему включають такі ручко-інжекторні системи для розведення ліофілізованого препарату в картриджі для введення розведеного розчину, як HumatroPen®.

Продукти, що заявляються, включають пакувальний матеріал. Пакувальний матеріал надає, на додаток до інформації, яка вимагається регуляторними органами, умови за яких продукт має використовуватися. Пакувальний матеріал даного винаходу надає інструкції пацієнту по розведенню принаймні одного анти-ФНП антитіла у водному розчиннику для утворення розчину та використання розчину протягом періоду 2-24 годин та більше для двох ампул, волога/суха, продукта. Для однієї ампули, розчинений продукт, показник вказує, що такий розчин може використовуватися протягом періоду 2-24 години або більше. Даний продукт, що заявляється, є корисним для використання в якості людського фармацевтичного продукту.

Препарати даного винаходу можуть бути приготовлені за допомогою процесу, що містить принаймні одне анти-ФНП антитіло та обраний буфер, бажано фосфатний буфер, який містить фізіологічний розчин або обрану сіль. Змішування принаймні одного антитіла та буфера у водному розчиннику здійснюється з використанням традиційних процедур розчинення та змішування. Для приготування належного розчинника, наприклад, вимірювана кількість принаймні одного антитіла у воді або буфері комбінується в кількостях, що достатні для забезпечення бажаних концентрацій протеїну та додатково консерванту або буфера. Варіації цього процесу можуть визначатися тим, хто є фахівцем у цій галузі. Наприклад, порядок додавання компонентів, чи додаються додаткові засоби, температура та рН при яких готується препарат, всі ці фактори можуть бути оптимізовані по використовуваним концентрації та засобам введення.

Заявлені стабільні або законсервовані препарати можуть надаватися пацієнтам в якості чистих розчинів або в якості подвійних ампул, що містять ампулу ліофілізованого принаймні одного анти-ФНП антитіла, яке розводиться другою ампулою, що містить консервант або буфер та добавки у водному розчиннику. Як одна ампула з розчином, так і дві ампули, що потребують розчинення, можуть використовуватися багато разів та можуть бути достатнім для одноразового чи багаторазового циклів лікування пацієнта та, отже, можуть забезпечити зручніший режим лікування, ніж натепер доступні.

Принаймні одне анти-ФНП антитіло як в стабільних, так і у законсервованих препаратах або розчинах, що описані тут, можуть бути призначені пацієнтові згідно з даними винаходом за допомогою різноманітних

методів введення таких як підшкірні або внутрішньом'язові ін'єкції; трансдермальні, легеневі, трансмукозальні, імплантовані, осмотичні помпи, картриджи, мікропомпи або інші засоби, що оцінені кваліфікованими фахівцями, як це добре відомо в даній галузі.

Терапевтичне застосування

Даний винахід також надає метод модуляції або лікування принаймні одного захворювання залежного від ФНП в клітинах, тканинах, органах, тваринах або пацієнтах, як це відомо в науці або описано тут, з використанням одного ФНП антитіла даного винаходу.

Даний винахід також надає метод модуляції або лікування принаймні одного захворювання залежного від ФНП в клітинах, тканинах, органах, тваринах або пацієнтах включаючи, але не обмежуючись, принаймні одне з такого - ожиріння, імунно-залежні захворювання, серцево-судинні захворювання, інфекційні захворювання або неврологічні захворювання.

Даний винахід також надає метод модуляції або лікування принаймні одного захворювання залежного від ФНП в клітинах, тканинах, органах, тваринах або пацієнтах включаючи, але не обмежуючись, принаймні одне з такого - ревматоїдний артрит, ювенільний ревматоїдний артрит, ювенільний ревматоїдний артрит з системним початком, псоріатичний артрит, анкілозуючий спондиліт, виразка шлунка, серонегативні артропатії, остеоартрит, запальні захворювання кишковика, виразковий коліт, системний червоний вовчак, антифосфоліпідний синдром, іридоцикліт/увеїт/неврит зорового нерву, ідіопатичний легеневий фіброз, системний васкуліт/гранульоматоз Вегенера, саркоїдоз, орхіт/процедури зворотної вазектомії, алергічні/атопічні захворювання, астма, алергічні риніти, екзема, алергічний контактний дерматит, алергічний кон'юнктивіт, гіперчутливий пневмоніт, трансплантанти, відторгнення трансплантованого органу, захворювання по типу шунт-проти-господаря, синдром системної запальної відповіді, септичний синдром, грам-позитивний сепсис, грам-негативний сепсис, культуро-негативний сепсис, грибовий сепсис, нейтропенічна лихоманка, уросепсис, менінгококемія, травма/кровотеча, опіки, опромінення іонізуючою радіацією, гострий панкреатит, гострий респіраторний дистрес-синдром у дорослих, ревматоїдний артрит, алкоголь-індукований гепатит, хронічні запальні процеси, саркоїдоз, хвороба Крона, серповидно-клітинна анемія, діабет, нефрох, атопічні захворювання, реакції гіперчутливості, алергічний риніт, сінна лихоманка, переніальний риніт, кон'юнктивіт, ендометріоз, астма, кропивниця, системна анафілаксія, дерматит, перниціозна анемія, гемолітичні захворювання, тромбоцитопенія, відторгнення трансплантата або будь-якого органа чи тканини, реакції відторгнення трансплантованих нирок, реакція відторгнення трансплантованого серця, реакція відторгнення трансплантованої печінки, реакція відторгнення трансплантованої підшлункової залози, реакція відторгнення трансплантованих легенів, реакція відторгнення трансплантованого кісткового мозку (ТКМ), відторгнення шкідливого трансплантата, відторгнення хрящового трансплантата, відторгнення кісткового трансплантата, відторгнення трансплантованого тонкого кишковика, відторгнення імплантованого тимуса плода, відторгнення паратиреоїдного трансплантата, відторгнення ксенотрансплантата будь-якого органа або тканини, відторгнення алотрансплантата, реакції антирецепторної гіперчутливості, хвороба Грейвса, хвороба Рейно, інсуліно-резистентний діабет типу В, астма, *myasthenia gravis*, антитіло-опосередкована цитотоксичність, реакції гіперчутливості типу III, системний червоний вовчак, синдром POEMS (полінейропатія, органомегалія, ендокринопатія, моноклональна гамопатія та синдром змін шкіри), полінейропатія, органомегалія, ендокринопатія, моноклональна гамопатія, змішане захворювання сполучної тканини, ідіопатична хвороба Аддісона, цукровий діабет, хронічний активний гепатит, первинний біліарний цирроз, вітіліго, васкуліт, синдром постінфарктної кардіотомії, гіперчутливість типу IV, контактний дерматит, пневмоніт гіперчутливості, відторгнення алотрансплантату, гранульома внаслідок внутріклітинних організмів, медикаментозна чутливість, метаболічна/ідіопатична, хвороба Вільсона, гемохроматоз, дефіцит альфа-1-антитрипсина, діабетична ретинопатія, тиреоїдит Гашимото, остеопороз, дослідження гіпоталамо-гіпофізо-аренальної осі, первинний біліарний цирроз, тиреоїдит, енцефаломієліт, кахексія, кістозний фіброз, хронічні легеневі захворювання новонароджених, хронічні обструктивні захворювання легень (ХОЗЛ), сімейний гепатофагоцитарний лімфогістиоцитоз, дерматологічні стани, псоріаз, алопеція, нефротичний синдром, нефрит, гломерулярний нефрит, гостра ниркова недостатність, гемодіаліз, уремія, токсичність, преекамсія, окт3 терапія, анти-са3 терапія, лікування цитокінами, хіміотерапія, радіаційна терапія (напр., включаючи, але не обмежуючись, тоастенія, анемія, кахексія тощо), хронічна інтоксикація саліцилатами тощо. [Див., напр., Merck Manual, 12th-17th Editions, Merck & Company, Rahway, NJ (1972, 1977, 1982, 1987, 1992, 1999), Pharmacotherapy Handbook, Wells et al., eds., Second Edition, Appleton and Lange, Stamford, Conn. (1998, 2000)], кожний з яких повністю включений тут у посиланнях.

Даний винахід також надає метод модуляції або лікування принаймні одного серцево-судинного захворювання в клітинах, тканинах, органах, тваринах або пацієнтах включаючи, але не обмежуючись, принаймні одне з такого - синдром кардіального оглушення, інфаркт міокарда, застійна серцева недостатність, інсульт, ішемічний інсульт, кровотеча, артеріосклероз, атеросклероз, рестеноз, діабетичне атеросклеротичне захворювання, гіпертензія, артеріальна гіпертензія, реноваскулярна гіпертензія, синкопе, шок, сифіліс серцево-судинної системи, серцева недостатність, легеневе серце, первинна легенева гіпертензія, аритмії серця, передсердні ектопічні скорочення, тріпотіння передсердь, фібриляція передсердь (стійка або пароксизмальна), постперфузійний синдром, запальна відповідь на серцево-легеневе шунтування, хаотична або мультифокальна передсердна тахікардія, звичайна тахікардія з вузькими комплексами QRS, певні аритмії, фібриляція шлуночків, аритмії з пучка Пса, атріовентрикулярна блокада, блокада ніжок пучка Пса, ішемічні міокардіальні порушення, ішемічна хвороба серця, стабільна стенокардія, інфаркт міокарда, кардіоміопатія, дилатаційна застійна кардіоміопатія, рестриктивна кардіоміопатія, клапанні захворювання серця, ендокардит, захворювання перикарда, пухлини серця, аортальні та периферичні аневризми, розшарування аорти, запалення аорти, оклюзія абдомінальної аорти та її гілок, периферичні судинні розлади, оклюзивні артеріальні розлади, атеросклеротичне захворювання периферичних судин, облітеруючий тромбоемболізм, функціональні розлади периферичних артерій, феномен і захворювання Рейно, акроціаноз, еритромегалія, венозні захворювання, венозний тромбоз, варикозні вени, артеріовенозна фістула, лімфодерма, ліподема,

нестабільна стенокардія, реперфузійне пошкодження, пост-насосний синдром, ішемічно-реперфузійне пошкодження тощо. Такий метод може додатково містити введення ефективної кількості складу або фармацевтичного препарату, що містить принаймні одне анти-ФНП антитіло, в клітину, тканину, орган, тварину або пацієнта при потребі такої модуляції або лікування.

Даний винахід також надає метод модуляції або лікування принаймні одного інфекційного захворювання в клітинах, тканинах, органах, тваринах або пацієнтах включаючи, але не обмежуючись, принаймні одне з такого - гостра або хронічна бактеріальна інфекція, гострі та хронічні паразитарні або інфекційні процеси, включаючи бактеріальні, вірусні та грибові інфекції, ВІЛ інфекція/ВІЛ нейропатія, менінгіт, гепатит (А, В або С тощо), септичний артрит, перитоніт, пневмонія, епіглотит, *E. coli* 0157:h7, гемолітичний уремічний синдром/тромболітична тромбоцитопенічна пурпура, малярія, геморагічна тропічна лихоманка, лейшманіоз, лепра, токсичний шокковий синдром, стрептококовий міозит, газова гангрена, мікобактеріальний туберкульоз, внутрішньоклітинна *Mycobacterium avium*, пневмонія *Pneumocystis carinii*, запальне захворювання тазових органів, орхіт/епідідиміт, леґіонела, хвороба Лайма, грип типу А, вірус Епштейна-Барр, гемафагоцитарний синдром сумісний з життям, енцефаліт/асептичний менінгіт тощо.

Даний винахід також надає метод модуляції або лікування принаймні одного злоякісного захворювання в клітинах, тканинах, органах, тваринах або пацієнтах включаючи, але не обмежуючись, принаймні одне з такого - лейкомія, гостра лейкомія, гостра лімфобластна лейкомія (ГЛЛ), В-клітинна, Т-клітинна або FAB ALL, гостра мієлоїдна лейкомія (ГМЛ), хронічна мієлоцитарна лейкомія (ХМЛ), хронічна лімфоцитарна лейкомія (ХЛЛ), волосато-клітинна лейкомія, мієлодиспластичний синдром (МДС), лімфома, хвороба Годжкіна, злоякісна лімфома, не-годжкінська лімфома, лімфома Борккіта, множинна мієлома, саркома Калощі, колоректальна карцинома, панкреатична карцинома, назофарингеальна карцинома, злоякісний гістіоцитоз, паранеопластичний синдром/гіперкальцемія злоякісності, безпорожнинні пухлини, аденокарциноми, саркоми, злоякісна меланома, гемангіома, метастатична хвороба, рако-залежна резорпція кісток, рако-залежний біль у кістках тощо.

Даний винахід також надає метод модуляції або лікування принаймні одного злоякісного захворювання в клітинах, тканинах, органах, тваринах або пацієнтах включаючи, але не обмежуючись, принаймні одне з такого - нейродегенеративні захворювання, множинний склероз, мігренозний головний біль, комплекс СНІД деменція, демінієлізуючі захворювання, такі як множинний склероз та гострий поперечний мієліт; екстрапірамідні та мозочкові захворювання, такі як пошкодження кортикоспінальної системи; розлади базальних гангліїв або мозочкові порушення; гіперкінетичні рухові порушення, такі як хорея Гантінгтона та сенільна хорея; медикаментозно-індуковані рухові порушення, такі як ті, що індуковані препаратами, котрі блокують допамінові рецептори ЦНС; гіпокінетичні рухові розлади, такі як хвороба Паркінсона; прогресуючий супраядерний параліч; структурні розлади мозочка; спіномозочкові дегенерації, такі як спінальна атаксія, атаксія Фрідрайха, мозочкова кортикальна дегенерація, множинні системні дегенерації (Mencel, Dejerine-Thomas, Shi-Drager та Machado-Joseph); системні розлади (хвороба Рефсама, абеталіпопротеїнемія, атаксія, телангіектазія та мітохондріальний багатосистемний розлад); демієлінізуючі ядерні розлади, такі як множинний склероз, гострий поперечний мієліт; та розлади моторних складових, такі як нейрогенна м'язова атрофія (дегенерація клітин переднього рогу, така як аміотрофічний боковий склероз, спінальна м'язова атрофія немовлят та ювенільна спінальна м'язова атрофія); хвороба Альцгеймера; синдром Дауна у середньому віці; дифузне захворювання Леві; сенільна деменція типу Леві; синдром Верніке-Корсаковфа; хронічний алкоголізм; хвороба Кройтцфельда-Якоба; підгострий склерозуючий паненцефаліт, хвороба Hallerorden-Spatz; і dementia pugilistica тощо. Такий метод може додатково включати введення ефективної кількості складу або фармацевтичного препарату, що містить принаймні одне антитіло до ФНП або певної його частини чи варіанта, в клітину, тканину, орган, тварину або пацієнта при потребі такої модуляції або лікування. [Див., напр., Merck Manual, 16th Edition, Merck & Company, Rahway, NJ (1992)].

Будь-який метод даного винаходу може включати введення ефективної кількості композиції або фармацевтичного препарату, що містить принаймні одне анти-ФНП антитіло, в клітину, тканину, орган, тварину або пацієнта при потребі такої модуляції або лікування. Такий метод може додатково включати супутнє призначення або комбіновану терапію для лікування таких імунних захворювань, де призначення вищеназваного принаймні одного анти-ФНП антитіла, певної його частини чи варіанта, окрім того містить введення до, одночасно та/або після принаймні одного засобу з принаймні одного антагоніста ФНП (напр., але не обмежуючись, антитіло або фрагмент до ФНП, розчинний рецептор або фрагмент до ФНП, їхні зливні протеїни або мала молекула антагоніста ФНП), антиревматичного засобу (напр., метотрексат, ауранофін, ауротіоглюкоза, азатіопрін, етанерсепт, тіомалат натрія золота, гідроксихлорохіна сульфат, лефлуномід, сульфасалазин), м'язового релаксанта, наркотичного препарату, нестероїдного протизапального препарату (НПЗП), анальгетичного препарату, анестетичного препарату, седативного препарату, місцевого анестетика, нервово-м'язового блокатора, антимікробного засобу (напр., аміноглікозид, антигрибковий препарат, антипаразитарний препарат, антивірусний препарат, карбапенем, цефалоспорин, фторхінолон, макролід, пеніцилін, сульфонамід, тетрациклін, інший антимікробний препарат), антипсоріатичного засобу, кортикостероїда, анаболічного стероїду, діабетологічного препарату, мінералу, харчового додатку, тиреоїдного препарату, вітаміну, кальцій-залежного гормону, антидіарейного засобу, протикашльового препарату, антиеметика, противіразкового препарату, послаблюючого, антикоагулянта, еритропоетина (напр., епоетин альфа), філграстима (напр., G-CSF, Нейподжен), сарграмостиму (напр., GM-CSF, Лейкін), імунізації, імуносупресивного засобу (напр., базиліксимаб, циклоспорин, даклізумаб), гормону росту, гормоно-замісної терапії, модулятора естрогенових рецепторів, мудріатичних, циклоплегічних, алкілюючих засобів, антиметаболітиків, інгібіторів мітозу, радіоізотопних засобів, антидепресантів, антиманічних препаратів, антипсихотиків, анксиолітиків, снодійних, симпатоміметиків, стимуляторів, донезепілу, такрину, астматичних препаратів, бета-агоністів, інгаляційних стероїдів, інгібіторів лейкоїториєну, метилксантину, кромоліну, адреналіну або аналогу, дорнази альфа (Пульмозим), цитокіна або цитокінового антагоніста або антитіла. Відповідні дози добре відомі в науці. [Див., напр., Wells et al., eds., Pharmacotherapy Handbook, 2nd Edition,

Appleton and Lange, Stamford, CT (2000); PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000), посилання з кожної з цих робіт повністю включені тут у посиланнях.

Антагоністи ФНП, що підходять для препаратів, комбінованого лікування, супутнього призначення, пристроїв та/або методів даного винаходу (що містять принаймні одне антитіло даного винаходу, певну його частину або варіант), включають, але не обмежуються, анти-ФНП антитіла, їхні антиген-зв'язуючі фрагменти і рецепторні молекули, які специфічно зв'язуються з ФНП; компоненти, які перешкоджають та/або пригнічують синтез ФНП, вивільнення ФНП або його дію на цільові клітини, такі як талідомід, тенідап, інгібітори фосфодієстерази (напр., пентоксифілін та роліпрам), агоністи аденозинового рецептора A2b та посилювачі аденозинового рецептора A2b; компоненти, які попереджають та/або пригнічують сигнальну систему рецептора до ФНП, такі як інгібітори кінази мітоген активованого протеїна (MAP); компоненти, що блокують та/або пригнічують активність ФНП, такі як інгібітори ангіотензин-перетворюючого ферменту (АПФ) (напр., каптоприл); та компоненти, що блокують та/або пригнічують продукцію та/або синтез ФНП, такі як інгібітори MAP кінази.

"Антитіло до фактору некрозу пухлини", "антитіло до ФНП", "антитіло до ФНП α " або фрагменти тощо, як тут використовується, зменшують, блокують, пригнічують, припиняють або перешкоджають діяльності ФНП α *in vitro*, *in situ* та/або бажано *in vivo*. Наприклад, відповідне людське антитіло до ФНП даного винаходу може зв'язувати ФНП α та включає анти-ФНП антитіла, їхні антиген-зв'язуючі фрагменти та певні їхні мутанти або домени, що специфічно зв'язуються з ФНП α . Належне антитіло або фрагмент до ФНП може також зменшити, блокувати, припиняти, перешкоджати та/або пригнічувати синтез РНК, ДНК або протеїну ФНП, вивільнення ФНП, сигнальну систему рецептора до ФНП, мембранне розщеплення ФНП, діяльність ФНП, продукцію та/або синтез ФНП.

Химеричне антитіло сA2 містить антиген-зв'язуючий варіабельний регіон високо-афінного нейтралізуючого мишиного антилюдського антитіла IgG1 до ФНП α , позначений A2, та постійні регіони людського IgG1, каппа імунноглобулін. Fc регіон людського IgG1 покриває аллогенну ефекторну функцію антитіла, підвищує час півжиття циркуляції у сировотці та зменшує імунногенність антитіла. Спорідненість та епітопна специфічність химеричного антитіла сA2 походить з варіабельного регіону мишиного антитіла A2. В окремому впровадженні, бажаним джерелом нуклеїнових кислот, що кодують варіабельний регіон мишиного антитіла A2, є клітинна лінія гібридоми A2.

Химеричне A2 (сA2) нейтралізує цитотоксичний ефект як природного, так і рекомбінантного людського ФНП α у дозо-залежний спосіб. З аналізу зв'язування химеричного антитіла сA2 та рекомбінантного людського ФНП α , константа афінності химеричного антитіла сA2 була визначена як $1,04 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$. Бажані методи для визначення специфічності та афінності моноклонального антитіла за допомогою конкурентного пригнічення можуть бути знайдені в [Harlow, et al., antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1988; Colligan et al., eds., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. And Wiley Interscience, New York, (1992-2000); Kozbor et al., Immunol. Today, 4: 12-19 (1983); Ausubel et al., eds. Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York (1987-2000); та Muller, Meth. Enzymol, 92: 589-601 (1983)], посилання котрих повністю включені тут у посиланнях.

В окремому впровадженні, мишине моноклональне антитіло A2 виробляється клітинною лінією, що позначається с134A. Химеричне антитіло сA2 виробляється клітинною лінією, що позначається с168A.

Додаткові приклади моноклональних анти-ФНП антитіл, що можуть бути використані в даному винаході, описані в науці [див., напр., патент США №5,231,024; МБІег, А. Et al, Cytokine 2(3): 162-169 (1990); заявка США №07/943,852 (zareєстровано 11 вересня 1992); Rathjen et al., міжнародна публікація №WO 91/02078 (опубліковано 21 лютого 1991); Rubin et al, патентна публікація ЕРО №0 218 868 (опубліковано 22 квітня 1987); Yone et al., патентна публікація ЕРО №0 288 088 (26 жовтня 1988); Liang, et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 757: 847-854 (1986); Meager, et al., Hybridoma 6: 305-311 (1987); Fendly et al., Hybridoma 6: 359-369 (1987); Bringman, et al., Hybridoma (5): 489-507 (1987); та Hirai, et al., J. Immunol. Meth. 96: 51-62 (1987)], посилання на котрі повністю включені тут у посиланнях.

Молекули рецептора до ФНП

Бажані молекули рецептора до ФНП корисні в даному винаході є тими, що зв'язують ФНП α з високою афінністю [див., напр., Feldmann et al., міжнародна публікація №WO 92/07076 (опубліковано 30 квітня 1992); Schall et al., Cell 61: 361-310 (1990); та Loetscher et al., Cell 67: 351-359 (1990), посилання на котрі повністю включені тут у посиланнях] та додатково мають низьку імунногенність. Зокрема, 55кДа (p55 ФНП-R) та 75кДа (p75 ФНП-R) рецептори до ФНП на поверхні клітин є корисними в даному винаході. Обмежені форми цих рецепторів, що містять екстрацелюлярні домени (ЕЦД) рецепторів або їхніх функціональних частин [див., напр., Corcoran et al., Eur. J. Biochem. 225: 831-840 (1994)] є також корисними в даному винаході. Обмежені форми рецепторів до ФНП, що містять ЕЦД, були виявлені у сечі та сировотці, в якості 30кДа та 40кДа інгібіторно-зв'язуючих протеїнів до ФНП α [Engelmann, H. et al., J. Biol Chem. 265: 1531-1536 (1990)]. Мультимеричні молекули рецептора до ФНП та зливні молекули імунорецептора до ФНП та їхні похідні і частини є додатковими прикладами молекул рецептора до ФНП, які є корисними в методах та препаратах даного винаходу. Молекули рецептора до ФНП, які можуть бути використані у винаході характеризовані по їхній здатності лікувати пацієнтів протягом подовженого періоду часу з добрим або прекрасним послабленням симптоматики і низькою токсичністю. Низька імунногенність та/або висока афінність, а також інші невизначені властивості, можуть робити внесок до досягнутих терапевтичних результатів.

Мультимеричні молекули рецептора до ФНП корисні в даному винаході містять весь або функціональну частину ECD двох або більше рецепторів до ФНП пов'язані через один або більше поліпептидний поєднувач або інші непептидні поєднувачі, такі як поліетилен гліколь (PEG). Мультимеричні молекули можуть окрім того містити сиганльний пептид секретованого протеїна для спрямування експресії мультимеричної молекули. Ці мультимеричні молекули та методи їхнього виготовлення були описані у [Заявці США №08/437,533 (zareєстровано 9 травня 1995)], зміст якої повністю включений тут у посиланнях.

Зливні молекули імунорецептора до ФНП, що є корисними в методах та складах даного винаходу, містять принаймні одну частину однієї або більше імунноглобулінових молекул та всіх або функціональної частини одного або більше рецептора до ФНП. Ці зливні молекули імунорецепторів можуть бути мономерними або гетеро- чи гомомультимерами. Зливні молекули імунорецепторів можуть також бути моновалентними або мультивалентними. Прикладом такої зливної молекули імунорецептора до ФНП є рецептор до ФНП/зливний протеїн IgG. Зливні молекули імунорецептора до ФНП та методи їхнього виробництва були описані в науці [Lesslauer et al., Eur. J. Immunol. 27: 2883-2886 (1991); Askenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA &S:10535-10539 (1991); Peppel et al., J. Exp. Med. 174: 1483-1489 (1991); Kolls et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 215-219 (1994); Butler et al, Cytokine 6(6): 616-623 (1994); Baker et al, Eur. J. Immunol 24: 2040-2048 (1994); Beutler et al, патент США №5,447,851; та Заявка США №08/442,133 (zareєстровано 16 травня 1995)], посилання на кожне з яких повністю включено тут у посиланнях. Методи виробництва зливних молекул імунорецептора можуть бути також знайдені у [Caron et al., Nature 337: 525-531 (1989)], посилання на котре повністю включено тут у посиланнях.

Функціональний еквівалент, похідне, фрагмент або регіон молекули рецептора до ФНП відноситься до частини молекули рецептора до ФНП або частини молекулярної послідовності рецептора до ФНП, що кодує молекулу рецептора до ФНП, що є достатньої величини та послідовності для відтворення молекул рецептора до ФНП, які можуть бути використані в даному винаході (напр., зв'язують ФНП з високою афінією та при низькій імунногеності). Функціональний еквівалент молекули рецептора до ФНП також включає модифіковані молекули рецептора до ФНП, що функціонально схожі на молекули рецептора до ФНП, які можуть бути використані в даному винаході (напр., зв'язують ФНП з високою афінією та при низькій імунногеності). Напр., функціональний еквівалент молекули рецептора до ФНП може містити кодон "SILENT" ("ТИША") або одну чи більше амінокислотних замінів; або заміну одного кодону, що кодує однакові або різні гідрофобні амінокислоти для іншого кодону, який кодує гідрофобні амінокислоти). [Див. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience, New York (1987-2000)].

Цитокіни включають будь-який відомий цитокін. [Див., напр., [SorewithCytokines.com](http://www.SorewithCytokines.com).] Антагоністи цитокінів включають, але не обмежуються, будь-яке антитіло, фрагмент або міметик, будь-який розчинний рецептор, фрагмент або міметик, будь-яку малу молекулу антагоніста або будь-яку їхню комбінацію.

Терапевтичне лікування. Будь-який метод даного винаходу може містити метод лікування розладів опосередкованих ФНП, що включає введення ефективної кількості складу або фармацевтичного препарату, який містить принаймні одне анти-ФНП антитіло в клітину, тканину, орган, тварину або пацієнта, при потребі такої модуляції або лікування. Такий метод може додатково окрім того включати супутнє призначення або комбіновану терапію для лікування таких імунних захворювань, де призначення вищевказаного принаймні одного анти-ФНП антитіла, певної його частини чи варіанта, окрім того включає призначення до, під час та/або після принаймні одного, що обране з принаймні з одного антагоніста ФНП (напр., але не обмежуючись, антитілом до ФНП або фрагментом, розчинний рецептор до ФНП або фрагмент, їхні зливні протеїни або малу молекулу антагоніста ФНП), антиревматичного засобу (напр., метотрексат, ауранофін, ауруглюкоза, азатіоприн, етанерсепт, натрія тіомалат золота, гідроксихлорохіна сульфат, лефлуномід, сульфасалазин), м'язового релаксанта, наркотиків, нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗП), анальгетиків, анестетиків, седативного препарату, місцевого анестетика, нервово-м'язового блокатора, антимікробного засобу (напр., аміноглікозид, антигрибковий препарат, антипаразитарний препарат, антивірусний препарат, карбапенем, цефалоспорин, фторхінолон, макролід, пеніцилін, сульфонамід, тетрациклін, інший антимікробний препарат), антипсоріатичного засобу, кортикостероїда, анаболічного стероїда, діабетологічного препарату, мінерала, харчового додатку, тиреоїдного препарату, вітаміна, кальцій-залежного гормону, антидіарейного засобу, протикашльового препарату, антиеметика, противиразкового препарату, послаблюючого, антикоагулянта, еритропоетина (напр., епоетин альфа), філграстима (напр., G-CSF, Нейподжен), сарграмостиму (напр., GM-CSF, Лейкін), імунізації, імуносупресивного засобу (напр., базиліксимаб, циклоспорин, даклізумаб), гормону роста, гормоно-замісної терапії, модулятора естрогенових рецепторів, мудріатичних, циклоплегічних, алкілюючих засобів, антиметаболіків, інгібіторів мітозу, радіоізотопних засобів, антидепресантів, антиманічних препаратів, антипсихотиків, анксиоліків, снодійних, симпатоміметиків, стимуляторів, донезепілу, такрину, астматичних препаратів, бета-агоністів, інгаляційних стероїдів, інгібіторів лейкаториєну, метилксантину, кромоліну, адреналіну або аналогу, дорнази альфа (Пульмозим), цитокіна або цитокінового антагоніста або антитіла.

Зазвичай, лікування патологічних станів здійснюється за допомогою введення ефективної кількості або дози препарату принаймні одного анти-ФНП антитіла, що всього, в середньому, в діапазоні від принаймні приблизно 0,01 до 500 міліграм принаймні одного анти-ФНП антитіла на кілограм ваги пацієнта на дозу, та бажано від принаймні приблизно 0,1 до 100 міліграм антитіла/кілограм ваги пацієнта на одноразове або багаторазове введення, залежно від певної активності, що міститься в даному препараті. Альтернативно, ефективна сировоткова концентрація може містити 0,1-5000µг/мл сировоткової концентрації на одноразове чи багаторазове введення. Належні дози відомі практикуючим медпрацівникам та, звісно, залежатимуть від окремого хворобливого стану, певної активності препарату, що вводиться, та окремого пацієнта, якому проводиться лікування. В деяких випадках, для досягнення бажаної терапевтичної кількості може бути необхідним повторне введення, тобто, повторні індивідуальні введення окремо дози, що монітується чи вимірюється, де індивідуальні введення повторюються доки не буде досягнуто бажана добова доза або ефект.

Бажані дози можуть додатково включати 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 та/або 100-500мг/кг/введення або будь-який їхній діапазон, значення або фракція, або до досягнення сировоткової концентрації 0,1, 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,5, 1,9, 2,0, 2,5, 2,9, 3,0, 3,5, 3,9, 4,0, 4,5, 4,9, 5,0, 5,5, 5,9, 6,0, 6,5, 6,9,

7,0, 7,5, 7,9, 8,0, 8,5, 8,9, 9,0, 9,5, 9,9, 10, 10,5, 10,9, 11, 11,5, 11,9, 20, 12,5, 12,9, 13,0, 13,5, 13,9, 14,0, 14,5, 4,9, 5,0, 5,5, 5,9, 6,0, 6,5, 6,9, 7,0, 7,5, 7,9, 8,0, 8,5, 8,9, 9,0, 9,5, 9,9, 10, 10,5, 10,9, 11, 11,5, 11,9, 12, 12,5, 12,9, 13,0, 13,5, 13,9, 14, 14,5, 15, 15,5, 15,9, 16, 16,5, 16,9, 17, 17,5, 17,9, 18, 18,5, 18,9, 19, 19,5, 19,9, 20, 20,5, 20,9, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 96, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 та/або 5000µг/мл сивороткової концентрації на одноразове або багаторазове введення, або будь-який їхній діапазон, значення або фракцію.

Альтернативно, доза, що призначається, може змінюватися залежно від відомих факторів, таких як фармакодинамічні характеристики окремих препаратів та їх способі і шлях введення; вік, здоров'я та вага реципієнт; природа та вираженість симптомів, тип супутнього лікування, частота лікування та бажаний ефект. Зазвичай доза активного інгредієнта може бути від приблизно 0,1 до 100 міліграм на кілограм ваги тіла. Як правило 0,1-50, та бажано 0,1-10 міліграм на кілограм на введення або у формах з уповільненим вивільненням є ефективною для досягнення бажаних результатів.

Як один із прикладів, лікування людей та тварин може бути забезпечено в якості одноразового або періодичного введення принаймні одного антитіла даного винаходу у дозі від 0,1 до 100мг/кг, такої як 0,5, 0,9, 1,0, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 або 100мг/кг, на добу в принаймні один із днів 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 або 40, або альтернативно чи додатково у принаймні один із тижнів 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 або 52, або альтернативно чи додатково, у принаймні один із 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 або 20 років, або будь-яка їхня комбінація, з використанням одноразового, інфузійного або повторного введення.

Форми дозування (препарату), що підходять для внутрішнього введення, загалом містять від приблизно 0,1 міліграма до приблизно 500 міліграм активної речовини на одиницю або контейнер. В цих фармацевтичних препаратах активний інгредієнт зазвичай буде присутнім у кількості від приблизно 0,5-99,999% ваги ґрунтуючись на загальній вазі препарату.

Для парентерального введення антитіла може бути виготовлене в якості розчину, суспензії, емульсії або ліофілізованого порошка у поєднанні, або окремо, з фармацевтично прийнятним парентеральним розчинником. Прикладами таких розчинників є вода, фізіологічний розчин, розчин Рінгера, розчин декстрази та 1-10% людський сиворотковий альбумін. Можуть також використовуватися ліпосоми та неводні розчинники, такі як фіксовані масла. Розчинник або ліофілізований порошок може містити добавки, що підтримують ізотонічність (напр., натрію хлорид, маннітол) та хімічну стабільність (напр., буфери та консерванти). Препарат стерилізується за допомогою відомих або належних методик.

Належні фармацевтичні носії [описані у більшості останніх видань Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol], стандартному базовому підручнику в цій галузі.

Альтернативне введення

Згідно з даними винаходом можуть використовуватися багато відомих та розроблених способів для введення фармацевтично ефективних кількостей принаймні одного анти-ФНП антитіла. В той час як в даному винаході використано легеневе введення, інші способи введення можуть використовуватися згідно з даним винаходом з належними результатами.

ФНП антитіла даного винаходу можуть бути доставлені за допомогою носія, в якості розчину, емульсії, колоїда або суспензії, або в якості сухого порошку, з використанням будь-якого з різноманіття пристроїв та методів, що підходять для введення за допомогою інгаляції або інших способів, описаних тут або відомих науці.

Парентеральні препарати та введення

Препарати для парентерального введення можуть містити в якості звичайних додатків воду або фізіологічний розчин, поліалкілен гліколь, такий як поліетилен гліколь, масла рослинного походження, гідрогеновані нафталіни тощо. Водні або масляні суспензії для ін'єкцій можуть бути приготовлені при використанні відповідних емульгаторів або зволожувачів та суспендуючих засобів, згідно з відомими методами. Препарати для ін'єкцій можуть бути нетоксичними, такими, що не призначаються перорально, розчинними засобами, такими як водний розчин або стерильний розчин для ін'єкцій або суспензія у розчиннику. В якості придатного для вжитку розчинника дозволено використовувати воду, розчин Рінгера, фізіологічний розчин тощо; в якості звичайного розчинника, або суспендуючого розчинника, може бути використане стерильне масло, що швидко не випаровується. З цією метою, може використовуватися будь-який тип нелетючого масла та жирної кислоти, включаючи природні або синтетичні або напівсинтетичні жирні масла чи жирні кислоти; природні або синтетичні або напівсинтетичні моно- чи ди- чи тригліцериди. Парентеральне введення відомо в науці і включає, але не обмежується, стандартні засоби ін'єкційного введення, газопресові безголовкові ін'єкційні пристрої, як це описано в [Патенті США №5,851,198], та лазерний перфораторний пристрій, як це описано в [Патенті США №5,839,446], що повністю включені тут у посиланнях.

Альтернативний пристрій

Винахід окрім того відноситься до введення принаймні одного анти-ФНП антитіла за допомогою парентерального, підшкірного, внутрішньом'язового, внутрішнього, внутрісуглобового, інтрабронхіального, інтраабдомінального, інтракапсулярного, інтрахрящового, інтракавітарного, інтрацеліального, інтрамозочкового, інтрацеребровентрикулярного, в товстий кишковик, інтрацервікального, інтрагастрального, внутріпечінкового, внутріміокардіального, інтраостеального, внутрітазового, інтраплеврального, інтрапростатового, внутрілегеневого, інтраректального, внутріниркового, інтраспінального, інтрасиновіального, інтраторакального, інтраіматкового, інтравезикального, болюсного, вагінального, ректального, букального, сублінгвального, інтраназального або трансдермального шляхів. Препарат принаймні одного анти-ФНП антитіла може бути приготовлений для використання для парентерального (підшкірного, внутрім'язового або внутрішнього) чи будь-якого іншого введення, зокрема у формі рідинних розчинів або суспензії; для

використання при вагінальному або ректальному введенні, зокрема у напівтвердих формах, таких як, але не обмежуючись, форма порошку, назальних крапель чи аерозолу або певних препаратів; або трансдермально, таких як, але не обмежуючись, гелі, мазь, лосьйон, суспензія або система пластырного введення з хімічними поліпшувачами, такими як диметил сульфоксид, для того щоб модифікувати структуру шкіри, чи збільшити концентрацію препарату у трансдермальному пластырі [Junginger, et al. В "Drug Permeation Enhancement"; Hsieh, D. S., Eds., pp.59-90 (Marcel Dekker, Inc. New York 1994), повністю включений тут у посиланнях], або з оксидуючими препаратами, що дають змогу нанесення препарату, який містить протези та пептиди, на шкіру [WO 98/53847], або нанесення електричних полів для створення тимчасового шляху транспортування, таких як електропорація, або для підвищення проникнення заряджених препаратів через шкіру, таких як іонтофорез, або нанесення ультразвуку, такий як сонофорез [Патенти США №4,309,989 та 4,767,402] (вищенаведені публікації та патенти повністю включені тут у посиланнях).

Пульмональне/назальне введення

Для пульмонального введення, бажано, щоб препарат принаймні одного анти-ФНП антитіла, подавався з розміром частинок, який ефективний для досягнення нижніх дихальних шляхів легенів або синусів. Згідно з даними винаходом, принаймні одне анти-ФНП антитіло може бути доставлене за допомогою різноманіття інгаляційних або назальних пристроїв, що відомі в науці для введення терапевтичних препаратів за допомогою інгаляції. Ці пристрої, що спроможні відкладати аерозольні препарати у порожнині синуса або альвеолах пацієнта, включаючи інгалятори, які відмірюють дозу, небулайзери, сухопорошкові генератори, спреєри тощо. Інші пристрої, що підходять для проведення пульмонального або назального введення антитіла, також відомі в науці. Всі такі пристрої можуть використовувати препарати, які підходять для введення диспенсованого антитіла в аерозолі. Такі аерозолі можуть складатися як з розчинів (як водних, так і неводних), таких із твердих частинок. Інгалятори, що відмірюють дозу, по типу дозуючого інгалятора Ventolin[®], зазвичай використовують пропелентний газ а потребують запуску під час вдиху [Див., напр., WO 94/16970, WO 98/35888]. Сухопорошкові інгалятори по типу Turbuhaler[™] (Astra), Rotahaler[®] (Glaxo), Diskus[®] (Glaxo), інгалятор Spiros[™] (Dura), пристрої, що продаються Inhale Therapeutics, та порошковий інгалятор Spinhaler[®] (Fisons), використовують дихальний запуск змішанного порошка [US 4668218 Astra, EP 237507 Astra, WO 97/25086 Glaxo, WO 94/08552 Dura, US 5458135 Inhale, WO 94/06498 Fisons, повністю включені тут у посиланнях]. Небулайзери (розпилювачі) по типу AERx[™] Aradigm, небулайзер Ultravent[®] (Mallinckrodt) та небулайзер Acorn II[®] (Marquest Medical Products) [US 5404871 Aradigm, WO 97/22376], вищенаведені посилання повністю включені тут у посиланнях, продукують аерозолі з розчинів, тоді як дозуючі інгалятори, сухопорошкові інгалятори тощо генерують аерозолі з малих частинок. Ці специфічні приклади комерційно доступних пристроїв призначені бути представниками специфічних пристроїв, що підходять для застосування даного винаходу, та не є обмеженням рамок даного винаходу. Бажано, щоб препарат, який містить принаймні одне анти-ФНП антитіло поставлявся у вигляді сухопорошкового інгалятора або спреєра. Існують декілька бажаних характеристик інгаляційного пристрою для введення принаймні одного антитіла даного винаходу. Наприклад, введення за допомогою інгаляційного пристрою має переваги в плані надійності, відтворюваності та акуратності. Інгаляційний пристрій може додатково доставляти малі сухі частинки, напр. менші, ніж приблизно 10µM, бажано приблизно 1-5µM, для хорошого проникнення через дихальні шляхи. Введення антитіла до ФНП.

Препарати у вигляді спрею

Спрей, що включає препарат протейну антитіла до ФНП, може бути виготовлений за допомогою прогонки під тиском суспензії чи розчину принаймні одного анти-ФНП антитіла через сопло. Розмір та конфігурація сопла, тиск та швидкість поставки рідини можуть підбиратися для досягнення бажаного виходу та розмірів часток. Електроспрей може бути виготовлений, наприклад, за допомогою електричного поля у поєднанні з прогонкою через капіляр або сопло. Частинки препарату протейну принаймні одного анти-ФНП антитіла, що доставляються спреєром, переважно мають розмір менше, ніж приблизно 10µM, бажано у діапазоні від приблизно 1µM до приблизно 5µM, і найбажаніше від приблизно 2µM до приблизно 3µM.

Препарати протейну принаймні одного анти-ФНП антитіла, що підходить для використання зі спреєром, зазвичай включають протейновий склад антитіла у водному розчині в концентрації від приблизно 0,1мг до приблизно 100мг протейнового складу принаймні одного анти-ФНП антитіла на мл розчину або мг/г, або будь-який їхній діапазон чи значення, напр., але не обмежуючись, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 або 100мг/мл чи мг/г. Препарат може включати такі компоненти, як додатки, буфер, ізотонічний компонент, консервант, сурфактант та, бажано, цинк. Препарат також може включати додаток або компонент для стабілізації протейнового складу антитіла, такий як буфер, пом'якшуючий компонент, основний протейн або карбогідрат. Основний протейн, що корисний при підготовці протейнового складу антитіла, включає альбумін, протамін тощо. Типові карбогідрати, які корисні при приготуванні протейнового складу антитіла, включають сахарозу, манітол, лактозу, трегалозу, глюкозу тощо. Протейновий склад антитіла препарату також може включати сурфактант, який може зменшувати або попереджати поверхне-індуковану агрегацію протейнового складу антитіла, що спричинена атомізацією розчину при утворенні аерозолу. Можуть застосовуватися різноманітні традиційні сурфактанти, такі як ефіри та алкоголі поліоксиетиленових жирних кислот і ефіри поліоксиетилена сорбітолових жирних кислот. Кількості загалом перебувають у діапазоні від 0,001 до 14% від ваги препарату. Особливо бажаними сурфактантами для мети даного винаходу є поліоксиетилена сорбітан моноолеат, полісорбат 80, полісорбат 20 тощо. Додаткові компоненти відомі науці для утворення протейну, такого як антитіла до ФНП, або певні їхні частини чи варіанти, можуть також включатися в препарат.

Введення препарату антитіла до ФНП за допомогою небулайзера

Протейновий склад антитіла може бути введено за допомогою небулайзера, такого як потоковий небулайзер або ультразвуковий небулайзер. Зазвичай, в потоковому небулайзері, використовується джерело скомпресованого повітря для створення високошвидкісного потоку повітря через отвір. По тому як газ поширюється за сопло, створюється ділянка низького тиску, який витягує розчин протейнового складу антитіла

через капілярну трубку, що під'єднана до резервуара з рідиною. Струмін рідини з капілярної трубки розбивається на нестабільні частинки та краплі, що створює аерозоль. Можуть застосовуватися цілий діапазон конфігурацій, швидкості потоку та типу дефлектора для досягнення бажаних характеристик в даному потоковому небулайзері. В ультразвуковому небулайзері, для створення вібраційної, механічної енергії використовується високочастотна електроенергія, що зазвичай потребує використання п'єзоелектричного трансдюсера. Ця енергія передається на препарат протеїнового складу антитіла або безпосередньо, або через сполучену рідину, що створює аерозоль, який включає протеїновий склад антитіла. Переважно, частинки протеїнового складу антитіла, які постачаються за допомогою небулайзера, мають бути розміром менше, ніж 10µm, бажано в діапазоні від приблизно 1µm до приблизно 5µm, і ще бажаніше від приблизно 2 µm до приблизно 3µm.

Препарати принаймні одного анти-ФНП антитіла, що підходять для використання з небулайзером, як потоковим, так і ультразвуковим, зазвичай включають концентрацію від приблизно 0,1мг до приблизно 100мг протеїна принаймні одного анти-ФНП антитіла на мл розчину. Препарат може включати такі компоненти, як добавки, буфер, ізотонічний компонент, консервант, сурфактант та, бажано, цинк. Препарат також може включати додаток або компонент для стабілізації протеїнового складу антитіла, такий як буфер, пом'якшувачий компонент, основний протеїн або карбогідрат. Основний протеїн, що корисний при підготовці протеїнового складу антитіла, включає альбумін, протамін тощо. Типові карбогідрати, які корисні при приготуванні протеїнового складу антитіла, включають сахарозу, маннітол, лактозу, трегалозу, глюкозу тощо. Протеїновий склад антитіла препарату також може включати сурфактант, який може зменшувати або попереджати поверхнево-індуковану агрегацію протеїнового складу антитіла, що спричинена атомізацією розчину при утворенні аерозолі. Можуть застосовуватися різноманітні традиційні сурфактанти, такі як ефіри та алкоголі поліоксиетиленових жирних кислот і ефіри поліоксиетилена сорбітолових жирних кислот. Кількості загалом перебувають у діапазоні від 0,001 до 14% від ваги препарату. Особливо бажаними сурфактантами для мети даного винаходу є поліоксиетилена сорбітан моноолеат, полісорбат 80, полісорбат 20 тощо. Додаткові компоненти відомі науці для утворення протеїна, такого як антитіла до ФНП, або певні їхні частини чи варіанти, можуть також включатися в препарат. Введення препаратів антитіла до ФНП за допомогою дозуючих інгаляторів

У дозуючому інгаляторі (ДІ), пропелент, принаймні одне анти-ФНП антитіло та будь-які добавки містяться у балончику, в якості суміші, що включає зріджений скомпресований газ. Запуск дозуючого клапану вивільняє суміш у вигляді аерозолі, що бажано має містити частинки в діапазоні розміру від менше, ніж приблизно 10µm, бажано від приблизно 1µm до приблизно 5µm, та ще бажаніше від приблизно 2µm до приблизно 3µm. Бажаний розмір частинок аерозолі може бути отриманий при застосуванні препарату протеїнового складу антитіла, що отриманий за допомогою різноманітних методів, відомих тим, хто є фахівцем в даній галузі, включаючи потрібнення струменя, висушення спрею, конденсацію в критичній точці тощо. Бажані дозуючі інгалятори включають ті, що вироблені 3M або Glaxo та використовують гідрофторовуглецевий пропелент.

Препарати принаймні одного анти-ФНП антитіла для використання у пристроях дозуючих інгаляторів загалом включатимуть чітко розділений порошок, що містить принаймні одне анти-ФНП антитіло, в якості суспензії у неводному середовищі, наприклад, суспендований у пропеленті за допомогою сурфактанта. Пропелентом може бути будь-який традиційний матеріал, що використовується для цієї мети, такий як хлорофторвуглець, гідрохлорофторвуглець, гідрофторвуглець або гідровуглець, включаючи трихлорофторометан, дихлородифторометан, дихлоротетрафтороетанол та 1,1,1,2-тетрафтороетан, HFA-134a (гідрофтороалкан-134a), HFA-227 (гідрофтороалкан-227) тощо. Бажаним пропелентом є гідрофторовуглець. Сурфактант може бути взятим для стабілізації принаймні одного анти-ФНП антитіла в якості суспензії в пропеленті, для захисту активного компоненту від хімічної деградації тощо. Належні сурфактанти включають сорбітан триолеат, соєвий лецитин, олеєву кислоту тощо. В деяких випадках бажаними є розчинні аерозолі, що використовують такі розчинники, як етанол. Додаткові компоненти, які відомі в науці, для утворення протеїну, такі як протеїн можуть бути також включені у препарат.

Ті, хто має належну кваліфікацію в даній галузі, визнають, що методи даного винаходу можуть бути досягнуті за допомогою пульмонального введення препаратів принаймні одного анти-ФНП антитіла з використанням пристроїв, які тут не описані.

Пероральні препарати та їх введення

Препарати для перорального призначення базуються на супутньому використанні ад'ювантів (напр., резциноли та неіонні сурфактанти, такі як поліоксиетилена олеїловий ефір та n-гексадецилполіетиленовий ефір) для штучного підвищення проникності стінок тонкого кишечника, а також на супутньому використанні ензиматичних інгібіторів (напр., інгібітори панкреатичного трипсина, діізопропілфторофосфат (DFF) та тразилол) для пригнічення ферментного розщеплення. Активні складові препарату у твердій формі для перорального прийому можуть бути змішані з принаймні одним додатком, включаючи сахарозу, лактозу, целюлозу, маннітол, трегалозу, рафінозу, мальтитол, декстран, крохмалі, агар, аргілати, хітини, хітозани, пектини, трагакантова камінь, арабікова смола, желатин, колаген, казеїн, альбумін, синтетичний або напівсинтетичний полімер та гліцерид. Ці форми також можуть містити інші типи додатків, напр., неактивний розчинючий компонент, любрікант, такий як магній стеарат, парабен, консервант, такий як цистеїн, дезінтегратор, зв'язувач, потовщувач, буферний компонент, посолоджувачий компонент, ароматизувачий компонент тощо.

Таблетки та пігулки можуть окрім того бути виготовлені в якості препаратів із спеціальним захисним покриттям. Рідинні препарати для перорального прийому включають емульсію, сироп, еліксир, суспензію та розчинні препарати, що дозволяються для медичного використання. Ці препарати можуть містити неактивний розчинючий компонент, що зазвичай використовуються у вищезгаданій галузі, напр., вода. Ліпосоми також були описані як системи доставки препарату для інсуліну та гепарина [Патент США №4,239,754]. Нещодавно, для доставки фармацевтичних засобів були використані мікросфери штучних полімерів змішаних амінокислот (протеноїди) [Патент США №4,239,673]. Окрім того, науці відомі компоненти носіїв для перорального прийому,

що були описані в [Патенті США №5,879,681 та Патенті США №5,5,871,753].

Мукозальні препарати та їх введення

Для всмоктування через слизові поверхні, препарати та методи введення принаймні одного анти-ФНП антитіла включають емульсію, що містить велику кількість субмікронних частинок, мукоадгезивні макромолекули, біоактивний пептид та безперервну водну фазу, яка покращує абсорбцію через слизові поверхні за допомогою досягнення мукоадгезії частинок емульсії [Патент США №5,514,670]. Слизові поверхні, що підходять для нанесення емульсії даного винаходу, можуть включати рогівковий, кон'юнктивальний, буккальний, сублінгвальний, назальний, вагінальний, пульмональний, шлунковий, інтестинальний та ректальний шляхи введення. Препарати для вагінального або ректального введення, напр. суппозиторії, можуть містити добавки, наприклад, поліалкіленегліколі, вазелін, масло какао тощо. Препарати для інтраназального призначення можуть бути твердими та містити в якості додатків, наприклад, лактозу, або можуть бути водними або масляними розчинами назальних крапель. Додатки для буккального призначення додатки включають цукри, кальцію стеарат, магнію стеарат, прежелатинований крохмаль тощо [Патент США №5,849,695].

Трансдермальні препарати та їх введення

Для трансдермального введення принаймні одне анти-ФНП антитіло закладене в капсулу засобу доставки, таких як ліпосома або полімерні наночастинки, мікрочастинки, мікрокапсула або мікросфери (що загалом називаються як мікрочастинки, якщо не обумовлено інше). Відомо багато відповідних засобів, включаючи мікрочастинки, що зроблені з синтетичних полімерів, таких як полігідроксикислоти, такі як полілактова кислота, полігліколева кислота та їхні кополімери, поліортоєфіри, поліангідриди та поліфосфазани та природні полімери, такі як коллаген, поліамінокислоти, альбумін та інші протеїни, альгінат та інші полісахариди та їхні комбінації [Патент США №5,814,599].

Пролонговане введення та препарати

Інколи бажано вводити компоненти даного винаходу в суб'єкт протягом подовженого періоду часу, наприклад, протягом від одного тижня до одного року при одноразовому введенні. Можуть бути використані різноманітні форми введення по типу повільного вивільнення, депо або імпланти. Наприклад, форма введення може містити фармацевтично прийнятну нетоксичну сіль компонента, що має низький ступінь розчинності в рідині організму, наприклад, (а) додатки солей кислот з поліосновної кислоти, таких як фосфорна кислота, сірчана кислота, лимонна кислота, тартарова кислота, таннієва кислота, памоева кислота, альгінієва кислота, поліглутамова кислота, нафатленові моно- або дисульфонієві кислоти, полігалактуронова кислота тощо; (б) сіль з полівалентного катіона металу, такого як цинк, кальцій, вісмут, барій, магній, алюміній, мідь, кобальт, нікель, кадмій тощо, або з органічного катіона, що утворений з напр., N,N'-дибензил-етиленадіамін або етиленадіамін; або (с) комбінації (а) і (б) напр. цинкова таннатова сіль. Додатково, компоненти даного винаходу чи, бажано, відносно нерозчинна сіль, такі як щойно було описано, можуть бути випущені в гелі, наприклад, гель моностеарата алюмінія з, напр. сезамової олії, що підходить для ін'єкцій. Зокрема бажаними солями є цинкові солі, цинкові таннатові солі, памоатові солі тощо. Інший тип препаратів-депо повільного вивільнення для ін'єкцій міститиме компонент або сіль, що розподілена для включення у замкнений об'єм у повільно деградууючому, нетоксичному, неантигенному полімері, такому як олілактокислотний/полігліколекислотний полімер, наприклад як описано в [Патенті США №3,773,919]. Компоненти або, бажано, відносно нерозчинні солі, такі як ті, що описані вище, можуть також бути розташовані у холестериновому матриці силастикових округлих таблеток великих розмірів, зокрема для використання у тварин. Додаткові препарати повільного вивільнення, депо або імпланти, напр. газові або рідинні ліпосоми відомі в літературі [Патент США №5,770,222 та "Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems", J. R. Robinson ed., Marcel Dekker, Inc., N.Y., 1978].

По описанні винаходу загалом, більшого розуміння можна буде досягнути при звертанні до прикладів, які надаються для ілюстрації і не можуть вважатися як вичерпні.

Приклад 1: Клонування та експресія антитіла до ФНП у клітинах ссавців

Типовий вектор експресії у ссавців містить принаймні один промоутерний елемент, який опосередковує ініціацію транскрипції мРНК, кодує послідовність антитіла та сигнали, що потрібні для припинення транскрипції та поліаденілації транскрипта. Додаткові елементи включають поліпшувачі, послідовності Kozak та проміжні послідовності, що розташовані обабіч донорських та акцепторних сайтів для розщеплення РНК. Високоєфективна транскрипція може бути досягнена за допомогою ранніх та пізніх промоутерів з SV40, довгих термінальних повторень (LTRS) з ретровірусів, напр., RSV, HTLV1, HIV1, таранні промоутери цитомегаловіруса (CMV). Однак, можуть також використовуватися клітинні елементи (напр., людський актиновий промоутер). Належні вектори експресії для використання даного винаходу на практиці включають, наприклад, такі вектори, як pRESIneo, pRetro-Off, pRetro-On, PLXSN або pLNCX (Clontech Labs, Palo Alto, CA), pcDNA3.1 (+/-), pcDNA/Zeo (+/-) або pcDNA3.1/Hygro (+/-) (Invitrogen), PSVL та PMSG (Pharmacia, Uppsala, Швеція), pRSVcat (ATCC 37152), pSV2dhfr (ATCC 37146) та pBC12MI (ATCC 67109). Клітини господаря ссавців, що можуть використовуватися, включають людські клітини Hela 293, H9 та Jurkat, мишині клітини NIH3T3 та C127, клітини Cos 1, Cos 7 та CV 1, клітини перепела QC1-3, мишині L клітини та клітини яєчників китайських хом'ячків (CHO).

Альтернативно, ген може бути експресований у стабільних клітинних лініях, що містять ген інтегрований у хромосому. Ко-трансфекція з обраним маркером, таким як dhfr, gpt, неоміцин або гіроміцин дозволяє ідентифікацію та ізоляцію трансфектних клітин.

Трансфектні гени також можуть бути посилені для експресії великих кількостей кодованого антитіла. Маркер DHFR (дегідролофат редукази) є корисним для розробки клітинних ліній, що несуть декілька сотень або навіть декілька тисяч копій зацікавленого гену. Іншими корисними маркерами відбору є фермент глутамін синтаза (GS) [Murphy, et al., Biochem. J. 227: 277-279 (1991); Bebbington, et al., Bio/Technology 10: 169-175 (1992)]. При використанні цих маркерів, клітини ссавців вирощуються в обраному середовищі та відбираються клітини з найбільшою резистентністю. Ці клітинні лінії містять-посилений ген(и), що інтегровані в хромосому.

Клітини яєчників китайських хом'ячків (CHO) та NSO часто використовуються для продукції антитіл.

Експресія векторів рС1 та рС4 містять потужний промоутер (LTR) вірусу саркоми Роуза [Cullen, et al., *Molec. Cell. Biol.* 5: 438-447 (1985)] плюс фрагмент CMV-поліпшувача [Boshart, et al., *Cell* 41: 521-530 (1985)]. Множинні сайти клонування, напр., з рестриктивними сайтами ферментативного розщеплення BamHI, XbaI та Asp718, покращують клонування зацікавленого гена. Вектори додатково містять 3' інтрон, сигнали поліаденилації та припинення гена препроінсуліна щура.

Клонування та експресія клітин CHO

Для експресії антитіла до ФНП використаний вектор рС4. Плазмідна рС4 є похідною плазміді рSV2-dhfr (ATCC Accession No.37146). Плазміді містять мишиний ген DHFR, що перебуває під контролем раннього промоутера SV40. Яєчники китайських хом'ячків або інші клітини, у котрих відсутня дигідрофолатна активність, що трансфіковані цими плазмідами, можуть бути відібраними за допомогою вирощування клітин у селективному середовищі (напр., alpha minus MEM, Life Technologies, Gaithersburg, MD), яке поставляється разом з хіміотерапевтичним препаратом метотрексатом. Посилення генів DHFR в клітинах, які резистентні до метотрексату (MTX), було добре встановлено [див., напр., F. W. Alt, et al., *J. Biol. Chem.* 253: 1357-1370 (1978); J. L. Hamlin та C. Ma, *Biochem. et Biophys. Acta* 1097: 107-143 (1990); та M. J. Page та M. A. Sydenham, *Biotechnology* 9: 64-68 (1991)]. Вирощування клітин у зростаючих концентраціях MTX розвивається резистентність до препарату внаслідок надвиробництва цільового ферменту, DHFR, в результаті посилення гена DHFR. Якщо другий ген пов'язаний з геном DHFR, то він зазвичай також посилюється і надмірно експресується. В науці відомо, що такий підхід може використовуватися для розвитку клітинних ліній, що несуть понад 1000 копій посиленого гена(-ів). В подальшому, коли метотрексат видаляється, отримуються клітинні лінії, які містять посилений ген, інтегрований в одну або більше хромосом клітини господаря.

Для експресії зацікавленого гена плазмідна рС4 містить потужний промоутер довготермінального повторення (LTR) вірусу саркоми Роуза [Cullen, et al., *Molec. Cell. Biol.* 5: 438-447 (1985)] плюс фрагмент, що ізолюється з покращувача негайного раннього гена людського цитомегаловірусу (CMV) [Boshart, et al., *Cell* 41: 521-530 (1985)]. Нижче промоутера знаходяться обмежувальні сайти ферментативного розщеплення BamHI, XbaI та Asp718, що дозволяє інтеграцію генів. Окрім цих клонуючих сайтів плазмідна містить інтрон 3' та поліаденилаційний сайт препроінсулінового гена щура. Для експресії також можуть бути використані інші високоефективні промоутери, напр., людський b-актиновий промоутер, ранній або пізній промоутери SV40 або довго-термінальні повторення з інших ретровірусів, напр., HIV та HTLV1. Для експресії ФНП у керований спосіб в клітинах ссавців можуть бути використані системи експресії генів Clontech Tet-Off і Tet-On та сході системи [M. Gossen та H. Bujard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5547-5551 (1992)]. Для поліаденилації мРНК можуть також використовуватися інші сигнали, напр., з генів людського гормону росту або глібіну. Стабільні клітинні лінії, що несуть зацікавлений ген інтегрований в хромосоми, також можуть бути відібрані по ко-трансфікуванні з обраним маркером, таким як gpt, G418 або гігromіцин. Використанню більше, ніж одного обраного маркера на початку, напр., G418 та метотрексату, має переваги.

Плазмідна рС4 розщеплюється рестриктивними ферментами і потім дефосфорилується з використанням інтестинальної фосфатази теляти, що виготовляється відомими виробниками. Вектор потім ізолюється з 1% агарозного геля.

Використана послідовність ДНК, що кодує антитіло до ФНП, відповідає варіабельним регіонам HC та LC антитіла до ФНП даного винаходу згідно з етапами відомого методу. В цьому також використовується ізолювана нуклеїнова кислота, що кодує відповідний людський постійний регіон (тобто, регіони HC та LC).

Ізолюваний варіабельний та постійний регіон кодуючої ДНК та дефосфорильований вектор після цього зв'язуються Т4 ДНК лігазою. Потім трансформуються клітини *E. coli* HB101 або XL-1 Blue та ідентифікується бактерія, яка містить фрагмент, що вставлений у плазмідну рС4, з використанням, наприклад, рестриктивного ферментного аналізу.

Клітини яєчників китайських хом'ячків (CHO), у котрих відсутній активний ген DHFR, використовуються для трансфікування. 5μг експресії плазміді рС4 котрансфікується з 0,5μг плазміді рSV2-нео з використанням ліпофектина. Плазмідна рSV2нео містить доміантний маркер, що обирається, ген нео з Tn5, що кодує фермент, який надає резистентність до групи антибіотиків, включаючи G418. Клітини висіваються в alpha minus MEM з 1μг/мл G418. Через 2 дні, клітини трипсинуються та висіваються в гібридомо-клонуючі пластини (Greiner, Німеччина) в alpha minus MEM з 10, 25 або 50нг/мл метотрексату плюс 1μг/мл G418. Через приблизно 10-14 днів прості клони трипсинуються і потім висіваються у 6-лункові чашки Петрі або 10мл колби з використанням різних концентрацій метотрексату (50нМ, 100нМ, 200нМ, 400нМ, 800нМ). Клоні, що вирощуються при найвищих концентраціях метотрексату, потім переносяться в нові 6-лункові пластини, що містять навіть вищі концентрації метотрексату (1мМ, 2мМ, 5мМ, 10мМ, 20мМ). Така ж процедура повторюється доти, доки не отримуються клони, що ростуть при концентрації 100-200мМ. Експресія бажаного генного продукту аналізується, наприклад, за допомогою SDS-PAGE та Western blot або за допомогою реверсивно-фазового аналізу HPLC.

Приклад 2: Створення людських моноклональних антитіл IgG з високою-афіністю реактивних до людського ФНП з використанням трансгенних мишей

Резюме

Для створення високоафінних, повністю людських, моноклональних антитіл, які можуть використовуватися для пригнічення дії ФНП при лікуванні одного або більше ФНП-опосередкованого захворювання, було використано трансгенні миші, що містять гени людських важко- та легколанцюгових імунноглобулінів. Гібридні миші (CBA/J×C57/BL6/J) F₂, що містять трансгени людських варіабельних та постійних регіонів антитіл як для важких, так і для легких ланцюгів, імунізувалися людським рекомбінантним ФНП [Taylor et al., *Intl. Immunol.* 6: 579-591 (1993); Lonberg, et al., *Nature* 368: 856-859 (1994); Neuberger, M., *Nature Biotech.* 14: 826 (1996); Fishwild, et al., *Nature Biotechnology* 14: 845-851 (1996)]. Декілька з'єднань надали один або більше комплексів людських моноклональних антитіл IgG реактивних до ФНП. Окрім того охарактеризовані повністю людські анти-ФНП антитіла. Всі вони є IgG1. Встановлено, що такі антитіла мають константи афіності десь між 1×10⁹

та 9×10^{12} . Несподівана висока афіність цих повністю людських антитіл робить їх належними кандидатами для терапевтичного застосування у хворобах, патологіях чи розладах залежних від ФНП.

Скорочення

КСА - коров'ячий сировотковий альбумін

CO₂ - диоксид вуглецю

ДМТО - диметил сульфоксид

ІФА - імуноферментний аналіз

ФКС - фетальна коров'яча сировотка

H₂O₂ - пероксид водню

ПХ - пероксидаза хрину

ВШ – внутрішкірно

Ig – імуноглобулін

ФНП - фактор некрозу пухлин альфа

ІП – інтраперитонеальний

ВВ – внутрішній

Мат - моноклональне антитіло

ОГ - оптична густина

ОФД - о-Фениленедіаміна дигідрохлорид

ПЕГ – полі етиленгліколь

ПСА - пеніцилін, стрептоміцин, амфотерицин

КТ - кімнатна температура

ПШ – підшкірний

БСР - буферний сольовий розчин

о/о - об'єм на об'єм

в/о - вага на об'єм

Матеріали і методи

Тварини

В даній галузі відомі трансгенні миші, що можуть продукувати людські антитіла (і вони є комерційно доступними (напр., від GenPharm International, San Jose, CA; Abgeniz, Freemont, CA, та інші), які продукують людські імуноглобуліни, а не мишині IgM або Ig. Наприклад, такі трансгенні миші, що містять трансгени людських послідовностей, які проходять V(D)J приєднання, важко-ланцюгове класове включення та соматичну мутацію, для генерації великої кількості людських імуноглобулінів [Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994)]. Трансген легкого ланцюга частково походить з дріжджевого штучного хромосомного клону, що включає приблизно половину ембріонального людського регіону V. На додаток важколанцюговий трансген може кодувати як людський μ , так і людський 1 [Fishwild, et al., Nature Biotechnology 14: 845-851 (1996)] та/або 3 постійні регіони. Миші, що походять з належних генотопічних ліній можуть використовуватися в процесах імунізації та злиття для створення повністю людських моноклональних антитіл до ФНП.

Імунізація

Для створення анти-ФНП людських гібридом можуть використовуватися один або більше розкладів імунізації. Перші декілька злиттів можуть бути виконані після такого, наприклад, імунізаційного протоколу, але також можуть використовуватися аналогічні відомі протоколи. Декілька 14-20-тижневих самок та/або хірургічно кастрованих самців трансгенних мишей імунізуються ІП та/або ВШ 1-1000 μ г рекомбінантного людського ФНП, емульсифікованого з однаковими об'ємами TITERMAX або повного ад'юванта Фройнда до остаточного об'єму 100-400 μ л (напр., 200). Кожна миша може також додатково отримувати 1-10 μ г в 100 μ л фізіологічного сольового розчину у 2 ПШ місцях. Миші можуть бути імунізовані через 1-7, 5-12, 10-18, 17-25 та/або 21-34 дні ІП (1-400 μ г) та ПШ (1-400 μ г \times 2) ФНП емульсифікованого з однаковим об'ємом TITERMAX або неповного ад'юванта Фройнда. У мишей бралася кров через 12-25 та 25-40 днів за допомогою ретро-орбітальної пункції без антикоагулянта. Кров згорталася при КТ протягом однієї години, сировотка відділялася і титрувалася з використанням ФНП ІФА аналізів згідно з відомими методиками. Коли повторні ін'єкції не спричиняли підвищення титру, виконувалося злиття. У той же час, мишам вводилася остання ВВ ін'єкція 1-400 μ г ФНП розведеного у 10СГ μ л фізіологічного розчину. Через три дні, миші умертвлялися за допомогою цервікальної дислокації і у них асептично видалялася селезінка та поміщалася в 10мл холодного фосфатного буферного сольового розчину (ФБСР), що містить 100Од/мл пеніциліна, 100 μ г/мл стрептоміцина та 0,25 μ г/мл амфотерицина В (ПСА). Спленцити відбиралися за допомогою стерильної перфузії селезінки за допомогою ПСА-ФБСР. Клітини були відмиті один раз у холодному ПСА-ФБСР, підраховані з використанням виключення синього фарбника Tripan та ресуспендовані в середовищі RPMI 1640, що містить 25мМ Нерес.

Злиття клітин

Злиття могло бути виконано у співвідношенні клітин мишиної мієломи до життєздатних клітин селезінки 1:1 та 1:10 згідно з відомими методами, напр., як це відомо в даній галузі. В якості необмежуючого прикладу, клітини селезінки та клітини мієломи можуть бути гранульовані разом. Гранула була повільно ресуспендована, протягом 30 секунд, в 1мл 50% (в/о) розчину ПЕГ/ФБСР (молекулярна вага ПЕГ 1450, Sigma) при 37°C. Злиття було припинене при повільному додаванні 10,5мл середовища RPMI 1640, що містить 25мМ Нерес (37°C), протягом 1 хвилини. Зливні клітини центрифугувалися протягом 5 хвилин при 500-1500об/хв. Клітини потім ресуспендувалися у середовищі НАТ (середовище RPMI 1640, що містить 25мМ Нерес, 10% сировотку фетального клона І (Нусіоне), 1мМ натрія пірувата, 4мМ L-глутаміна, 10 μ г/мл гентаміцина, 2,5% культурального додатку Origen (Fisher), 10% середовища 653-кондиціонованого RPMI 1640/Нерес, 50 μ М 2-меркаптоетанола, 100 μ М гіпоксантина, 0,4 μ М аміноптерина та 16 μ М тимідина) та потім розподілені по 200 μ л/лунку в п'ятнадцяти 96-лункових плоскодонних пластинах для клітинних культур. Пластини потім було поміщено у зволожуючий 37°C інкубатор, що містить 5% CO₂ та 95% повітря на 7-10 днів.

Визначення людських IgG анти-ФНП антитіл у мишиній сировотці

Для скринінгу мишиної сировотки на людські IgG антитіла специфічні до людського ФНП було використано твердофазовий ІФА. Коротко, пластини були покриті ФНП 2μг/мл у ФБСР на ніч. Після відмивання 0,15М сольового розчину, що містить 0,02% (о/о) Tween 20, лунки були заблоковані 1% (в/о) КСА А у ФБСР, 200μл/лунку на 1 годину при КТ. Пластини використовувалися відразу або заморожувалися при -20°C для майбутнього використання. Розведення мишиної сировотки інкубувалися на пластині покритих ФНП з концентрацією 50μл/лунку при КТ протягом 1 години. Пластини відмивалися, а потім оброблялися 50μл/лунку HRP-міченими Fc специфічними козлиними антилюдськими IgG розведеними 1:30000 у 1% КСА-ФБСР протягом 1 год. при КТ. Пластини потім знову відмивалися та додавали 100μл/лунку розчину субстрата цитрат-фосфату (0,1М лимонної кислоти та 0,2М фосфату натрію, 0,01% H₂O₂ та 1мг/мл ОФД) на 15 хвилин при КТ. Зупиняючий розчин (4N сірчана кислота) додавався у концентрації 25μл/лунку та ОГ визначалася при 490нм за допомогою автоматичного спектрофотометра пластин.

Визначення повністю людських імунноглобулінів у верхньому шарі гібридоми

Гібридоми з позитивним ростом, що секретують повністю людські імунноглобуліни, можуть бути визначені з використанням відповідних ІФА. Коротко, 96-лункові висовуючі пластини (VWR, 610744) можуть бути покритими 10μг/мл козлиними антилюдськими IgG Fc у натрієво-карбонатному буфері на ніч при 4°C Пластини були відмиті та заблоковані 1% КСА у ФБСР на одну годину при 37°C та використовувалися негайно або заморожувалися при -20°C Нерозведений верхній шар гібридоми інкубувався на пластині протягом однієї години при 37°C. Пластини були відмиті та проаналізовані за допомогою HRP-мічених козлиних анти-людських капла розведених 1:10000 у 1% КСА-ФБСР протягом однієї години при 37°C. Пластини потім інкубувалися з субстратом розчині, як це було описано вище.

Визначення повністю людської анти-ФНП реактивності

Гібридоми, такі як вище, можуть бути одночасно проаналізовані на реактивність до ФНП з використанням відповідного PIA або інших аналізів. Наприклад, верхній шар інкубується на пластині з козлиним анти-людським IgG, як описано вище, відмивається, а потім досліджується радіоміченим ФНП з відповідною кількістю на лунку протягом 1 години при КТ. Лунки двічі відмиваються з ФБСР та зв'язаний радіомічений ФНП оцінюється з використанням відповідного лічильника.

Гібридоми, що секретують людські IgG1 анти-ФНП, можуть бути поширені у клітинній культурі та серійно субклоновані за допомогою обмежуючого розведення. Результируюча клонована популяція може бути розширена та криозбережена у заморожувальному середовищі (95% ФКС, 5% ДМСО) та зберігатися у рідкому азоту.

Ізотипування

Ізотипне визначення антитіл було виконано з використанням ІФА в такому ж форматі, що використовувалася для скринінгу мишиної імунної сировотки на специфічні титри. ФНП може бути нанесений на 96-лункові пластини, як це було описано вище, та очищене антитіло в концентрації 2μг/мл може бути інкубоване на пластині протягом 1 години при КТ. Пластина відмивалася та оброблялася HRP-міченим козлиним анти-людським IgG₁ (Binding Site) або HRP-міченим козлиним анти-людським IgG₃ розведеним при 1:4000 у 1% КСА-ФБСР протягом 1 години при КТ. Пластина була знову відмита та інкубована з субстратним розчином, як описано вище.

Кінетика зв'язування людських анти-людських антитіл дог ФНП з людським ФНП

Характеристики зв'язування для антитіл можуть бути належним чином оцінені при використанні ІФА та ВІОscore технологій захоплення ФНП, наприклад. Різні концентрації очищених людських антитіл до ФНП можуть бути оцінені на зв'язування з ІФА пластини покритими 2μг/мл ФНП у аналізах, як це описано вище. ОГ може бути представлена в якості напівлогарифмічних схем, що показують ефективність відносного зв'язування.

Можуть бути отримані константи людського зв'язування, напр., як описано далі, або за допомогою будь-якого відповідного методу. ВІАscore CM-5 (карбокіметил) чип розташовується у ВІАscore 2000 unit. Буфер HBS (0,01M HEPES, 0,15M NaCl, 3mM EDTA, 0,005% о/о сурфактанта P20, pH7,4) пропускається над потоком клітин чіпа зі швидкістю 5μл/хвилину до отримання стабільного стану. Розчин (100μл) 15мг EDC (N-етил-N'-(3-диметил-амінопропіл)-карбодіимід гідрохлориду) у 200μл води додається до 100μл розчину 2,3 мг NHS (N-гідрокисукцинімід) у 200μл води. Сорос (40)μл результируючого розчину вводиться в чіп. Шістьμл розчину людського ФНП (15μг/мл у 10mM натрія ацетата, pH4,8) вводиться в чіп, що призводить до підвищення са. 500 RU. Буфер замінювався на TBS/Ca/Mg/KSA текучий буфер (20mM Tris, 0,15mM натрію хлориду, 2mM кальція хлориду, 2mM магнія ацетата, 0,5% Triton X-100, 25μг/мл КСА, pH7,4) та пропущений над чіпом протягом ночі для його врівноваження та гідролізації або завершення будь-яких непрореагувавших ефірів сукцината.

Антитіла розчинялися у текучому буфері при 33,33, 16,67, 8,33 та 4,17нМ. Швидкість потоку коригувалася до 30μл/хв, а температура приладу до 25°C. Два клітинних потоки використовувалися для кінетичних потоків, один на якому ФНП був іммобілізованим (проба) та другий, невиведених клітин (взірець). Кожне антитіло у концентрації 120μл вводилося над потоком клітин зі швидкістю 30μл/хв. (фаза асоціації), а потім слідували 360с безперервного буферного потоку (фаза дисоціації). Поверхня чіпа регенерувалася (дисоціація комплексу фактор некрозу пухлин альфа/антитіло) за допомогою двох послідовних ін'єкцій по 30μл кожна 2M гуанідіна тіоцианата.

Виконувалася аналіз даних з використанням ВІА evaluation 3.0 або CLAMP 2.0, як це відомо в даній галузі. Для кожної концентрації антитіла сенсограма взірця віднімалася від сенсограми проби. Проводилася глобальна оцінка як дисоціації (k_d , с⁻¹), так і асоціації (k_a , моль⁻¹с⁻¹) та підраховувалася (k_d/k_a) константа дисоціації (K_D , моль). Коли афінітет антитіла була досить високою, щоб RU захопленого антитіла було >100, проводилися додаткові розведення антитіла.

Результати та обговорення

Створення анти-людських моноклональних антитіл до ФНП

Виконувалася декілька злиттів і кожне злиття висівалося на 15 пластин (1440 лунок/злиття), що дало декілька десятків антитіл специфічних до людського ФНП. З них деякі були визначені, як такі, що містять

комбінацію людських та мишиних Ig ланцюгів. Решта анти-ФНП антитіл, секретованих гібридомами, містили винятково людські важкі та легкі ланцюги. Серед людських гібридом всі очікуються як IgG1.

Кінетика зв'язування людських анти-людських антитіл до ФНП

Аналіз ELISA підтвердив, що очищені антитіла більшості або всіх цих гібридом зв'язує ФНП у концентрації-залежний спосіб. На Фіг.1-2 показано результати відносної зв'язуючої ефективності цих антитіл. В даному випадку, вимірювалася спорідненість антитіла до його відповідного антигена (епітопа). Слід зазначити, що зв'язування ФНП безпосередньо з пластинами ІФА може спричинити денатурацію білка та наявні зв'язуючі афіності можуть не відображати зв'язування неденатурованого протеїну. П'ятидесятивідсоткове зв'язування встановлене при цілому діапазоні концентрацій.

При використанні аналізу ВІАсоге було отримано кількісні константи зв'язування людських антитіл та виявлено, що декілька людських моноклональних антитіл є високоафінними з K_D у діапазоні від 1×10^{-9} до 7×10^{-12} .

Висновки

Біло виконано декілька злиттів з використанням спленоцитів гібридних мишей, що містять трансгени людських варіабельних та постійних регіонів антитіла, що імунізовані людським ФНП. Було створено набір декількох повністю людських реактивних до ФНП моноклональних IgG антитіл ізотипу IgG1. Далі було охарактеризовано повністю людські анти-ФНП антитіла. Декілька створених антитіл мали константи афіності між 1×10^9 та 9×10^{12} . Несподівано високі афіності цих повністю людських моноклональних антитіл зробили їх придатними до терапевтичного використання при ФНП-опосередкованих захворюваннях, патологіях та відповідних станах.

Приклад 2: Створення людських моноклональних IgG антитіл реактивних до людського ФНП

Резюме

Гібридні миші (CBA/JxC57/BL6/J) F₂ (1-4), що містять людські трансгени варіабельного та постійного регіону антитіла як для важких, так і для легких ланцюгів, були імунізовані рекомбінантним людським ФНП. Одне злиття, що називається GenTNV, надало вісім повністю людських моноклональних IgG1к антитіл, що зв'язуються з імобілізованими рекомбінантним людським ФНП. Незабаром після ідентифікації, вісім клітинних ліній були переведені до Molecular Biology для подальшої характеристики. Оскільки ці Мат є повністю людськими щодо послідовності, очікуються, що вони будуть менш імуногенними, ніж cA2 (Remicade) у людей.

Скорочення

КСА - коров'ячий сировотковий альбумін

СО₂ - диоксид вуглецю

ДМТО - диметил сульфоксид

ІФА - імуноферментний аналіз

ФКС - фетальна коров'яча сировотка

Н₂О₂ - пероксид водню

ВЛ - важкий ланцюг

ПХ- пероксидаза хрину

ВШ - внутрішкірно

Ig - імуноглобулін

ІП - інтраперитонеальний

ВВ - внутрішній

Мат - моноклональне антитіло

ОГ - оптична густина

ОФД - о-Фениленедіаміна дигідрохлорид

ПЕГ - поліетиленгліколь

ПСА - пеніцилін, стрептоміцин, амфотерицин

КТ - кімнатна температура

ПШ - підшкірний

ФНП \forall - фактор некрозу пухлин альфа

о/о - об'єм на об'єм

в/о - вага на об'єм

Вступ

Було використано трансгенних мишей, що містять гени людських важких та легких ланцюгів імуноглобулінів, для генерації повністю людських моноклональних антитіл, що є специфічними до рекомбінантного людського ФНП \forall . Сподіваються, що ці унікальні антитіла можуть бути використані, так само як cA2 (Remicade) використовуються для терапевтичного пригнічення запальних процесів, залучених у ФНП \forall -опосередкованих захворюваннях, з перевагами щодо подовженого часу півжиття у сировотці та зменшенням рівню побічних ефектів залежних від імуногеності.

Матеріали та методи

Тварини

Трансгенні миші, які були розроблені GenPharm International, виробляють людські імуноглобуліни, а не мишині IgM чи Igk. Ці миші містять трансгени функціональних людських антитіл, які проходять V(D)J приєднання, важко-ланцюгове класове включення та соматичну мутацію, для генерації великої кількості людських імуноглобулінів (1). Трансген легкого ланцюга частково походить з дріжджевого штучного хромосомного клону, що включає приблизно половину ембріонального людського локусу V_k. На додаток до декількох генів V_H, важко ланцюговий (ВЛ) трансген кодує як людський μ та людський γ 1 (2) та/або γ 3 постійні регіони. В процесах імунізації та злиття для отримання цих моноклональних антитіл використовувалися миші з генотипічного роду HCo12/KCo5.

Очищення людського ФНП \forall

Людський ФНПv було очищено з верхнього шару тканинної культури з клітин C237A за допомогою афіної хроматографії з використанням колонки з рецептором ФНПv-Fc зливним протеїном (p55-sf2) (5) поєднаним з Sepharose 4B (Pharmacia). Верхній шар клітин було змішано з однією дев'ятою його об'єму 10x ФБСР Далбеко (ФБСР-Д) та пропущено через колонку при 4°C зі швидкістю 4мл/хв. Колонка була відмита з ФБСР та ФНПv був елюйований з 0,1М натрія цитрата, рН 3, % та нейтралізований з 2М Tris-HCl рН8,5. Очищений ФНПv було переміщено у буфер з 10мМ Tris, 0,12М натрія хлориду рН7,5 та профільтований через 0,2µм шприцевий фільтр.

Імунізація

Самки мишей GenPharm, приблизно 16-тижневого віку, були уміннізовані ІП (200µл) та ВШ (100µл в основу хвоста) загальною кількістю 100µг ФНПv (серія JG102298 або JG102098), емульсифікованого з однаковим об'ємом ад'юванта Titermax у дні 0, 12 та 28. На 21 та 35 дні у мишей бралася кров за допомогою ретроорбітальної пункції без антикоагулянтів. Кров згорталася при РТ протягом 1 години, а потім відбиралася сировотка і вона титрувалася з використанням ФНПv твердофазового ІФА аналізу. Злиття, що називається GenTNV, виконувалося після того, як миші відпочивали протягом семи тижнів після ін'єкції на 28 день. Мишам зі специфічним титром людського IgG 1:160 проти ФНПv, вводилася фінальна ВВ ін'єкція 50µг ФНПv розведеного у 100µл фізіологічного розчину. Через три дні, миші умертвлялися за допомогою цервікальної дислокації і у них асептично видалялася селезінка та поміщалася в 10мл холодного фосфатного буферного сольового розчину (ФБСР), що містить 100Од/мл пеніциліна, 100µг/мл стрептоміцина та 0,25µг/мл амфотерицина В (ПСА). Спленоцити відбиралися за допомогою стерильної перфузії селезінки за допомогою ПСА-ФБСР. Клітини були відмиті один раз у холодному ПСА-ФБСР, підраховані з використанням виключення синього фарбника Tіраp та ресуспендовані в середовищі RPMI 1640, що містить 25мМ Hерес.

Клітинні лінії

Несекретуючий мишиний міеломний зливний партнер, 653 був отриманий групою Cell Biology Services (CBS) 14/05/97 від групи Centocor's Product Development. Клітинна лінія була поширена у середовищі RPMI (JRH Biosciences) з умістом 10% (v/v) ФКС (Cell Culture Labs), 1мМ натрію піруват, 0,1мМ NEAA, 2мМ L-глутаміну (всі від JRH Biosciences) та криоконсервована у 95% FBS та 5% DMSO (Sigma), потім збережена парофазовому рідинноазотному холодильнику в CBS. Клітинний банк був стерильним (Qulality Control Centocor, Malvern) та не містив мікоплазму (Bionique Laboratories). Клітини підтримувалися в фазовій культурі до злиття. Вони відмивалися у PBS, підраховувалися та визначалася їхня життєздатність (>95%) за допомогою виключення трипанового синього барвника до злиття.

Людський ФНПv було продуковано за допомогою рекомбінантної клітинної лінії, що називається C237A, створеної у Molecular Biology при Centocor. Клітинна лінія була поширена у середовищі IMDM (JRH Biosciences) з умістом 5% (v/v) ФКС (Cell Culture Labs), 2мМ L-глутаміна та 5% ДМСО (Sigma), а потім збережені у паровій фазі рідинноазотного холодильника у CBS (13). Клітинний банк був стерильним (Qulality Control Centocor, Malvern) та не містив мікоплазму (Bionique Laboratories).

Злиття клітин

Було виконано злиття у співвідношенні 1:1 клітини мишиної міеломи 653 з життєздатними клітинами селезінки. Коротко, клітини селезінки та клітини міеломи були спільно гранульовані. Гранула була повільно ресуспендована, протягом 30 секунд, в 1мл 50% (v/v) розчину ПЕГ/ФБСР (молекулярна вага ПЕГ 1450, Sigma) при 37°C. Злиття було припинене при повільному додаванні 10,5мл середовища RPMI (без додатків) (JRH) (37°C) протягом 1 хвилини. Зливні клітини було відцентрифуговано протягом 5 хвилин при 750 обертах/хвилину. Клітини було потім ресуспендовано у середовищі HAT (середовище RPMI/HERES, що містить 20% фетальну коров'ячу сировотку (JRH), 1мМ натрія піруват, 2мМ L-глутаміна, 10µг/мл гентаміцину, 2,5% культуруючого додатка Origen (Fisher), 50µМ 2-меркаптоетанола, 1% 653-кондиціонованого середовища RPMI, 100µМ гіпоксантина, 0,4µМ аміноптерина та 16µМ тимідину), а потім розподілено по 200µл/лунку в п'яти 96-лункових плоскодонних пластинах для клітинних культур. Пластини потім було поміщено у зволожуючий 37°C інкубатор, що містить 5% CO₂ та 95% повітря на 7-10 днів.

Визначення людських анти-ФНПv IgG антитіл у мишиній сировотці

Для скринінгу мишиної сировотки на людські IgG антитіла специфічні до людського ФНПv було використано твердофазовий ІФА. Коротко, пластини були покриті ФБСР при концентрації ФНПv 1µг/мл на ніч. Після відмивання 0,15М сольового розчину, що містить 0,02% (v/v) Tween 20, лунки були блоковані 1% (v/v) КСА у ФБСР, 200µл/лунку на 1 годину при КТ. Пластини використовувалися відразу або заморожувалися при -20°C для майбутнього використання. Мишина сировотка інкубувалася у подвійному розчиненні на пластинах покритих ФНПv з концентрацією 50µл/лунку при КТ протягом 1 години. Пластини відмивалися, а потім оброблялися 50µл/лунку HRP-міченими Fc специфічними козлиними антилюдськими IgG (Accurate) розведеними 1:30000 у 1% КСА-ФБСР протягом 1 год. при КТ. Пластини потім знову відмивалися та додавали 100µл/лунку розчину субстрату цитрат-фосфату (0,1М лимонної кислоти та 0,2М фосфату натрія, 0,01% H₂O₂ та 1мг/мл OPD) на 15 хвилин при КТ. Зупиняючий розчин (4N сірчана кислота) додавався у концентрації 25µл/лунку та ОГ визначалася при 490нм за допомогою автоматичного спектрофотометра.

Визначення повністю людських імунноглобулінів у верхньому шарі гібридоми

Оскільки миші GenPharm спроможні генерувати як мишині, так і людські, імунноглобулінові ланцюги, при використанні двох окремих систем ІФА було визначено росто-позитивні гібридоми, що секретують повністю людські імунноглобуліни. Пластини були покриті, як це описано вище, та нерозведений верхній шар гібридоми інкубувався на пластинах протягом 1 години при 37°C. Пластини були відмиті та оброблені або з HRP-міченим козлиним антилюдським антитілом каппа (Southern Biotech) розведеним 1:10000 у 1% КСА-HBSS або HRP-міченим козлиним анти-людським IgG Fc специфічним антитілом розведеним до 1:30000 у 1% КСА-HBSS протягом 1 години при 37°C. Пластини потім інкубувалися з субстратним розчином, як це було описано вище. Клоні гібридом, що не дали позитивного сигналу як щодо анти-людського каппа, так і щодо анти-людського IgG Fc ІФА форматів були відкинуті.

Ізотипування

Ізотипне визначення антитіл було виконано з використанням ІФА в такому ж форматі, що використовувався для скринінгу мишиної імунної сировотки на специфічні титри. ІФА пластини були покриті козлиним анти-людським IgG (В+Л) у концентрації 10г/мл у натрій карбонатному буфері на ніч при 4°C та блоковані так, як це було описано вище. Очищені верхні шари з 24-лункових культур були інкубовані на пластинах протягом однієї години при КТ. Пластини були відмиті та проаналізовані з HRP-міченими козлиними анти-людськими IgG1, IgG2, IgG3 та IgG4 (Binding Site) розведеними 1:4000 у 1% КСА-ФБСР на одну годину при КТ. Пластина була знову відмита та інкубована з субстратним розчином, як описано вище.

Результати та обговорення

Створення повністю людських анти-людських ФНПВ моноклональних антитіл

Одне злиття, під назвою GenTNV, було виконано з мишей GenPharm, імунізованих рекомбінантним людським ФНПВ протеїном. З цього злиття, було відібрано 196 росто-позитивних гібридів. Було ідентифіковано вісім клітинних ліній гібридом, які секретують повністю людські IgG антитіла, що реактивні з людським ФНПВ. Ці вісім клітинних ліній, кожна з яких секретує імунноглобуліни людського IgG1_κ ізотипу та обидві були субклоновані двічі за допомогою обмеженого розведення для отримання стабільних клітинних ліній (>90% гомогенності). Назви клітинних ліній та відповідні С-коди позначені у таблиці 1. Кожна з цих клітинних ліній була заморожена у 12-ампульному дослідницькому клітинному банку, що зберігається у рідинному азоті.

Батьківські клітини зібрані з лунок 24-лункової культуральної чаші для кожної з восьми клітинних ліній були передані до групи Molecular Biology 18/02/99 для трансфекції та подальшої характеристики.

Таблиця 1: Позначення клітинної лінії GenTNV

Назва	Позначення С-коду
GenTNV14.17.12	C414A
GenTNV15.28.11	C415A
GenTNV32.2.16	C416A
GenTNV86.14.34	C417A
GenTNV118.3.36	C418A
GenTNV122.23.2	C419A
GenTNV148.26.12	C420A
GenTNV196.9.1	C421A

Висновок

Злиття GenTNV було виконано з використанням спленоцитів гібридних мишей, що містять трансгени людського варіабельного та постійного регіонів антитіла, які були імунізовані людським ФНПВ підготовленого Centocor. Було створено вісім повністю людських ФНПВ-реактивних моноклональних IgG антитіл ізотипу IgG1_κ. Батьківські клітинні лінії були передані в групу Molecular Biology для подальшої характеристики та розвитку. Один з цих нових людських антитіл може виявитися корисним щодо анти-запальних впливів з потенційними перевагами зниженої імунногеності та меншого рівня алергічно-подібних ускладнень при порівнянні з Remicade.

Посилання

1. Taylor et al., International Immunology 6: 579-591 (1993).
2. Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994).
3. Neuberger, Nature Biotechnology 14: 826 (1996).
4. Fishwild et al., Nature Biotechnology 14: 845-851 (1996).
5. Scallon, et al., Cytokine 7: 759-770 (1995).

Приклад 3: Клонування та підготовка клітинних ліній, що експресують людські анти-ФНПВ антитіла

Резюме

Було виявлено вісім людських моноклональних антитіл (мАт) з позначенням TNV, що зв'язують іmobілізований людський ФНПВ з високою спорідненістю. Було встановлено, що сім з восьми мАт ефективно блокують зв'язування huФНПВ з рекомбінантним рецептором ФНП. Аналіз послідовності кодуючої ДНК семи мАт підтвердив, що всі мАт мали людські регіони V. Послідовності ДНК також виявили, що три пари мАт були ідентичними одна до одної, так що початковий набір восьми мАт містив тільки чотири окремі мАт, представлені TNV14, TNV15, TNV148 та TNV196. Грунтуючись на аналізі скорочених амінокислотних послідовностей мАт та результатах даних нейтралізації ФНПВ in vitro, мАт TNV 148 та TNV 14 були відібрані для подальшого дослідження.

Оскільки проліновий залишок у позиції 75 (каркас 3) у важкому ланцюзі TNV148 не було виявлено у цій позиції в інших людських антитілах тієї ж підгрупи під час пошуку у базі даних, було виконано сайто-спрямований ДНК мутагенез для кодування серинового залишку в цій позиції для того, щоб узгодити її з відомими бактеріальними каркасними є послідовностями. Серин-модифіковані мАт були позначені TNV148B. ПЛР-посиленні ДНК кодуючі важко- та легколанцюговий варіабельні регіони TNV148B та TNV14 були клоновані у новоприготовлені вектори експресії, що базуються на нещодавно клонуваних важко- та легколанцюгових генах іншого людського мАт (12B75), оприлюдненого у патентній заявці США № _____, від 7 жовтня 2000, що називається антитіла до IL-12, препарати, методи та використання, яка повністю включена тут у посиланнях.

Клітини P3X63Ag8.653 (653) або клітини мишиної мієломи Sp2/0-Ag14 (Sp2/0) були трансфіковані відповідними важко- та легколанцюговими плазмідами експресії та перевірені у двох раундах субклонування для клітинних ліній, що продукують високі рівні рекомбінантного TNV148B та TNV14 (rTNV148B та TNV14) мАт. Оцінка кривих росту та стабільності продукції мАт протягом часу показала, що 653-трансфіковані клони С466D та С466С стабільно продукують приблизно 125г/мл rTNV148B мАт у виснажених культурах, тоді як Sp0/2 трансфектант 1.73-12-122 (С467А) стабільно продукує приблизно 25г/мл rTNV148B у виснажених культурах. Аналогічний аналіз показав, що Sp2/0-трансфіковані клони С476А продукували 18г/мл rTNV14 у виснажених культурах.

Вступ

Було попередньо встановлено, що набір восьми мАт отриманих від ФНП \forall -імунізованих мишей GenPharm/Medarex (генотип HCo12/KCo5) зв'язує людський ФНП \forall та має повністю людський ізотип IgG1, каппа. Простий аналіз зв'язування було використано для визначення того чи мАт даного винаходу будуть мати ФНП \forall -нейтралізуючу дію за допомогою оцінки їхньої здатності блокувати зв'язування ФНП \forall з рекомбінантним рецептором ФНП. Ґрунтуючись на цих результатах, результати послідовності ДНК, та характеристика in vitro декількох мАт, TNV148 було відібрано для подальшої характеристики.

Було клоновано ДНК послідовності, що кодують TNV148 мАт, та модифіковано для відповідності гену векторів експресії, що кодують відповідні постійні регіони, впроваджені у добре-охарактеризовані клітини 653 та Sp2/0 мишиної мієломи., і результуючі трансфіковані клітинні лінії перевірялися доти, доки не було ідентифіковано субклони, що продукують у 40 разів більше мАт, ніж початкова гібридомна клітинна лінія.

Матеріали та методи

Реагенти та клітини

Реагент TRIZOL було придбано у Gibco BRL. Протеїназа К була отримана від Sigma Chemical Company. Реверсивна транскриптаза була отримана від Life Sciences, Inc. Таq ДНК полімераза отримувалася або від Perkin Elmer Cetus, або від Gibco BRL. Обмежувальні ферменти були придбані у New England Biolabs. QIAquick ПЛР очищувальний набір був поставлений Qiagen. QuickSnap набір сайто-спрямованого мутагенезу було придбано у Stratagene. Набори Wizard plasmid miniprep та RNasin були поставлені Promega. Оптипластини були отримані від Packard. ¹²⁵Йодин було куплено у Amersham. Окремі олігонуклеотиди було придбано у Keystone/Bioresource International. Назви, ідентифікаційні номери та послідовності олігонуклеотидів, що використовувалися в даній роботі представлено у таблиці 1.

Таблиця 1. Олігонуклеотиди, що використовувалися для клонування, інженерингу або послідовності генів TNV МАТ. Амінокислоти, які кодується олігонуклеотидом 5'14s та HuH-J6 показані над послідовностями. Амінокислотний залишок 'M' відображає кодон початку трансляції. Підкреслені послідовності в олігонуклеотидах 5'14s та HuH-J6 позначають обмежувальні сайти BsiWI та BstBI, відповідно. Коса риска у HuH-J6 відповідає межі екзон/інтрон. Відзначте, що олігонуклеотиди, чий послідовності відповідають мінусовій нитці записані в орієнтації 3'-5'.

Назва	Номер	Послідовність
HG1-4b	119	3'-TTGGTCCAGTCGGACTGG-5'
HG1-5b	354	3'-CACCTGCACTCGGTGCTT-5'
HG1hg	360	3'-CACTGTTTTGAGTGTGTACGGGCTTAAGTT-5'
HG1-6	35	3'-GCCGCACGTGTGTGGAAGGG-5'
HCK1-3E	117	3'-AGTCAAGGTCGGACTGGCTTAAGTT-5'
HuK-3'Hd	208	3'-GTTGTCCCCTCTCACAAATCTTCGACTTT-5'
HVKRNaseq	34	3'-GGCGGTAGACTACTCGTC-5'
		BsiWI M D W T W S I
5'14s	366	5'-TTTCGTACGCCACCATGGACTGGACCTGGAGCATC-3'
5'46s	367	5'-TTTCGTACGCCACCATGGGGTTTGGGCTGAGCTG-3'
5'47s	368	5'-TTTCGTACGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCATG-3'
5'63s	369	5'-TTTCGTACGCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTC-3'
5'73s	370	5'-TTTCGTACGCCACCATGGGGTCAACCGCCATCCTC-3'
		T V T V S S BstBI
HuH-J6	388	3'-GTGCCAGTGGCAGAGGAGTC/CATTCAAGCTTAAGTT-5'
		SaiI M D M R V
LK7s	362	5'-TTTGTGACACCATGGACATGAGGGTCC(TC)C-3'
LVgs	363	5'-TTTGTGACACCATGGAAGCCCCAGCTC-3'
		T K V D I K Afl2
HuL-J3	380	3'CTGGTTTCACCTATAGTTTG/CATTCAAGCTTAAGTT-5'
V148-QC1	399	5'-CATCTCCAGAGACAATCCCAAGAACACGCTGTATC-3'
V148-QC2	400	3'-GTAGAGGTCTCTGTTAaGGTTCTTGTGCGACATAG-5'

Було отримано одну заморожену ампулу клітин мишиної мієломи 653. Ампула була розморожена у той же день та поширена у Т колбах в IMDM, 5% ФКС, 2мМ глютаміна (середовище). Ці клітини були підтримані у постійній культурі доки вони не були трансфіковані через 2-3 тижні з анти-ФНП ДНК, описаній тут. Деякі культури вирощувалися 5 днів після дати розмороження, гранулювалися центрифугуванням та ресуспендувалися в 95% ФКС, 5% ДМСО, розподілялися по 30 ампулах, заморожувалися та зберігалися для подальшого використання. Так само, було отримано одну ампулу клітин мишиної мієломи Sp2/0. Ампула була розморожена, як описувалося вище було приготовлено нові заморожені зразки, і заморожені ампули

зберігалися у шухлядах AA та АВ холодильника СВС. Ці клітини розморожувалися та використовувалися для всіх трансфекцій Sp2/0, описаних тут.

Аналіз пригнічення зв'язування ФНП з рецептором

Для аналізу здатності мАт блокувати зв'язування ¹²⁵I-міченого ФНП з зливним протеїном рецептора до ФНП, р55-sf2, використовувалися верхні шари клітин гібридами, що містять мАт до ФНП [Scallon et al. (1995) Cytokine 7: 759-770]. 50 :л р55-sf2 у концентрації 0,5 :г/мл у ФБСР додавалися до пластин Optiplaste для покриття лунок протягом одноденної інкубації при 37°C. Серійні розведення восьми верхніх шарів клітин TNV були приготовлені у 96-лункових круглodonних пластинах з використанням ФБСР/0,1% КСА в якості розчинника. Верхні шари клітин, що містять анти-IL-18 мАт були включені в якості негативного контролю та ті ж верхні шари анти-IL-18 збагачені сА2 (анти-ФНП химеричні антитіла, Remicade, [патент США №5,770,198], повністю включений тут у посиланнях) були включені в якості позитивного контролю. ¹²⁵I-мічений ФНП (58 :Ки/г, D. Shealy) було додано до 100 :л верхнього шару клітин для отримання достаточної концентрації ФНП 5нг/мл. Суміш була попередньо інкубована протягом однієї години при КТ. Покриті пластини Optiplates були відмиті для того, щоб прибрати незв'язаний р55-sf2 та 50 :л суміші ¹²⁵I-ФНП/верхні шари клітин були переміщені на пластини Optiplates. Після 2год. при КТ, пластини Optiplates були тричі відмиті з ФБСР-Tween. Було додано 100 :л Microscint-20 та було визначено срт зв'язок з використанням TopCount гамма-лічильника.

Посилення генів V та аналіз послідовності ДНК

Клітини гібридами були відмиті один раз у ФБСР до того як додати реагент TRIZOL для приготування РНК. Від 7X10⁶ до 1,7X10⁷ клітин були ресуспендовані у 1мл TRIZOL. Після додавання 200μл хлороформа пробірки були ретельно струшені. Взірці центрифугувалися при 4°C протягом 10 хвилин. Водна фаза була переміщена до свіжих мікрофугальних пробірок та було додано такий же об'єм ізопропанолу. Пробірки були ретельно струшені та інкубувалися при кімнатній температурі протягом 10 хвилин. Взірці були потім центрифуговані при 4°C протягом 10 хвилин. Гранули були відмиті один раз з 1мл 70% етанолу та висушені протягом короткого періоду часу у вакуумному сушнику. Гранули РНК були ресуспендовані с 40μл DEPC-обробленої води. Кількість препаратів РНК була визначена за допомогою фракціонування у 1% агарозному гелі. РНК зберігалася у холодильнику з -80°C до використання.

Для підготовки важко- та легколанцюгових цДНК, були підготовлені суміші, що включали 3μл РНК та 1μл або олігонуклеотида 119 (важкий ланцюг), або олігонуклеотида 117 (легкий ланцюг) (див. Таблицю 1) у об'ємі 11,5μл. Суміш інкубувалася при 70°C протягом 10 хвилин у водяній бані, а потім охолоджена на льоду протягом 10 хвилин. Була приготовлена окрема суміш, що складалася з 2,5μл 10X буфера реверсивної транскриптази, 10μл 2,5мМ dNTP, 1μл реверсивної транскриптази (20 одиниць) та 0,4μл рибонуклеазного інгібітора RNasin (1 одиниця), 13,5μл цієї суміші було додано до 11,5μл охолодженої суміші РНК/олігонуклеотид та реакція продовжувалася при температурі 42°C протягом 40 хвилин. Реакція синтезу цДНК була збережена у холодильнику з -20°C до використання.

Неочищені важко- та легколанцюгові цДНК використовувалися в якості шаблонів для ПЛР-посилення послідовностей, що кодують варіабельний регіон. П'ять олігонуклеотидних пар (366/354, 367/354, 368/354, 369/354 та 370/354, таблиця 1) було одночасно перевірені щодо їх здатності первинного посилення важколанцюгової ДНК. Реакції ПЛР були проведені з використанням 2 одиниць PLATINUM™ високоточної (ВИТО) Taq ДНК полімерази загальним об'ємом 50μл. Кожна реакція включала 2μл цДНК реакції, 10 пікомоль кожного олігонуклеотида, 0,2мМ dNTP, 5μл 10XВИТО Буфера та 2мМ магнію сульфата. Термальна циклова програма становила 95°C протягом 5 хвилин, а потім 30 циклів по (94°C протягом 30 секунд, 62°C протягом 30 секунд, 68°C протягом 1,5 хвилини). Потім відбувалася остаточна інкубація при 68°C протягом 10 хвилин.

Для підготовки продуктів ПЛР для безпосереднього встановлення послідовності ДНК, вони були очищені з використанням QLAquick™ ПЛР Очищувального Набору згідно з протоколом виробника. ДНК була елюювана з обертальної колонки з використанням 50μл стерильної води, а потім висушена до об'єму 10μл з використанням вакуумного сушника. Потім були проведені реакції встановлення послідовності ДНК з 1μл очищеного продукту ПЛР, 10μл первинного олігонуклеотида, 4μл готової реакційної суміші BigDye Terminator™ та 14μл стерильної води до загального об'єму 20μл. Важколанцюгові продукти ПЛР вироблені з олігонуклеотидною парою 367/354 були упорядковані з олігонуклеотидами 34 та 163. Термальна циклова програма для встановлення послідовності становила 25 циклів по (96°C протягом 30 секунд, 50°C протягом 15 секунд, 60°C протягом 4 хвилин), а потім при 4°C на ніч. Продукти реакції були фракціоновані через поліакриламідний гель та визначення з використанням ABI377 DNA Sequencer.

Сайто-спрямований мутагенез для заміни амінокислот

Один нуклеотид у ДНК послідовності важколанцюгового варіабельного регіону TNV148 було змінено для того, щоб замінити Pro⁷⁵ сериновим залишком у мАт TNV148. Було розроблено та впорядковані допоміжні олігонуклеотиди, 399 та 400 (таблиця 1), для того, щоб зробити цю зміну з використанням унікального клонуєчого сайту BsiWI вгору щодо сайту ініціації трансляції, згідно з протоколом виробника. Результуюча плазміда була названа р1747. Для введення сайту BstBI у 3' кінець варіабельного регіону, було створено 5' олігонуклеотид примір з сайтів Sall та BstBI. Цей примір використовувався з реверсивним приміром рUC для посилення 2,75kb фрагмента з р1747. Цей був потім знову клонований у природно-виниклий сайт Sall у варіабельному регіоні 12B75 та сайт HindIII, таким чином вводячи унікальний сайт BstBI. Результуючий проміжний вектор, позначений як р1750, може прийняти фрагменти варіабельного регіону з закінченнями BsiWI та BstBI. Для приготування версії важколанцюгового вектора, у котрому постійний регіон також походив з гена 12B75, вставка BamHI-HindIII в р1750 була переміщена до рBR322 для того, щоб отримати сайт EcoRI нижче щодо сайту HindIII. У результуюча плазміда, р1768, було відщеплено HindIII та EcoRI та приєднана до 5,7kb фрагменту HindIII-EcoRI з р1744, субклона отриманого за допомогою клонування великого фрагмента BamHI-BamHI з р1560 у рBC. Результуюча плазміда, р1784, була потім використана в якості вектора фрагментів цДНК TNV Ab із закінченнями BsiWI та BstBI. Було проведено додаткову роботу для приготування векторів експресії, р1788 та р1789, які включали постійний регіон IgG1 з гена 12B75 та відрізнялися один від одного по тому як багато вони містили важколанцюгового J-C інтрона 12B75.

Для модифікації легколанцюгового гена 12B75 у плазміді p1588, 5,7kb фрагмент SalI/AflII, що містить промотор 12B75 та варіабельний регіон, було переміщено з p1558 до сайтів XhoI/AflII плазміда: L28. Ця нова плазміда, p1745, надала менший шаблон для етапу мутагенезу. Було використано олігонуклеотиди (C340sal1 та C340sal2) для введення унікального SalI рестрикційного сайту у 5' закінчення варіабельного- регіону за допомогою мутагенеза QuikChange™. Результуючий проміжний вектор, p1746, мав унікальні обмежувальні сайти SalI та AflII у яких фрагменти варіабельного регіону могли бути клоновані. Будь-який варіабельний регіон клонований у p1746 переважно з'єднувався з 3' половиною легко ланцюгового гена. Для підготовки обмежувального фрагмента з 3' половини легколанцюгового гена 12B75, який міг бути використаним для цієї мети, олігонуклеотиди BAHN-1 та BAHN-2 були припаяні один до одного для утворення двониткового поєднувача, що містить обмежувальний сайт BsiWI, AflII, HindII та NotI і кожний містив закінчення, що могли бути з'єднаними з сайтами KpnI та Sad. Цей поєднувач було клоновано між сайтами KpnI та Sad pBC для утворення плазміди p1757. 7,1kb фрагмент, що містить легколанцюговий постійний регіон 12B75, утворений розщепленням p1558 з AflII, потім частковим відщепленням з HindIII, було клоновано між сайтами AflII та HindII p1757 для отримання p1762. Ця нова плазміда, яка містить унікальні сайти для BsiWI та AflII, у котрих фрагмент BsiWI/AflII, що містить промоторний та варіабельний регіони, може бути перенесена для з'єднання двох половин гена.

Клонування цДНК та збирання плазмід експреси

Всі реакції (див. вище) були оброблені з ферментом Klenow для кращого заповнення закінчень ДНК. Важколанцюгові фрагменти ПЛР були розщеплені з обмежувальними ферментами BsiWI та BstBI та потім клоновані між сайтами BsiWI та BstBI плазміди L28 (L28 використовувалася оскільки проміжний вектор p1750, що базується на 12B75, ще не було приготовано). Аналіз послідовності ДНК клонованих вставок показав, що результуючі конструкції були правильними і під час ПЛР посилень не відбулося помилок. Визначені ідентифікаційні номери для цих конструкцій плазміди L28 (для TNV14, TNV15, TNV148, TNV148B та TNV196) показані у Таблиці 2.

Вставки BsiWI/BstBI для важких ланцюгів TNV14, TNV148 та TNV148B були перенесені з вектора L28 до новоприготовленого проміжного вектора, p1750. Визначені ідентифікаційні номери для цих проміжних плазмід показані у Таблиці 2. Ці етапи клонування та подальші етапи не були проведені для TNV15 та TNV196. Варіабельні регіони були потім перенесені у два різних вектора експресії людського IgG1. Обмежувальні ферменти EcoRI та HindIII використовувалися для перенесення варіабельних регіонів у попередньо використаний IgG1 вектор Centocor, p104. Результуючі плазміди експресії, які кодують IgG1 алотипу Gm(f+), були позначені p1781 (TNV14), p1782 (TNV148B) та p1783 (TNV148B) (див. Таблицю 2). Варіабельні регіони були також клоновані вище щодо постійного регіона IgG1 отриманого від гена 12B75 (GenPharm). Ті плазміди експресії, які кодують IgG1 алотипу G1m(z), також перелічені у Таблиці 2.

Таблиця 2. Ідентифікаційні номери плазмід для різних важко- та легколанцюгових плазмід.

Вектор L28 або вектор pBC відображає початковий клон Ab цДНК. Вставки у цих плазмідах були перенесені до неповного вектора на основі 12B75 для утворення проміжних плазмід. Один додатковий етап перенесення привів до остаточного утворення плазмід експресії, що були або введені в клітини, що були лінеаризовані, або використані для очищення генних вставок mAт до клітинної трансфекції. (НЗ) = не зроблено.

<u>mAт</u>	Вектор L28		Gm(f+)	Glm(z)
	<u>Номер плазміди</u>	<u>Номер плазміди</u>	<u>Номер плазміди</u>	<u>Номер плазміди</u>
<i>Важкі ланцюги</i>				
TNV14	p1751	p1777	p1781	p1786
TNV15	p1752	(НЗ)	(НЗ)	(НЗ)
TNV148	p1753 p1778	p1782	p1787	
TNV148B	p1760 p1779	p1783	p1788	
TNV196	p1754 (НЗ)	(НЗ)	(НЗ)	
		Проміжна	Експресія	Експресія
		Номер плазміди	Номер плазміди	Номер плазміди
<i>Легкі ланцюги</i>				
TNV14		p1748	p1755	p1775
TNV15		p1748	p1755	p1775
TNV148		p1749	p1756	p1776
TNV196		p1749	p1756	p1776

Легкі ланцюги продуктів ПЛР були розщеплені з обмежувальними ферментами Sall та SacII і вони потім клонувалися між сайтами Sall та SacII плазміди pBC. Дві різні версії легких ланцюгів, які відрізнялися по одній амінокислоті, були позначені p1748 та p1749 (Таблиця 2). Аналіз послідовності ДНК підтвердив, що ці конструкції мали правильні послідовності. Фрагменти Sall/AflII у p1748 та p1749 були потім клоновані між сайтами Sall та AflII проміжного вектора p1746 для утворення p1755 та p1756, відповідно. Ці 5' половини легколанцюгових генів були потім приєднані 3' половині гена за допомогою-перенесення фрагментів BsiWI/AflII від p1755 та p1756 до новоприготовленої конструкції p1762 для утворення остаточних плазмід експресії p1775 та p1776, відповідно (Таблиця 2).

Клітинні трансфекції, скринінг та субклонування

Було виконано загалом 15 трансфекцій клітин мишинної мієломи з різноманітними плазмідами експресії TNV (див. Таблицю 3 у розділі Результати та обговорення). Ці трансфекції відрізнялися по тому (1) чи клітини господаря були Sp2/0 або 653; (2) чи важколанцюговий постійний регіон було кодовано за допомогою попереднього IgG1 вектора Centosor або важколанцюгового постійного регіону 12B75; (3) mAт були TNV148B, TNV148, TNV14 або нова комбінація HC/LC; (4) чи ДНК було лінеаризованою плазмідною або очищеною генною вставкою Ab; та (5) відсутності або наявності повної J-C інтронної послідовності у важколанцюговому гені. До того ж, декілька трансфекцій було повторено для збільшення ймовірності того, що велика кількість клонів може бути перевірена.

Клітини Sp2/0 та клітини 653 були трансфіковані сумішшю важко- та легколанцюгових ДНК (8-12 :г кожна) за допомогою електропорації при стандартних умовах, що раніше описувалися [Knight DM et al. (1993) Molecular Immunology 30: 1443-1453]. Для трансфекцій номери 1, 2, 3 та 16, належна кількість плазмід експресії була лінеаризована за допомогою розщеплення обмежувальними ферментами до трансфекції. Наприклад, обмежувальні ферменти Sal та NotI використовувалися для лінеаризації TNV148B важколанцюгової плазміди p1783 та легколанцюгової плазміди p1776, відповідно. Для решти трансфекцій,

вставки ДНК, що містили тільки ген мАт були відокремлені від плазмідного вектора за допомогою розщеплення важколанцюгових плазмід з BsiWI та NotI. Вставки генів мАт були потім очищені за допомогою електрофорезу на агарозному гелю та очищувальних секвестрантів Qiex. Клітини трансфіковані очищеними генними вставками були одночасно трансфіковані з 3-5 :г PstI-лінеаризованими плазмідами рSV2gpt (р13) в якості джерела маркера відбору. Після електропорації, клітини були посіяні у 96-лункові чаші клітинних культур у IMDM, 15% ФКС, 2мМ глютаміна та інкубовані при 37°C у інкубаторі з 5% CO₂. Через два дні було додано такий же об'єм IMDM, 15% ФКС, 2мМ глютаміна, 2ХМНХ набору (1ХМНХ=0,5 :г/мл мікофенолової кислоти, 2,5 :г/мл гіпоксантина, 50 :г/мл ксантина) та чаші інкубувалися протягом додаткових 2-3 тижнів до формування колоній.

Верхні шари клітин збиралися з лунок і колонії аналізувалися на IgG за допомогою ELISA, як це описувалося. Коротко, різні розведення верхніх шарів клітин були інкубовані у 96-лункових пластинах ІФА покриті Fc фрагментами поліклональних козлиних-анти-людських IgG та потім зв'язування людських IgG були визначені були визначені з використанням козлиних анти-людських IgG(H+L) кон'югованих лужною фосфатазою та відповідних колірних субстратів. Стандартні криві, які використовували в якості стандарту такий самий очищений мАт, що визначалися у верхніх шарах клітин, були включені у кожну пластину ІФА для уможливлення кількісної оцінки людського IgG у верхніх шарах. Клітини в цих колоніях, що продукують більшість людського IgG були перенесені у 24-лункові пластини для визначення додаткової продукції в послаблених культурах та в подальшому було ідентифіковано найбільш продукуючі батьківські клони.

Найбільш продукуючі батьківські клони були субклоновані для ідентифікації найбільш продукуючих субклонів та підготовлені більш гомогенні клітинні лінії. 96-лункові пластини тканинних культур були засіяні по одній клітині на лунку чи по чотири клітини на лунку в IMDM, 5% ФКС, 2мМ глютаміна, 1Х МНХ та інкубовані при 37°C в інкубаторі з 5% CO₂ протягом 12-20 днів до появи колоній. Верхні шари клітин були зібрані з лунок, що містили одну колонію на лунку та проаналізовані за допомогою ELISA, як описувалося вище. Відібрані колонії були пересажені до 24-лункових пластин та культури були послаблені до ідентифікації найбільш продукуючих субклонів за допомогою кількісної оцінки рівню людських IgG в їх верхніх шарах. Цей процес було повторено, коли обрані у першому раунді субклони були повторно субклоновані (другий раунд). Найкращі субклони другого раунду було відібрано в якості клітинних ліній для розвитку.

Характеризація клітинних субклонів

Було обрано найкращі субклони другого раунду та виконані криві росту для оцінки рівней продукції мАт та характеристик клітинного росту. Колби Т75 були засіяні 1Х10⁵клітин/мл у 30мл IMDM, 5% ФКС, 2мМ глютаміна та 1Х МНХ (або безсировоткове середовище). Бралися взірці по 300μл з 24год. інтервалом та визначалася густина живих клітин. Аналіз продовжувався доти, доки кількість живих клітин не була меншою за 1х10⁵клітин/мл. Зібрані взірці верхніх шарів клітин аналізувалися на концентрацію наявних антитіл. Було виконано аналіз ELISA з використанням в якості стандартів rTNV148В або rTNV14 JG92399. Взірці інкубувалися протягом 1год. на пластинах ELISA покритих поліклональними козлиними анти-людськими IgG Fc та зв'язані мАт визначалися з козлиними анти-людськими IgG(H+L) кон'югованими з лужною фосфатазою при розведенні 1:1000.

Було також виконано різні аналізи кривих росту для двох клітинних ліній з метою порівняння швидкостей росту за наявності різних кількостей наборів МНХ. Клітинні лінії С466А та С466В були розморожені у мереховищі без МНХ (IMDM, 5% ФКС, 2мМ глютамін) та культивовані протягом двох додаткових днів. Обидві клітинні культури були потім розподілені на три культури, що були або без МНХ, або з 0,2Х МНХ, або з 1Х МНХ (з 1Х МНХ=0,5 :г/мл мікофенолової кислоти, 2,5 :г/мл гіпоксантина, 50 :г/мл ксантина). Через один день, свіжі колби Т75 були засіяні культурами зі стартовою густиною 1Х10⁵клітин/мл і клітини підраховувалися з 24-годинними інтервалами протягом одного тижня. Аналізи продукції мАт не збиралися. Подвоєння часу було підраховано для цих взірців з використанням формули, що надається у SOP PD32.025.

Було виконано додаткові дослідження для оцінки стабільності продукції мАт протягом часу. Культури були вирощені у 24-лункових пластинах у IMDM, 5% ФКС, 2мМ глютаміні, як з, так і без набору МНХ. Культури розподілялися у свіжі культури тоді, коли вони починали зливатися, а старим культурам дозволялося виснажуватися. У цей період часу, відбиралися певні кількості верхніх шарів, які зберігалися при 4°C. Взірці збиралися протягом 55-78 днів. Наприкінці цього періоду, верхні шари перевірялися на кількість наявних антитіл за допомогою анти-людського IgG Fc ELISA, як це описувалося вище.

Результати та обговорення

Пригнічення зв'язування ФНП з рекомбінантним рецептором

Було виконано простий аналіз зв'язування для визначення того чи вісім TNV мАт, що містяться у верхніх шарах клітин гібридоми, мають здатність блокувати зв'язування ФНП з рецептором. Концентрації TNV мАт у їхніх відповідних верхніх клітинних шарах спочатку визначалися за допомогою стандартного аналізу ELISA на наявність людських IgG. Потім рекомбінантний р55 рецептор до ФНП/зливний протеїн IgG, р55-sf2, був нанесений на пластини ІФА, і ¹²⁵I-мічений ФНП зв'язувався з рецепторами р55 за присутності різних кількостей TNV мАт. Як показано на Фіг.1, всі окрім одного (TNV122) з восьми TNV мАт ефективно блокують зв'язування ФНП з рецептором р55. Насправді, TNV мАт виявилися ефективнішими щодо пригнічення зв'язування ФНП, ніж позитивні контрольні антитіла сА2, які вводилися у негативні контрольні верхні шари гібридоми. Ці результати були інтерпретовані як такі, що вказують на високу ймовірність блокади TNV мАт біоактивності ФНП у аналізах, що базуються на клітинах, та in vitro і таким чином необхідні подальші аналізи.

Аналіз послідовності ДНК

Підтвердження того, що РНК кодує людські мАт

В якості першого кроку в характеризованні семи TNV мАт (TNV14, TNV15, TNV32, TNV86, TNV118, TNV 148 та TNV 196), що показали ФНП-блокуючу активність у аналізах рецепторного зв'язування, загальна РНК була ізольована з семи клітинних ліній гібридоми, що продукують ці мАт. Кожний зразок РНК було потім використано для підготовки людських антитільних важко- або легколанцюгових цДНК, що включала повну

сигнальну послідовність, повну послідовність варіабельного регіону та частину послідовності постійного регіона для кожного мАт. Ці продукти цДНК були потім посилені у реакціях ПЛР та ПЛР-посилена ДНК була безпосередньо упорядкована без попереднього клонування фрагментів. Упорядковані важколанцюгові цДНК були >90% ідентичні до одного з п'яти людських ембріональних генів, наявних у мишах, DP-46 (Фіг.2). Так само, упорядковані легколанцюгові цДНК були на 100%, чи на 98% ідентичними до одного з людських ембріональних генів, що є у мишах (Фіг.3). Ці результати послідовності підтвердили, що молекули РНК, які транскрибуються у цДНК та упорядковуються, кодують важкі ланцюги людських антитіл та легкі ланцюги людських антитіл. Слід зазначити, що оскільки варіабельні регіони були ПЛР-посилені з використанням олігонуклеотидів, які відображають 5' закінчення сигнальної послідовності, що кодує послідовність, перші декілька амінокислот сигнальної послідовності можуть не бути оригінальною послідовністю оригінальних продуктів трансляції TNV, але вони відображають справжні послідовності рекомбінантних TNV мАт.

Унікальні нейтралізуючі мАт

Аналіз послідовностей цДНК для цілих варіабельних регіонів як важких, так і легких ланцюгів для кожного мАт показав, що TNV32 є ідентичним до TNV15, TNV118 є ідентичним до TNV14 та TNV86 є ідентичним до TNV148. Результати аналізу рецепторного зв'язування збіглися з аналізами послідовності ДНК, тобто як TNV86, так і TNV148 були приблизно у 4 рази кращі, ніж як TNV118, так і TNV14 при блокаді зв'язування ФНП. Таким чином, подальша робота сфокусувалася тільки на чотирьох унікальних TNV мАт, TNV14, TNV15, TNV148 та TNV196.

Зв'язаність чотирьох мАт

Результати послідовності ДНК показали, що гени, які кодують важкі ланцюги чотирьох TNV мАт, всі були високогомологічними один до одного та виявилися такими, що походять з одного ембріонального гена, DP-46 (Фіг.2). До того ж, оскільки кожен з важких ланцюгів послідовностей ДВРЗ є настільки однаковими та однакової довжини, та оскільки всі вони використовують екзон J6, вони очевидно походять з простої події переналаштування гена VDJ, після якого йшла соматична мутація, яка зробила кожне мАт унікальним. Аналіз послідовності ДНК показав, що було тільки два відмінних легколанцюгових гена серед чотирьох мАт (Фіг.3). Послідовності, що кодують варіабельний регіон легких ланцюгів, у TNV14 та TNV15 є ідентичними одна до одної та відображають ембріональну послідовність родини Vg/38K людських каппа ланцюгів. Послідовності, що кодують легкі ланцюги TNV148 та TNV196, є ідентичними одна до одної, але відрізняються від ембріональної послідовності у двох нуклеотидних позиціях (Фіг.3).

Виведені амінокислотні послідовності чотирьох мАт показали зв'язаність справжніх мАт. Чотири мАт містять чотири відмінні важких ланцюги (Фіг.4), але тільки два відмінні легкі ланцюги (Фіг.5). Відмінності між послідовностями TNV мАт та ембріональними послідовностями були переважно обмеженими до доменів ДВР, але три з важких ланцюгів мАт також відрізняються від ембріональної послідовності у каркасних регіонах (Фіг.4). Порівняно до DP-46 ембріонально-кодованих каркасних регіонів At, TNV14 був ідентичним, TNV15 відрізнявся по одній амінокислоті, TNV148 відрізнявся по двом амінокислотам, а TNV196 відрізнявся по трьом амінокислотам.

Клонування цДНК, сайто-специфічний мутагенез та збирання остаточних плазмід експресії

Клонування цДНК

Грунтуючись на аналізі послідовності цДНК ПЛР-посилених варіабельних регіонів, було замовлено нові олігонуклеотиди для виконання іншого етапу ПЛР посилення з метою адаптації кодуючої послідовності для клонування у векторах експресії. У випадку важких ланцюгів, продукти цього другого етапу ПЛР були розщеплені обмежувальними ферментами BsiWI та BstBI і клоновані у плазмідний вектор L28 (ідентифікаційні номери плазмід показані у Таблиці 2). У випадку легких ланцюгів, ПЛР продукти другого етапу були розщеплені з Sall та AflII та клоновані у плазмідний вектор pBC. Індивідуальні клони були потім упорядковані для підтвердження того, що їхні послідовності були ідентичними до попередньої послідовності отриманої з безпосереднього упорядкування продуктів ПЛР, які показали найчастіший нуклеотид у кожній позиції у потенційно гетерогенній популяції молекул.

Сайто-специфічний мутагенез для зміни TNV148

Було чітко встановлено, що мАт TNV148 та TNV196, є у чотири рази більш потужними, ніж наступне найкраще мАт (TNV14) щодо нейтралізації біоактивності ФНПГ. Однак, як описано вище, каркасні послідовності важких ланцюгів TNV148 та TNV196 відрізняються від ембріональних каркасних послідовностей. Порівняння важколанцюгової послідовності TNV148 з іншими людськими антитілами вказує, що багато інших людських мАт містить залишок He в позиції 28 каркасу 1 (беручи до уваги тільки вихідну послідовність), тоді як залишок Pro у позиції 75 в каркасі 3 був незвичайною амінокислотою в цій позиції.

Таке ж порівняння важкого ланцюга TNV196 свідчить, що три амінокислоти за якими він відрізняється від ембріональної послідовності у каркасі 3 можуть бути рідкісними у людських мАт. Існує можливість, що ці відмінності можуть робити TNV148 та TNV196 імуногенними, якщо їх ввести людям. Оскільки TNV148 мав тільки один амінокислотний залишок, що викликав зацікавленість, і цей залишок вважався неважливим для зв'язування ФНПГ, була використана техніка сайто-специфічного мутагенезу для зміни одного нуклеотида у послідовності, що кодує важкий ланцюг TNV148 (у плазміді p1753), так щоб ембріональний залишок Ser кодувався у місці залишку Pro у позиції 75. Результуюча плазміда була названа p1760 (див. Таблицю 2). Результуючий ген та мАт були названі TNV148B для розрізнення його з оригінальним геном TNV148 та мАт (див. Фіг.5).

Збирання плазмід фінальної експресії

Були приготовлені нові антитіл векторів експресії, що базуються на генах важких ланцюгів та легких ланцюгів 12B75, які попередньо клонувалися як геномні фрагменти. Хоча було приготовано різні плазміди експресії TNV (див. Таблицю 2), у кожному випадку 5' флангові послідовності, промоутер та інтронний поліпшувач походили з відповідних генів 12B75. Для плазмід експресії легких ланцюгів, повний інтрон J-C, послідовність, що кодує постійний регіон, та 3' флангова послідовність також походили з гена легкого ланцюга 12B75. Для плазмід експресії важких ланцюгів, що призвели до остаточної продукції клітинних ліній (p1781 та

p1783, див. нижче), послідовності, що кодують постійний регіон людського IgG1, отримані з попередньо-використаних векторів експресії Centocor (p104). Важливо, що клітинні лінії остаточної продукції, про які доповідалося тут, експресують інший алотип (Gm(f+)) TNV mAt, ніж оригінальні TNV mAt (Glm(z)), що походять з гібридами. Це через те, що ген важкого ланцюга 12B75, що отриманий з мишей GenPharm, кодує залишок Arg у C-термінальному закінченні домена CH1, тоді як вектор експресії p104 IgG1 Centocor кодує залишок Lys у тій позиції. Були приготовлені інші плазмідні експресії важкого ланцюга (напр. p1786 та p1788), в якій інтрон J-C, послідовність, що кодує повний постійний регіон та 3' флангова послідовність були отримані з гена важкого ланцюга 12B75, але клітинні лінії трансфіковані цими генами не обиралися в якості клітинних ліній продукції. Вектори були ретельно розроблені для того, щоб уможливити одно-етапне клонування майбутніх ПЛР-посилених регіонів V, що призвело до остаточних плазмід експресії.

ПЛР-посилений варіабельний регіон цДНК були трансфіковані від векторів L28 або pBC до векторів проміжної стадії, які ґрунтуються на 12B75, що забезпечують промютерний регіон та частину інтрона J-C (див. Таблиця 2 для ідентифікаційних номерів плазмід). Обмежувальні фрагменти, що містять 5' половину генів антитіла були потім трансфіковані з цих векторів проміжної стадії до остаточних векторів експресії, що надали 3' половину відповідних генів для утворення остаточних плазмід експресії (див. Таблицю 2 для ідентифікаційних номерів плазмід).

Трансфікування та субклонування клітин

Плазмідні експресії були або лінеаризовані за допомогою обмежувального розщеплення, або вставок генів антитіл у кожній плазміді, були очищені від плазмідових основ. Клітини Sp2/0 та мишиної мієломи 653 були трансфіковані важко- та легколанцюговою ДНК за допомогою електропорації. Було проведено п'ятнадцять різних трансфекцій, більшість з яких були унікальними, як визначено за допомогою Ат, специфічних характеристик генів Ат., по тому чи гени були на лінеаризованих цілих плазмідах чи очищених генних вставках, та лініях клітин господаря (підсумок у Таблиці 3). Верхні шари клітин з клонів резистентних до мікофенолової кислоти були проаналізовані на наявність людських IgG за допомогою ELISA та кількісно оцінені з використанням очищеного rTNV148B в якості стандартної кривої відповідності.

Високо-продукуючі клітинні лінії rTNV148B

Десять батьківських ліній 653 з найкращою продукцією з rTNV148B трансфекції 2 (продукує 5-10 :г/мл у виснажених 24-лункових культурах) були субклоновані для скринінгу на клітинні лінії з найвищою продукцією та було підготовлено більш гомогенну клітинну популяцію. Два субклона батьківської лінії 2.320, 2.320-17 та 2.320-20 продукували приблизно 50 :г/мл у виснажених 24-лункових культурах, що відповідало 5-разовому збільшенню щодо батьківської лінії. Другий етап субклонування субклонованих ліній 2.320-17 та 2.320-20 призвів

Таблиця 3. Підсумок клітинних трансфекцій. Показано ідентифікаційні номери важко- та легколанцюгових плазмід, що кодують кожне mAt. У випадку виконання трансфекції очищеними вставками генів mAt, плазмідна р13 (pSV2gpt) була включена в якості джерела обраного маркера gpt. Важколанцюговий постійний регіон кодувався або тим же вектором експресії людських IgG1, що використовувався для кодування Remicade («старий»), або з використанням постійних регіонів, які містяться у важколанцюговому гені 12B75 (GenPharm/Medarex) ("новий"). H1/L2 відноситься до "нового" mAt створеного з важкого ланцюга TNV14 та легкого ланцюга TNV148. Плазмідні р1783 та р1801 відрізняються тільки по тому скільки інтронів J-C містять їхні гени важких ланцюгів. Кількість трансфекцій, яка визначає першу цифру генеричних назв клітинних клонів, показана праворуч. rTNV148B-продукуючі клітинні лінії C466 (A, B, C, D) та C467A описані тут походять з трансфекцій номер 2 та 1, відповідно. rTNV14-продукуюча клітинна лінія C467A походить з трансфекції номер 3.

mAt	Плазмідні HC/LC/gpt	Вектор HC	Формат ДНК	Трансфекції №	
				Sp2/0	653
rTNV148B	1783/1776	старий	лінійний	1	2
rTNV14	1781/1775	старий	лінійний	3	-
rTNV14	3.27-1	C467ф		Sp2/0	19 :г/мл

Характеризація субклонованих клітинних ліній

Для того, щоб ретельніше охарактеризувати ростові характеристики клітинних ліній та визначити рівні продукції mAt у більшому розмірі було виконано аналіз кривих росту з використанням культур T75. Результати показали, що кожна з чотирьох серій C466 клітинних ліній досягла пікової клітинної густини між $1,0 \times 10^6$ та $1,25 \times 10^6$ клітин/мл та максимальні рівні акумуляції mAt між 110 та 140 :г/мл (Фіг.7). Натомість, найкращий продукуючий субклон Sp2/0, C467A, досягав пікову-густину клітин $2,0 \times 10^6$ клітин/мл та рівней максимальної акумуляції mAt 25 :г/мл (Фіг.7). Аналіз кривих росту не виконувався на rTNV14-продукуючій клітинній лінії, C467A.

Було виконано додатковий аналіз кривих росту для порівняння швидкостей росту при різних концентраціях набору MNX. Це порівняння було підказане останніми спостереженнями того, що клітини C466, які культивувалися за відсутності MNX, можуть рости швидше, ніж ті ж самі клітини, що культивувалися у нормальній кількості MNX (1X). Оскільки цитотоксичні концентрації таких компонентів, як мікофенолова кислота мають тенденцію

Вимірюватися над порядком величини, вважалося можливим, що використання нижчих концентрацій MNX може призвести до значно швидшого часу подвоєння клітин без втрати у стабільності продукції mAt. Клітинні лінії C466A та C466B культивувалися у: без MNX, з 0,2X MNX або 1X MNX. Кількість живих клітин підраховувалася з 24-годинним інтервалом протягом 7 днів. Результати не виявили залежності швидкості

клітинного росту від концентрації МНХ. Так само, клітинні лінії С466В показали час подвоєння 32,4 години у 1Х МНХ, але тільки 22,9 годин без МНХ. Важливо, що час подвоєння для обох клітинних ліній у 0,2Х МНХ був ближчим до того, що спостерігався у середовищі без МНХ, ніж з 1Х МНХ (Фіг.8). Це спостереження наштовхнуло на думку, що покращена клітинна діяльність у біореакторах, для яких час подвоєння є важливим параметром, може реалізуватися з використанням меншої кількості МНХ. Однак, хоча результати тестів на стабільність (див. нижче) свідчать, що клітинна лінія С466 спроможна стабільно продукувати rTNV148В протягом принаймні 60 діб навіть без МНХ, тест на стабільність також показав вищі рівні продукції МАТ, коли клітини культивувалися за присутності МНХ у порівнянні без МНХ.

Для оцінки продукції МАТ з різноманітних клітинних ліній протягом періоду приблизно 60 діб, тести на стабільність було виконано на культурах, що або містять, або не містять набір МНХ. Не всі ці клітинні лінії підтримували високу продукцію МАТ. Після двох тижнів клонування, клон С466А продукував приблизно на 45% менше, ніж на початку дослідження. Продукція з клону С466В також значно впала. Однак, клони С466С та С466D підтримували досить стабільну продукцію, при найбільших рівнях абсолютної продукції у С466D (Фіг.9).

Висновок

З початкового набору восьми людських МАТ проти людського ФНП ψ , TNV148В було обрано як найкращий, ґрунтуючись на декількох критеріях, що включали протеїнову послідовність та силу нейтралізації ФНП, а також TNV14. Було приготовлено клітинні лінії, що продукують більше, ніж 100 :г/мл rTNV148В та 19 :г/мл rTNV14.

Приклад 4: Дослідження артритичних мишей з використанням анти-ФНП антитіл та контролю при застосуванні одноразової боліюсної ін'єкції

Приблизно на 4 тижні життя досліджувані миші Tg197 розподілялися, базуючись на статі та вазі тіла, в одну з 9 груп лікування та отримували одноразове інтраперитонеальне введення ФБСР Далбекко (ФБСР-Д) або анти-ФНП антитіло даного винаходу (TNV14, TNV148 або TNV196) в дозі або 1мг/кг, або 10мг/кг.

Результати: Коли вага аналізувалася як зміна від моменту до введення препарату, у тварин, які отримували 10мг/кг сА2, чітко спостерігалось більший набір ваги, ніж тварини, що отримували ФБСР-Д протягом дослідження. Цей набір ваги був достовірним на 3-7 тижні. У тварин, що отримували 10мг/кг TNV148, також спостерігався значний набір ваги на 7 тижні дослідження (див. Фіг.10).

Фіг.11А-С відображають прогресування важкості захворювання, ґрунтуючись на артритичному індексі. Артритичний індекс у групі, що отримувала 10 мг/кг сА2, був менший, аніж у контрольній групі ФБСР-Д, починаючи з 3 тижня, і продовжував залишатися таким протягом дослідження (7 тижнів). Тварини, що отримували 1 мг/кг TNV14, та тварини, що отримували 1мг/кг сА2, не продемонстрували достовірного зменшення AI після 3 тижня у порівнянні з групою, що лікувалася ФБСР-Д. Не було достовірних відмінностей між групами лікування 10мг/кг, коли кожна з них порівнювалася з іншою з тією ж дозою (10мг/кг сА2 у порівнянні з 10мг/кг TNV14, 148 та 196). Коли порівнювалися групи лікування 1мг/кг, то у групі 1мг/кг TNV148 показав достовірно менший AI, ніж у групі 1мг/кг сА2 на 3, 4 та 7 тижнів. У групі 1мг/кг TNV148 був також менший, ніж у групі, що отримувала 1мг/кг TNV14, на 3 і 4 тижні. Хоча у групі TNV196 спостерігалось достовірне зменшення AI до 6 тижня дослідження (при порівнянні з групою, що отримувала ФБСР-Д), TNV148 був єдиним лікуванням у дозі 1мг/кг при якому спостерігався достовірний ефект у кінці дослідження.

Приклад 5: Дослідження артритичних мишей з використанням анти-ФНП антитіл та контролю при застосуванні багаторазових боліюсних ін'єкцій

Приблизно на 4 тижні життя досліджувані миші Tg197 розподілялися базуючись, на статі та вазі тіла, в одну з 8 груп лікування та отримували інтраперитонеальне введення контрольної речовини (ФБСР-Д) або антитіла (TNV14, TNV148 або TNV196) в дозі або 3мг/кг (тиждень 0). Ін'єкції повторювалися у всіх тваринна 1, 2, 3 та 4 тижнях. Групи 1-6 оцінювалися по ефективності досліджуваної речовини. Зразки сировотки, що отримувалися у тварин з груп 7 і 8 оцінювалися на індукцію імунної відповіді та фармакокінетичний кліренс TNV14 або TNV148 на 2, 3 і 4 тижнях.

Результати: Не було відзначено достовірних відмінностей, коли вага аналізувалася як зміна від періоду до введення препарату. Тварини, що лікувалися з 10мг/кг сА2 мали чітко більший набір ваги, ніж тварини, що протягом дослідження отримували ФБСР-Д (див. Фіг.12).

На Фіг.13А-С відображено прогресування важкості захворювання, ґрунтуючись на артритичному індексі. Артритичний індекс у групі, що отримувала 10мг/кг сА2 був достовірно меншим, ніж у контрольній групі ФБСР-Д, починаючи з 2 тижня та продовжував залишатися таким протягом решти дослідження (тиждень 5). У тварин, що лікувалися або з 1мг/кг, або з 3мг/кг сА2, та у тварин, що отримували 3мг/кг TNV14, не спостерігалось будь-якого достовірного зменшення AI у будь-який період часу протягом дослідження при порівнянні з контрольною групою ФБСР-д. У тварин, що отримували 3 мг/кг TNV148, спостерігалось достовірне зменшення при порівнянні з групою, що отримувала ФБСР-д, починаючи з 3 тижня та триваючи до 5 тижня. У тварин, що отримували 10мг/кг сА2, спостерігалось достовірне зменшення AI при порівнянні з обома нижчими дозами (1мг/кг та 3мг/кг) сА2 на 4 та 5 тижнях дослідження, а також він був значно нижчим, аніж у тварин, що лікувалися TNV14 на 3-5 тижнях. Хоча не було достовірних відмінностей між будь-якими групами лікування у дозі 3мг/кг, AI у тварин, що отримували 3мг/кг TNV14, були достовірно вищими у деякі періоди часу, ніж у групі 10мг/кг, тоді як тварини, що отримували TNV148 не відрізнялися достовірно від тварин, що отримували 10мг/кг сА2.

Приклад 6: Дослідження артритичних мишей з використанням анти-ФНП антитіл та контролю при застосуванні одноразової інтраперитонеальної боліюсної ін'єкції

Приблизно на 4 тижні життя досліджувані миші Tg197 розподілялися, базуючись на статі та вазі тіла, в одну з 6 груп лікування та отримували одноразове інтраперитонеальне боліюсне введення антитіла (сА2 або TNV148) в дозі або 3мг/кг або 5мг/кг. В цьому дослідженні використовувалися ФБСР-Д та 10мг/кг сА2 контрольні групи.

При аналізі ваги в якості зміни від періоду до лікування, у всіх групах лікування досягався однаковий набір ваги. Тварини, що отримували або 3, або 5мг/кг TNV148 або 5мг/кг сА2, набрали достовірну кількість ваги на ранніх етапах дослідження (на тижнях 2 і 3). Тільки тварини, що отримували TNV148, підтримували

достовірний набір ваги у більш пізні часові періоди. У тваринах, що отримували як 3, так і 5мг/кг TNV148, спостерігалася достовірність на 7 тижні, а у тварин з групи 3мг/кг TNV148 вага все ще була достовірно підвищена на 8 тижні після ін'єкції (див. Фіг.14).

На Фіг.15 відображене прогресування важкості захворювання, базуючись на артритичному індексі. Всі групи лікування продемонстрували деякий ступінь захисту на ранніх періодах лікування, при достовірному зменшенні AI при 5мг/кг сА2 та 5мг/кг TNV148 на тижнях 1-3, та у всіх групах лікування спостерігалася достовірне зменшення на тижні 2. Пізніше у дослідженні тварини, що отримували 5мг/кг сА2, показали деякий ступінь захисту, з достовірним зменшенням на тижнях 4, 6 і 7. Низька доза (3мг/кг) як сА2, так і TNV148, продемонструвала достовірне зменшення на 6 тижні, а у всіх групах лікування спостерігалася достовірне зменшення на 7 тижні. Жодна з груп лікування не продемонструвала достовірного зменшення в кінці дослідження (тиждень 8). Не було достовірних відмінностей між будь-якими групами лікування (за винятком групи контролю сольового розчину) у будь-який проміжок часу.

Приклад 7: Дослідження артритичних мишей з використанням анти-ФНП антитіл та контролю при застосуванні одноразової інтраперитонеальної болюсної ін'єкції між анти-ФНП антитілом та модифікованим анти-ФНП антитілом

Для порівняння ефективності інтраперитонеального введення TNV148 (отриманого з клітин гібридами) та rTNV148B (отриманого з трансфікованих клітин). Приблизно на 4 тижні життя досліджувані миші Tg197 були розподілені, ґрунтуючись на статі та вазі тіла, в одну з 9 груп лікування та отримували одноразову інтраперитонеальну болюсну дозу ФБСР Далбекко (ФБСР-Д) або антитіла (TNV148, rTNV148B) у дозі 1мг/кг.

Коли вага аналізувалася як зміна від моменту до введення дози, у тварин, що отримували 10мг/кг сА2, спостерігався чітко більший набір ваги, ніж у тварин, що отримували ФБСР-Д протягом періоду дослідження. Набір ваги був достовірним на 1 тижні та 3-8 тижнях. У тварин, що отримували 1мг/кг TNV148, також спостерігався достовірний набір ваги на 5,6 та 8 тижнях дослідження (див. Фіг.16).

На Фіг.17 відображено прогресування важкості захворювання, ґрунтуючись на артритичному індексі. Артритичний індекс у групі, що отримувала 10мг/кг сА2, був нижчим, ніж у контрольній групі ФБСР-Д, починаючи з тижня 4, та продовжував залишатися таким протягом решти дослідження (тиждень 8). Як у групі, що отримувала TNV148, так і у групі, що отримувала 1мг/кг сА2, спостерігалася достовірне зменшення AI на 4 тижні. Хоча попереднє дослідження (P-099-017) показало, що TNV148 був дещо ефективнішим щодо зменшення артритичного індексу після одноразового інтраперитонеального введення 1мг/кг, дане дослідження показало, що AI в групах, що лікувалися обома версіями TNV антитіла, був дещо вищим. Хоча (за винятком тижня 6) у групі, що отримувала 1мг/кг сА2, не спостерігалася достовірне підвищення при порівнянні з групою 10мг/кг сА2, а в групах, що отримували TNV148, були достовірно більшими на 7 та 8 тижнях, не спостерігалася достовірних відмінностей AI між групами 1мг/кг сА2, 1мг/кг TNV148 та 1мг/кг TNV148B у будь-який момент дослідження.

Зрозуміло, що винахід може використовуватися в інший спосіб, ніж це зокрема описано у згаданих вище описах та прикладах.

Можливі багато модифікацій та варіацій даного винаходу в світлі вищевикладеного і, таким чином, в рамках мети поданої заявки.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Гілес-Комар, Джим;
Шилі, Девід;
Найт, Девід, М.;
Скеллон, Бернард;
Хевнер, Джордж.

<120> АНТИ-TNF АНТИТІЛА, КОМПОЗИЦІЇ, СПОСОБИ ТА ВИКОРИСТАННЯ

<130> CEN250

<160> 15

<170> PatentIn Ver 2.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Arg Tyr Thr Met His
5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Asn Lys Tyr 1
1 5 10

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Glu Ala Arg Gly Ser Tyr Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu 1
1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 6

<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 6
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Phe Thr
1 5 10

<210> 7
<211> 115
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 7
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Arg Gly Ile Ser Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Val
115

<210> 8
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 8
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20

25

30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 9

<211> 157

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val
 1 5 10 15

Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg
 20 25 30

Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
 35 40 45

Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
 50 55 60

Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala
 85 90 95

Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys
 100 105 110

Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys
 115 120 125

Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
 130 135 140

Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
 145 150 155

<210> 10
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 agatatacta tgcac 15

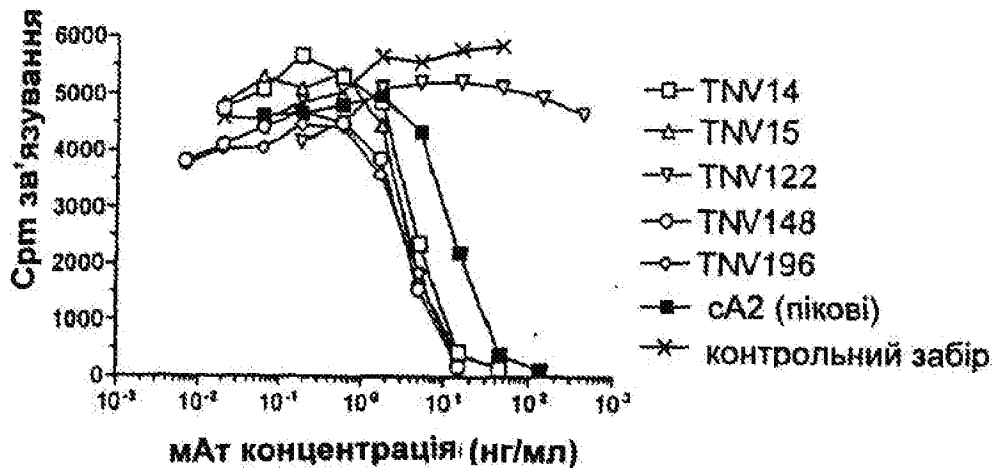
<210> 11
 <211> 51
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 11
 gttatatcat ttgatggaag caataaatac tacgtagact ccgtgagggg c 51

<210> 12
 <211> 51
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 gaggcccggg gatcgtatgc ttttgatac 30

<210> 13
 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 ctctctctgca gggccagtca gsgtgttagc agctacttag cc 33

<210> 14
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 gatgcatcca acagggcc 18

<210> 15
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 15
 cagcagcgtg gcaactggcc t 21



Фіг.1

TNVs ATGGGGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCCTCGTTGCTCTTTTAAGA

 Q V Q L V E S G G G V
 бактеріальна CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG
 TNVs GGTGTCCAGTGT.....
 TNV148 (B) GGTGTCCAGTGT.....A.....

 V Q F G R S L R L S C A A S G
 бактеріальна GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGA
 TNVs

 F T F S E Y A M H W V R Q A P
 бактеріальна TTCACCTTCAGTAGCTATGCTATGCACCTGGGTCCGCCAGGCTCCA
 TNV14, 15

 T.....T.....
 TNV148 (B)

 C.....C.....
 TNV196

 G K G L E W V A Y I S Y D G S
 бактеріальна GGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGC
 TNV14

 A...C.T.....T
 TNV15

 T.....T.....T
 TNV148 (B)

 C.....T...G.....
 TNV196

 N K Y Y A D S V K G R F T I S
 бактеріальна AATAAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCC
 TNV14 .GC...A.G....G.....A.....

 C...A.G.....C.....
 TNV15

 A.G.....
 TNV148 (B)

 A.G.C.....G.....
 TNV196

ФІГ. 2А.

	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L
бактеріальна	AGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG														
TNV14														
TNV15G.....														
TNV148C.....														
TNV148B														
TNV196T.....														

	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R
бактеріальна	AGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA											
TNV14,15GATCGAGGT											
TNV148 (B)A											
TNV196T.....											

	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>G</u>	<u>M</u>	<u>D</u>	<u>V</u>	<u>W</u>
бактеріальна	TACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGG									
TNV14	ATATCAGCAGGTGGAA.....									
TNV15	G.C.....A.T..T.....									
TNV148 (B)	...G.....A.....									
TNV196	..TGG.....A.....									

	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S
бактеріальна	GGGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAG									
TNV14	..C.....									
TNV15	..C.....									
TNV148 (B)	..C.....									
TNV196	..C..G.....									

ФІГ. 2В

TNVs ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTC

 E I V L T Q S P A T
 бактеріальна GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACC
 TNVs CCAGATACCACCGGA.....

 L S L S P G E R A T L S C R A
 бактеріальна STGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCC
 TNVs

S Q S V S S Y L A W Y Q Q K P
 бактеріальна AGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCT
 TNV14,15
 TNV148,196TA.....

 G Q A P R L L I Y D A S N R A
 бактеріальна GGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCC
 TNVs

T G I P A R F S G S G S G T D
 бактеріальна ACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAC
 TNVs

 F T L T I S S L E P E D F A V
 бактеріальна TTCACCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTCAGTT
 TNVs

Y Y C Q Q R S N W P P F T F G
 бактеріальна TATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCCATTCACCTTCGGC
 TNVsA.....

 P G T K V D I K R
 бактеріальна CCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGT
 TNVs

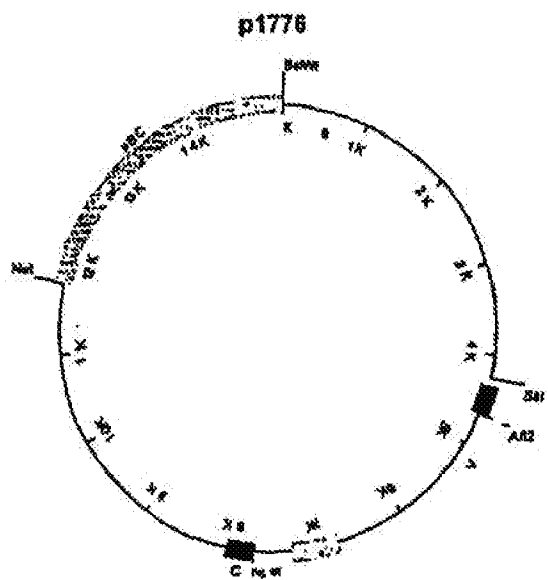
ФІГ. 3

бактеріальна	MGFGLSWVFLVALLRGVQC	сигнал
TNVs	
бактеріальна	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	FR1
TNVs	
TNV148 (B)I..	
бактеріальна	SYAMH	ДВР1
TNVs	
бактеріальна	WVRQAPGKGLEWVA	FR2
TNVs	
TNV148 (B)N.....	
бактеріальна:	VISYDGSNKYYADSVKG	ДВР2
TNV14	I.L....S.K.....D	
TNV15	F.L....K.....	
TNV148 (B)	FM.....K.....	
TNV196	F.....KS.....	
бактеріальна	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	FR3
TNV14	
TNV15A.....	
TNV148P.....	
TNV148B	
TNV196	...V.....F.....F....	
бактеріальна	-----Y Y Y Y Y G M D V	ДВР3
TNV14	DRGISAGGN.....	
TNV15	...V...N.....	
TNV148 (B)	...A...N.....	
TNV196	...G...N.....	
бактеріальна	WGQGTITVTVSS	J6
TNVs	

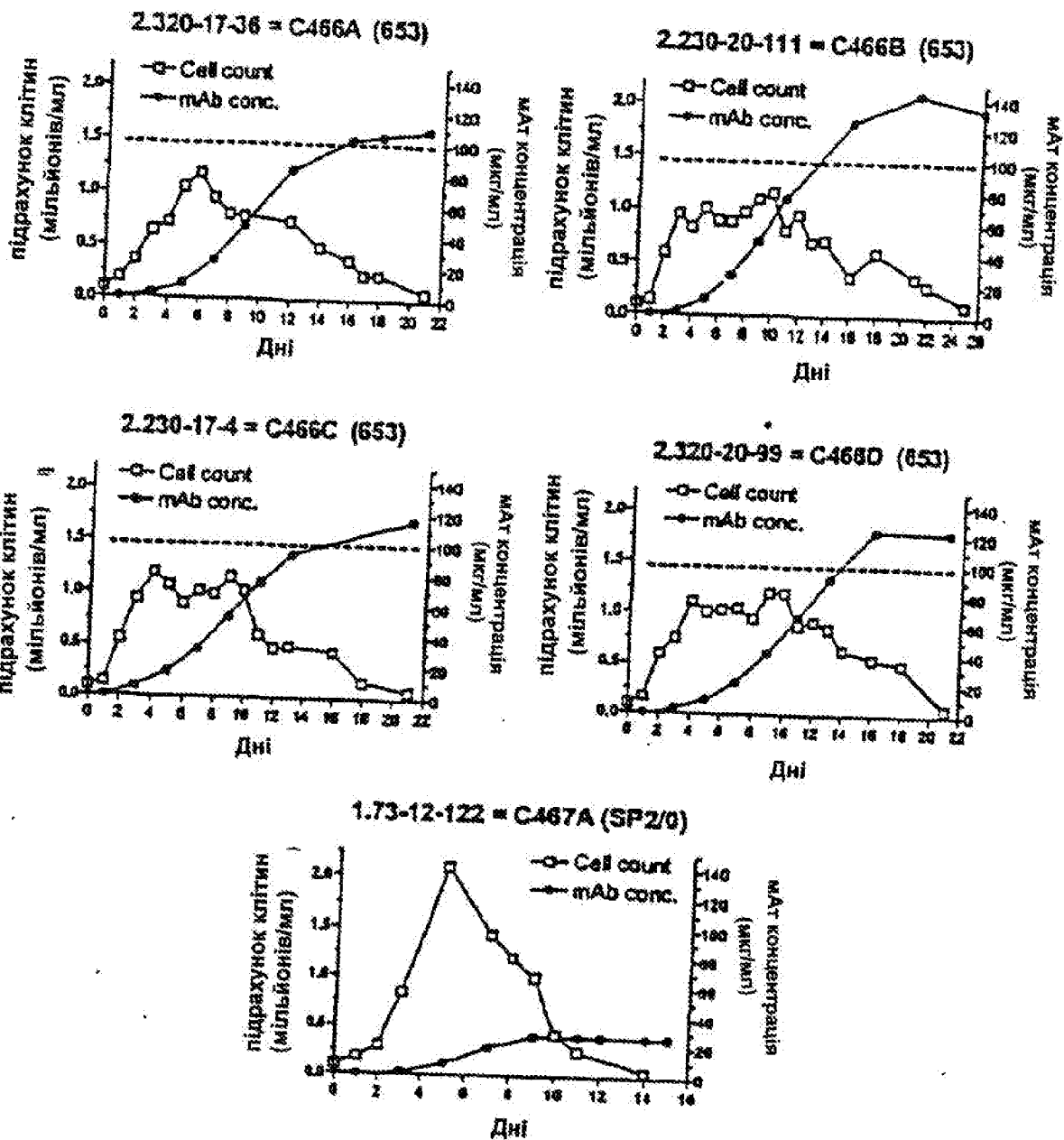
ФІГ. 4

TNVs	MEAPAQLLFLLLLLWLPDTTG	сигнал
бактеріальна TNVs	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	FR1
бактеріальна TNV14 TNV15 TNV148 (B) TNV196	RASQSVSSYLAY.....Y.....	ДВР1
бактеріальна TNVs	WYQQKPGQAPRLLIY	ДВР2
бактеріальна TNVs	DASNRAT	CDR2
бактеріальна TNVs	GI PARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC	ДВР3
бактеріальна TNVs	QQRSNWPPFT	CDR3
бактеріальна TNVs	FGPGTKVDIK	J3

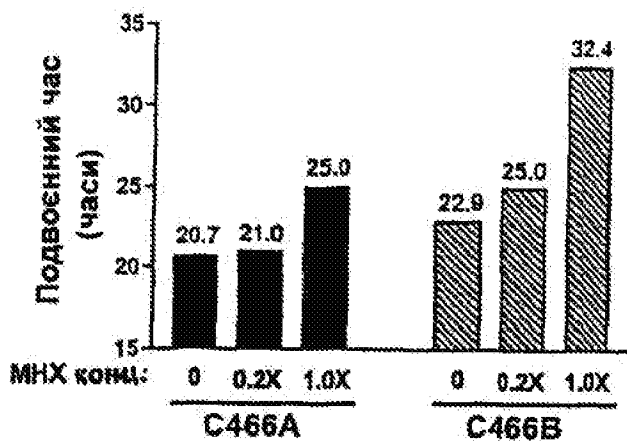
ФІГ. 5



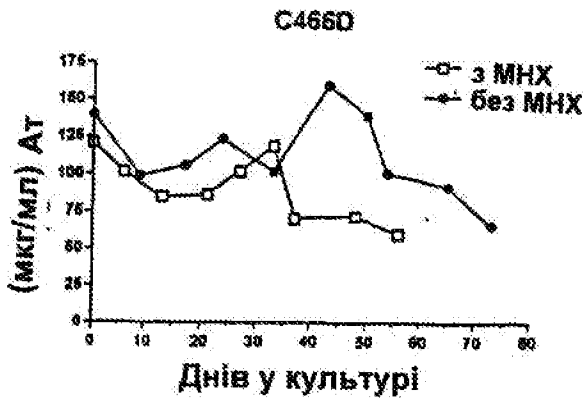
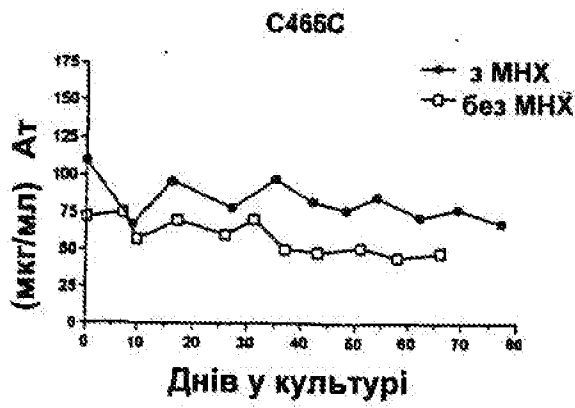
ФИГ. 6



ФІГ. 7

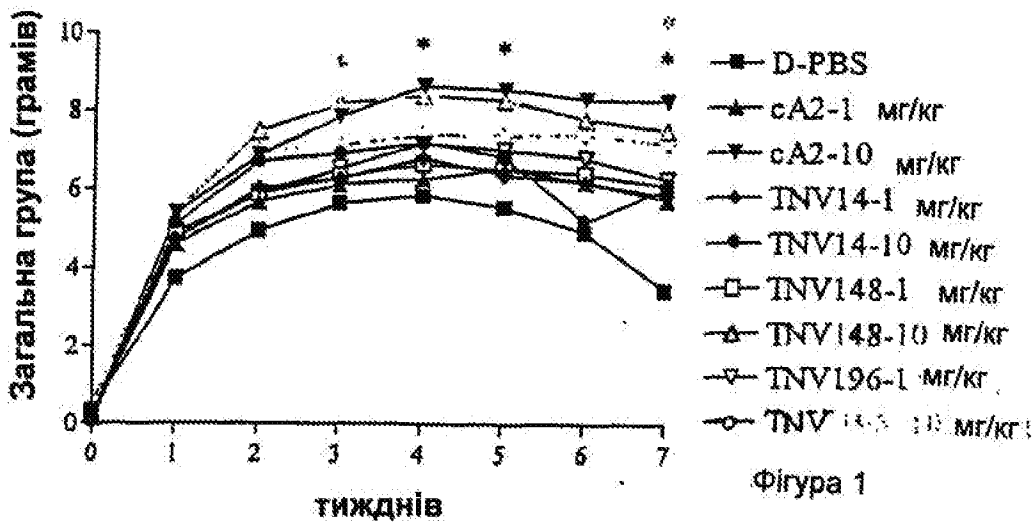


ФІГ. 8



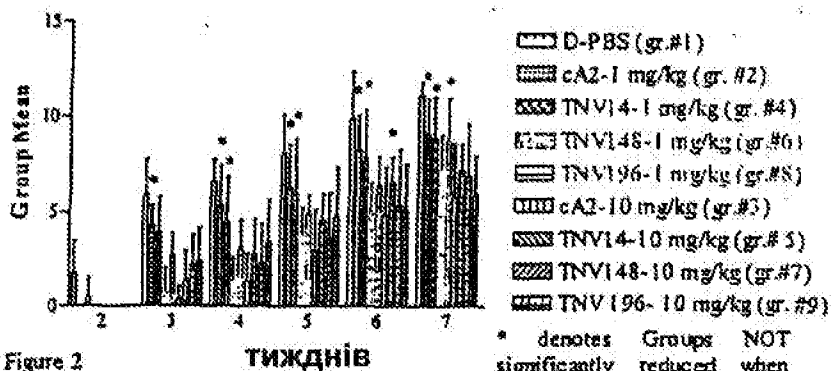
ФІГ. 9

Вага тіла. Зміна від вихідного значення



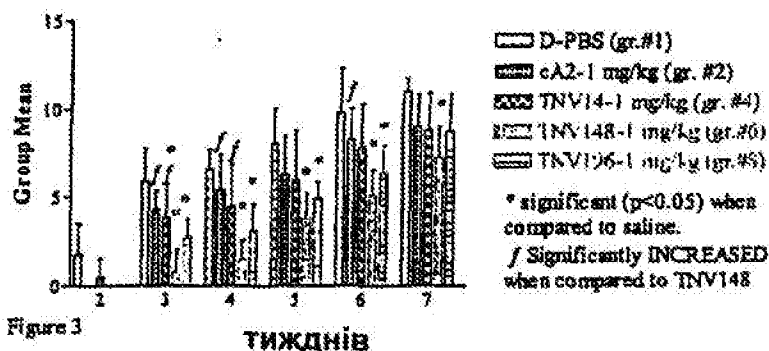
ФІГ. 10

Артритичний індекс



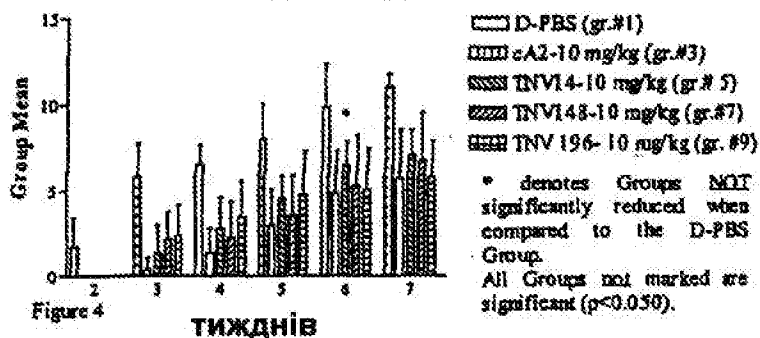
ФІГ. 11А

Артритичний індекс



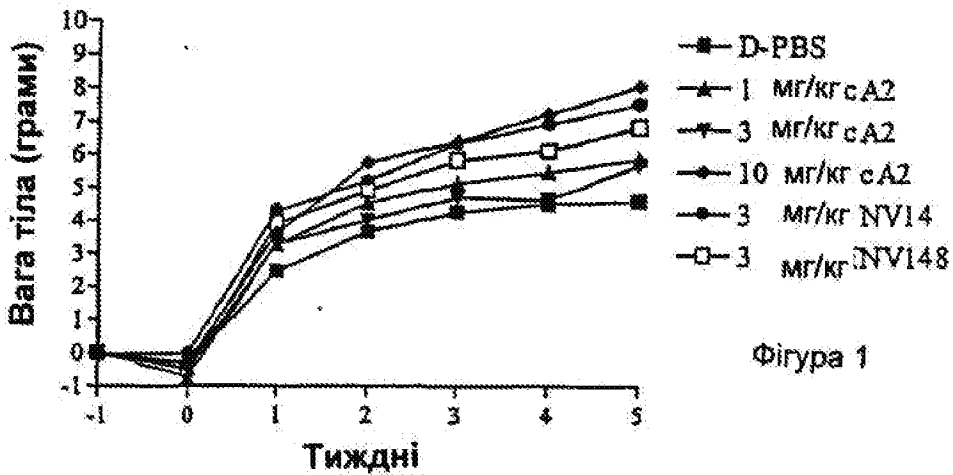
ФІГ. 11В

Артритичний індекс



ФІГ. 11С

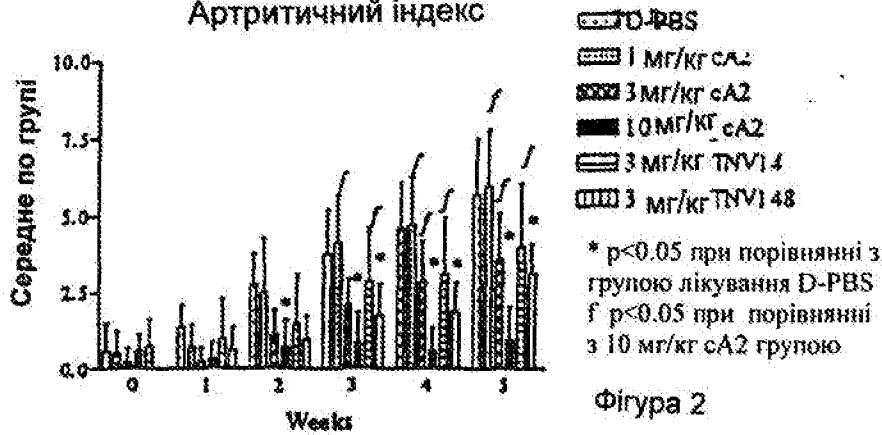
Зміни ваги тіла (середні по групах)



Фігура 1

ФІГ. 12

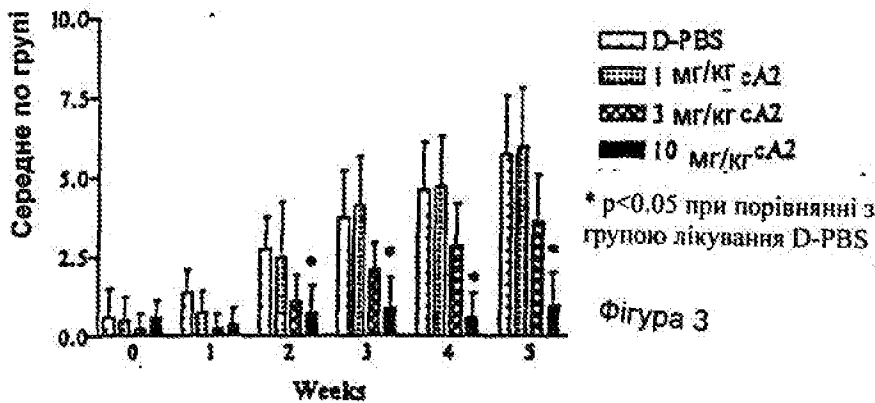
Артритичний індекс



Фігура 2

ФІГ. 13А

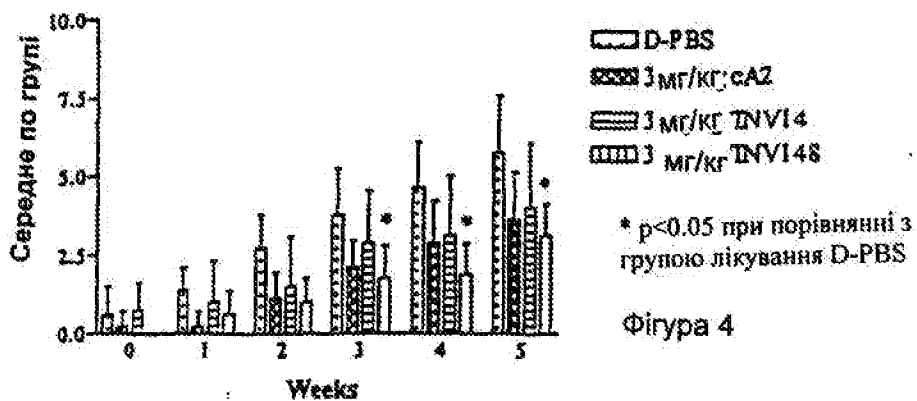
Артритичний індекс (контроль)



Фігура 3

ФІГ. 13В

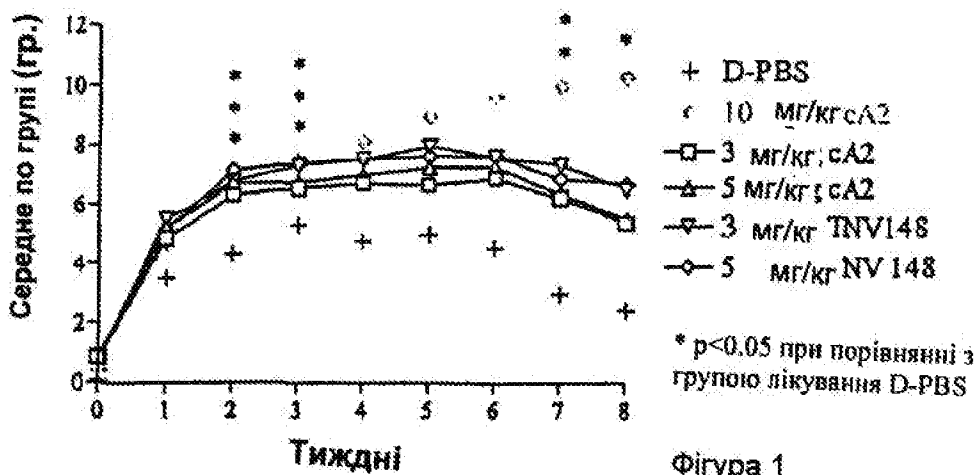
Артритичний індекс



Фігура 4

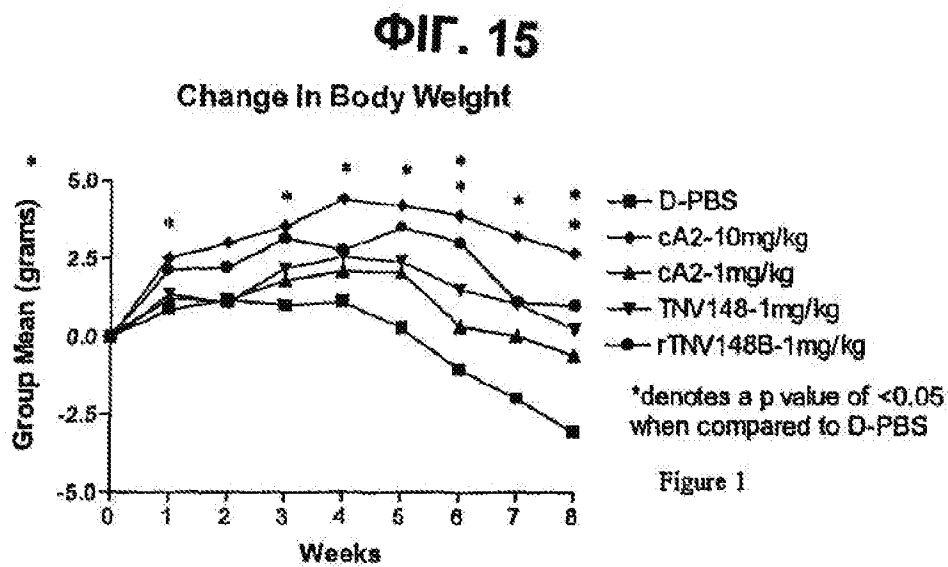
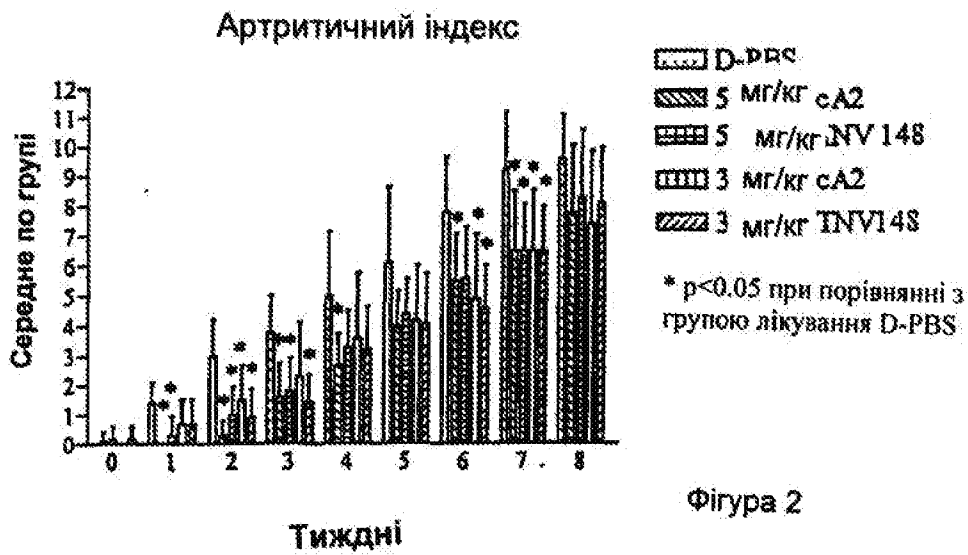
ФІГ. 13С

Зміни ваги тіла



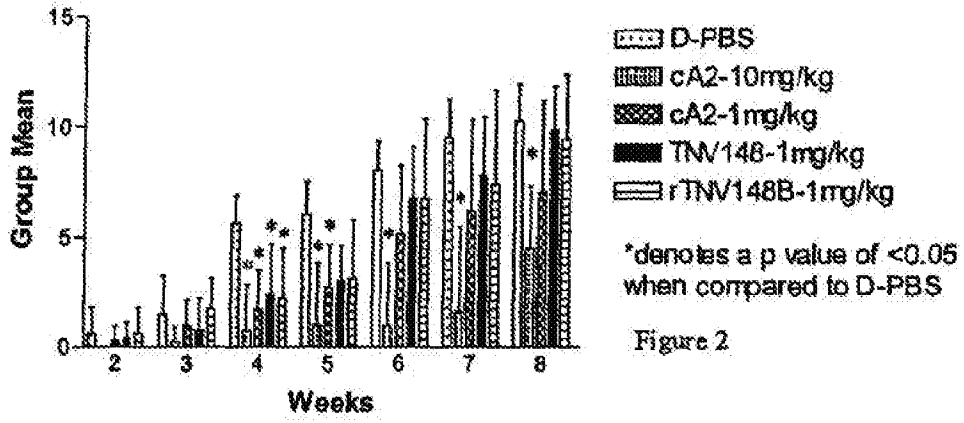
Фігура 1

ФІГ. 14



ФІГ. 16

Arthritic Index



*denotes a p value of <0.05 when compared to D-PBS

Figure 2

FIG. 17