

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 033750

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.11.21

(21) Номер заявки
201300022

(22) Дата подачи заявки
2003.09.05

(51) Int. Cl. C07K 16/24 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

(54) ИЗОЛИРОВАННАЯ МОЛЕКУЛА НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ, КОДИРУЮЩАЯ
АНТИТЕЛО ЧЕЛОВЕКА К РЕЦЕПТОРУ ИНТЕРЛЕЙКИНА-1, И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 60/408,719

(32) 2002.09.06

(33) US

(43) 2014.01.30

(62) 200500441; 2003.09.05

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АМДЖЕН, ИНК.; МЕДАРЕКС, ИНК.
(US)

(56) MARIA SCHÄFERS et al. Combined
epineurial therapy with neutralizing antibodies to
tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 receptor
has an additive effect in reducing neuropathic pain in
mice, Neuroscience Letters, 2001, 310, p. 113-116
US-A-4968607
US-A-5770429
JP-A-2000209980

(72) Изобретатель:
Варнум Брайан, Везина Крис, Витт
Алисон, Кван Хьюминг, Мартин
Фрэнк, Хуан Хайчун, Эллиот Гари
(US)

(74) Представитель:
Харин А.В., Буре Н.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующих антитела человека к
рецептору интерлейкина-1 типа 1, и их применению для получения соответствующих антител.

033750

B1

033750

B1

Заявка на данный патент относится и заявляет приоритет по предварительной заявке США № 60/408719, поданной 6 сентября 2002 г., описание которой включено сюда путем ссылки.

Область изобретения

Изобретение относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим антитела, которые связываются с белком-рецептором интерлейкина-1 типа 1 (IL-1R1), и их применению для получения соответствующих антител.

Предшествующий уровень техники

Разработка антител.

Воспаление представляет собой ответ организма на повреждения, являющиеся результатом механического повреждения, инфекции или антигенной стимуляции. Воспалительные реакции часто патологически выражены. Такие состояния возникают, когда воспаление преувеличенно выражено, неправильно стимулировано или продолжает существовать после удаления повреждающего агента.

Воспалительный ответ опосредован, среди прочего, цитокинами. Одним из уже открытых наиболее сильнодействующих воспалительных цитокинов является интерлейкин-1 (IL-1). Возрастание сигнала IL-1 вызывает персистентное воспаление, связанное с несколькими заболеваниями, и IL-1 считают ключевым медиатором при многих заболеваниях и медицинских состояниях. Этот цитокин производится, прежде всего (но не исключительно), клетками макрофагально-моноцитарной линии и может продуцироваться в двух формах: IL-1 альфа (IL-1 α) и IL-1 бета (IL-1 β).

IL-1 стимулирует клеточные ответы путем взаимодействия с гетеродимерным рецепторным комплексом, состоящим из двух трансмембранных белков, белка-рецептора IL-1 типа 1 (IL-1R1) и вспомогательного белка-рецептора IL-1 (IL-1RAcP). IL-1 сначала связывается с IL-1R1; затем IL-1RAcP рекрутируется в этот комплекс (Greenfeder et al., 1995, J. Biol. Chem. 270: 13757-13765; Yoon and Dinarello, 1998, J. Immunology 160: 3170-3179; Cullinan et al., 1998, J. Immunology 161: 5614-5620) с последующим преобразованием сигнала, приводящим в результате к индукции клеточного ответа.

Исследования связывания на основе клеток позволяют предположить, что IL-1RAcP стабилизирует комплекс передачи сигнала IL-1R путем замедления скорости выключения лиганда (Wesche et al., 1998, FEBS Letters 429: 303-306). Хотя взаимодействие IL-1 с IL-1R тщательно описано, взаимодействие IL-1RAcP с рецептором, связанным с лигандом, остается плохо изученным. Поскольку IL-1RAcP не обладает значительным сродством ни к одному IL-1, ни к одному IL-1R1, но обладает высоким сродством к комплексу, из этого следует, что новые сайты связывания для IL-1RAcP образуются в результате события связывания IL-1/IL-1R, в которых могут даже принимать участие остатки IL-1 (Ettorre et al., 1997, Eur. Cytokine Netw. 8, 161-171). Другая молекула, антагонист рецептора IL-1 (IL-1ra), конкурирует с IL-1 α и IL-1 β за связывание с рецептором, но не способна рекрутировать IL-1RAcP, образуя в результате занятый, но не передающий сигнал рецептор. Активность IL-1 может быть дополнительно уравновешена IL-1R типа II, рецептором-приманкой, который связывает лиганд, но не участвует в передаче сигнала в связи с укороченным внутриклеточным доменом. Действие IL-1ra и IL-1R типа II уменьшает тяжесть и продолжительность опосредованных IL-1 воспалительных событий (Wesche et al., 1998, FEBS Letters 429: 303-306; Dripps et al., 1991, J. Biol. Chem. 266: 10331-10336; Dripps et al., 1991, J. Biol. Chem. 266: 20331-20335).

Ингибиторы интерлейкина-1 могут быть получены из любого белка, способного к специфичному предотвращению действия клеточных рецепторов к IL-1, которое может быть результатом ряда механизмов. Такие механизмы включают негативную регуляцию продуцирования IL-1, связывание свободного IL-1, вмешательство в связывание IL-1 с IL-1R, вмешательство в образование комплекса IL-1 R-IL-1 RAcP или вмешательство в модулирование передачи сигнала IL-1 после связывания с его рецептором. Классы ингибиторов IL-1 включают

антагонисты рецептора интерлейкина-1, такие как IL-1ra, как описано ниже;

моноклональные анти-IL-1R антитела (например, как раскрыто в опубликованной Европейской патентной заявке EP 623674, описание которой включено сюда путем ссылки);

белки, связывающие IL-1, такие как растворимые рецепторы IL-1 (например, как раскрыто в патентах США № 5492888; 5488032; 5464937; 5319071 и 5180812; описания которых включены сюда путем ссылки);

моноклональные анти-IL-1 антитела (например, как раскрыто в публикациях международных патентных заявок № WO 9501997, WO 9402627, WO 9006371, в патенте США № 4935343, в EP 364778, EP 267611 и EP 220063, описания которых включены сюда путем ссылки);

вспомогательные белки-рецепторы IL-1 и антитела к ним (например, как раскрыто в публикациях международных патентных заявок № WO 96/23067 и WO 99/37773, описания которых включены сюда путем ссылки);

ингибиторы интерлейкин-1 β -превращающего фермента (ИПФ) или каспазы 1 (например, как раскрыто в публикациях международных патентных заявок № WO 99/46248, WO 99/47545 и WO 99/47154, описания которых включены сюда путем ссылки), которые могут применяться для ингибирования продуцирования и секреции IL-1 β ;

ингибиторы интерлейкин-1 β -протеазы и

другие соединения и белки, которые блокируют синтез *in vivo* или высвобождение IL-1 из клеток.

Примерные ингибиторы IL-1 раскрыты в следующих ссылках: Патенты США № 5747444; 5359032; 5608035; 5843905; 5359032; 5866576; 5869660; 5869315; 5872095; 5955480 и 5965564; публикации международных патентных заявок WO 98/21957, WO 96/09323, WO 91/17184, WO 96/40907, WO 98/32733, WO 98/42325, WO 98/44940, WO 98/47892, WO 98/56377, WO 99/03837, WO 99/06426, WO 99/06942, WO 91/17249, WO 98/32733, WO 98/17661, WO 97/08174, WO 95/34326, WO 99/36426 и WO 99/364125; публикации Европейских патентных заявок EP534978 и EP89479 и Французской патентной заявки FR 2762514. Описания всех этих вышеупомянутых ссылок включены сюда путем ссылки.

Антагонист рецептора интерлейкина-1 (IL-1ra) представляет собой человеческий белок, который действует в качестве природного ингибитора интерлейкина-1 и является членом семейства IL-1, которое включает IL-1 α и IL-1 β . Предпочтительные антагонисты рецептора (включая IL-1ra и его варианты и производные), а также способы его получения и применения описаны в патенте US 5075222; в публикациях международных патентных заявок № WO 91/08285; WO 91/17184; WO 92/16221; WO 93/21946; WO 94/06457; WO 94/21275; WO 94/21235; DE 4219626, WO 94/20517; WO 96/22793; WO 97/28828 и WO 99/36541, в Австралийской патентной заявке № AU9173636 и Французской патентной заявке № FR2706772; описания которых включены сюда путем ссылки. Эти белки включают как гликозилированные, так и негликозилированные формы антагонистов рецептора IL-1.

Конкретно раскрыты три полезные формы IL-1ra и его вариантов, и они описаны в патенте США № 5075222 ("патент 222"). IL-1ra α охарактеризован с помощью ДСН-ПААГ электрофореза как 22-23 кДа молекула, имеющая приблизительную изоэлектрическую точку 4,8, элюирующая из колонки Mono Q FLPC примерно при 52 mM NaCl в Трис-буфере, pH 7,6. IL-1ra β охарактеризован как 22-23 кДа белок, элюирующий из колонки Mono Q при 48 mM NaCl. Как IL-1ra α , так и IL-1ra β гликозилированы. IL-1ra γ охарактеризован как 20 кДа белок, элюирующий из колонки Mono Q при 48 mM NaCl, и не являющийся гликозилированным. В "патенте 222" также раскрыты способы выделения генов, ответственных за кодирование указанных ингибиторов, клонирования этого гена в подходящих векторах и типах клеток и экспрессии этого гена для продуцирования указанных ингибиторов. IL-1ra, хотя и является эффективным, имеет относительно короткий период полужизни. При современном применении IL-1ra вводят один раз в сутки. Таким образом, данная область выиграет от получения антагониста рецептора IL-1 с приемлемо более длительным периодом полужизни.

Предотвращение передачи сигнала путем ингибирования связывания IL-1 с рецептором IL-1 является привлекательным терапевтическим подходом к лечению опосредованных IL-1 заболеваний. В данной области существует необходимость в клинически эффективных ингибиторах пути передачи сигнала IL-1, которые могут ослаблять воздействия опосредованных IL-1 заболеваний и пригодны для введения пациентам-людям. Человеческое антитело, которое блокирует передачу сигнала IL-1, обладает особенным преимуществом при выполнении этой задачи и обеспечит более длительный период полужизни чем доступная в настоящее время терапия.

Краткое изложение сущности изобретения

В изобретении предложены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие моноклональные антитела, которые связываются с рецептором интерлейкина-1 типа I (IL-1R1). Предпочтительно эти антитела ингибируют передачу сигнала IL-1, конкурируя со связыванием IL-1 β и IL-1 α с IL-1R1. В данном изобретении также предложены клеточные линии гибридомы, которые продуцируют и, наиболее предпочтительно, секретируют в клеточную культуральную среду моноклональные антитела по изобретению. Антитела по изобретению успешно блокируют передачу сигнала IL-1 в человеческих клетках и в результате этого полезны для лечения пациентов с опосредованными IL-1 заболеваниями.

В определенных аспектах, антитела по изобретению содержат тяжелую цепь и легкую цепь, где вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную любой из SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 16, либо ее антиген-связывающий фрагмент или иммунологически функциональный иммуноглобулиновый фрагмент. В других аспектах, вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, как представлено любой из SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 18, либо ее антиген-связывающий или иммунологически функциональный иммуноглобулиновый фрагмент. Такие цепи антител полезны при получении антител, которые связываются специфично с IL-1R1, а также при получении антител двойной специфичности, у которых полученная в результате молекула связывается с IL-1R1 и/или с другой молекулой-мишенью (например, с TNF или с рецептором TNF).

В изобретении также предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела, которые связываются специфично с IL-1R1, где тяжелая цепь содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 10, либо ее антиген-связывающий фрагмент или иммунологически функциональный иммуноглобулиновый фрагмент, а легкая цепь содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 12, либо ее антиген-связывающий или иммунологически функцио-

нальный иммуноглобулиновый фрагмент.

В изобретении, далее, предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела, которые специфично связываются с IL-1R1, где тяжелая цепь содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 14, либо ее антиген-связывающий или иммунологически функциональный иммуноглобулиновый фрагмент, а легкая цепь содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 12, либо ее антиген-связывающий или иммунологически функциональный иммуноглобулиновый фрагмент.

В изобретении также предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела, которые специфично связываются с IL-1R1, где тяжелая цепь содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 16, либо ее антиген-связывающий или иммунологически функциональный иммуноглобулиновый фрагмент, а легкая цепь содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 18, либо ее антиген-связывающий или иммунологически функциональный иммуноглобулиновый фрагмент.

Изобретение также относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим выделенные человеческие антитела, которые специфично связываются с IL-1R1, где это антитело содержит: (а) каркасные участки тяжелой цепи антитела человека, участок CDR1 тяжелой цепи антитела человека, участок CDR2 тяжелой цепи антитела человека и участок CDR3 тяжелой цепи антитела человека и (б) каркасные участки легкой цепи антитела человека, участок CDR1 легкой цепи антитела человека, участок CDR2 легкой цепи антитела человека и участок CDR3 легкой цепи антитела человека. В некоторых аспектах участок CDR1 тяжелой цепи антитела человека может представлять собой участок CDR1 тяжелой цепи 26F5, 27F2 или 15C4, как показано на фиг. 10, а участок CDR1 легкой цепи антитела человека может представлять собой участок CDR1 легкой цепи 26F5, 27F2 или 15C4, как показано на фиг. 11. В других аспектах участок CDR2 тяжелой цепи антитела человека может представлять собой участок CDR2 тяжелой цепи 26F5, 27F2 или 15C4, как показано на фиг. 10, а участок CDR2 легкой цепи антитела человека может представлять собой участок CDR2 легкой цепи 26F5, 27F2 или 15C4, как показано на фиг. 11. В следующих аспектах участок CDR3 тяжелой цепи антитела человека может представлять собой участок CDR3 тяжелой цепи 26F5, 27F2 или 15C4, как показано на фиг. 10, а участок CDR3 легкой цепи антитела человека может представлять собой участок CDR3 легкой цепи 26F5, 27F2 или 15C4, как показано на фиг. 11.

Кроме того, в изобретении предложена молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая отдельное человеческое антитело, которое специфично связывается с рецептором интерлейкина-1 типа 1 (IL-1R1), содержащее: участок CDR1 тяжелой цепи антитела человека, где этот участок CDR1 тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62 или SEQ ID NO: 63; участок CDR2 тяжелой цепи антитела человека, где этот участок CDR2 тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 или SEQ ID NO: 66; и/или участок CDR3 тяжелой цепи антитела человека, где этот участок CDR3 тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68 или SEQ ID NO: 69.

Кроме того, в изобретении предложена молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая отдельное человеческое антитело, которое специфично связывается с рецептором интерлейкина-1 типа 1 (IL-1R1), содержащее: участок CDR1 легкой цепи антитела человека, где этот участок CDR1 легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70 или SEQ ID NO: 71; участок CDR2 тяжелой цепи антитела человека, где этот участок CDR2 легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72 или SEQ ID NO: 73; и/или участок CDR3 тяжелой цепи антитела человека, где этот участок CDR3 тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74 или SEQ ID NO: 75.

Конкретные предпочтительные воплощения изобретения будут очевидны на основании последующего более подробного описания некоторых предпочтительных воплощений и формулы изобретения.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1A, 1B изображена последовательность кДНК (фиг. 1A), кодирующая константный участок тяжелой цепи IgG1 человеческого анти-IL-1R1 антитела (SEQ ID NO: 1) и аминокислотная последовательность (фиг. 1B) константного участка тяжелой цепи IgG1 человеческого анти-IL-1R1 антитела (SEQ ID NO: 2).

На фиг. 2A, 2B изображена последовательность кДНК (фиг. 2A), кодирующая константный участок каппа-цепи человеческого анти-IL-1R1 антитела (SEQ ID NO: 3) и аминокислотная последовательность (фиг. 2B) константного участка каппа-цепи человеческого анти-IL-1R1 антитела (SEQ ID NO: 4).

На фиг. 3A, 3B изображена последовательность кДНК (фиг. 3A), кодирующая константный участок тяжелой цепи IgG2 человеческого анти-IL-1R1 антитела (SEQ ID NO: 5) и аминокислотная последовательность (фиг. 3B) константного участка тяжелой цепи IgG2 человеческого анти-IL-1R1 антитела (SEQ ID NO: 6).

На фиг. 4A, 4B изображена последовательность кДНК (фиг. 4A), кодирующая константный участок тяжелой цепи IgG4 человеческого анти-IL-1R1 антитела (SEQ ID NO: 7) и аминокислотная последовательность (фиг. 4B) константного участка тяжелой цепи IgG4 человеческого анти-IL-1R1 антитела (SEQ

ID NO: 8).

На фиг. 5А, 5В изображена последовательность кДНК (фиг. 5А), кодирующая переменный участок 26F5 тяжелой цепи человеческого анти-IL-1R1 антитела (SEQ ID NO: 9) и аминокислотная последовательность (фиг. 5В) переменного участка 26F5 тяжелой цепи человеческого анти-IL-1R1 антитела (SEQ ID NO: 10).

На фиг. 6А, 6В изображена последовательность кДНК (фиг. 6А), кодирующая переменный участок 26F5 каппа-цепи человеческого анти-IL-1R1 антитела (SEQ ID NO: 11) и аминокислотная последовательность (фиг. 6В) переменного участка 26F5 каппа-цепи человеческого анти-IL-1R1 антитела (SEQ ID NO: 12).

На фиг. 7А, 7В изображена последовательность кДНК (фиг. 7А), кодирующая переменный участок 27F2 тяжелой цепи человеческого анти-IL-1R1 антитела (SEQ ID NO: 13) и аминокислотная последовательность (фиг. 7В) переменного участка 27F2 тяжелой цепи человеческого анти-IL-1R1 антитела (SEQ ID NO: 14).

На фиг. 8А, 8В изображена последовательность кДНК (фиг. 8А), кодирующая переменный участок 15C4 тяжелой цепи человеческого анти-IL-1R1 антитела (SEQ ID NO: 15) и аминокислотная последовательность (фиг. 8В) переменного участка 15C4 тяжелой цепи человеческого анти-IL-1R1 антитела (SEQ ID NO: 16).

На фиг. 9А, 9В изображена последовательность кДНК (фиг. 9А), кодирующая переменный участок 15C4 каппа-цепи человеческого анти-IL-1R1 антитела (SEQ ID NO: 17) и аминокислотная последовательность (фиг. 9В) переменного участка 15C4 каппа-цепи человеческого анти-IL-1R1 антитела (SEQ ID NO: 18).

На фиг. 10 показано выравнивание аминокислотных последовательностей тяжелых цепей от антител анти-IL-1R1, обозначенных 15C4, 27F2 и 26F5. Участки, определяющие комплементарность (CDR, complementarity determining regions), подчеркнуты. CDR1 для 26F5 обозначен как SEQ ID NO: 61; для 27F2 обозначен как SEQ ID NO: 62; для 15C4 обозначен как SEQ ID NO: 63. CDR2 для 26F5 обозначен как SEQ ID NO: 64; для 27F2 обозначен как SEQ ID NO: 65; для 15C4 обозначен как SEQ ID NO: 66. CDR1 для 26F5 обозначен как SEQ ID NO: 67; для 27F2 обозначен как SEQ ID NO: 68; для 15C4 обозначен как SEQ ID NO: 69.

На фиг. 11 показано выравнивание аминокислотных последовательностей легких цепей от антител анти-IL-1R1-γ, обозначенных как 15C4, 27F2 и 26F5. CDR1 для 26F5/27F2 обозначен как SEQ ID NO: 70; для 15C4 обозначен как SEQ ID NO: 71. CDR2 для 26F5/27F2 обозначен как SEQ ID NO: 72; для 15C4 обозначен как SEQ ID NO: 73. CDR1 для 26F5/27F2 обозначен как SEQ ID NO: 74; для 15C4 обозначен как SEQ ID NO: 75.

Фиг. 12 представляет собой график, иллюстрирующий ингибиторное воздействие анти-IL-1R1 антител на образование комплекса IL-1R/IL-1β/IL-1RacP.

Фиг. 13 представляет собой график, иллюстрирующий ингибиторное воздействие моноклонального анти-IL-1R1 антитела, описанного здесь и обозначенного как 15C4, на образование комплекса IL-1R/IL-1α/IL-1RacP.

Фиг. 14 представляет собой график, на котором представлена способность анти-IL-1R1 антител к блокированию связывания IL-1β при незначительном вмешательстве в связывание IL-1α по сравнению с контролем IgG.

Фиг. 15А представляет собой график, показывающий ингибирование продуцирования IL-6 в первичных человеческих хондроцитах анти-IL-1R1 антителами, идентифицированными здесь и обозначенными как 15C4, 26F5 и 27F2, по сравнению с IL-1α.

Фиг. 15В представляет собой график, показывающий ингибирование продуцирования IL-6 в первичных человеческих хондроцитах IL-1α и моноклональными антителами 15C4 и 27F2 по сравнению с классом моноклональных антител, представленным 10H7 и 24E12.

Фиг. 16 представляет собой график, показывающий ингибирование продуцирования IL-6 в цельной крови человека моноклональными антителами анти-IL-1R1, обозначенными 15C4, 26F5 и 27F2, по сравнению с IL-1α.

На фиг. 17 изображена человеческая аминокислотная (SEQ ID NO: 78) и нуклеотидная (SEQ ID NO: 77) последовательность, а также крысиная нуклеотидная (SEQ ID NO: 78) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 79) 3-го домена IL-1R1. Пронумерованные полосы над человеческой последовательностью показывают 15 различных сайтов, мутированных для конструирования 15 различных мутированных белков. Крысиные остатки, введенные в результате мутации, перечислены под крысиной нуклеотидной последовательностью.

На фиг. 18 показан Вестерн-блот-анализ, демонстрирующий распознавание моноклонального анти-IL-1R1 антитела мутантами IL-1R1.

Фиг. 19 представляет собой рисунок, на котором представлены (I) активация пути передачи сигнала IL-1, который начинается со связывания IL-1β с IL-1R1 и рекрутмента IL-1RacP, и три класса анти-IL-1R1 антител: (II) блокаторы эпитопа 3-го домена IL-1, (III) блокаторы эпитопа 3-го домена RacP и (IV)

блокаторы эпитопа 1-го/2-го домена IL-1.

На фиг. 20 изображена кристаллическая структура 15C4 и 27F2 с мутацией 10, как описано здесь. Остатки, изображенные серым цветом, показывают эпитопы 15C4 и 27F2.

На фиг. 21 изображены эпитопы 15C4 в третьем домене внеклеточного IL-1R1.

На фиг. 22 изображены эпитопы 24E12 в третьем домене внеклеточного IL-1R1.

На фиг. 23 изображена аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 59) химерного белка авидин - человеческий IL-1R1-FLAG по изобретению.

На фиг. 24 изображена аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 60) химерного белка авидин - IL-1R1-FLAG Cynomolgus по изобретению. Рекомбинантный авидин цыпленка (выделен курсивом) соединен со зрелым внеклеточным доменом IL-1R1 Cynomolgus (подчеркнут, с С-концевой меткой FLAG, выделенной жирным шрифтом) с помощью 6-аминокислотного линкера. Четыре аминокислоты из человеческого IL-1R1, которые были введены одни или в комбинации с последовательностью Cynomolgus, выделены жирным шрифтом под последовательностью Cynomolgus. Эпитоп 4 выделен жирным шрифтом, курсивом и подчеркнут.

На фиг. 25A показан Вестерн-блот-анализ связывания античеловеческий IL1-R1 антитела (анти-huIL1-R1) с IL-1R1. Символ "*" указывает на то, что антитела использовали в концентрации 5 мкг/мл, тогда как остальные антитела использовали в концентрации 1 мкг/мл.

На фиг. 25B показано суммирование данных денситометрического анализа двойной серии экспериментов Вестерн-блоттинга.

На фиг. 26 показаны графики, представляющие связывание антител анти-huIL1-R1 с белками авидин-IL-1R1-FLAG во множественном анализе связывания на гранулах.

Подробное описание некоторых предпочтительных воплощений

Заголовки разделов, использованные здесь, нужны только для организационных целей и не должны рассматриваться как ограничивающие сущность изобретения. Все источники, цитируемые в данном патенте, точно включены сюда путем ссылки в любых целях.

Определения.

Заболевание или медицинское состояние считают "опосредованным интерлейкином-1 (IL-1) заболеванием", если встречающееся естественным образом или вызванное экспериментально заболевание или медицинское состояние связано с повышенными уровнями IL-1 в жидкостях организма или в тканях, либо, если клетки или ткани, взятые из организма, продуцируют повышенные уровни IL-1 в культуре. Повышенные уровни IL-1 могут включать, например, уровни, которые превышают таковые, обнаруживаемые в норме в конкретной клетке или ткани, либо могут представлять собой любой обнаружимый уровень IL-1 в клетке или в ткани, в которых в норме IL-1 не экспрессируется. Во многих случаях опосредованные IL-1 заболевания распознают также на основании двух приведенных ниже дополнительных условий: (1) патологические показатели, связанные с заболеванием или медицинским состоянием, можно имитировать экспериментальным путем у животных посредством введения IL-1 или положительной регуляции экспрессии IL-1 и (2) патология, вызванная в экспериментальных животных моделях заболевания или медицинского состояния, может быть ингибирована или устранена посредством обработки агентами, которые ингибируют действие IL-1. При большинстве опосредованных IL-1 заболеваний встречаются по меньшей мере два из указанных условий, и при многих опосредованных IL-1 заболеваниях встречаются все три указанных условия.

Не исключительный перечень острых и хронических опосредованных IL-1 заболеваний включает, но не ограничен ими, приведенные ниже: острый панкреатит; боковой амиелотрофический склероз (ALS, amyelolaterosclerosis); болезнь Альцгеймера; кахексию/анорексию, включая кахексию, вызванную СПИД; астму и другие легочные заболевания; атеросклероз; аутоиммунный васкулит; синдром хронической усталости; заболевания, связанные с Clostridium, включая диарею, связанную с Clostridium; коронарные состояния и показания, включая застойную сердечную недостаточность, коронарный рестеноз, инфаркт миокарда, дисфункцию миокарда (например, связанную с сепсисом) и коронарный артериальный шунтированный трансплантат; рак, такой как множественная миелома и миелогенная (например, AML (острая миелоидная лейкемия) или CML (хроническая миелоидная лейкемия)) и другие лейкемии, а также метастаз опухоли; диабет (например, инсулинзависимый диабет); эндометриоз; лихорадку; фибромиалгию; гломерулонефрит; болезнь трансплантат против хозяина/отторжение трансплантата; геморрагический шок; гипералгезию; воспалительное кишечное заболевание; воспалительные состояния сустава, включая остеоартрит, псориатический артрит и ревматоидный артрит; воспалительное глазное заболевание, которое может быть связано, например, с трансплантатом роговицы; ишемию, включая церебральную ишемию (например, повреждение головного мозга в результате травмы, эпилепсии, геморрагии или удара, каждое из которых может привести к нейродегенерации); болезнь Кавасаки; нарушение познавательной способности; легочные заболевания (например, РДСВ (острый респираторный дистресс-синдром)); рассеянный склероз; миопатии (например, мышечный метаболизм белков, особенно при сепсисе); нейротоксичность (например, которая вызвана ВИЧ); остеопороз; боль, включая боль при раке; болезнь Паркинсона; заболевание периодаонта; преждевременные роды; псориаз; реперфузионное повреждение; септический шок; побочные эффекты лучевой терапии; заболевание височно-верхнечелюстного сустава; рас-

стройство сна; увеит или воспалительное состояние в результате деформации, растяжения, повреждения хряща, травмы, ортопедической операции, инфекции или других болезненных процессов. Способы по изобретению для лечения этих острых и хронических опосредованных IL-1 заболеваний, а также других опосредованных IL-1 заболеваний описаны ниже.

Для получения рекомбинантной ДНК, осуществления синтеза олигонуклеотидов и практики культивирования ткани и трансформации (например, электропорации, трансфекции или липофекции) могут быть использованы общепринятые методики. Ферментативные реакции и методики очистки можно осуществлять в соответствии с указаниями фирмы-производителя, либо как их обычно выполняют в данной области, либо как описано здесь. Вышеуказанные методики и процедуры можно, как правило, осуществлять общепринятыми методами, хорошо известными в уровне техники, и как описано в различных общих и более конкретных источниках, которые цитируются и обсуждаются на протяжении всего настоящего описания. См., например, книгу Sambrook et al., 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., которая включена сюда путем ссылки для любой цели. Если не представлены конкретные определения, лабораторные процедуры и методики аналитической химии, химии органического синтеза, а также лекарственной и фармацевтической химии, описанные здесь, и номенклатура, связанная с ними, хорошо известны и обычно используются в данной области. Для химических синтезов, химических анализов, получения, изготовления и доставки фармацевтических препаратов и лечения пациентов могут быть использованы стандартные методики.

Как используют в соответствии с настоящим описанием, приведенные ниже термины, если не указано иное, следует понимать следующим образом:

Термин "изолированный полинуклеотид" означает, что рассматриваемый полинуклеотид: 1) не связан (ковалентно или нековалентно) со всеми другими полинуклеотидами или частью их, с которыми указанный полинуклеотид связан в природе, или 2) связан с молекулой, с которой он не связан в природе, или 3) не встречается в природе связанным с какими-либо другими полинуклеотидами. Такой отдельный полинуклеотид может представлять собой геномную ДНК, кДНК, мРНК или другие РНК, синтетического происхождения, или любую их комбинацию.

Термин "изолированный белок", упоминаемый здесь, означает, что указанный белок: 1) свободен, по меньшей мере, от некоторых других белков, с которыми он должен обычно обнаруживаться, 2) по существу свободен от других белков из того же источника, например, из того же вида, 3) экспрессируется клеткой другого вида, 4) отделен по меньшей мере от 50% полинуклеотидов, липидов, углеводов или других веществ, с которыми он связан в природе, 5) не связан (посредством ковалентного или нековалентного взаимодействия) с участками белка, с которым "изолированный белок" связан в природе, 6) оперативно связан (посредством ковалентного или нековалентного взаимодействия) с полипептидом, с которым он не связан в природе, или 7) не встречается в природе. Геномная ДНК, кДНК, мРНК или другие РНК синтетического происхождения или любая их комбинация могут кодировать такой изолированный белок. Предпочтительно изолированный белок по существу свободен от белков или полипептидов, либо других примесей, которые обнаруживаются в его природном окружении, которые будут препятствовать его терапевтическому, диагностическому, профилактическому, исследовательскому или другому применению.

Термин "полипептид" или "белок" означает одну или более чем одну цепь аминокислот, где каждая цепь содержит аминокислоты, ковалентно связанные пептидными связями, и где указанный полипептид или белок может содержать множество цепей, нековалентно и/или ковалентно связанных вместе пептидными связями, имеющих последовательность нативных белков, т.е. белков, продуцируемых встречающимися в природе и, конкретно, нерекомбинантными клетками, либо полученными генно-инженерным путем или рекомбинантными клетками, и содержит молекулы, имеющие аминокислотную последовательность нативного белка, или молекулы, имеющие делеции, вставки и/или замены одной или более чем одной аминокислоты нативной последовательности. Термин "полипептид" или "белок", конкретно, включает анти-IL1-R1 антитела или последовательности, которые имеют делеции, вставки и/или замены одной или более чем одной аминокислоты анти-IL1-R1 антитела. Таким образом, "полипептид" или "белок" может включать одну цепь (называется "мономер") или множество цепей (называется "мультимер") аминокислот.

Термин "фрагмент полипептида" относится к полипептиду, который может быть мономерным или мультимерным, который имеет amino-концевую делецию, карбокси-концевую делецию и/или внутреннюю делецию или замену встречающегося в природе или продуцированного рекомбинантным путем полипептида. В некоторых воплощениях фрагмент полипептида может содержать аминокислотную цепь длиной по меньшей мере от 5 до примерно 500 аминокислот. Должно быть понятно, что в некоторых воплощениях фрагменты имеют длину по меньшей мере 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 или 450 аминокислот. Особенно полезные фрагменты полипептида включают в себя функциональные домены, включая связывающие домены. В случае антитела IL1-R1 полезные фрагменты включают, но не ограничены ими, участок CDR, особенно участок CDR3 тяжелой или легкой цепи; вариативный домен тяжелой или легкой цепи; участок аминокислотной цепи или, по меньшей мере, ее вариативный участок, включающий два CDR, и т.п.

Термин "иммунологически функциональный иммуноглобулиновый фрагмент", как его используют здесь, относится к фрагменту полипептида, который содержит, по меньшей мере, переменные домены тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина. Иммунологически функциональный иммуноглобулиновый фрагмент по изобретению способен к связыванию с лигандом, предотвращая связывание этого лиганда с его рецептором, прерывая биологический ответ в результате связывания лиганда с рецептором или любой их комбинацией. Предпочтительно иммунологически функциональный иммуноглобулиновый фрагмент по изобретению специфично связывается с IL-1R1.

Термины "встречающийся в природе" и "нативный" означают, что биологические материалы (молекулы, последовательности, белковые комплексы, клетки и т.п.), к которым применяют эти термины, могут быть обнаружены в природе, а не сконструированы человеком. Например, полипептид или полипептидная последовательность, которые присутствуют в организме (включая вирусы), которые могут быть выделены из природного источника и не модифицированы человеком намеренно, являются встречающимися в природе. Подобным образом термины "не встречающийся в природе" или "не нативный" относятся к материалу, который не обнаруживается в природе или который был структурно модифицирован или синтезирован человеком.

Термин "функциональным образом связанный" означает, что компоненты, к которым применяют этот термин, находятся во взаимоотношениях, которые дают им возможность осуществлять свойственные им функции в подходящих условиях. Например, регуляторная последовательность "функциональным образом связана" с последовательностью, кодирующей белок, считая с ней таким образом, что экспрессия этой последовательности, кодирующей белок, достигается в условиях, совместимых с транскрипционной активностью этих регуляторных последовательностей.

Термин "регуляторная последовательность" означает, что указанная полинуклеотидная последовательность может осуществлять экспрессию и процессинг кодирующих последовательностей, с которыми она считана. Природа таких регуляторных последовательностей может зависеть от организма-хозяина. В конкретных воплощениях регуляторные последовательности для прокариот могут включать промотор, сайт связывания рибосомы и последовательность терминации транскрипции. В других конкретных воплощениях регуляторные последовательности для эукариот могут включать промоторы, содержащие один сайт или множество сайтов распознавания для факторов транскрипции, последовательности-энхансеры транскрипции и последовательность терминации транскрипции. В некоторых воплощениях "регуляторные последовательности" могут включать лидерные последовательности и/или последовательности партнера слияния.

Термин "полинуклеотид" означает полимеры однонитевой или двунитевой нуклеиновой кислоты длиной по меньшей мере 10 оснований. В некоторых воплощениях нуклеотиды, составляющие полинуклеотид, могут представлять собой рибонуклеотиды или дезоксирибонуклеотиды или модифицированную форму любого типа нуклеотида. Такие модификации включают модификации оснований, такие как производные бромуридина и инозина, модификации рибозы, такие как 2',3'-дидезоксирибоза, и модификации межнуклеотидной связи, такие как фосфоротиоат, фосфородитиоат, фосфороселеноат, фосфородиселеноат, фосфороанилотиоат, фосфороанилатат и фосфороамидат. Этот термин включает однонитевую и двунитевую формы ДНК.

Термин "олигонуклеотид" означает полинуклеотид, имеющий длину 200 оснований или меньше. В предпочтительных воплощениях длина олигонуклеотидов составляет 10-60 оснований. В более предпочтительных воплощениях длина олигонуклеотидов составляет 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20-40 оснований. Олигонуклеотиды могут быть однонитевыми или двунитевыми, например, для использования при конструировании мутантного гена. Олигонуклеотиды по изобретению могут представлять собой смысловые или бессмысловые олигонуклеотиды.

Термин "встречающиеся в природе нуклеотиды" включает дезоксирибонуклеотиды и рибонуклеотиды. Термин "модифицированные нуклеотиды" включает нуклеотиды с модифицированными или замещенными сахарными группами, либо с модифицированными или замещенными основаниями. Термин "олигонуклеотидные связи" включает такие связи, как фосфоротиоат, фосфородитиоат, фосфороселеноат, фосфородиселеноат, фосфороанилотиоат, фосфороанилатат, фосфороамидат и тому подобные. См., например, LaPlanche et al. (1986), Nucl. Acids Res. 14: 9081; Stec et al. (1984), J. Am. Chem. Soc. 106: 6077; Stein et al. (1988), Nucl. Acids Res. 16: 3209; Zon et al. (1991), Anti-Cancer Drug Design 6: 539; Zon et al. (1991), Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, p. 87-108 (F. Eckstein, ed.), Oxford University Press, Oxford, England; Stec et al., US Pat. No. 5151510; Uhlmann and Peyman (1990), Chemical Reviews 90: 543, описания которых включены сюда путем ссылки для любой цели. Олигонуклеотид по изобретению может включать метку, в том числе радиоактивную метку, флуоресцентную метку, гаптен или антигенную метку для анализов на обнаружение.

Термин "вектор" означает любую молекулу (например, нуклеиновую кислоту, плазмиду или вирус), используемую для переноса кодирующей информации в клетку-хозяина.

Термин "экспрессионный вектор" или "экспрессионная конструкция" относится к вектору, который является пригодным для трансформации клетки-хозяина и содержит последовательности нуклеиновой кислоты, которые направляют и/или регулируют (в связи с клеткой-хозяином) экспрессию одного или

более чем одного гетерологичного кодирующего участка, функциональным образом связанного с ней. Экспрессионная конструкция может включать, но не ограничиваться ими, последовательности, которые воздействуют на транскрипцию, трансляцию и сплайсинг РНК, если присутствуют интроны, кодирующего участка, функциональным образом связанного с ними, или контролируют их.

Термин "клетка-хозяин" означает клетку, которая трансформирована или способна быть трансформированной последовательностью нуклеиновой кислоты и посредством этого экспрессирует выбранный интересующий ген. Этот термин включает потомство родительской клетки, пока присутствует выбранный ген, независимо от того, идентично ли это потомство по морфологии или по генетическому составу исходной родительской клетке.

Термин "трансдукция" означает перенос генов от одной бактерии к другой, обычно посредством фага. "Трансдукция" также относится к приобретению и переносу эукариотических клеточных последовательностей ретровирусами.

Термин "трансфекция" означает захват чужеродной или экзогенной ДНК клеткой, и клетка "трансфицирована", когда экзогенная ДНК введена внутрь под клеточную мембрану. Ряд методик трансфекции хорошо известен в данной области и обсуждается здесь. См., например, Graham et al., 1973, *Virology* 52: 456; Sambrook et al., 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Davis et al., 1986, *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier; и Chu et al., 1981, *Gene* 13: 197. Такие методики можно использовать для введения одной или более чем одной молекулы экзогенной ДНК в подходящие клетки-хозяева.

Термин "трансформация" относится к изменению генетических характеристик клетки, и клетка трансформирована, когда она модифицирована таким образом, что содержит новую ДНК. Например, клетка трансформирована, когда она модифицирована по сравнению с ее нативным состоянием посредством трансфекции, трансдукции или других методик. После трансфекции или трансдукции трансформирующая ДНК может рекомбинировать с ДНК клетки путем физической интеграции в хромосому клетки, либо может поддерживаться транзитно в виде эпизомного элемента без репликации, либо может реплицироваться независимо в виде плазмиды. Клетку считают "стабильно трансформированной", когда трансформирующая ДНК реплицируется при делении клетки.

Термин "антиген" относится к молекуле или участку молекулы, которые способны связываться с избирательным связывающим агентом, таким как антитело, и, кроме того, могут быть использованы у животного для продуцирования антител, способных связываться с эпитопом этого антигена. Антиген может иметь один или более чем один эпитоп.

Термин "эпитоп" включает любой детерминант, предпочтительно полипептидный детерминант, способный к специфичному связыванию с иммуноглобулином или рецептором Т-клетки. В некоторых воплощениях детерминанты эпитопов включают химически активные поверхностные группировки молекул, такие как аминокислоты, сахарные боковые цепи, фосфорил или сульфонил, и в некоторых воплощениях могут иметь специфичные характеристики трехмерной структуры и/или специфичные характеристики заряда. Эпитоп представляет собой участок антигена, который связывается антителом. В некоторых воплощениях указано, что антитело специфично связывает антиген, когда оно преимущественно распознает его антиген-мишень в сложной смеси белков и макромолекул. В предпочтительных воплощениях указано, что антитело специфично связывает антиген, когда константа диссоциации меньше или равна примерно 10 нМ, более предпочтительно, когда константа диссоциации меньше или равна примерно 100 пМ и наиболее предпочтительно, когда константа диссоциации меньше или равна примерно 10 пМ.

Термин "идентичность" относится к родству между последовательностями двух или более полипептидных молекул либо двух или более молекул нуклеиновых кислот, как определено на основании сравнения их последовательностей. В данной области "идентичность" также означает степень родства между молекулами нуклеиновых кислот или полипептидов, что в данном случае определяют как совпадение между последовательностями двух или более нуклеотидов либо двух или более аминокислот. "Идентичность" определяет процент идентичных совпадений между меньшими из двух или более последовательностей с выравниванием разрывов (если они есть) со ссылкой на конкретную математическую модель или компьютерную программу (т.е. "алгоритмы").

Термин "подобие" используют в данной области в отношении родственной концепции; в отличие от "идентичности", тем не менее, "подобие" относится к мере родства, которое включает как идентичные совпадения, так и совпадения консервативных замен. Если две полипептидные последовательности имеют, например, 10/20 идентичных аминокислот, а остальные представляют собой неконсервативные замены, тогда и процент идентичности, и процент подобия будут составлять 50%. Если в том же примере существует пять дополнительных положений, где имеются консервативные замены, тогда процент идентичности остается 50%, но процент подобия будет составлять 75% (15/20). Следовательно, в случаях, где имеются консервативные замены, процент подобия между двумя полипептидами будет выше, чем процент идентичности между этими двумя полипептидами.

Идентичность и подобие родственных нуклеиновых кислот и полипептидов можно легко вычислить известными способами. Такие способы включают, но не ограничены ими, способы, описанные в *Computational Molecular Biology* (Lesk, A.M., ed.), 1988, Oxford University Press, New York; *Biocomputing: Infor-*

matics and Genome Projects (Smith, D. W., ed.), 1993, Academic Press, New York; Computer analysis of Sequence Data, Part 1 (Griffin, A. M. and Griffin, H. G., eds.), 1994, Humana Press, New Jersey; von Heinje, G. Sequence Analysis in Molecular Biology, 1987, Academic Press; Sequence Analysis Primer (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.), 1991, M. Stockton Press, New York; Carillo et al., 1988, SIAM J. Applied Math. 48: 1073; и Durbin et al., 1998, Biological Sequence Analysis, Cambridge University Press.

Предпочтительные способы определения идентичности разработаны так, чтобы давать наибольшее совпадение между тестируемыми последовательностями. Способы определения идентичности описаны в общедоступных компьютерных программах. Предпочтительные компьютерные программные способы определения идентичности между двумя последовательностями включают, но не ограничены ими, пакет программ GCG, включая GAP (Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12: 387; Genetic Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), BLASTP, BLASTN и FASTA (Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410). Программа BLASTX общедоступна от National Center for Biotechnology Information (NCBI) и из других источников (BLAST Manual, Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul et al., 1990, см. выше). Хорошо известный алгоритм Смита-Вотермана (Smith Waterman) может быть также использован для определения идентичности.

Некоторые схемы выравнивания для выравнивания двух аминокислотных последовательностей могут приводить в результате к совпадению только короткого участка этих двух последовательностей, и этот небольшой выровненный участок может иметь очень высокую идентичность последовательности, даже если нет значительного родства между двумя полноразмерными последовательностями. Соответственно, в некоторых воплощениях избранный способ выравнивания (программа GAP) будет приводить в результате к выравниванию, которое охватывает по меньшей мере 50 смежных аминокислот целевого полипептида.

Например, используя компьютерный алгоритм GAP (Genetic Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), два полипептида, для которых нужно определить процент идентичности последовательности, выравнивают до оптимального совпадения их соответствующих аминокислот ("совпадающий промежуток", как определено с помощью этого алгоритма). В некоторых воплощениях в соответствии с этим алгоритмом используют метод штрафных функций открытия разрыва (которые вычисляют как трехкратную среднюю диагональ, где "средняя диагональ" представляет собой среднее диагонали матрицы сравнения; "диагональ" представляет собой очки или число, оцениваемое для каждого точного совпадения аминокислот конкретной матрицей сравнения) и метод штрафных функций протяженности разрыва (которые обычно составляют одну десятую штрафных функций открытия разрыва), а также матрицу сравнения PAM 250 или BLOSUM 62. В некоторых воплощениях этим алгоритмом также используется стандартная матрица сравнения (см. Dayhoff et al., 1978, Atlas of Protein Sequence and Structure 5: 345-352 для матрицы сравнения PAM 250; Henikoff et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919 для матрицы сравнения BLOSUM 62).

В некоторых воплощениях параметры для сравнения полипептидных последовательностей включают приведенные ниже:

- алгоритм: Needleman et al. (1970), J. Mol. Biol. 48: 443-453;
- матрица сравнения: BLOSUM 62 от Henikoff et al. (1992), см. выше;
- штрафная функция разрыва: 12;
- штрафная функция длины разрыва: 4;
- порог подобия: 0.

Программа GAP может быть применима с приведенными выше параметрами. В некоторых воплощениях вышеупомянутые параметры являются недостаточными параметрами для полипептидных сравнений (параллельно с отсутствием штрафных функций для концевых разрывов) при использовании алгоритма GAP.

Термин "встречающийся в природе", как его используют в отношении аминокислот, относится к двадцати традиционным аминокислотам. См. Immunology-A Synthesis, 2nd Edition (E.S. Golub and D.R. Gren, eds.), Sinauer Associates: Sunderland, MA (1991), включенную сюда путем ссылки для любой цели.

Пептидные аналоги широко применяют в фармацевтической промышленности в качестве непептидных лекарств со свойствами, аналогичными свойствам пептида-матрицы. Эти типы непептидных соединений называют "пептидные миметики" или "пептидомиметики". См. Fauchere (1986) Adv. Drug Res. 15: 29; Veber & Friedinger, 1985, TINS, p. 392; и Evans et al. (1987), J. Med. Chem. 30: 1229, которые включены сюда путем ссылки для любой цели. Такие соединения часто разрабатывают с целью компьютерного молекулярного моделирования. Пептидные миметики, которые структурно подобны терапевтически полезным пептидам, можно использовать для получения подобного терапевтического или профилактического эффекта. Как правило, пептидомиметики структурно подобны пептиду или полипептиду-образцу (т.е. пептиду или полипептиду, который обладает биологическим свойством или фармакологической активностью), такому как человеческое антитело, но имеют одну или более чем одну пептидную связь, возможно, замененную связью, выбранной из -CH₂-NH-, -CH₂-S-, -CH₂-CH₂-, -CH=CH- (цис и транс), -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- и -CH₂SO-, способами, хорошо известными в данной области. Систематическая замена одной или более чем одной аминокислоты согласованной последовательности D-аминокислотой

того же типа (например, D-лизин вместо L-лизина) может быть использована в некоторых воплощениях для создания более стабильных пептидов. Кроме того, сжатые пептиды, содержащие согласованную последовательность или по существу идентичный вариант согласованной последовательности, можно сконструировать способами, известными в данной области (Rizo & Gierasch, 1992, *Ann. Rev. Biochem.* 61: 387, включено сюда путем ссылки для любой цели); например, путем добавления внутренних цистеиновых остатков, способных к образованию внутримолекулярных дисульфидных мостиков, которые приводят к циклизации пептида.

"Антитело" или "пептид(ы) антитела" относятся к интактному антителу или к его связывающему фрагменту, который конкурирует с интактным антителом за специфичное связывание и включает химерные, гуманизированные, полностью человеческие антитела и антитела двойной направленности. В некоторых воплощениях связывающие фрагменты получают с помощью методик рекомбинантной ДНК. В дополнительных воплощениях связывающие фрагменты получают путем ферментативного или химического расщепления интактных антител. Связывающие фрагменты включают, но не ограничены ими, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv и одноцепочечные антитела.

Термин "тяжелая цепь" включает полноразмерную тяжелую цепь и ее фрагменты, имеющие достаточную последовательность варибельного участка для придания специфичности к IL-1R1. Полноразмерная тяжелая цепь включает домен варибельного участка, V_H, и три домена константного участка, C_H1, C_H2 и C_H3. Домен V_H находится на аминоконце полипептида, а домен C_H3 находится на карбоксильном конце.

Термин "легкая цепь" включает полноразмерную легкую цепь и ее фрагменты, имеющие достаточную последовательность варибельного участка для придания специфичности к IL-1R1. Полноразмерная легкая цепь включает домен варибельного участка, V_L, и домен константного участка, C_L. Подобно тяжелой цепи домен варибельного участка легкой цепи находится на аминоконце полипептида.

"Fab фрагмент" состоит из одной легкой цепи и C_H1 и варибельных участков тяжелой цепи. Тяжелая цепь молекулы Fab не может образовать дисульфидную связь с другой молекулой тяжелой цепи.

"Fab' фрагмент" содержит одну легкую цепь и одну тяжелую цепь, которая содержит большую часть константного участка между доменами C_H1 и C_H2, так что межцепочечная дисульфидная связь может образоваться между двумя тяжелыми цепями с образованием молекулы F(ab')₂.

Фрагмент F(ab')₂ содержит две легких цепи и две тяжелых цепи, содержащих часть константного участка между доменами C_H1 и C_H2, так что между двумя тяжелыми цепями образована межцепочечная дисульфидная связь.

"Fv участок" содержит варибельные участки из обеих цепей, тяжелой и легкой, но не содержит константного участка.

"Одноцепочечные антитела" представляют собой молекулы Fv, в которых варибельные участки тяжелой и легкой цепи соединены гибким линкером с образованием единой полипептидной цепи, которая формирует антиген-связывающий участок. Одноцепочечные антитела подробно обсуждаются в публикации международной патентной заявки № WO 88/01649 и в патентах США № 4946778 и 5260203, описания которых включены путем ссылки для любой цели.

"Бивалентное антитело", иное чем "мультиспецифичное" или "многофункциональное" антитело в некоторых воплощениях понимают как содержащее сайты связывания, имеющие идентичную антигенную специфичность.

"Биспецифичное" или "бифункциональное" антитело представляет собой гибридное антитело, имеющее две пары тяжелой/легкой цепей и два различных сайта связывания. Биспецифичные антитела могут быть получены с помощью ряда способов, включая, но не ограничиваясь ими, слияние гибридом или сшивку Fab' фрагментов. См., например, Songsivilai & Lachmann (1990), *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321; Kostelny et al., *J. Immunol.* 148: 1547-1553.

При оценке связывания антитела и специфичности по изобретению антитело "по существу ингибирует" адгезию лиганда к рецептору тогда, когда избыток антитела уменьшает количество рецептора, связанного с контррецептором по меньшей мере на 20, 40, 60, 80, 85% или более (как измерено в конкурентном анализе связывания *in vitro*).

Термин "агент" означает химическое соединение, смесь химических соединений, биологическую макромолекулу или экстракт, полученные из биологических материалов.

Термин "метка" или "меченый" относится к включению обнаружимого маркера, например, путем включения аминокислоты с радиоактивной меткой или присоединения к полипептиду биотинных группировок, которые можно обнаружить с помощью меченого авидина (например, стрептавидина, предпочтительно содержащего обнаружимый маркер, такой как флуоресцентный маркер, хемилюминесцентный маркер или ферментативную активность, которую можно обнаружить оптическими или колориметрическими способами). В некоторых воплощениях эта метка может быть, также, терапевтической. Различные способы мечения полипептидов и гликопротеинов известны в данной области техники и могут успешно использоваться в способах, раскрытых здесь. Примеры меток для полипептидов включают, но не ограничены ими, приведенные ниже: радиоактивные изотопы и радионуклиды (например, ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ^{99m}Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I), флуоресцентные метки (например, флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ), родамин

или фосфоры лантаноидов), ферментативные метки (например, пероксидазу хрена, β -галактозидазу, люциферазу, щелочную фосфатазу), хемилюминесцентные метки, гаптенотипы, такие как биотинилируемые группы, и предопределенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, последовательности пар лейциновых молний, сайты связывания для вторичных антител, домены связывания металла, эпитопные метки). В некоторых воплощениях метки присоединены с помощью спейсерных плеч (таких как $(CH_2)_n$, где $n < 20$) различной длины для уменьшения потенциальных стерических препятствий.

Термин "биологический образец" включает, но не ограничен этим, любое количество вещества из живого организма или прежде жившего организма. Такие живые организмы включают, но не ограничены ими, людей, мышей, обезьян, крыс, кроликов и других животных. Такие вещества включают, но не ограничены ими, кровь, сыворотку, мочу, клетки, органы, ткани, кости, костный мозг, лимфу, лимфатические узлы, синовиальную жидкость, хондроциты, синовиальные макрофаги, эндотелиальные клетки, сосудистую ткань (в частности, воспаленную сосудистую ткань) и кожу. Термины "фармацевтический агент" и "лекарство" относятся к химическому соединению или композиции, которые способны вызвать желаемый терапевтический эффект при правильном введении пациенту.

Термин "пациент" включает субъектов-людей и животных.

Если в контексте не требуется иное, термины в единственном числе включают множественные числа, а термины во множественном числе включают единственное.

Аминокислоты.

Двадцать встречающихся в природе аминокислот и их сокращения соответствуют общепринятому использованию. См. Immunology-A Synthesis, 2nd Edition (E. S. Golub and D. R. Gren, eds.), Sinauer Associates: Sunderland, MA (1991), включенную сюда путем ссылки для любой цели. Стереизомеры (например, D-аминокислоты) этих двадцати обычных аминокислот, неприродные аминокислоты, такие как α -, α -двузамещенные аминокислоты, N-алкиламинокислоты и другие необычные аминокислоты могут также быть пригодными компонентами полипептидов по изобретению. Примеры необычных аминокислот включают: 4-гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат, ϵ -N,N,N-триметиллизин, ϵ -N-ацетиллизин, о-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин, σ -N-метиларгинин и другие подобные аминокислоты и иминокислоты (например, 4-гидроксипролин). В обозначении полипептидов, используемом здесь, левое направление является аминоконцевым направлением, а правое направление является карбокси-концевым направлением, в соответствии со стандартным употреблением и соглашением.

Подобным образом, если не указано иное, левый конец одонитевой полинуклеотидной последовательности является 5'-концом; левое направление двунитевых полинуклеотидных последовательностей является 5'-направлением. Направление наращивания транскриптов вновь образующейся РНК от 5'- к 3'-концу называют направлением транскрипции; участки последовательности на нити ДНК, имеющей такую же последовательность, как РНК транскрипт, которые являются 5'- по отношению к 5'-концу РНК транскрипта, называют "последовательностями в обратном направлении"; участки последовательности на нити ДНК, имеющей такую же последовательность, как РНК транскрипт, которые являются 3'- по отношению к 3'-концу РНК транскрипта, называют "последовательностями в прямом направлении".

Встречающиеся в природе аминокислотные остатки можно разделить на классы на основании общих свойств боковой цепи:

- 1) гидрофобные: норлейцин (Nor или Nle), Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- 2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- 3) кислотные: Asp, Glu;
- 4) основные: His, Lys, Arg;
- 5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro и
- 6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Консервативные аминокислотные замены могут подразумевать замену члена одного из этих классов другим членом того же класса. Консервативные аминокислотные замены могут охватывать не встречающиеся в природе аминокислотные остатки, которые обычно включаются посредством химического синтеза пептидов, а не при синтезе в биологических системах. Они включают пептидомиметики и другие обращенные или инвертированные формы аминокислотных группировок.

Неконсервативные замены могут включать замену члена одного из этих классов членом другого класса. Такие замененные остатки могут быть введены, например, в участки человеческого антитела, которые гомологичны антителам, не являющимся человеческими, либо в негомологичные участки этой молекулы.

При создании таких замен согласно некоторым воплощениям можно учитывать гидропатический индекс аминокислот. Каждой аминокислоте присваивают гидропатический индекс на основании ее гидрофобности и характеристик заряда. Они представляют собой: изолейцин (+4,5); валин (+4,2); лейцин (+3,8); фенилаланин (+2,8); цистеин/цистин (+2,5); метионин (+1,9); аланин (+1,8); глицин (-0,4); треонин (-0,7); серин (-0,8); триптофан (-0,9); тирозин (-1,3); пролин (-1,6); гистидин (-3,2); глутамат (-3,5); глута-

мин (-3,5); аспартат (-3,5); аспарагин (-3,5); лизин (-3,9) и аргинин (-4,5).

В данной области понятна важность гидропатического индекса аминокислоты при придании интерактивной биологической функции белку (см., например, Kyte et al., 1982, J. Mol. Biol. 157: 105-131). Известно, что некоторые аминокислоты могут быть заменены другими аминокислотами, имеющими подобный гидропатический индекс или показатель и все же сохраняют подобную биологическую активность. При создании замен, основанных на гидропатическом индексе, в некоторые воплощения включена замена аминокислот, гидропатические индексы которых находятся в пределах ± 2 . В некоторые воплощения включены те, которые находятся в пределах ± 1 , а в некоторые воплощения те, которые находятся в пределах $\pm 0,5$.

В данной области также понятно, что замена подобных аминокислот может быть эффективно осуществлена на основании гидрофильности, в частности, когда биологически функциональный белок или пептид, созданный посредством этого, предназначен для применения в иммунологических воплощениях, как раскрыто здесь. В некоторых воплощениях локальная наибольшая средняя гидрофильность белка, управляемая гидрофильностью его соседних аминокислот, коррелирует с его иммуногенностью и антигенностью, т.е. с биологическим свойством этого белка.

Этим аминокислотным остаткам присвоены приведенные ниже значения гидрофильности: аргинин (+3,0); лизин (+3,0); аспартат (+3,0 $\pm$ 1); глутамат (+3,0 $\pm$ 1); серин (+0,3); аспарагин (+0,2); глутамин (+0,2); глицин (0); треонин (-0,4); пролин (-0,5 $\pm$ 1); аланин (-0,5); гистидин (-0,5); цистеин (-1,0); метионин (-1,3); валин (-1,5); лейцин (-1,8); изолейцин (-1,8); тирозин (-2,3); фенилаланин (-2,5) и триптофан (-3,4). При создании замен на основании подобных значений гидрофильности в некоторые воплощения включена замена аминокислот, значения гидрофильности которых находятся в пределах ± 2 , в некоторые воплощения включены те, которые находятся в пределах ± 1 , а в некоторые воплощения те, которые находятся в пределах $\pm 0,5$. Можно также идентифицировать эпитопы из первичной аминокислотной последовательности на основании гидрофильности. Эти участки также называют "кор-участками эпитопов".

Примеры замен аминокислот представлены в табл. 1.

Таблица 1

Аминокислотные замены

Исходные остатки	Примеры замен	Предпочтительные замены
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Норлейцин	Leu
Leu	Norleucine, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4-диамино-масляная кислота, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Норлейцин	Leu

Специалист в данной области сможет определить подходящие варианты полипептидов, как изложено ниже, используя хорошо известные методики. В некоторых воплощениях специалист в данной области может идентифицировать подходящие области молекул, которые могут быть заменены без разрушения активности, путем выбора участков, которые не считаются важными для активности. В других

воплощениях специалист в данной области может идентифицировать остатки и участки молекул, которые являются консервативными для подобных полипептидов. В следующих воплощениях, даже области, которые могут быть важны для биологической активности или для структуры, могут быть подвергнуты консервативным аминокислотным заменам без разрушения биологической активности или без вредного воздействия на структуру полипептида.

Кроме того, специалист в данной области может сделать обзор структурно-функциональных исследований, идентифицирующих остатки в подобных полипептидах, которые важны для активности или структуры. С точки зрения такого сравнения специалист в данной области может предсказать важность аминокислотных остатков в белке, которые соответствуют аминокислотным остаткам, важным для активности или структуры в подобных белках. Специалист в данной области может подобрать химически подобные аминокислотные замены для таких предсказанных важных аминокислотных остатков.

Специалист в данной области может также анализировать трехмерную структуру и аминокислотную последовательность в отношении этой структуры в подобных полипептидах. С точки зрения такой информации специалист в данной области техники может предсказать выравнивание аминокислотных остатков антитела по отношению к его трехмерной структуре. В некоторых воплощениях специалист в данной области может сделать выбор не осуществлять радикальных замен аминокислотных остатков, предположительно находящихся на поверхности белка, поскольку такие остатки могут быть вовлечены в важные взаимодействия с другими молекулами. Кроме того, специалист в данной области может создать контрольные варианты, содержащие единственную аминокислотную замену по каждому желаемому аминокислотному остатку. Затем эти варианты можно подвергнуть скринингу с использованием анализов активности, известных специалистам в данной области. Такие варианты могут быть использованы для сбора информации о подходящих вариантах. Например, если обнаружено, что изменение конкретного аминокислотного остатка привело в результате к разрушенной, нежелательно сниженной или непригодной активности, вариантов с таким изменением следует избегать. Иными словами, на основании информации, собранной из таких рутинных экспериментов, специалист в данной области может легко обнаружить аминокислоты, где дополнительных изменений следует избегать и как таковых, и в комбинации с другими мутациями.

Ряд конкретных публикаций посвящен предсказанию вторичной структуры. См. Moulton, 1996, *Curr. Op. in Biotech.* 7: 422-427; Chou et al., 1974, *Biochemistry* 13: 222-245; Chou et al., 1974, *Biochemistry* 113: 211-222; Chou et al., 1978, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47: 45-148; Chou et al., 1979, *Ann. Rev. Biochem.* 47: 251-276; и Chou et al., 1979, *Biophys. J.* 26: 367-384. Кроме того, в настоящее время доступны компьютерные программы для помощи в предсказании вторичной структуры. Один из способов предсказания вторичной структуры основан на моделировании гомологии. Например, два полипептида или белка, которые имеют идентичность последовательности более чем 30% или подобие более чем 40%, часто обладают подобными структурными топологиями. В последнее время рост структурной белковой базы данных (PDB, protein database) обеспечил повышенную предсказуемость вторичной структуры, включая потенциальное число складок в структуре полипептида или белка. См. Holm et al., 1999, *Nucl. Acid Res.* 27: 244-247. Выказано предположение (Brenner et al., 1997, *Curr. Op. Struct. Biol.* 7: 369-376), что в заданном полипептиде или белке существует ограниченное число складок, и что, как только критическое число структур установлено, предсказание структуры станет значительно более точным.

Дополнительные способы предсказания вторичной структуры включают "нанизывание" (Jones et al., 1997, *Curr. Op. Struct. Biol.* 7: 377-87; Sippl et al., 1996, *Structure* 4: 15-19), "профильный анализ" (Bowie et al., 1991, *Science* 253: 164-170; Gribskov et al., 1990, *Meth. Enzym.* 183: 146-159; Gribskov et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 4355-4358) и "эволюционную связь" (см. Holm, 1999, выше, и Brenner, 1997, выше).

В некоторых воплощениях варианты антител включают варианты гликозилирования, где число и/или тип сайтов гликозилирования изменены по сравнению с аминокислотными последовательностями исходного полипептида. В некоторых воплощениях варианты белка содержат больше или меньше сайтов N-гликозилирования чем нативный белок. N-связанный сайт гликозилирования характеризуется последовательностью: Asp-X-Ser или Asp-X-Thr, где аминокислотный остаток, обозначенный X, может представлять собой любой аминокислотный остаток кроме пролина. Замена аминокислотных остатков для создания этой последовательности обеспечивает потенциально новый сайт для добавления N-связанной углеводной цепи. Альтернативно замены, которые элиминируют эту последовательность, будут удалять существующую N-связанную углеводную цепь. Предложена также перестройка N-связанных углеводных цепей, где один или более чем один N-связанный сайт гликозилирования (обычно те, которые встречаются в природе) элиминируется, а один или более чем один новый N-связанный сайт образуется. Предпочтительные дополнительные варианты антитела включают цистеиновые варианты, где один или более чем один цистеиновый остаток удален или заменен другой аминокислотой (например, серином) по сравнению с исходной аминокислотной последовательностью. Цистеиновые варианты могут быть полезны, когда антитела должны быть заново уложены в биологически активную конформацию, как, например, после отделения нерастворимых телец включения. Цистеиновые варианты, как правило, имеют меньше цистеиновых остатков, чем нативный белок, и обычно имеют равное число остатков, чтобы минимизировать взаимодействия в результате неспаренных цистеинов.

Согласно некоторым воплощениям аминокислотными заменами являются те, которые (1) снижают чувствительность к протеолизу, (2) снижают чувствительность к окислению, (3) изменяют связывающую аффинность к образованию белковых комплексов, (4) изменяют аффинность связывания и/или (5) придают или модифицируют другие физико-химические или функциональные свойства таких полипептидов. Согласно некоторым воплощениям единственные или множественные аминокислотные замены (в некоторых воплощениях консервативные аминокислотные замены) могут быть сделаны в последовательности, встречающейся в природе (в некоторых воплощениях - в участке полипептида вне домена(ов), образующего(их) межмолекулярные контакты). В предпочтительных воплощениях консервативная аминокислотная замена обычно не изменяет по существу структурные характеристики исходной последовательности (например, замененная аминокислота не склонна разрушать спираль, которая встречается в исходной последовательности, или разрушать другие типы вторичной структуры, характеризующей исходную последовательность). Примеры вторичных и третичных структур полипептидов, известных в данной области, описаны в *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, ed.), 1984, W. H. Freeman and Company, New York; *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds.), 1991, Garland Publishing, New York, N. Y.; и Thornton et al. (1991), *Nature* 354: 105, причем каждая из публикаций включена сюда путем ссылки.

Получение антител.

Структурные единицы, представляющие собой встречающиеся в природе антитела, обычно являются тетрамерами. Каждый такой тетрамер обычно состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, причем каждая пара имеет одну полноразмерную "легкую" цепь (обычно имеющую молекулярную массу примерно 25 кДа) и одну полноразмерную "тяжелую" цепь (обычно имеющую молекулярную массу примерно 50-70 кДа). Амино-концевая часть каждой цепи обычно содержит вариабельный участок из примерно от 100 до 110 или более аминокислот, который обычно ответствен за распознавание антигена. Карбокси-концевая часть каждой цепи обычно определяет константный участок, ответственный за эффекторную функцию. Легкие цепи антитела человека обычно классифицируются как каппа- и ламбда-легкие цепи. Тяжелые цепи обычно классифицируются как мю-, дельта-, гамма-, альфа- или эpsilon- и определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE соответственно. IgG имеет несколько подклассов, включая, но не ограничиваясь ими, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. IgM имеет подклассы, включая, но не ограничиваясь ими, IgM1 и IgM2. IgA, подобным же образом, подразделен на подклассы, включающие, но неограниченные ими, IgA1 и IgA2. В пределах полноразмерных легких и тяжелых цепей участок "J" примерно из 12 или более аминокислот обычно соединяет вариабельный участок и константные участки, причем тяжелая цепь также включает "D" участок из примерно 10 или более аминокислот. См., например, *Fundamental Immunology*, Ch. 7, 2nd ed. (Paul, W., ed.), 1989, Raven Press, N. Y. (включена путем ссылки в полном объеме для всех целей). Комбинация вариабельных участков каждой пары легкая цепь/тяжелая цепь обычно образует антиген-связывающий сайт.

Вариабельные районы каждой из тяжелых цепей и легких цепей обычно проявляют/имеют общую структуру, состоящую из относительно консервативных каркасных участков (FR, framework regions), соединенных тремя гипервариабельными участками, также называемыми "участками, определяющими комплементарность", или CDR (complementarity determining regions). CDR из двух цепей каждой пары обычно выравнены по каркасным участкам, причем это выравнивание может обеспечить связывание со специфичным эпитопом. От N-конца к C-концу вариабельные участки как легкой, так и тяжелой цепи обычно содержат домены FR1, CDR1, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Распределение аминокислот в каждом домене обычно соответствует тому, как определено в *Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest* (1987 и 1991, National Institutes of Health, Bethesda, Md.), Chothia & Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917, или Chothia et al., 1989, *Nature* 342: 878-883).

Антитела стали применимыми и начали представлять интерес в качестве фармацевтических агентов со времени разработки моноклональных антител. Моноклональные антитела получают, используя любой способ, с помощью которого производят молекулы антител непрерывными клеточными линиями в культуре. Примеры подходящих способов получения моноклональных антител включают метод гибридом Kohler et al. (1975, *Nature* 256: 495-497) и метод гибридом человеческих В-клеток (Kozbor, 1984, *J. Immunol.* 133: 3001; и Brodeur et al., 1987, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications* (Marcel Dekker, Inc., New York), p. 51-63).

Моноклональные антитела могут быть модифицированы для применения в качестве терапевтических агентов. Одним из примеров является "химерное" антитело, в котором часть тяжелой цепи и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующей последовательности в антителах, имеющих происхождение от конкретного вида или принадлежащей к конкретному классу или подклассу антител, а остальная часть цепи(ей) идентична(ы) или гомологична(ы) соответствующей последовательности антител, имеющих происхождение от другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител. Другими примерами являются фрагменты таких антител, в той степени, в какой они проявляют желаемую биологическую активность. См. патент США № 4816567 и Morrison et al. (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81.: 6851-6855. Подобной разработкой является "CDR-трансплантированное" антитело, которое содержит один или более чем один участок, определяющий комплементарность (CDR), из кон-

кретного вида или принадлежащий к конкретному классу или подклассу антител, тогда как остальная цепь(и) антитела идентична(ы) или гомологична(ы) соответствующей последовательности в антителах, имеющих происхождение из другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител.

Другой разработкой является "гуманизированное" антитело. Способы "гуманизации" антител, не являющихся человеческими, хорошо известны в данной области. (См. патенты США № 5585089 и 5693762). Как правило, гуманизированное антитело продуцируется животным, не представляющим собой человека, и некоторые аминокислотные остатки, обычно не из антиген-распознающих участков, этого антитела модифицируют таким образом, чтобы они были гомологичны указанным остаткам в человеческом антителе соответствующего изотипа. Гуманизацию можно осуществить, например, способами, описанными в уровне техники (Jones et al., 1986, Nature 321: 522-525; Riechmann et al., 1988, Nature 332: 323-327; Verhoeven et al., 1988, Science 239: 1534-1536), путем замещения, по меньшей мере, части вариабельного участка грызунов соответствующими участками человеческого антитела.

Более поздней и многообещающей является разработка человеческих антител без подвергания людей воздействию антигена ("полностью человеческие антитела"). Используя трансгенных животных (например, мышей), которые способны продуцировать репертуар человеческих антител в отсутствие продуцирования эндогенного мышинового иммуноглобулина, получают такие антитела путем иммунизации антигеном (обычно имеющим по меньшей мере 6 непрерывно рядом расположенных аминокислот), возможно, конъюгированным с носителем. См., например, Jakobovits et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551-2555; Jakobovits et al., 1993, Nature 362: 255-258; и Bruggermann et al., 1993, Year in Immunol. 7: 33. В одном примере этих способов трансгенных животных получают путем выведения из строя локусов эндогенного мышинового иммуноглобулина, кодирующих у них тяжелую и легкую цепи мышинового иммуноглобулина, и вставки в их геном локусов, кодирующих белки тяжелой и легкой цепи антитела человека. Затем частично модифицированных животных, имеющих неполный комплект модификаций, скрещивают для получения животного, имеющего все желаемые модификации иммунной системы. При введении иммуногена эти трансгенные животные продуцируют антитела, которые являются иммуноспецифичными к этим антигенам, имеющие человеческие (а не мышинные) аминокислотные последовательности, включая вариабельные участки. См. публикации WO 96/33735 и WO 94/02602, включенные путем ссылки. Другие способы описаны в патенте США № 5545807, WO 91/10741, WO 90/04036, EP 546073 B1 и EP 546073 A1, включенных сюда путем ссылки. Человеческие антитела можно также получить путем экспрессии рекомбинантной ДНК в клетках-хозяевах или путем экспрессии в клетках гибридомы, как описано здесь.

Полностью человеческие антитела могут быть также получены с помощью фагово-дисплейных библиотек (как описано в Hoogenboom et al., 1991, J. Mol. Biol. 227: 381; и Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222: 581). Эти способы имитируют иммунный отбор посредством проявления репертуара антител на поверхности нитевидного бактериофага и последующего отбора фагов по их связыванию с выбранным антигеном. Одна из таких методик описана в WO 99/10494, включенной сюда путем ссылки, в которой описано выделение высокоаффинных и функциональных антител, агонистических для MPL- и msk-рецепторов, с использованием такого подхода.

Как только определены нуклеотидные последовательности, кодирующие такие антитела, химерные, CDR-трансплантированные, гуманизированные и полностью человеческие антитела также могут быть получены рекомбинантными способами. Нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, вводят в клетки-хозяева и осуществляют их экспрессию, используя материалы и методики, хорошо известные в данной области.

В изобретении предложено одно или множество полностью человеческих моноклональных антител против человеческого IL-1R1. Предпочтительно эти антитела связывают третий домен IL-1R1. В предпочтительных воплощениях в изобретении предложены нуклеотидные последовательности, кодирующие, и аминокислотные последовательности, содержащие молекулы тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина, в частности, последовательности, соответствующие их вариабельным участкам. В предпочтительных воплощениях предложены последовательности, соответствующие участкам, определяющим комплементарность (CDR), предпочтительно от CDR1 до CDR3 включительно. В других предпочтительных воплощениях в изобретении предложены клеточные линии гибридомы, экспрессирующие такие молекулы иммуноглобулина, и моноклональные антитела, продуцируемые ими, наиболее предпочтительно, очищенные человеческие моноклональные антитела против человеческого IL-1R1.

Возможность клонировать и осуществлять реконструкцию человеческих локусов размером несколько мегабаз в дрожжевых искусственных хромосомах (YAC) и вводить их в зародыши мышей обеспечивает прогрессивный подход к выявлению функциональных компонентов очень больших или неточно картированных локусов, а также к созданию полезных моделей заболевания человека. Кроме того, использование такой технологии для замещения мышинных локусов их человеческими эквивалентами позволяет уникальным образом изучить экспрессию и регуляцию продуктов человеческих генов в процессе развития, их взаимосвязь с другими системами и их вовлечение в индукцию и прогрессирование заболевания.

Важным практическим применением такой стратегии является "гуманизация" мышинной системы

гуморального иммунитета. Введение локусов человеческого иммуноглобулина (Ig) в мышей, у которых эндогенные гены Ig инактивированы, дает возможность исследовать механизмы, лежащие в основе запрограммированной экспрессии и сборки антител, а также их роли в развитии В-клеток. Кроме того, такая стратегия обеспечивает источник получения полностью человеческих моноклональных антител (MAb), в частности, для применения в качестве терапевтических агентов. Полностью человеческие антитела экспрессируются таким образом, чтобы минимизировать иммуногенные и аллергические ответы, свойственные мышам или MAb мышинового происхождения, и посредством этого повысить эффективность и безопасность вводимых антител при терапевтических применениях. Полностью человеческие антитела можно применять при лечении хронических и рекуррентных заболеваний человека, таких как остеоартрит, ревматоидный артрит и другие воспалительные состояния, лечение которых требует повторного введения антител.

Специалист в данной области техники может сконструировать линии мышей, дефектных по продуцированию мышинных антител, с большими фрагментами человеческих локусов Ig, так что такие мыши продуцируют человеческие антитела в отсутствие мышинных антител. Большие фрагменты человеческого Ig могут сохранять большое разнообразие вариабельных генов, а также правильную регуляцию продуцирования и экспрессии антител. Использование мышинового механизма многообразия и отбора антител и отсутствие иммунологической толерантности к человеческим белкам, дают воспроизведенный репертуар человеческих антител в этих линиях мышей, содержащий высокоаффинные антитела против любого представляющего интерес антигена, включая человеческие антигены. Используя гибридную технологию, можно получить и отобрать специфичные к антигену человеческие MAb с желаемой специфичностью.

В некоторых воплощениях специалист в данной области может использовать в таких мышах константные участки из видов, иных чем человек, вместе с вариабельными участками антитела человека с образованием химерных антител. Антитела по изобретению можно продуцировать путем иммунизации таких животных полноразмерным IL-1R1, растворимыми формами IL-1R1 или их фрагментом. См., например, международную патентную заявку, публикация WO 93/1227.

CDR-районы вариабельных участков легкой и тяжелой цепи анти-IL-1R1 антитела по изобретению можно трансплантировать в каркасные участки (FR) из того же или из другого вида. В некоторых воплощениях CDR-районы вариабельных участков легкой и тяжелой цепи анти-IL-1R1 антитела можно трансплантировать в консенсусные FR-участки антитела человека. Для создания консенсусных FR-участков антитела человека FR-участки аминокислотных последовательностей нескольких тяжелых цепей или легких цепей антитела человека выравнивают, чтобы идентифицировать консенсусную аминокислотную последовательность. FR из тяжелой цепи или легкой цепи анти-IL-1R1 антитела могут быть заменены FR из другой тяжелой цепи или легкой цепи. Редкие аминокислоты в FR тяжелых и легких цепей анти-IL-1R1 антитела обычно не заменяют, тогда как остальные аминокислоты FR могут быть заменены. Редкими аминокислотами являются определенные аминокислоты, которые находятся в положениях, в которых они обычно не обнаруживаются в FR. Трансплантированные вариабельные участки из анти-IL-1R1 антител по изобретению можно использовать с константным участком, который отличается от константного участка анти-IL-1R1 антитела. Или же, трансплантированные вариабельные участки являются частью одноцепочечного антитела Fv. CDR-трансплантация описана, например, в патентах США № 6180370, 5693762, 5693761, 5585089 и 5530101, которые включены сюда путем ссылки для любой цели.

В некоторых воплощениях в изобретении предложены анти-IL-1R1 антитела, которые содержат участок CDR1 тяжелой цепи антитела человека, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62 или SEQ ID NO: 63; участок CDR2 тяжелой цепи антитела человека, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 или SEQ ID NO: 66; и/или участок CDR3 тяжелой цепи антитела человека, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68 или SEQ ID NO: 69.

В других воплощениях в изобретении предложены антитела анти-IL-1R1, которые содержат участок CDR1 легкой цепи антитела человека, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70 или SEQ ID NO: 71; участок CDR2 тяжелой цепи антитела человека, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72 или SEQ ID NO: 73; и/или участок CDR3 тяжелой цепи антитела человека, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74 или SEQ ID NO: 75.

Антитела по изобретению предпочтительно получают, используя трансгенных мышей, которые имеют существенный участок человеческого локуса, продуцирующего антитела, встроенный в клетки мышей, продуцирующие антитела, и у которых далее генно-инженерным путем создают дефект по продуцированию эндогенных мышинных антител. Такие мыши способны продуцировать молекулы человеческого иммуноглобулина и антитела и не способны либо способны продуцировать значительно сниженные количества молекул мышинового иммуноглобулина и антител. Технологии, используемые для достижения этого результата, раскрыты в патентах, заявках и ссылках, раскрытых здесь в описании. В предпочтительных воплощениях квалифицированный специалист может использовать способы, как раскрыто в публикации международной патентной заявки № WO 98/24893, которая включена сюда путем ссылки

для любой цели. См. также статью Mendez et al., 1997, *Nature Genetics* 15: 146-156, которая включена сюда путем ссылки для любой цели.

Моноклональные антитела (MAb) по изобретению можно получить с помощью разнообразных методик, включая общепринятую методологию моноклональных антител, например стандартную гибридизацию соматических клеток Kohler and Milstein, 1975, *Nature* 256: 495. Хотя методики гибридизации соматических клеток являются предпочтительными, в принципе для получения моноклональных антител можно использовать другие методики, например, вирусную или онкогенную трансформацию В-лимфоцитов.

В предпочтительном воплощении человеческие моноклональные антитела, направленные против IL-1R1, можно создать, используя мышей, называемых "HuMab" мышами, содержащих минилокус человеческого гена иммуноглобулина, который кодирует не перестроенные человеческие последовательности тяжелой (μ и γ) и легкой к цепи иммуноглобулина, вместе с направленными мутациями, которые инактивируют локусы μ и к цепи (Lonberg et al., 1994, *Nature* 368: 856-859). Соответственно, эти мыши проявляют пониженную экспрессию мышинного IgM или к в ответ на иммунизацию, встроенные трансгены тяжелой и легкой цепей антитела человека претерпевают переключение класса и соматическую мутацию с образованием человеческих моноклональных антител к IgG высокой аффинности (Lonberg et al., см. выше; Lonberg and Huszar, 1995, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93; Harding and Lonberg, 1995, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764: 536-546). Получение HuMab мышей подробно описано в Taylor et al., 1992, *Nucleic Acids Res.* 20: 6287-6295; Chen et al., 1993, *International Immunology* 5: 647-656; Tuailon et al., 1994, *J. Immunol.* 152: 2912-2920; Lonberg et al., 1994, *Nature* 368: 856-859; Lonberg, 1994, *Handbook of Exp. Pharmacology* 113: 49-101; Taylor et al., 1994, *International Immunology* 6: 579-591; Lonberg & Huszar, 1995, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93; Harding & Lonberg, 1995, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764: 536-546; Fishwild et al., 1996, *Nature Biotechnology* 14: 845-851, причем содержания всех этих публикаций включены сюда путем ссылки в полном объеме. См. дополнительно патенты США № 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5789650; 5877397; 5661016; 5814318; 5814318; 5874299 и 5770429; авторы всех патентов Lonberg and Kay, а также патент США № 5545807, авторы Surani et al., публикации международной патентной заявки № WO 93/1227, опубликована 24 июня 1993; WO 92/22646, опубликована 23 декабря 1992, и WO 92/03918, опубликована 19 марта 1992, причем описания всех этих публикаций включены сюда путем ссылки в полном объеме. Альтернативно, для создания человеческих анти-IL-1R1 антител можно использовать трансгенные линии мышей HCo7 и HCo12, описанные в приведенных ниже примерах.

Предпочтительно полностью человеческие моноклональные антитела, специфичные к IL-1R1, получают как описано ниже. Трансгенных мышей, содержащих человеческие гены иммуноглобулинов, иммунизируют представляющим интерес антигеном, родственным IL-1R1. Лимфатические клетки (такие как В-клетки) получают из мышей, которые экспрессируют антитела. Такие выделенные клетки сливают с клеточной линией миелоидного типа с получением бессмертных клеточных линий гибридомы, и эти клеточные линии гибридомы подвергают скринингу и отбору по идентификации клеточных линий гибридомы, которые продуцируют антитела, специфичные к представляющему интерес антигену. В некоторых воплощениях предложено получение клеточной линии гибридомы, которая продуцирует антитела к IL-1R1.

В предпочтительных воплощениях антитела по изобретению продуцируют с помощью линий гибридомы. В этих воплощениях антитела по изобретению связываются с IL-1R1 с константой диссоциации (K_d) между примерно 4 и 100 пМ. В некоторых воплощениях изобретения антитела связываются с IL-1R1 с K_d менее чем примерно 20 пМ. В других воплощениях антитела по изобретению связываются с третьим доменом IL-1R1. Нуклеотидная и аминокислотная последовательности третьего домена человеческого и крысиного IL-1R1 показаны на фиг. 17.

В предпочтительных воплощениях антитела по изобретению представляют собой антитела изотипа IgG1, IgG2 или IgG4, причем предпочтителен изотип IgG2. В предпочтительных воплощениях изобретения антитела содержат легкую каппа-цепь антитела человека и тяжелую цепь IgG1, IgG2 или IgG4 человека. В конкретных воплощениях переменные участки антител лигированы с константным участком, иным, чем константный участок для изотипа IgG1, IgG2 или IgG4. В некоторых воплощениях антитела по изобретению клонированы для экспрессии в клетках млекопитающих.

В некоторых воплощениях консервативные аминокислотные замены в тяжелой и легкой цепях анти-IL-1R1 антитела (и соответствующие модификации кодирующих нуклеотидов) будут давать анти-IL-1R1 антитела, имеющие функциональные и химические характеристики, подобные таковым антитела IL-1R1. Напротив, могут быть получены существенные изменения функциональных или химических характеристик анти-IL-1R1 антитела, если выбираются замены в аминокислотной последовательности тяжелых и легких цепей, которые существенно отличаются по влиянию на сохранение (а) структуры молекулярного каркаса в области замены, например, в виде листовой или спиральной конформации, (б) заряда или гидрофобности молекулы в сайте-мишени или (в) общего объема боковых цепей.

Например, "консервативная аминокислотная замена" может включать замену нативного аминокислотного остатка ненативным остатком, так что воздействие на полярность или заряд аминокислотного

остатка в данном положении мало или отсутствует. Кроме того, любой нативный остаток в полипептиде может быть заменен аланином, как описано ранее для "аланинового сканирующего мутагенеза" (Wells, 1991, *Methods Enzymol.* 202: 390 (ed. J. J. Langone), Academic Press, London).

Желаемые аминокислотные замены (либо консервативные, либо неконсервативные) могут быть определены специалистами в данной области в тот момент, когда такие замены желательны. В некоторых воплощениях аминокислотные замены могут быть использованы для идентификации важных остатков анти-IL-1R1 антитела, либо для повышения или снижения аффинности анти-IL-1R1 антител, описанных здесь.

В альтернативных воплощениях антитела по изобретению можно экспрессировать в клеточных линиях, иных, чем клеточные линии гибридомы. В этих воплощениях последовательности, кодирующие конкретные антитела, можно использовать для трансформации подходящей клетки-хозяина млекопитающих. Согласно этим воплощениям трансформация может быть достигнута с использованием любого известного способа введения полинуклеотидов в клетку-хозяина, включая, например, упаковку этого полинуклеотида в вирус (или в вирусном векторе) и трансдукцию клетки-хозяина этим вирусом (вектором), либо методики трансфекции, известные в данной области. Примеры таких методик приведены в патентах США № 4399216, 4912040, 4740461 и 4959455 (все они включены сюда путем ссылки для любой цели). Как правило, используемая методика трансформации может зависеть от клетки-хозяина, подлежащей трансформации. Способы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны в данной области и включают, но не ограничены ими, опосредованную декстраном трансфекцию, кальцийфосфатную преципитацию, опосредованную полибренном трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, инкапсуляцию полинуклеотида(ов) в липосомы и прямую микроинъекцию ДНК в ядра.

Согласно некоторым воплощениям способов по изобретению молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность константного участка тяжелой цепи, варибельного участка тяжелой цепи, константного участка легкой цепи или варибельного участка легкой цепи IL-1R1 антитела по изобретению, встраивают в соответствующий экспрессионный вектор, используя стандартные методики лигирования. В предпочтительно воплощении константный участок тяжелой или легкой цепи IL-1R1 присоединен к С-концу соответствующего варибельного участка и лигирован в экспрессионном векторе. Этот вектор обычно отбирают таким образом, чтобы он был функциональным в конкретной используемой клетке-хозяине (т.е. вектор, совместимый с аппаратом клетки-хозяина, так чтобы могли происходить амплификация гена и/или экспрессия гена). Обзор экспрессионных векторов см. в Goeddel (ed), 1990, *Meth. Enzymol.* Vol. 185, Academic Press, N. Y.

Обычно экспрессионные векторы, используемые в любой из клеток-хозяев, будут содержать последовательности для поддержания плазмиды, а также для клонирования и экспрессии нуклеотидных экзогенных последовательностей. Такие последовательности, называемые все вместе "фланкирующие последовательности", в некоторых воплощениях будут обычно включать одну или более чем одну из приведенных ниже нуклеотидных последовательностей: промотор, одну или более чем одну энхансерную последовательность, точку начала репликации, последовательность терминации транскрипции, полную интронную последовательность, содержащую донорный и акцепторный сайт сплайсинга, последовательность, кодирующая лидерную последовательность для секреции полипептида, сайт связывания рибосомы, последовательность полиаденилирования, полилинкерный участок для встраивания нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, подлежащий экспрессии, и селективный маркерный элемент. Каждая из этих последовательностей обсуждается ниже.

Вектор необязательно может содержать последовательность, кодирующую метку (tag), т.е. олигонуклеотидную молекулу, локализованную на 5'- или 3'-конце последовательности, кодирующей полипептид IL-1R1; причем указанная олигонуклеотидная последовательность кодирует поли-His (такой как гекса-His), или другую метку, такую как FLAG, HA (гемагглютинин вируса гриппа) или тус, для которых имеются в продаже антитела. Эта метка обычно сливается с полипептидом при экспрессии этого полипептида и может служить в качестве средства для аффинной очистки или обнаружения антитела IL-1R1 из клетки-хозяина. Аффинную очистку можно осуществить, например, путем колоночной хроматографии, используя антитела против метки в качестве матрицы аффинности. Оптимально эту метку можно после этого удалить из очищенного полипептида IL-1R1 различными способами, такими как использование некоторых пептидаз для расщепления.

Фланкирующие последовательности могут быть гомологичными, (т.е. из того же вида и/или линии, что и клетка-хозяин), гетерологичными (т.е. из вида, иного, чем вид или линия клетки-хозяина), гибридными (т.е. комбинация фланкирующих последовательностей более чем из одного источника), синтетическими или нативными. Как таковым источником фланкирующей последовательности может быть любой прокариотический или эукариотический организм, любой позвоночный или беспозвоночный организм или любое растение при условии, что эта фланкирующая последовательность является функциональной в аппарате клетки-хозяина и может быть активирована этим аппаратом.

Фланкирующие последовательности, пригодные в векторах по данному изобретению, могут быть получены любыми из нескольких способов, хорошо известных в данной области. Обычно пригодные

здесь фланкирующие последовательности будут такими предварительно идентифицированы путем картирования и/или ферментативного гидролиза эндонуклеазами рестрикции и могут быть, таким образом, выделены из соответствующего тканевого источника с использованием подходящих эндонуклеаз рестрикции. В некоторых случаях может быть известна полная нуклеотидная последовательность фланкирующей последовательности. Здесь фланкирующую последовательность можно синтезировать, используя описанные здесь способы, для синтеза или клонирования нуклеиновых кислот.

Когда известна вся фланкирующая последовательность или только ее часть, их можно получить, используя полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и/или путем скрининга геномной библиотеки подходящим зондом, таким как олигонуклеотид и/или фрагмент фланкирующей последовательности из того же или из другого вида. Когда фланкирующая последовательность неизвестна, фрагмент ДНК, содержащий фланкирующую последовательность, можно выделить из большого участка ДНК, который может содержать, например, кодирующую последовательность или даже другой ген или другие гены. Выделение можно осуществить с помощью ферментативного гидролиза эндонуклеазами рестрикции с получением правильного фрагмента ДНК с последующим выделением с использованием очистки из агарозного геля, колоночной хроматографии Quagen® (Chatsworth, CA) или другими способами, известными специалисту в данной области. Выбор подходящих ферментов для осуществления данной цели будет очевиден обычному специалисту в данной области.

Точка начала репликации обычно представляет собой часть прокариотических экспрессионных векторов, имеющихся в продаже, и эта точка начала репликации способствует амплификации вектора в клетке-хозяине. Если выбранный вектор не содержит точку начала сайта репликации, ее можно синтезировать химическим путем на основе известной последовательности и лигировать в вектор. Например, точка начала репликации из плазмиды pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) пригодна для большинства грамотрицательных бактерий, а различные точки начала репликации вирусного происхождения (например, от SV40, полиомы, аденовируса, вируса герпетического стоматита (VSV) или папилломавирусов, таких как HPV или BPV) полезны для клонирования векторов в клетках млекопитающих. Как правило, компонент, представляющий собой точку начала репликации, не является необходимым для экспрессионных векторов млекопитающих (например, точку начала репликации SV40 часто используют только в связи с тем, что она также содержит ранний вирусный промотор).

Последовательность терминации транскрипции обычно локализована 3' от конца участка, кодирующего полипептид, и служит для терминации транскрипции. Обычно последовательность терминации транскрипции в прокариотических клетках представляет собой G-C богатый фрагмент, за которым следует поли-Т последовательность. Хотя эту последовательность обычно клонируют из библиотеки или даже покупают в виде части вектора, ее, также, можно легко синтезировать, используя способы синтеза нуклеиновых кислот, такие как описано здесь.

Селективный маркерный ген кодирует белок, необходимый для выживания и роста клетки-хозяина, выращиваемой на селективной культуральной среде. Типичные селективные маркерные гены кодируют белки, которые (а) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например, к ампициллину, тетрациклину или канамицину, прокариотическим клеткам-хозяевам; (б) восполняют ауксотрофные дефициты клетки или (в) обеспечивают критические питательные вещества, недоступные из комплексной или определенной среды. Предпочтительными селективными маркерами являются ген устойчивости к канамицину, ген устойчивости к ампициллину и ген устойчивости к тетрациклину. Ген устойчивости к неомицину можно также использовать для отбора как прокариотических, так и эукариотических клеток-хозяев.

Можно использовать другие селективные гены для амплификации гена, который нужно экспрессировать. Амплификация представляет собой процесс, где гены, которые более нужны для продуцирования белка, критичного для роста или выживания клетки, воспроизводятся снова и снова, обычно в tandem, в хромосомах последующих поколений рекомбинантных клеток. Примеры подходящих селективных маркеров для клеток млекопитающих включают дигидрофолатредуктазу (DHFR) и беспромоторную тимидинкиназу.

Трансформанты клеток млекопитающих помещают в условия селективного давления, при котором только трансформанты адаптируются к выживанию за счет селективного гена, присутствующего в векторе. Селективное давление прилагают путем культивирования трансформированных клеток в условиях, в которых концентрацию селективного агента в среде последовательно увеличивают, приводя посредством этого к амплификации как селективного гена, так и ДНК, которая кодирует другой ген, такой как полипептид IL-1R1, включенный в вектор. В результате с амплифицированной ДНК синтезируются повышенные количества полипептида, такого как полипептид IL-1R1.

Сайт связывания рибосом обычно необходим для инициации трансляции мРНК и характеризуется последовательностью Шайна-Далгарно (прокариоты) или последовательностью Козака (эукариоты). Этот элемент обычно локализован 3' к промотору и 5' к кодирующей последовательности полипептида, подлежащего экспрессии.

В некоторых случаях, например когда желательно гликозилирование в системе эукариотической клетки-хозяина, можно манипулировать различными пре- и постпоследовательностями для улучшения

гликозилирования или выхода. Например, можно изменить сайт отщепления пептидазой конкретного сигнального пептида или добавить пропоследовательности, которые также могут влиять на гликозилирование. Конечный белковый продукт будет иметь в положении -1 (относительно первой аминокислоты зрелого белка) одну или более чем одну дополнительную аминокислоту, свойственную экспрессии, которая может не быть полностью удалена. Например, конечный белковый продукт может иметь один или два аминокислотных остатка, обнаруживаемых в сайте отщепления пептидазой, присоединенном к аминно-концу. Альтернативно, использование некоторых сайтов ферментативного отщепления может привести в результате к несколько укороченной форме желаемого полипептида, если фермент расщепляет в такой области в зрелом полипептиде.

Векторы экспрессии и клонирования по изобретению будут обычно содержать промотор, который распознается организмом-хозяином и функциональным образом связан с молекулой, кодирующей анти-IL-1R1 антитело. Промоторы представляют собой нетранскрибируемые последовательности, локализованные вверх по течению (т.е. 5') от стартового кодона структурного гена (как правило, в пределах примерно от 100 до 1000 п.о.), которые регулируют транскрипцию структурного гена. Промоторы традиционно группируют в один из двух классов: индуцибельные промоторы и конститутивные промоторы. Индуцибельные промоторы повышают уровни транскрипции с ДНК под их контролем в ответ на некоторое изменение условий культивирования, таких как присутствие или отсутствие питательного вещества или изменение температуры. Конститутивные же промоторы инициируют постоянное продуцирование генного продукта; т.е., существует небольшой или не существует никакого контроля над экспрессией гена. Хорошо известен широкий ряд промоторов, распознаваемых разнообразными потенциальными клетками-хозяевами. Подходящий промотор функциональным образом связывают с ДНК, кодирующей тяжелую цепь или легкую цепь, составляющие антитело анти-IL-1R1 по изобретению, путем извлечения промотора из источника ДНК путем ферментативного гидролиза ферментами рестрикции и вставки желаемой промоторной последовательности в вектор.

Подходящие промоторы для использования с дрожжевыми хозяевами также хорошо известны в данной области. Дрожжевые энхансеры успешно используют с дрожжевыми промоторами. Подходящие промоторы для использования с клетками-хозяевами млекопитающих хорошо известны и включают, но не ограничены ими, промоторы, полученные из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус fowl-рох, аденовирус (такой как Аденовирус 2), вирус бычьей папилломы, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирусы, вирус гепатита В и наиболее предпочтительно вирус обезьян 40 (SV40). Другие подходящие промоторы млекопитающих включают гетерологичные промоторы млекопитающих, например, термошоковые промоторы и промотор актина.

Дополнительные промоторы, которые могут представлять интерес, включают, но не ограничены ими: участок раннего промотора SV40 (Bernoist and Chambon, 1981, *Nature* 290: 304-10); промотор CMV; промотор, содержащийся в 3' длинном концевом повторе вируса саркомы Payca (Yamamoto et al., 1980, *Cell* 22: 787-97); промотор тимидинкиназы герпеса (Wagner et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1444-45); регуляторные последовательности гена металлотioneина (Brinster et al., 1982, *Nature* 296: 39-42); прокариотические экспрессионные векторы, такие как промотор бета-лактамазы (Villa-Kamaroff et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3727-31) или tac промотор (DeBoer et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 21-25). Также представляют интерес следующие участки регуляции транскрипции животных, которые проявляют тканевую специфичность и были использованы в трансгенных животных: регуляторный участок гена эластазы I, который активен в ацинарных клетках поджелудочной железы (Swift et al., 1984, *Cell* 38: 639-46; Ornitz et al., 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50: 399-409 (1986); MacDonald, 1987, *Hepatology* 7: 425-515); регуляторный участок гена инсулина, который активен в бета-клетках поджелудочной железы (Hanaman, 1985, *Nature* 315: 115-22); регуляторный участок гена иммуноглобулина, который активен в лимфоидных клетках (Grosschedl et al., 1984, *Cell* 38: 647-58; Adames et al., 1985, *Nature* 318: 533-38; Alexander et al., 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7: 1436-44); регуляторный участок вируса опухоли молочной железы мыши, который активен в семенниках, молочной железе, лимфоидных и тучных клетках (Leder et al., 1986, *Cell* 45: 485-95); регуляторный участок гена альбумина, который активен в печени (Pinkert et al., 1987, *Genes and Devel.* V. 268-76); регуляторный участок гена альфа-фетопротеина, который активен в печени (Krumlauf et al., 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5: 1639-48; Hammer et al., 1987, *Science* 235: 53-58); регуляторный участок гена альфа-1-антитрипсина, который активен в печени (Kesley et al., 1987, *Genes and Devel.* V. 161-71); регуляторный участок гена бета-глобина, который активен в миелоидных клетках (Mogam et al., 1985, *Nature* 315: 338-40; Kollias et al., 1986, *Cell* 46: 89-94); регуляторный участок гена основного белка миелина, который активен в клетках-олигодендроцитах в головном мозге (Readhead et al., 1987, *Cell* 48: 703-12); регуляторный участок легкой цепи-2 миозина, который активен в скелетных мышцах (Sani, 1985, *Nature* 314: 283-86) и регуляторный участок гена гормона, высвобождающего гонадотропин, который активен в гипоталамусе (Mason et al., 1986, *Science* 234: 1372-78).

Энхансерная последовательность может быть вставлена в вектор для усиления транскрипции ДНК, кодирующей легкую или тяжелую цепь, входящую в состав анти-IL-1R1 антитела по изобретению, высшими эукариотами. Энхансеры представляют собой цис-активные элементы ДНК, обычно примерно 10-300 п.о. в длину, которые действуют на промотор, усиливая транскрипцию. Энхансеры являются относи-

тельно независимыми от ориентации и положения. Они обнаружены в направлении 5' и 3' от транскрипционной единицы. Известны некоторые энхансерные последовательности, доступные из генов млекопитающих (например, гены глобина, эластазы, альбумина, альфа-фето-протеина и инсулина). Обычно, однако, используют энхансер из вируса. Энхансер SV40, энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы и аденовирусные энхансеры, известные в данной области техники, являются примерными энхансерными элементами для активации эукариотических промоторов. Хотя энхансер можно встроить в вектор в положении 5' или 3' к молекуле нуклеиновой кислоты, обычно его локализуют в сайте 5' от промотора.

Экспрессионные векторы по изобретению можно конструировать из исходного вектора, например имеющегося в продаже вектора. Такие векторы могут содержать, а могут не содержать все желаемые фланкирующие последовательности. Когда одна или более из фланкирующих последовательностей, описанных здесь, еще не присутствует в векторе, их можно получить отдельно и лигировать в этот вектор. Способы, используемые для получения каждой из фланкирующих последовательностей, хорошо известны специалистам в данной области.

После того как вектор сконструирован и молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь или тяжелую цепь либо и легкую цепь и тяжелую цепь, входящие в состав анти-IL-1R1 антитела, встроена в правильный сайт этого вектора, такой полный вектор можно вводить в подходящую клетку-хозяина для амплификации и/или экспрессии полипептида. Трансформацию экспрессионного вектора для анти-IL-1R1 антитела в выбранную клетку-хозяина можно осуществить хорошо известными способами, включая трансфекцию, инфекцию, кальцийфосфатную совместную преципитацию, электропорацию, микроинъекцию, липофекцию, трансфекцию, опосредованную ДЭАЭ-декстраном, или другие известные методики. Выбранный способ будет отчасти зависеть от типа клетки-хозяина, которую будут использовать. Эти и другие подходящие способы хорошо известны специалистам в данной области и изложены, например, в Sambrook et al., см. выше.

Клетка-хозяин при культивировании в соответствующих условиях синтезирует анти-IL-1R1 антитело, которое можно затем собрать из культуральной среды (если клетка-хозяин секретирует его в среду) или непосредственно из клетки-хозяина, продуцирующей его (если она не секретирует). Выбор подходящей клетки-хозяина будет зависеть от различных факторов, таких как желаемые уровни экспрессии, модификации полипептида, которые желательны или необходимы для активности (такие как гликозилирование или фосфорилирование) и легкость его укладки в биологически активную молекулу.

Линии клеток млекопитающих, доступные в качестве хозяев для экспрессии, хорошо известны в данной области и включают, но не ограничены ими, множество бессмертных клеточных линий, имеющих в Американской Коллекции Типовых Культур (ATCC, American Type Culture Collection) и включающих, но не ограниченных ими, клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки HeLa, клетки почек детеныша хомячка (BHK), клетки почек обезьяны (COS), клетки печеночно-клеточной карциномы человека (например, HepG2) и ряд других клеточных линий. В некоторых воплощениях можно выбрать клеточные линии путем определения того, какие клеточные линии обладают высокими уровнями экспрессии и продуцируют антитела с конститутивными свойствами связывания IL-1R1. В другом воплощении, можно выбрать клеточную линию из линий В-клеток, которая не производит свои собственные антитела, но обладает способностью производить и секретировать гетерологичное антитело (например, линии клеток миеломы мыши NS0 и SP2/0).

Антитела по изобретению полезны для обнаружения IL-1R1 в биологических образцах и идентификации клеток или тканей, которые продуцируют белок IL-1R1. Указанные антитела, которые связываются с IL-1R1 и блокируют взаимодействие с другими связывающими соединениями, имеют терапевтическое применение при модулировании опосредованных IL-1 заболеваний. В предпочтительных воплощениях антитела к IL-1R1 могут блокировать связывание IL-1R1 с IL-1 β или с IL-1 α , что может приводить в результате к прерыванию каскада преобразования сигнала IL-1.

Антитела по изобретению, которые специфично связываются с IL-1R1, могут быть полезны при лечении опосредованных IL-1 заболеваний, как обсуждается ниже. Указанные антитела можно применять в анализах связывания для обнаружения связывания IL-1R1 и их способности ингибировать IL-1R1 в результате образования комплекса с IL-1 β и со вспомогательным белком IL-1R (IL-1RacP), либо с IL-1 α и с IL-1RacP.

В некоторых воплощениях в изобретении предложены способы лечения медицинских расстройств, связанных с опосредованными IL-1 воспалительными реакциями или с опосредованными IL-1 иммунорегуляторными реакциями. Способы по изобретению включают введение антитела анти-IL-1R1 по изобретению индивидууму, который поражен воспалительным или иммунорегуляторным заболеванием, которое опосредовано IL-1. Как используют здесь, термины "болезнь", "заболевание", "медицинское состояние" или "аномальное состояние" используют взаимозаменяемо с термином "медицинское расстройство".

В конкретном воплощении способы по изобретению включают введение пациенту анти-IL-1R1 антитела по изобретению, посредством чего предотвращается связывание IL-1 с его рецептором на клеточ-

ной поверхности (IL-1R1).

Для лечения медицинского расстройства, характеризующегося аномальной или избыточной экспрессией IL-1 либо аномальной или избыточной передачей сигнала IL-1, молекулу, содержащую антитело к IL-1R типа 1, по данному изобретению вводят пациенту в количестве и в течение периода времени, которые достаточны для индукции длительного улучшения по меньшей мере одного признака, отражающего тяжесть этого расстройства. Улучшение считают "длительным", если пациент проявляет это улучшение по меньшей мере два раза с интервалом от одной до четырех недель. Степень улучшения определяют на основании признаков или симптомов, и можно также применять вопросники, которые предлагают пациенту, такие как вопросники качества жизни.

Для определения того, достаточны ли количество и время лечения, можно оценивать различные признаки, которые отражают степень заболевания пациента. Базовое значение для выбранного признака или признаков устанавливают путем обследования пациента перед введением первой дозы антитела. Предпочтительно обследование базового уровня проводят в пределах примерно 60 суток от введения первой дозы. Если антитело IL-1R вводят для лечения острых симптомов, как, например, для лечения травматических повреждений (травматического повреждения колена, удара, повреждения головы и т. д.), первую дозу вводят настолько быстро, насколько это возможно после того, как произошло повреждение или событие.

Улучшение индуцируется посредством повторного введения дозы антитела до тех пор, пока пациент не проявляет улучшения по сравнению с базовым уровнем для выбранного(ых) признака или признаков. При лечении хронических состояний этой степени улучшения достигают повторяющимся введением данного лекарства в течение периода по меньшей мере месяц или более, например в течение одного, двух или трех месяцев или более, либо в течение неопределенного времени. Период от одной до шести недель или даже однократная доза часто являются достаточными для лечения острых состояний.

Хотя степень заболевания пациента после лечения может казаться улучшенной по одному или более чем одному признаку, лечение может быть продолжено в течение неопределенного времени на том же уровне или с повышенной дозой или частотой. Если лечение снижено или прервано, оно может быть позднее возобновлено, когда симптомы появятся снова.

Любой эффективный путь введения можно использовать для терапевтического введения антитела. Антитело можно вводить посредством внутрисуставного, внутривенного, внутримышечного введения, введения внутрь очага поражения, внутрибрюшинного, внутричерепного, ингаляционного или подкожного путей введения, с помощью болюсной инъекции или путем непрерывной инфузии. Например, легочные заболевания могут включать интраназальный и ингаляционный способы введения. Другие подходящие средства введения включают пролонгированное высвобождение из имплантатов, аэрозольную ингаляцию, глазные капли, пероральные препараты, включая пилюли, сиропы, лепешки или жевательную резинку, и местные препараты, такие как лосьоны, гели, спреи, мази или другие подходящие методики. Введение путем ингаляции особенно полезно при лечении заболеваний, связанных с легочными расстройствами.

В одном воплощении изобретения анти-IL-1R1 антитело по изобретению можно вводить один раз в месяц. В другом воплощении это антитело вводят один раз каждые две недели или один раз в неделю для лечения различных медицинских расстройств, раскрытых здесь. Еще в одном другом воплощении антитело вводят по меньшей мере два раза в неделю, а в другом воплощении его вводят по меньшей мере раз в сутки. Взрослым пациентом является человек в возрасте 18 лет или старше. При инфекции эффективное количество для взрослого пациента находится в интервале от 1-200 мг/м², либо от 1-40 мг/м², либо примерно 5-25 мг/м². Альтернативно, можно вводить равномерную дозу, количество которой может находиться в интервале от 2-400, 2-100 мг/доза либо примерно от 10 до 80 мг/доза. Если дозу нужно вводить более чем один раз в неделю, примерным интервал дозы является таким же, как выше- или ниже-описанные интервалы дозы. В одном воплощении изобретения различные показания, приведенные ниже, лечат путем введения препарата, приемлемого для инъекции, содержащей антитело к рецептору IL-1, при 80-100 мг/доза, или, альтернативно, содержащего 80 мг на дозу. Эту дозу вводят повторно. Если используют иной путь введения, чем инъекция, дозу соответствующим образом корректируют в соответствии со стандартной медицинской практикой. Например, если путем введения является ингаляция, дозировка может включать введение от одного до семи раз в неделю при дозах от 10 до 50 мг/доза.

В предпочтительных воплощениях в изобретении также предложены фармацевтические композиции, содержащие терапевтически эффективное количество одного антитела или множества антител по изобретению вместе с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем, солюбилизатором, эмульгатором, консервантом и/или адъювантом. Предпочтительно приемлемые вещества препаратов являются нетоксичными для реципиентов при применяемых дозировках и концентрациях. В предпочтительных воплощениях предложены фармацевтические композиции, содержащие терапевтически эффективное количество анти-IL-1R1 антител.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция может содержать вещества препаратов, предназначенные для модификации, поддержания или сохранения, например, pH, осмотического давления, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости рас-

творения или высвобождения, всасывания или проникновения композиции. В таких воплощениях подходящие вещества для препаратов включают, но не ограничены ими, аминокислоты (такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин); противомикробные агенты; антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота, сульфит натрия или гидросульфит натрия); буферы (такие как боратный, бикарбонатный, Трис-HCl, цитраты, фосфаты или другие органические кислоты); сыпучие агенты (такие как маннит или глицин); хелатирующие агенты (такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА)); комплексообразующие агенты (такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин); наполнители; моносахариды; дисахариды и другие углеводы (такие как глюкоза, манноза или декстрины); белки (такие как сывороточный альбумин, желатин или гемоглобины); красящие, корригирующие и разбавляющие агенты; эмульгирующие агенты; гидрофильные полимеры (такие как поливинилпирролидон); полипептиды низкой молекулярной массы; противоионы (такие как натрий); консерванты (такие как бензалкония хлорид, азотная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенетиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, циклогексидин, сорбиновая кислота или перекись водорода); растворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль); сахарные спирты (такие как маннит или сорбит); суспендирующие агенты; сурфактанты или увлажняющие агенты (такие как плороники, ПЭГ, сорбитановые эфиры, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат 80, тритон, триметамин, лецитин, манитерол, тилоксапал); агенты, повышающие стабильность (такие как сахароза или сорбит); тонические агенты (такие как галогениды щелочных металлов, предпочтительно хлорид натрия или калия, маннит, сорбит); носители для доставки; разбавители; эксципиенты и/или фармацевтические агенты. См. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition (A. R. Gennaro, ed.), Mack Publishing Company.

В некоторых воплощениях оптимальная фармацевтическая композиция будет определяться специалистом в данной области в зависимости, например, от назначенного пути введения, формы доставки и желаемой дозировки. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, выше. В некоторых воплощениях такие композиции могут влиять на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость выведения *in vivo* антител по изобретению.

В некоторых воплощениях первичный растворитель или носитель в фармацевтической композиции может быть либо водным, либо неводным по природе. Например, подходящий растворитель или носитель может представлять собой воду для инъекций, физиологический солевой раствор или искусственную спинномозговую жидкость, в которые, возможно, добавлены другие вещества, общие в композициях для парентерального введения. Нейтральный буферный физиологический раствор или физиологический раствор, смешанный с сывороточным альбумином, представляют собой примеры дополнительных растворителей. В предпочтительных воплощениях фармацевтические композиции содержат Трис-буфер с примерным pH 7,0-8,5 или ацетатный буфер с примерным pH 4,0-5,5, и могут дополнительно включать сорбит или его подходящий заменитель. В некоторых воплощениях изобретения для хранения композиции анти-IL-1R1 антитела можно изготовить путем смешивания выбранной композиции, имеющей желаемую степень очистки, с возможными агентами препаратов (Remington's Pharmaceutical Sciences, выше) в форме лепешки лиофилизированного порошка или в форме водного раствора. Кроме того, в некоторых воплощениях препарат продукта анти-IL-1R1 антитела можно готовить в виде лиофилизата, используя соответствующие эксципиенты, такие как сахароза.

Фармацевтические композиции по изобретению могут быть выбраны для парентеральной доставки. Эти композиции могут быть выбраны для ингаляции или для доставки через пищеварительный тракт, например, перорально.

Изготовление таких фармацевтически приемлемых композиций находится в пределах компетенции специалиста в данной области.

Компоненты препарата присутствуют предпочтительно в концентрациях, которые являются приемлемыми для сайта введения. В некоторых воплощениях буферы используют для поддержания физиологического pH или несколько более низкого pH композиции, обычно pH в интервале от примерно 5 до примерно 8.

Когда рассматривают парентеральное введение, терапевтические композиции для применения по данному изобретению могут быть предложены в форме апирогенного, парентерально приемлемого водного раствора, содержащего желаемое анти-IL-1R1 антитело в фармацевтически приемлемом растворителе. Конкретным подходящим растворителем для парентеральной инъекции является стерильная дистиллированная вода, в которой готовят препарат анти-IL-1R1 антитела в виде стерильного, изотонического раствора, правильно законсервированного. В некоторых воплощениях этот препарат включает изготовление препарата желаемой молекулы с агентом, таким как инъекционные микросферы, биологически разрушаемые частицы, полимерные соединения (такие как полимолочная кислота или полигликолевая кислота), гранулы или липосомы, которые могут обеспечить регулируемое или пролонгированное высвобождение продукта, который можно доставлять посредством депонируемой инъекции. В некоторых воплощениях можно также использовать гиалуроновую кислоту, обладающую эффектом, способствующим пролонгированному нахождению в кровообращении. В некоторых воплощениях для введения желаемой молекулы антитела можно использовать имплантируемые устройства доставки лекарства.

Можно готовить препараты фармацевтических композиций по изобретению для ингаляции. В этих воплощениях препараты анти-IL-1R1 антител готовят в виде сухого порошка для ингаляции. В предпочтительных воплощениях можно также готовить препараты анти-IL-1R1 антител в виде ингаляционных растворов с пропеллентом для доставки аэрозоля. В некоторых воплощениях растворы можно распылять с помощью небулайзера. Введение в легкие и способы изготовления препаратов для этого дополнительно описаны в публикации международной патентной заявки № WO 94/20069, включенной путем ссылки, в которой описана доставка в легкие химически модифицированных белков.

Рассматривается также, что препараты можно вводить перорально. Препараты анти-IL-1R1 антител, которые вводят таким образом, можно готовить с носителями, обычно используемыми для приготовления препаратов твердых лекарственных форм, таких как таблетки или капсулы, или без них. В некоторых воплощениях капсула может быть предназначена для высвобождения активной части препарата в желудочно-кишечном тракте, где биологическая доступность максимальна, а досистемный распад минимален. Можно включать дополнительные агенты, чтобы способствовать всасыванию анти-IL-1R1 антитела. Можно также использовать разбавители, корригенты, воска с низкой точкой плавления, растительные масла, смазывающие агенты, суспендирующие агенты, разрыхлители для таблеток и связующие агенты.

Фармацевтическая композиция по изобретению предпочтительно должна содержать эффективное количество одного или множества анти-IL-1R1 антител в смеси с нетоксичными эксципиентами, которые пригодны для производства таблеток. Путем растворения таблеток в стерильной воде или другом подходящем растворителе можно получить растворы в форме со стандартной дозой. Подходящие эксципиенты включают, но не ограничены ими, инертные разбавители, такие как карбонат кальция, карбонат или бикарбонат натрия, лактоза или фосфат кальция; или связующие агенты, такие как крахмал, желатин или аравийская камедь; или смазывающие агенты, такие как стеарат магния, стеариновая кислота или тальк.

Дополнительные фармацевтические композиции будут очевидны специалистам в данной области, включая препараты, содержащие анти-IL-1R1 антитела для пролонгированной или регулируемой доставки. Методики изготовления ряда препаратов других средств с пролонгированной или регулируемой доставкой, таких как липосомные носители, биологически разрушаемые гранулы или пористые гранулы и депонируемые инъекции, также известны специалистам в данной области. См., например, публикацию международной патентной заявки № WO 93/15722, включенную сюда путем ссылки, в которой описано регулируемое высвобождение пористых полимерных микрочастиц для доставки фармацевтических композиций. Препараты пролонгированного высвобождения могут включать полупроницаемые полимерные матрицы в виде формованных изделий, например, пленок или микрокапсул. Матрицы для пролонгированного высвобождения могут включать полиэферы, гидрогели, полилактиды (как раскрыто в патенте США № 3773919 и в публикации Европейской патентной заявки № EP 058481), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата (Sidman et al., 1983, Biopolymers 22: 547-556), поли-(2-гидроксиэтил-метакрилат) (Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277 и Langer, 1982, Chem. Tech. 12: 98-105), этиленвинилацетат (Langer et al., см. выше) или поли-D(-)-3-гидроксимасляную кислоту (публикация Европейской патентной заявки № EP 133988). Композиции пролонгированного высвобождения могут также включать липосомы, которые могут быть получены любым из нескольких способов, известных в данной области, см., например, Eppstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688-3692; публикации Европейских патентных заявок № EP 036676; EP 088046 и EP 143949.

Фармацевтические композиции, используемые для введения *in vivo*, обычно предлагают в виде стерильных препаратов. Стерилизацию можно осуществить путем фильтрования через стерильные фильтрующие мембраны. Когда композиция лиофилизирована, стерилизацию с использованием такого способа можно проводить либо до, либо после лиофилизации и восстановления. Композиции для парентерального введения можно хранить в лиофилизированной форме или в растворе. Парентеральные композиции, как правило, помещают в контейнер, имеющий стерильный канал доступа, например, пакет или флакон для внутривенного раствора, имеющий пробку, которую можно проткнуть иглой для подкожных инъекций.

Как только препарат фармацевтической композиции изготовлен, его можно хранить в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества или в виде дегидратированного или лиофилизированного порошка. Такие препараты можно хранить либо в готовой к употреблению форме, либо в форме (например, лиофилизата), которую разводят перед введением.

В изобретении также предложены наборы для производства единицы для введения однократной дозы. Каждый набор по изобретению может содержать как первый контейнер, в котором имеется высушенный белок, так и второй контейнер, в котором имеется водный препарат. В некоторых воплощениях данного изобретения предложены наборы, содержащие однокамерные и многокамерные предварительно наполненные шприцы (например, шприцы с жидким содержимым или с лиофилизатом).

Эффективное количество фармацевтической композиции, содержащей анти-IL-1R1 антитело, для терапевтического применения, будет зависеть, например, от терапевтической ситуации и цели. Специалисту в данной области техники будет понятно, что подходящие уровни дозировки для лечения будут варьировать в зависимости отчасти от доставляемой молекулы, от показания, для которого применяют анти-IL-1R1 антитело, от пути введения и от размера (массы тела, поверхности тела или размера органа)

и/или состояния (возраста и общего состояния здоровья) пациента. В некоторых воплощениях врач может титровать дозировку и модифицировать путь введения для получения оптимального терапевтического эффекта. Типичная дозировка может находиться в интервале от примерно 0,1 мкг/кг вплоть до примерно 100 мкг/кг или более, в зависимости от упомянутых выше факторов. В предпочтительных воплощениях дозировка может находиться в интервале от 0,1 мкг/кг вплоть до 100 мкг/кг; более предпочтительно от 1 мкг/кг вплоть до примерно 100 мкг/кг или даже более предпочтительно от 5 мкг/кг вплоть до примерно 100 мкг/кг.

Частота дозировки будет зависеть от фармакокинетических параметров конкретного анти-IL-1R1 антитела в применяемом препарате. Обычно врач вводит композицию до тех пор, пока не достигнет дозировки, при которой достигается желаемый эффект. Следовательно, композицию можно вводить в виде однократной дозы или в виде двух или более доз (которые могут содержать или не содержать такое же количество желаемой молекулы) за определенный период времени, либо в виде непрерывной инфузии посредством имплантационного устройства или катетера. Дальнейшее улучшение подходящей дозировки производится рутинным способом обычными специалистами в данной области, что входит в их рутинно выполняемые обязанности. Подходящие дозировки могут быть установлены с использованием соответствующих данных испытаний доза-ответ.

Путь введения фармацевтической композиции находится в соответствии с известными способами, например, пероральным введением, внутривенной инъекцией, внутрибрюшинным, интрацеребральным (интрапаренхимальным), интрацеребровентрикулярным, внутримышечным, внутриглазным, внутриартериальным введением, введением внутрь воротной вены или внутрь повреждения; введением с помощью систем пролонгированного высвобождения или с помощью имплантационных устройств. В некоторых воплощениях композиции можно вводить путем болюсной инъекции или непрерывно путем инфузии либо с помощью имплантационного устройства.

Композицию можно также вводить местно посредством имплантации мембраны, губки или другого подходящего материала, на котором адсорбирована или в котором инкапсулирована желаемая молекула. В некоторых воплощениях, где применяют имплантационное устройство, это устройство может быть имплантировано в любую подходящую ткань или орган, и доставка желаемой молекулы может происходить посредством диффузии, болюса, высвобождаемого со временем, или непрерывного введения.

Фармацевтические композиции анти-IL-1R1 антитела согласно изобретению, также, может быть желательно применять *ex vivo*. В таких случаях клетки, ткани или органы, которые извлечены из пациента, подвергают воздействию фармацевтических композиций анти-IL-1R1 антитела, после чего эти клетки, ткани и/или органы имплантируют обратно пациенту.

В частности, анти-IL-1R1 антитела можно доставлять путем имплантации некоторых клеток, которые были подвергнуты генной инженерии, используя такие способы, как описано здесь для экспрессии и секреции полипептида. В некоторых воплощениях такие клетки могут представлять собой животные или человеческие клетки и могут быть аутологичными, гетерологичными или ксеногенными. В некоторых воплощениях эти клетки могут быть бессмертными. В других воплощениях, чтобы уменьшить возможность иммунологического ответа, эти клетки можно инкапсулировать во избежание инфильтрации в окружающие ткани. В других воплощениях материалы инкапсуляции обычно представляют собой биологически совместимые полупроницаемые полимерные оболочки или мембраны, которые дают возможность высвобождения белкового(ых) продукта(ов), но предотвращают разрушение клеток иммунной системой пациента или другими вредными факторами из окружающих тканей.

В некоторых воплощениях изобретение дополнительно охватывает введение анти-IL-1R1 антитела или фармацевтической композиции по изобретению одновременно с одним или более чем одним лекарством, которое вводят тому же пациенту, причем каждое лекарство вводят в режиме, подходящем для данного лекарства. Эти воплощения охватывают предварительное лечение, одновременное лечение, последовательное лечение и переменные режимы. Примеры таких лекарств включают, но не ограничены ими, противовирусные агенты, антибиотики, анальгетики, кортикостероиды, антагонисты воспалительных цитокинов, модифицирующие заболевание противоревматические лекарства (МЗПЛ), а также нестероидные противовоспалительные лекарства.

В других воплощениях анти-IL-1R1 антитело или фармацевтическую композицию по изобретению можно вводить в комбинации с другими ингибиторами цитокинов, включая те, которые антагонизируют, например, RANKL, TGF β , IFN γ , IL-6 или IL-8 и TNF, предпочтительно TNF α . В комбинации с IL-6 антитело по данному изобретению можно применять для лечения и предупреждения рецидива эпилептических припадков, включая припадки, вызванные антагонизмом рецептора GABA $_A$, припадки, связанные с икctalными эпизодами ЭЭГ, и моторно-лимбические припадки, возникающие во время эпилептического статуса. В комбинации с ингибитором IFN γ антитело по данному изобретению полезно при лечении идиопатического фиброза легких и муковисцидоза. Комбинация антитела к рецептору IL-1 и ингибиторами RANKL, например, с антителом RANKL, полезна для предупреждения деструкции костей при различных состояниях, включая, но не ограничиваясь ими, различные ревматические расстройства, остеопороз, множественную миелому или другие злокачественные опухоли, которые вызывают разрушение

костей, либо противоопухолевую терапию с целью предупреждения метастаза в кость, либо разрушение костей, связанное с отходами износа протеза или с периодонтитом. Кроме того, антитела по изобретению можно вводить в комбинации с ингибиторами IL-17, такими как растворимые формы рецептора IL-17 (такого как IL-17R:Fc), либо с антителом к IL-17, либо с антителом к IL-17R, белком, связывающим IL-18, растворимыми формами рецепторов к IL-18, с антителами против рецепторов к IL-18 или с антителами против CD30-лиганда или против CD4.

Изобретение, далее, охватывает способы применения анти-IL-1R1 антитела или фармацевтической композиции по изобретению при лечении раскрытых здесь медицинских расстройств в комбинации с ингибитором TNF, предпочтительно TNF:Fc (ENBREL®), и любую комбинацию вышеописанных цитокинов или ингибиторов цитокинов, которые являются активными агентами в комбинационной терапии. Например, в соответствии с настоящим изобретением способы комбинационной терапии можно применять для лечения ревматоидного артрита, удара, астмы, псориаза и т. д.

Состояния, которые эффективно лечат с помощью анти-IL-1R1 антитела или фармацевтической композиции, описанных здесь, включают легочные заболевания, такие как астма, хроническая обструктивная болезнь легких, легочно-альвеолярный протеиноз, индуцированная блеомицином пневмопатия и фиброз, индуцированный облучением фиброз легких, муковисцидоз, аккумуляция коллагена в легких и РДСВ (респираторный дистресс-синдром взрослых), все из которых можно лечить комбинациями антитела к IL-1R и ингибитора IL-4 и/или ингибитора IL-13, например, антитела IL-4R, которое ингибирует активность IL-13 и IL-4. Описанные антитела и фармацевтические композиции по изобретению также полезны для лечения бронхолегочной дисплазии (БЛД); хронических обструктивных болезней легких (например, эмфиземы и хронического бронхита) и хронической фибротической болезни легких недоношенных детей. Кроме того, соединения, композиции и комбинированную терапию по изобретению применяют для лечения профессиональных легочных заболеваний, включая асбестоз, пневмокониоз хлопко-розов, силикоз или подобные состояния, связанные с длительным воздействием мелких частиц. В других аспектах изобретения раскрытые соединения, композиции и комбинированную терапию применяют для лечения пневмонии, образующей бронхолиты, фиброза легких, включая идиопатический фиброз легких и индуцированный облучением фиброз легких; саркоидоза легких и аллергий, включая аллергический ринит, контактный дерматит, атопический дерматит и астму.

Такие комбинации полезны также для лечения пациентов, страдающих различными кожными расстройствами, включая, но не ограничиваясь ими, герпетиформный дерматит (болезнь Дюринга), атопический дерматит, контактный дерматит, крапивницу (включая хроническую идиопатическую крапивницу) и аутоиммунные заболевания, вызывающие образование пузырей, включая обыкновенную пузырчатку и буллезный пемфигоид. Другие заболевания, поддающиеся лечению комбинацией антитела IL-1R и ингибитора IL-4 и/или IL-13, включают тяжелую миастению, саркоидоз, включая саркоидоз легких, склеродерму, реактивный артрит, синдром повышенного IgE, рассеянный склероз и идиопатический гиперэозинофильный синдром. Эту комбинацию также применяют для лечения аллергических реакций на лекарства, а также в качестве адъюванта для иммунотерапии аллергии.

Антитела к рецептору IL-1 или фармацевтические композиции, описанные здесь, полезны для лечения протозойных заболеваний, включая малярию и шистосомиаз, и для лечения лепрозной узловой эритемы; бактериального или вирусного менингита; туберкулеза, включая туберкулез легких и пневмонии, вторичной по отношению к бактериальной или вирусной инфекции, включая гриппозную инфекцию и инфекционный мононуклеоз.

Сердечно-сосудистые расстройства и повреждения можно лечить и/или предупреждать описанными фармацевтическими композициями или анти-IL-1R1 антителами, одними или в комбинации с ингибиторами других цитокинов.

Сердечно-сосудистые заболевания, поддающиеся лечению, включают абдоминальную аневризму аорты, острый коронарный синдром, артериит; закупорку сосудов, включая закупорку церебральной артерии; осложнения операции коронарного шунтирования; ишемическое/реперфузионное повреждение; заболевание сердца, включая атеросклеротическую болезнь сердца, миокардит, включая хронический аутоиммунный миокардит и вирусный миокардит; сердечную недостаточность, включая хроническую сердечную недостаточность, застойную сердечную недостаточность, кахексию сердечной недостаточности; инфаркт миокарда; рестеноз и/или атеросклероз после операции на сердце или после баллонных пластических операций на сонной артерии; бессимптомную ишемию миокарда; дисфункцию клапана левого желудочка, осложнения после имплантации вспомогательных устройств левого желудочка; синдром Рейно; тромбоз; васкулит, включая васкулит Кавасаки; болезнь окклюзии вен, гигантоклеточный артериит, гранулематоз Вегенера; спутанность сознания после операции сердечно-легочного шунтирования и пурпур Шенлейн-Геноха.

В некоторых воплощениях анти-IL-1R1 антитела и фармацевтические композиции по изобретению можно также применять для лечения хронических болевых состояний, таких как хроническая боль в области таза, включая хронический простатит/тазовый болевой синдром, и постгерпетическая боль.

Расстройства эндокринной системы, включая юношеский диабет (включает аутоиммунный сахарный диабет и инсулинзависимые типы диабета) и диабет взрослых (включая инсулиннезависимый и опо-

средованный ожирением диабет) также можно лечить анти-IL-1R1 антителами или фармацевтическими композициями по изобретению. Такое лечение включает вторичные состояния, связанные с диабетом, такие как диабетическая ретинопатия, отторжение трансплантата почки у больных диабетом, устойчивость к инсулину, опосредованная ожирением, и почечная недостаточность, которая сама по себе может быть связана с протеинурией и гипертензией. Другие эндокринные расстройства также можно лечить этими соединениями и включают болезнь поликистоза яичников, X-сцепленная адренолейкодистрофию, гипотиреоз и тиреоидит, включая тиреоидит Хасимото (т.е. аутоиммунный тиреоидит), дисфункцию клеток щитовидной железы, включая синдром заболевания при эутиреозе.

Состояния желудочно-кишечной системы можно лечить или предупреждать анти-IL-1R1 антителами или фармацевтическими композициями по изобретению, одними или в комбинации с другими терапевтическими агентами. Эти состояния включают глютенную болезнь, болезнь Крона; неспецифический язвенный колит; идиопатический гастропарез; панкреатит, включая хронический панкреатит; острый панкреатит, воспалительное кишечное заболевание и язвы, включая язвы желудка и двенадцатиперстной кишки.

Расстройства мочеполовой системы также можно лечить или предупреждать описанными здесь анти-IL-1R1 антителами или фармацевтическими композициями. Такие расстройства включают гломерулонефрит, включая аутоиммунный гломерулонефрит, гломерулонефрит вследствие воздействия токсинов или гломерулонефрит, вторичный по отношению к инфекциям гемолитическими стрептококками или другими инфекционными агентами. Также можно лечить соединениями, композициями и комбинированными терапиями по изобретению уремический синдром и его клинические осложнения (например, почечная недостаточность, анемия и гипертрофическая кардиомиопатия), включая уремический синдром, связанный с воздействием токсинов окружающей среды, лекарств или других причин. Осложнения, которые возникают в результате воспаления стенки желчного пузыря, которые приводят к изменению всасывающей функции, можно лечить или предупреждать антителами по изобретению. В такие осложнения включены холелитиаз (желчные конкременты) и холидохолитиаз (камни желчного протока) и рецидивы холелитиаза и холидохолитиаза. Дополнительными состояниями, которые можно лечить этими соединениями, композициями и комбинированными терапиями по изобретению, являются осложнения гемодиализа; состояния простаты, включая доброкачественную гипертрофию простаты, не бактериальный простатит и хронический простатит, а также осложнения гемодиализа.

Также по изобретению предложены способы применения антител анти-IL-1R1 по изобретению, композиций и комбинированных терапий для лечения различных гематологических и онкологических расстройств. Например, анти-IL-1R1 антитела, одни или в комбинации с ингибиторами других цитокинов или с другими активными агентами, как описано выше, можно применять для лечения различных форм рака, включая острую миелогенную лейкемию, хроническую миелогенную лейкемию, носоглоточную вирусоложительную карциному Эпштейна-Барра, глиому, раки ободочной кишки, желудка, простаты, почечных клеток, шейки матки и яичника, рак легких (SCLC и NSCLC), включая кахексию, связанную с раком, утомляемость, астению, паранеопластический синдром кахексии и гиперкальцемию. Солитарные опухоли, включая саркому, остеосаркому и карциному, такую как аденокарцинома (например, рак молочной железы) и сквамозно-клеточная карцинома, также можно лечить. Дополнительные раки, которые можно лечить, включают рак пищевода, рак желудка, карциному желчного пузыря, лейкемию, включая острую миелогенную лейкемию, хроническую миелогенную лейкемию, миелоидную лейкемию, хроническую или острую лимфобластную лейкемию и волосисто-клеточную лейкемию. Другие злокачественные опухоли с инвазивным метастатическим потенциалом, включая множественную миелому, можно лечить целевыми соединениями, композициями и комбинированными терапиями.

Кроме того, описанные анти-IL-1R1 антитела можно применять для лечения анемий и гематологических расстройств, включая хроническую идиопатическую нейтропению, анемию хронического заболевания, гипопластическую анемию, включая врожденную гипопластическую анемию Фанкони; идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП); тромбоцитическую тромбоцитопеническую пурпуру, синдромы миелодисплазии (включая рефракторную анемию, рефракторную анемию с кольцевыми сидеробластами, рефракторную анемию с избытком бластных клеток, рефракторную анемию с избытком бластных клеток в трансформации); миелофиброз/миелоидную метаплазию и серповидно-клеточный вазоокклюзивный криз.

Анти-IL-1R1 антителами по изобретению также можно лечить различные лимфопролиферативные заболевания, включая аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (АЛПС), хроническую лимфобластную лейкемию, волосисто-клеточную лейкемию, хронический лимфолейкоз, периферическую Т-клеточную лимфому, лимфому малых лимфоцитов, лимфому клеток коры головного мозга, лимфому Беркитта, вирус-положительную Т-клеточную лимфому Эпштейна-Барра, гистиоцитарную лимфому, болезнь Ходжкина, диффузную агрессивную лимфому, острые лимфатические лейкемии, Т-гамма лимфопролиферативное заболевание, лимфому кожных В клеток (т.е. грибовидный микоз) и синдром Сезари.

Антителами по данному изобретению можно лечить наследственные состояния, такие как болезнь Гоше, болезнь Гентингтона, болезнь, связанная с линейным IgA, и мышечная дистрофия.

Другие состояния, которые можно лечить или предупреждать описанными антителами к рецептору IL-1 или фармацевтическими композициями, включают состояния, которые являются результатом повреждений головы или спинного мозга, включая субдуральную гематому вследствие травмы головы. Касательно данной терапии, описанные композиции и комбинации пригодны для предупреждения неврологической черепно-мозговой травмы, а также для предупреждения и лечения цервикогенной головной боли. Описанные композиции и комбинации, кроме того, пригодны для лечения неврологических побочных эффектов, связанных с облучением головного мозга.

Анти-IL-1R1 антитела и фармацевтическая композиция по изобретению также полезны для лечения состояний печени, таких как гепатит, включая острый алкогольный гепатит, острый индуцированный лекарствами или вирусный гепатит, гепатит А, В и С, склерозирующий холангит, печеночный синусоидный эпителий и воспаление печени вследствие неизвестных причин.

Расстройства, в которые вовлечена потеря слуха и которые связаны с аномальной экспрессией IL-1, можно лечить антителами анти-IL-1R1 или фармацевтическими композициями по изобретению. Такие расстройства включают потерю слуха, связанную с преддверно-улитковым нервом, которую считают результатом аутоиммунного процесса, т.е. аутоиммунную потерю слуха. Антителами анти-IL-1R1 или фармацевтическими композициями по изобретению также можно лечить синдром Меньера и холестеатому, расстройство среднего уха, часто связанное с потерей слуха.

Неартритные расстройства костей и суставов также можно лечить описанными здесь антителами. Эти расстройства включают расстройства остеокластов, которые приводят к разрежению кости, такие как, но не ограниченные ими, остеопороз, включая постменопаузный остеопороз, остеоартрит, периодонтит, приводящий в результате к расшатыванию и потере зубов, и расшатывание протеза после замещения сустава (как правило, связанное с воспалительным ответом на инородные остатки от износа). Это последнее состояние часто называют "ортопедический имплантанный остеолитизм". Другим состоянием, которое можно лечить соединениями, композициями и комбинированными терапиями по изобретению, является дисфункция височно-нижнечелюстного сустава (ВНЧС).

Антитела анти-IL-1R1 или фармацевтические композиции по изобретению также можно применять для лечения ревматических расстройств, включая взрослый и ювенильный ревматоидный артрит; склеродерму; системную красную волчанку; подагру; остеоартрит; ревматическую полимиалгию; серонегативные спондилартропатии, включая анкилозирующий спондилоартрит и болезнь Рейтера, псориатический артрит и хронический артрит Лайма. Антитела по изобретению также полезны для лечения воспаления произвольно сокращающихся мышц и других мышц, включая дерматомиозит, миозит, связанный с тельцами включения, полимиозит и лимфангиолейомиоматоз.

Другим применением антител и фармацевтических композиций по изобретению является лечение и/или предупреждение первичного амилоидоза и вторичного амилоидоза, которые свойственны различным состояниям, включая болезнь Альцгеймера, вторичный реактивный амилоидоз; синдром Дауна и амилоидоз, связанный с диализом. Антителами и фармацевтическими композициями по изобретению также можно лечить наследственные синдромы периодической лихорадки, включая семейную Средиземноморскую лихорадку, повышенный иммуноглобулин D и синдром периодической лихорадки, а также периодические синдромы, связанные с рецептором TNF (TRAPS).

В других воплощениях антитела или фармацевтические композиции по изобретению можно применять для лечения расстройств, в которые вовлечены кожа или слизистые оболочки. Такие расстройства включают акантолитические заболевания, включая болезнь Дарье, фолликулярный кератоз и обыкновенную пузырчатку. Другие кожными расстройствами, которые можно лечить, используя антитела по изобретению, включают угри, розовые угри, гнездную алопецию, афтозный стоматит, буллезный пемфигоид, ожоги, экзему, эритему, включая полиморфную эритему и буллезную полиморфную эритему (синдром Стивенса-Джонсона), воспалительное кожное заболевание, плоский лишай, буллезное заболевание, связанное с линейным IgA (детский хронический буллезный дерматоз), потерю эластичности кожи, поверхностные язвы слизистой оболочки, включая язвы желудка, нейтрофильный дерматит (синдром Свита), дерматомиозит, педикулез *tunga pilaris*, псориаз, гангренозную пиодерму, полицентрический ретикулоэритематоз и токсический эпидермальный некролиз. Другие состояния, связанные с кожей, которые можно лечить терапиями и комбинированными терапиями по настоящему изобретению, включают герпетический дерматит.

Дополнительные расстройства, которые можно лечить антителами или фармацевтическими композициями по изобретению, включают болезнь "трансплантат против хозяина" и осложнения в результате трансплантации солидных органов, таких как сердце, печень, кожа, почка, легкое (облитерация дыхательных путей трансплантата легкого) или другие трансплантаты, включая трансплантаты костного мозга.

Описанными анти-IL-1R1 антителами или фармацевтическими композициями также можно лечить или предупреждать глазные заболевания, включая регматогенную отслойку сетчатки и воспалительное глазное заболевание, включая воспалительное глазное заболевание, связанное с курением и дегенерацией желтого пятна.

Антитела или фармацевтические композиции по изобретению, как описано здесь, полезны для ле-

чения расстройств, которые поражают женскую репродуктивную систему. Примеры включают, но не ограничены ими, множественное расстройство имплантации/бесплодие; синдром невынашивания плода или потеря плода (спонтанный аборт); преэкламптические беременности или эклампсию; эндометриоз, хронический цервицит и преждевременные роды.

Кроме того, антитела или фармацевтические композиции по изобретению полезны для лечения и/или предупреждения ишиалгии, симптомов старения, тяжелых реакций на лекарства (например, токсичности IL-2 или индуцированных блеомицином пневмопатии и фиброза) или для подавления иммунного ответа до, во время или после трансфузии чужеродных красных кровяных телец при операции на сердце или другой операции или при лечении травматического повреждения конечности или сустава, такого как травматическое повреждение колена. Различные другие медицинские расстройства, которые можно лечить раскрытыми антителами анти-IL-1R1 или фармацевтическими композициями, включают: рассеянный склероз; синдром Бехчета; синдром Шегрена; аутоиммунную гемолитическую анемию; бета-талассемию; боковой амиотрофический склероз (болезнь Лоу-Герига); болезнь Паркинсона и тендосиновиит неизвестной причины, а также различные аутоиммунные расстройства или заболевания, связанные с наследственными дефицитами, включая X-сцепленную задержку умственного развития.

Кроме того, анти-IL-1R1 антитела или фармацевтические композиции по изобретению полезны для лечения повреждений центральной нервной системы (ЦНС), включая эффекты нейротоксических нейротрансмиттеров, высвобождаемых во время возбуждения воспаления в центральной нервной системе, и для ингибирования или предупреждения развития глиальных рубцов в местах повреждения центральной нервной системы, в связи с эпилепсией и лечением эпилептических припадков, уменьшением тяжести и числа повторных припадков и уменьшением тяжести вредных эффектов припадков, уменьшением потери нейронов, дегенерации нейронов и глиоза, связанного с припадками.

Дополнительные способы применения антител или фармацевтических композиций по изобретению включают, но не ограничены ими, лечение болезненной критической полиневропатии и миопатии (КБПНМ), острой полиневропатии; нервной анорексии; паралича Белля; синдрома хронической усталости; транссиндромной деменции, включая болезнь Крейтцфельда-Якоба; демиелинизирующей невропатии; синдрома Гийена-Барре; заболевания позвоночного диска; синдрома войны в Персидском заливе; хронической воспалительной демиелинизирующей полиневропатии; тяжелой миастении; бессимптомной церебральной ишемии; расстройств сна, включая нарколепсию и остановку дыхания во сне; хронической нейрональной дегенерации и удара, включая церебральные ишемические заболевания. Другими способами применения антител по изобретению являются анорексия и/или анорексические состояния, перитонит, эндотоксемия и септический шок, образование гранулемы, сердечный удар, синдром Чурга-Штраусса, хроническое воспаление после острых инфекций, таких как туберкулез и лепра, системный склероз и гипертрофическое рубцевание.

В других воплощениях для различных целей можно конструировать слитые белки с авидином, содержащие аминокислотную последовательность одного из антител IL-1R1 по изобретению. Слитые белки с авидином можно конструировать, например, используя экспрессионный вектор млекопитающих, содержащий последовательность кДНК, кодирующую рекомбинантный авидин цыпленка, прилежащий к сайту клонирования для вставки конкретного целевого гена - партнера слияния. В этот вектор можно включать последовательность авидина с ее эндогенной сигнальной последовательностью, чтобы обеспечить секрецию дискретных генов-партнеров слияния, которые в природе не содержат сигнальные последовательности. Слитый белок, который экспрессируется этим вектором, имеет метку белка авидина в N-концевом участке партнера слияния. Стратегия слияния, как описано здесь, дает возможность секреции белков, которые обычно экспрессируются внутри клетки, как, например, гены преобразования сигнала или ядерные рецепторы гормонов.

Альтернативно, можно использовать вектор, который кодирует авидин без его эндогенной сигнальной последовательности, что приведет в результате к С-концевому мечению белков-партнеров слияния. С-концевое слияние с авидином также дает возможность секреции белка на основе эндогенной сигнальной последовательности партнера слияния. Такую стратегию можно применять, чтобы обеспечить правильность процессинга и укладки белка или чтобы определить пригодность предполагаемой сигнальной последовательности. Кроме того, этот вектор может содержать короткую нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, которая может действовать в качестве специфического субстрата, расщепляемого ферментом, между последовательностями авидина и партнера слияния. Такие последовательности, расщепляемые ферментом, дают возможность отделения партнера слияния от авидина в целях очистки или высвобождения белка.

Слитые белки с авидином по изобретению можно использовать, например, при скрининге антител, функциональной характеристике (определении пригодности антитела в качестве агониста или антагониста, нейтрализующего агента и т. д.), картировании эпитопов или в стратегиях иммунизации. Слияние целевого белка с авидином можно также использовать в анализах фармакокинетики, эффективности и в других стандартных форматах анализов, предназначенных для тестирования доклинических образцов или клинических образцов пациентов на присутствие терапевтического антитела в крови, моче или других образцах ткани. Белки-партнеры слияния с авидином могут быть получены в виде полноразмерных

или укороченных последовательностей, конкретных изолированных структурных доменов или в виде химерных последовательностей с другими гомологами партнера слияния из другого вида.

Слитые белки с авидином можно экспрессировать, используя любые стандартные способы введения генов в клетки, как описано здесь и известно в данной области. Эти белки можно экспрессировать, например, в клетках 293 или CHO путем трансфекции этих клеток слитой конструкцией с авидином в растворе липидов, таком как липофектамин (Lipofectamine, Invitrogen, Carlsbad, CA).

Кондиционная среда и/или клеточные лизаты из клеток, экспрессирующих слитые белки, можно собрать и нанести на аналитический субстрат, такой как покрытые биотином полистироловые гранулы или покрытые биотином планшеты для ELISA (твердофазного иммуноферментного анализа). Сборку кондиционной среды и/или клеточного лизата можно осуществить в момент времени, который дает возможность оптимальной экспрессии слитого белка. Этот момент времени может быть определен экспериментально специалистом в данной области техники, но обычно составляет 48 ч после трансфекции. Слитые белки можно также анализировать на клеточной мембране или внутри клетки на экспрессию и функциональность в связывании известных лигандов, рецепторов или антител.

Слитые белки с авидином по изобретению можно также анализировать любым известным или охарактеризованным ранее способом, в котором используется взаимодействия биотин-авидин. Такие способы включают, но не ограничены ими, проточную цитометрию и флуоресцентную визуализацию/микроскопию. Например, слияния с авидином, экспрессируемые в среде, или клеточные лизаты можно нанести на покрытые биотином гранулы и окрасить меченым флуоресцентной меткой антителом против авидина, показывающим уровень экспрессии. Также можно нанести флуоресцентные антитела, которые распознают специфичный белок-партнер слияния в многоцветной форме анализа. Кроме того, немеченые антитела, специфичные к белку-партнеру слияния, можно нанести одновременно с мечеными флуоресцентной меткой антителами в конкурентном анализе.

В некоторых воплощениях в изобретении предложены способы картирования эпитопов, используя слитые белки с авидином. Пример способа картирования эпитопов по изобретению приведен ниже в отношении картирования эпитопов для анти-IL-1R1 антител. Однако специалисту в данной области будет понятно, что такие способы можно легко применить к картированию эпитопов для любого антитела, и они не ограничены антителами анти-IL-1R1. Например, кДНК, кодирующую авидин цыпленка (с эндогенной сигнальной последовательностью), можно соединить с 5'-концом кДНК, кодирующих интересующий белок (т.е. белок, который распознается антителами, для которых желательно обнаружение эпитопов), слитый с последовательностью FLAG-метки у 3'-конца. FLAG-меченые слитые гены можно собрать в экспрессионном векторе, используя традиционные молекулярные методики. Панели мутантных меченых авидин-FLAG белков, в которых некоторые аминокислоты заменены (например, соответствующими аминокислотными остатками из другого вида животных), можно сконструировать, используя общепринятые методики. Мутантные белки и белки дикого типа можно экспрессировать в клетках-хозяевах, и связывание белков дикого типа или мутантных белков с интересующим антителом можно обнаружить, используя, например, Вестерн-блот-анализ или анализы связывания на основе гранул, как описано здесь. Таким образом, эпитоп можно определить путем обнаружения, какие замены в мутантных белках нарушают связывание с интересующим антителом.

Примеры

Приведенные ниже примеры, включая проведенные эксперименты и полученные результаты, представлены только в иллюстративных целях и не должны рассматриваться как ограничивающие изобретение.

Пример 1.

Получение человеческих моноклональных антител против рецептора интерлейкина-1 типа I (IL-1R1).

Трансгенные мыши HuMab.

Полностью человеческие моноклональные антитела к рецептору IL-1 типа I (IL-1R1) получили, используя линию трансгенных мышей HCo7, которая экспрессирует гены человеческих антител. В каждой из этих линий мышей эндогенный мышинный ген легкой каппа-цепи прерван в гомозиготном состоянии как описано в Chen et al. (1993, EMBO J. 12: 811-820), а эндогенный мышинный ген тяжелой цепи прерван в гомозиготном состоянии, как описано в примере 1 WO 01/09187 (включенной сюда путем ссылки). Каждая из этих линий мышей несет трансген легкой каппа-цепи антитела человека, KCo5, как описано Fishwild et al. (1996, Nature Biotechnology 14: 845-851). Линия HCo7 несет трансген тяжелой цепи антитела человека, как описано в патентах США № 5545806; 5625825 и 5545807 (включенных сюда путем ссылки). Линию HCo7 здесь называют мышами HuMab.

Иммунизации HuMab.

Для получения полностью человеческих моноклональных антител к IL-1R1 мышей HuMab иммунизировали очищенным рекомбинантным IL-1R1, выделенным из клеток насекомых или млекопитающих (например, клеток CHO), в качестве антигена. Общие схемы иммунизации для мышей HuMab описаны в Lonberg et al. (1994, Nature 368: 856-859); Fishwild et al., см. выше и в WO 98/24884, выводы каждой из которых включены сюда путем ссылки. Возраст мышей составлял 6-16 недель при первой инфузии анти-

гена. Очищенный рекомбинантный препарат (25-50 мкг) антигена IL-1R1 (например, очищенный из трансфицированных клеток насекомых или млекопитающих, экспрессирующих IL-1R1) использовали для иммунизации мышей NuMab внутривенно (IV) или подкожно (SC).

Иммунизации трансгенных мышей NuMab были достигнуты при использовании антигена в полном адьюванте Фрейнда и двух инъекциях с последующей IV иммунизацией через 2-4 недели (вплоть до 11 иммунизации суммарно) антигеном в неполном адьюванте Фрейнда. Каждым антигеном иммунизировали несколько дюжин мышей. Суммарно 149 мышей линии HCo7 иммунизировали IL-1R1. Мониторинг иммунного ответа осуществляли путем ретроорбитального забора крови.

Для отбора мышей NuMab, продуцирующих антитела, которые связывают IL-1R1, сыворотки от иммунизированных мышей тестировали с помощью ELISA, как описано Fishwild et al., см. выше. Коротко: микротитровальные планшеты покрывали очищенным рекомбинантным IL-1R1 из клеток насекомых или млекопитающих в концентрации 1-2 мкг/мл в ФСБ (фосфатно-солевом буферном растворе), и 50 мкл/лунка инкубировали при 4°C в течение ночи, затем блокировали 200 мкл/лунка 5% сыворотки цыпленка в ФСБ/Твин (0,05%). Разведения плазмы от мышей, иммунизированных IL-1R1, добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 1-2 ч при температуре окружающей среды. Планшеты промывали ФСБ/Твин, а затем инкубировали с Fc-специфичным поликлональным реагентом IgG козы против человека, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP), в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали ФСБ/Твин и инкубировали с Fc-специфичным поликлональным реагентом IgG козы против человека, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP), в течение 1 ч при комнатной температуре. После отмычки планшеты проявляли субстратом ABTS (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, № по каталогу A-1888, 0,22 мг/мл) и анализировали с помощью спектрофотометра при OD 415-495. Мышей с достаточными титрами человеческого иммуноглобулина анти-IL-1R1 использовали для получения моноклональных антител, как описано ниже.

Получение гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к IL-1R1.

Мышей готовили для продуцирования моноклональных антител путем ревакцинации антигена внутривенно за 2 суток до умерщвления и извлекали из них селезенки. Спленоциты мыши выделяли из мышей NuMab и подвергали слиянию с помощью ПЭГ с линией клеток миеломы мыши, используя стандартные протоколы. Обычно осуществляли 20-30 слияний для каждого антигена.

Кратко: одну часть клеточной суспензии лимфоцитов селезенки из иммунизированных мышей подвергали слиянию с одной четвертью несекретирующих клеток миеломы мыши № P3X63-Ag8.653 (ATCC, № по каталогу CRL 1580) или несекретирующих клеток миеломы мыши SP2/0 (ATCC, CRL 1581) с 50% ПЭГ (Sigma). Клетки высевали в концентрации примерно 1×10^5 /лунка в микротитровальные планшеты с плоским дном с последующей инкубацией в течение примерно 2 недель в селективной среде, содержащей 10% фетальную бычью сыворотку, 10% кондиционной среды P388D1 (ATCC, № по каталогу CRL TIB-63), 3-5% ORIGEN (IGEN) в DMEM (модифицированной Дельбрюкком среде Игла, Mediatech, № по каталогу CRL 10013, с высоким содержанием глюкозы, L-глутамина и пирувата натрия) плюс 5 мМ ГЭ-ПЭС, 0,055 мМ 2-меркаптоэтанол, 50 мг/мл гентамицина и 1xHAT (Sigma, № по каталогу CRL P-7185). Через 1-2 недели клетки культивировали в среде, в которой HAT был заменен HT.

Полученные в результате гибридомы подвергали скринингу на продуцирование антиген-специфичных антител. Индивидуальные лунки подвергали скринингу с помощью ELISA (описано выше) на человеческие моноклональные антитела IgG анти-IL-1R1. Как только появлялся интенсивный рост гибридом, проводили мониторинг среды, обычно после 10-14 суток. Гибридомы, секретирующие антитела, пересеивали, подвергали повторному скринингу и, если они оставались положительными по человеческому IgG, моноклональные анти-IL-1R1 антитела субклонировали по меньшей мере дважды путем ограничивающего разведения. Затем стабильные субклоны культивировали *in vitro* для получения небольших количеств антитела в тканевой культуральной среде для характеристики.

Отбор человеческих моноклональных антител, связывающихся с IL-1R1.

Анализ ELISA, описанный выше, использовали для скрининга гибридом, которые показали положительную реактивность с иммуногеном IL-1R1. Гибридомы, секретирующие моноклональное антитело, которое связывается при высоком авидине с IL-1R1, субклонировали и характеризовали далее. Один клон от каждой гибридомы, который сохранял реактивность родительских клеток (как определено с помощью ELISA), выбирали для получения клеточного банка из 5-10 флаконов, который хранили в жидком азоте.

Анализ ELISA на специфичность к изотипу проводили для определения изотипа моноклональных антител, полученных как здесь описано. В этом эксперименте лунки микротитровальных планшетов покрывали 50 мкл/лунка раствора 1 мкг/мл легкой каппа-цепи мыши против человека в ФСБ и инкубировали при 4°C в течение ночи. После блокирования 5% сывороткой цыпленка планшеты подвергали реакции с супернатантом из каждого протестированного моноклонального антитела и контроля чистого изотипа. Планшеты инкубировали при температуре окружающей среды в течение 1-2 ч. Затем лунки подвергали реакции с каждой специфичной к человеческому IgG1, IgG2 или IgG4 поликлональной антисывороткой козы против человека, конъюгированной с пероксидазой хрена, и планшеты проявляли и анализировали как описано ниже.

Моноклональные антитела, очищенные из супернатантов гибридомы, которые проявляли значительное связывание с IL-1R1, как обнаружено с помощью ELISA, затем тестировали на биологическую активность, используя анализы связывания *in vitro* и анализы, основанные на человеческих хондроцитах и клетках цельной крови. Антитела, которые проявляли лучшую активность, обозначили как 15C4, 26F5, 27F2, 24E12 и 10H7. Эти антитела подвергали предварительному эксперименту по сортировке эпитопов. Планшеты ELISA покрывали человеческим sIL-1R1 (домен 1+2+3), укороченным человеческим sIL-1R1 (домен 1+2), крысиным sIL-1R1, человеческим sIL-1R типа II и овальбумином (отрицательный контроль). Связывание антител обнаруживали с помощью конъюгированного с пероксидазой хрена Fc антитела против человека (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Результаты суммированы в табл. 2. Значок "галочка" (✓) в табл. 2 означает положительный результат по связыванию; "X" представляет отрицательный результат. Антитела 15C4, 26F5, 27F2 и 24E12 связываются только с белком IL-1R1, который имеет все три внеклеточных домена, указывая на то, что эпитопы для каждого попадают в пределы третьего домена. Антитело 10H7 связывается как с полноразмерным внеклеточным доменом IL-1R1, так и с укороченным белком, который имеет только домены 1 и 2, демонстрируя, что эпитоп для данного антитела находится либо внутри домена 1, либо внутри домена 2. Ни одно из протестированных антител не обладает перекрестной реактивностью с человеческим рецептором типа II или крысиным IL-1R1.

Таблица 2

	ОА (отрицательный контроль)	Hu sIL- 1R1 (домен 1+2+3)	Hu sIL- 1R1 (домен 1+2)	Hu sIL- 1RII (домен 1+2+3)	Крысиный sIL-1R1 (домен 1+2+3)
Антитело					
15C4	X	✓	X	X	X
26F5	X	✓	X	X	X
27F2	X	✓	X	X	X
24E12	X	✓	X	X	X
10H7	X	✓	✓	X	X

Пример 2.

Ингибирование образования комплекса IL-1 - рецептора типа I *in vitro* антителами анти-IL-1R1.

Способность антител ингибировать события внеклеточного связывания, необходимые для передачи сигнала IL-1, оценивали с использованием рекомбинантных белков *in vitro* в анализе, в котором связывание IL-1 с IL-1R приводит в результате к образованию высокоаффинного сайта связывания для IL-1RAcP. Связывание IL-1RAcP с IL-1-связанным IL-1R (называемое "образование комплекса") измеряли как описано ниже. Рекомбинантные белки в анализах связывания инкубировали в микротитровальных планшетах в отсутствие (контроль) и в присутствии антител. Значения IC₅₀ выводили на основании сравнения контрольных значений со значениями, полученными в присутствии антитела в концентрации между 10 фМ и 1 мкМ. Коротко: этот анализ проводили следующим образом. Биотинилированный IL-1R1 и покрытые стрептавидином гранулы (Dyna, Dynabeads M-28) распределяли в микротитровальных планшетах. Затем антитела добавляли в соответствующие лунки в концентрации 1 нМ, и IL1RAcP, меченый рутением (полученный с NHS-TAG (IGFN) согласно протоколу IGFN), добавляли в конечной концентрации 5 нМ. После инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре реакцию связывания анализировали либо ORIGEN™ 1,5, либо M18 (IGEN International Inc). Связывание IL1RAcP со связанным с IL-1 IL-1R1 определяли с помощью обнаружения электрохемилюминесцентного сигнала, связанного с IL-1R1-связывающими гранулами. Уменьшение сигнала в результате конкуренции антитела связыванием либо IL-1, либо IL-1RAcP вычисляли как процент сигнала ECL для максимума связывания (конкуренция отсутствует).

Для каждого антитела в этих анализах связывания устанавливали кривую ответа ингибирования и выводили IC₅₀, используя программное обеспечение PRISM™. Результаты по ингибированию индуцированных IL-1β событий связывания изображены в виде графика на фиг. 12. Значения IC₅₀ для ингибирования образования комплекса показаны в табл. 3 ниже. Антитела 15C4, 26F5, 27F2 и 24E12 сильно ингибируют образование комплекса. Эти антитела все являются связывающими третий домен IL-1R1, как описано выше. Антитело 10H7 принадлежит к классу антител, которые связываются с конструкцией IL-1R без третьего домена. 10H7 является наименее эффективным ингибитором направляемого IL-1 связывания IL-1AcP, чем антитела, связывающие третий домен. Ингибирование образования комплекса антителами по изобретению сравнивали с ингибированием IL-1ra. Антитела, связывающие третий домен, демонстрировали подобную или несколько большую способность к ингибированию образования комплекса по сравнению с IL-1ra.

На фиг. 13 изображена способность антитела 15C4 к ингибированию образования комплекса IL-1R1/IL-1α/RAcP. IC₅₀ для образования комплекса IL-1R1/IL-1α/RAcP составляла 43 пМ.

Таблица 3

	Человеческие анти-IL-1R1 антитела					
	15C4	26F5	27F2	24E12	10H7	rII-1ra
IC₅₀	96 пМ	160 пМ	333 пМ	348 пМ	5,3 нМ	555 пМ
95% доверительные интервалы	71 пМ – 129 пМ	118 пМ – 219 пМ	214 пМ – 517 пМ	223 пМ – 542 пМ	3,6 нМ – 7,5 нМ	414 пМ – 743 пМ

Пример 3.

Анти-IL-1R1 антитела ингибируют связывание IL-1 β и IL-1ra с рецептором.

Способность анти-IL-1R1 антител к ингибированию связывания либо IL-1 β , либо IL-1ra с IL-1R1 оценивали в анализе с рекомбинантными белками. Реакционная смесь содержала 0,1 мг/мл Dynabeads M-280 Streptavidin (Dyna) и 1 нМ биотинилированного IL-1R1. Антитела добавляли в концентрациях от 320 до 0,3 нМ. Добавлением меченого рутением IL-1 β (5 нМ) или IL-1ra (1 нМ) инициировали связывание, которое происходило в течение 1 ч при комнатной температуре. Реакционные смеси измеряли, как описано выше, используя инструмент ORIGEN™ 1,5 или M8 (IGEN International Inc.). Конкуренцию вычисляли в виде процента сигнала ECL для максимального связывания (нет конкуренции). Антитела 15C4, 26F5 и 27F2, наиболее эффективные антитела, блокируют связывание лиганда (IL-1 β) с рецептором, но не создают значительного препятствия связыванию IL-1ra по сравнению с контролем IgG. Напротив, антитело 24E12 связывается с рецептором, но не блокирует связывание IL-1 β или IL-1ra с рецептором. Таким образом, антитело 24E12 представляет уникальный класс антител, связывающих третий домен, отличный от класса, представленного 15C4, 26F5 и 27F2. Антитело 10H7 ингибирует связывание как IL-1 β , так и IL-1ra с рецептором. Эти результаты суммированы на фиг. 14.

Пример 4.

Анализы хондроцитов и цельной крови человека.

Первичные человеческие хондроциты (Cell Applications Inc., San Diego, CA) высевали в 96-луночные планшеты с густотой 10000 клеток/лунка в среде DMEM, содержащей 1% ФБС и 1% Pen Strep (Gibco). Клетки оставляли воспроизводиться в течение ночи, после чего добавляли анти-IL-1R1 антитела в концентрациях, находящихся в интервале от 10 нМ до 0,1 пМ, в течение 20 мин. Добавляли IL-1 β до концентрации 1 пМ (~EC₅₀), и супернатанты культуры собирали после 16 ч инкубации при 37°C. Уровни IL-6 в супернатанте измеряли, используя ELISA (Pierce-Endogen, Rockford, IL, Cat# EH2IL-6) в соответствии с инструкциями производителя. Для каждого антитела по изобретению в этих анализах на основе клеток устанавливали кривую ответа ингибирования и выводили IC₅₀, используя программное обеспечение PRISM™. Антитела 15C4, 26F5 и 27F2 являются сильными ингибиторами передачи сигнала IL-1 по сравнению с IL-1ra (фиг. 15A). Антитела 24E12 и 10H7 являются значительно менее сильными, чем 15C4 и 27F2 (фиг. 15B). Значения IC₅₀ для ингибирования индуцированного IL-1 β продуцирования IL-6 человеческими хондроцитами показаны в табл. 4A и 4B (соответствующих фиг. 15A и 15B соответственно).

Моноклональные анти-IL-1R1 антитела 15C4, 26F5 и 27F2 предварительно инкубировали 40-60 мин с цельной человеческой кровью, собранной от нормальных доноров, в контейнерах под вакуумом с натрийгепарином. Анализы проводили следующим образом: аликвоты по 100 мкл свежесывленной крови добавляли в лунки 96-луночного планшета. Добавляли 50 мкл антитела в среде RPMI, содержащей 10% человеческой сыворотки АВ. Затем добавляли IL-1 β при концентрации 30 пМ (EC₅₀). Супернатанты культуры собирали после 18 ч и уровни IL-6 в супернатанте измеряли, используя ELISA. В качестве контроля IL-1ra предварительно инкубировали 40-60 мин с цельной кровью, и продуцирование IL-6 измеряли, как выше. Три анти-IL-1R1 антитела блокировали активность IL-1 с эффективностью, сравнимой с таковой у IL-1ra (фиг. 16). Значения IC₅₀ для ингибирования индуцированного IL-1 β продуцирования IL-6 в цельной человеческой крови показаны в табл. 5.

Таблица 4A

	Человеческие анти-IL-1R1 антитела			
	15C4	27F2	26F5	rII-1ra
IC₅₀	16 пМ	32 пМ	26 пМ	32 пМ
95% доверительные интервалы	15 пМ – 18 пМ	21 пМ – 49 пМ	19 пМ – 36 пМ	22 пМ – 46 пМ

Таблица 4B

	Человеческие анти-IL-1R1 антитела				
	15C4	27F2	10H7	24E12	rII-1ra
IC₅₀	7 пМ	28 пМ	7,5 пМ	NA	20 пМ
95% доверительные интервалы	5,8 пМ – 7,9 пМ	22 пМ – 35 пМ	5,6 пМ – 10 пМ	NA	17 пМ – 23 пМ

Таблица 5

Донор	Параметры анализа	15C4	26F5	27F2	rl-1ra
1047	IC50	126 nM	410 nM	249 nM	241 nM
	95% доверительные интервалы	47 nM – 339 nM	213 nM – 790 nM	88 nM – 703 nM	124 nM – 471 nM
1319	IC50	111 nM	174 nM	579 nM	381 nM
	95% доверительные интервалы	59 nM – 208 nM	60 nM – 501 nM	249 nM – 1,3 nM	167 nM – 875 nM
Собирабельный	IC50	126 nM	372 nM	387 nM	264 nM
(Объединенные данные)	95% доверительные интервалы	62 nM – 255 nM	187 nM – 739 nM	202 nM – 748 nM	134 nM – 517 nM

Пример 5.

Мутагенез и картирование эпитопов.

Сайт-направленный мутагенез (Altered Sites® In Vitro Mutagenesis System, Promega, Madison WI) IL-1r1 использовали для получения панели мутантных белков ("мутеинов"), в которых крысиные аминокислотные остатки были заменены соответствующей человеческой последовательностью. Сконструировали пятнадцать различных мутантных плазмид (см. пронумерованные полосы на фиг. 17). Плазмиды, кодирующие эти замещенные белки и исходный IL-1R1, подвергали временной трансфекции в клетки СНО. Трансфектанты Mock получали в качестве отрицательных контролей. Кондиционную среду (СМ) от этих клеток концентрировали ~ в 20 раз, используя концентрирующие колонки Centiprep 10 (Amicon). Экспрессию мутеинов оценивали с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ и Вестерн-блоттинга. Тринадцать мутантных белков экспрессировались на уровнях, которые дали возможность оценки связывания антитела. Белки наносили на гель, проводили электрофорез и переносили на мембраны. Мембраны блокировали в 1% молоке в ФСБ, 0,1% Твин-20, а затем инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с антителами анти-IL-1R 15C4, 27F2 или 24E12 при 0,5 мкг/мл в ФСБ, 0,1% Твин-20. После промывки мембраны инкубировали с IgG-Fc-HRP козы против человека. Сигнал обнаруживали, используя хемилюминесцентный (ECL) субстрат (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Специфичные человеческие последовательности, критичные для связывания антител, идентифицировали как последовательности, которые при замещении крысиными последовательностями снижали или элиминировали сигнал ECL. Распознавание 15C4 мутантов 1, 2 и 4 было нарушено по сравнению с 24E12 (фиг. 18, верхняя панель). Подобным образом связывание 27F2 с мутантами 1, 2 и 4 было нарушено (фиг. 18, средняя панель). Не было значительного связывания 24E12 с мутантами 12, 13, 14 и 15 (фиг. 18, нижняя панель).

Выделение и характеристика человеческих анти-IL-1R1 антител идентифицировали три различных класса конкурентных антител (фиг. 19). Самыми сильными ингибиторами биологической активности IL-1, как продемонстрировано в биологических анализах на основе клеток, являются те антитела, которые связывают третий домен IL-1R1 и предотвращают связывание IL-1-β. Эксперименты по картированию эпитопов с использованием панели мутантных белков третьего домена продемонстрировали, что этот класс антител, который включает 15C4, 27F2 и 26F5, имеет общий перекрывающийся, но не идентичный конформационный эпитоп. На фиг. 20 и 21 проиллюстрировано положение эпитопов 15C4 на третьем домене рецептора IL-1 в ленточной диаграмме связанного с IL-1ra рецептора IL-1 (Schreuder et al., 1997, Nature 386: 194-200). Остатки рецептора IL-1, которые определяют связывание наиболее эффективного класса антител, показаны серым цветом. Эти антитела продемонстрировали лучшую эффективность, и, следовательно, эти эпитопы определяют связывание для антител лучшего класса. Сайты связывания 15C4 и 27F2 перекрываются, но не идентичны, как определено с помощью мутационного анализа 15 различных сайтов в пределах IL-1R1, описанных выше. Эти сайты изображены на фиг. 17 в виде пронумерованных полос над последовательностью белка. Оказалось, что критичные сайты взаимодействия находятся в пределах мутаций в сайтах 1 (LSDIA; SEQ ID NO: 41), 2 (VIDE; SEQ ID NO: 42), 4 (YSV) и 10 (TCFA; SEQ ID NO: 43). Сайты связывания 15C4 и 27F2 содержатся внутри сайтов 1 и 2, поскольку замещение человеческих остатков крысиными остатками в любом из этих сайтов запрещает связывание. 27F2 отличается от 15C4 тем, что замены в сайте 4 полностью запрещают его связывание, тогда как связывание 15C4 снижено, но не полностью элиминировано. Мутация 10 также снижает связывание 15C4, но 27F2 не имеет видимого взаимодействия в данном сайте. Исследование кристаллической структуры выявило, что эти остатки определяют лицо третьего домена, которое ориентировано по направлению к области, занятой связанным лигандом (фиг. 20 и 21) (Vigers et al., 1997, Nature 386: 190-194).

Второй идентифицированный класс антител, представленный 10H7, не требует третьего домена для связывания и, в отличие от предпочтительного класса, ингибирует связывание IL-1ra. Этот класс являет-

ся активным в биологических анализах, но менее сильный, чем предпочтительный класс.

В противоположность сильному ингибированию IL-1 в биологических анализах предпочтительного класса антител, 24E12 является неэффективным ингибитором в биологических анализах. Антитело 24E12 ингибирует связывание IL-1RAcP с IL-1-связанным IL-1R. Эпитоп данного класса антител, определенный мутантами 12, 13, 14 и 15, расположен проксимально к трансмембранному домену IL-1R1 и находится в участке, непосредственно не вовлеченном в связывание ни IL-1, ни IL-1ra (фиг. 22).

Пример 6.

Клонирование тяжелой и легкой цепей анти-IL-1R1 антитела.

Клонирование легкой цепи анти-IL-1R1 MAб 15C4.

Легкие цепи для трех гибридом, экспрессирующих связывающие α IL-1R1 моноклональные антитела 15C4, 27F2 и 26F5, клонировали в экспрессионном векторе клеток млекопитающих pDSR α 19 (см. WO 90/14363, которая включена сюда путем ссылки для любой цели). Конструирование плазмиды, кодирующей легкую каппа-цепь 15C4, здесь подробно описано; клонирование других видов легкой цепи осуществляли, используя такую же методику. Вариабельный участок легкой каппа-цепи α IL-1R1 получили амплификацией с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с первой нити кДНК, полученной из тотальной РНК гибридомы α IL-1R1 15C4, полученной с использованием реагента TRIzol® (Invitrogen). Первую нить кДНК синтезировали, используя случайный праймер с адаптером элонгации (5'- GGC CGG ATA GGC CTC CAN NNN NNT -3'; SEQ ID NO: 44) и проводили 5' RACE (быстрая амплификация концов кДНК, rapid amplification of cDNA ends), используя набор GeneRacer™ (Invitrogen). Для полноразмерной легкой цепи прямой праймер представлял собой внутренний праймер GeneRacer™ (5' GGA CAC TGA CAT GGA CTG AAG GAG TA -3'; SEQ ID NO: 45), а обратный праймер представлял собой 5'- GGG GTC AGG CTG GAA CTG AGG -3' (SEQ ID NO: 46). Продукты RACE клонировали в pCR4-TOPO (Invitrogen) и определяли последовательности ДНК. Консенсусную последовательность ДНК каппа-цепи 15C4 использовали для дизайна праймеров для ПЦР-амплификации полноразмерной цепи антитела. Праймер для ПЦР 5' каппа кодировал аминоконечную сигнальную последовательность, сайт фермента рестрикции XbaI и оптимизированную последовательность Козака (5'- CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC CAT GTC GCC ATC ACA ACT CAT TGG G -3'; SEQ ID NO: 47). Праймер 3' кодировал карбокси-конец и кодон терминации, а также сайт рестрикции SalI (5'- CTT GTC GAC TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GCT C -3'; SEQ ID NO: 48).

5' Праймер каппа 15C4 α IL-1R1 (SEQ ID NO:47):

5'- CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC CAT GTC GCC ATC ACA ACT

XbaI Kozak M S P S Q L

CAT TGG G-3'

I G (SEQ ID NO: 49)

3' Праймер каппа 15C4 α IL-1R1 (SEQ ID NO:48):

5'- CTT GTC GAC TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GCT C -3'

SalI * C E G R N F S (SEQ ID NO: 50)

Клон полноразмерной каппа-цепи α IL-1R1 15C4 получили, используя каппа клон pCR4: 15C4 с помощью ПЦР-амплификации с 5'- и 3'-праймерами каппа α IL-1R1 15C4. В реакции ПЦР образовался продукт длиной 733 пар оснований, кодирующий 233 аминокислотных остатка (включая 19 аминокислот сигнальной последовательности каппа-цепи) каппа-цепи α IL-1R1 15C4. Продукт ПЦР очищали, используя набор ПЦР-очистки QIAquick (Quagen Cat. No. 28104), подвергали рестрикции XbaI и SalI, выделяли из геля и очищали, используя набор для выделения из геля QIAquick (Quagen Cat. No. 28704). Затем этот фрагмент ПЦР, содержащий полноразмерную каппа-цепь α IL-1R1 15C4, лигировали в экспрессионный вектор млекопитающих pDSR α 19. ДНК экспрессионного клона каппа цепи 15C4 секвенировали и подтвердили, что он кодирует тот же пептид, который идентифицирован в гибридоме 15C4. Конечный экспрессионный вектор pDSR α 19:15C4 каппа имеет длину 5468 пар оснований и содержит семь функциональных участков, описанных в табл. 6.

Таблица 6

Номер пары оснований плазмиды	
2-881	Сигнал терминации транскрипции/полиаденилирования из α -субъединицы бычьего гликопротеинового гормона надпочечников (α -FSH) (Goodwin et al., 1983, <i>Nucleic Acids Res.</i> <u>11</u> : 6873-82; GenBank; № по каталогу X00004)
882-2027	Миниген мышинной дигидрофолатредуктазы (DHFR), содержащий эндогенный мышинный промотор DHFR, кодирующие последовательности кДНК и сигналы терминации транскрипции/полиаденилирования DHFR (Gasser et al., 1982, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> <u>79</u> : 6522-6; Nunberg et al., 1980, <i>Cell</i> <u>19</u> : 355-64; Setzer et al., 1982, <i>J. Biol. Chem.</i> <u>257</u> : 5143-7; McGrogan et al., 1985, <i>J. Biol. Chem.</i> <u>260</u> : 2307-14)
2031-3947	Последовательности рBR322, содержащие маркерный ген устойчивости к ампициллину и точку начала репликации плазмиды в <i>E. coli</i> (GenBank; № по каталогу J01749)
3949-4292	Ранний промотор SV40, энхансер и точка начала репликации (Takebe et al., 1988, <i>Mol. Cell. Biol.</i> <u>8</u> : 466-72, GenBank; № по каталогу J02400)
4299-4565	Транскрипционный энхансерный элемент из домена LTR HTLV-1 (Seiki et al., 1983, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> <u>80</u> : 3618-22; GenBank; № по каталогу J02029)
4574-4730	Сигналы донора/акцептора сплайсинга интрона из SV40 16S, 19S (Okayama and Berg, 1983, <i>Mol. Cell. Biol.</i> <u>3</u> : 280-9, GenBank; № по каталогу J02400)
4755-5468	кДНК легкой каппа-цепи 15C4 между сайтами XbaI и SalI

Конструирование pDSR19:hlgG1C_H.

Сконструировали экспрессионную плазмиду pDSR α 19: варибельный участок антитела крысы/константный участок человеческого IgG1 (rVh/hCh1) MAb в результате лигирования трех фрагментов: оканчивающийся XbaI и BsmBI продукт ПЦР варибельного участка антитела крысы, константный участок человеческого IgG1 (домены C_{H1}, замковый, C_{H2} и C_{H3}), полученный путем ферментативного гидролиза SalI и выделения из геля фрагмента BsmBI и SalI из линейной плазмиды pDSR α 19:hlgG1 C_H (концы HindIII и BsmBI), и линеаризованная pDSR α 19 с концами XbaI и SalI (см. совместно заявленную и совместно поданную временную патентную заявку США № 60/370407, поданную 5 апреля 2002, "Human anti-OPGL Neutralizing Antibodies As Selective OPGL Pathway Inhibitors", включенную путем ссылки). Конечный экспрессионный вектор pDSR α 19: варибельный участок антитела крысы/константный участок человеческого IgG1 (rVh/hCh1) имеет длину 6158 пар оснований и содержит 7 функциональных участков, описанных в табл. 7.

Таблица 7

Номер пары оснований плазмиды	
2-881	Сигнал терминации транскрипции/полиаденилирования из α -субъединицы бычьего гликопротеинового гормона надпочечников (α -FSH) (Goodwin et al., 1983, <i>Nucleic Acids Res.</i> <u>11</u> : 6873-82; GenBank; № по каталогу X00004)
882-2027	Миниген мышинной дигидрофолатредуктазы (DHFR), содержащий эндогенный мышинный промотор DHFR, кодирующие последовательности кДНК и сигналы терминации транскрипции/полиаденилирования DHFR (Gasser et al., 1982, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> <u>79</u> : 6522-6; Nunberg et al., 1980, <i>Cell</i> <u>19</u> : 355-64; Setzer et al., 1982, <i>J. Biol. Chem.</i> <u>257</u> : 5143-7; McGrogan et al., 1985, <i>J. Biol. Chem.</i> <u>260</u> : 2307-14)
2031-3947	Последовательности рBR322, содержащие маркерный ген устойчивости к ампициллину и точку начала репликации плазмиды в <i>E. coli</i> (GenBank; № по каталогу J01749)
3949-4292	Ранний промотор SV40, энхансер и точка начала репликации (Takebe et al., 1988, <i>Mol. Cell. Biol.</i> <u>8</u> : 466-72, GenBank; № по каталогу J02400)
4299-4565	Транскрипционный энхансерный элемент из домена LTR HTLV-1 (Seiki et al., 1983, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> <u>80</u> : 3618-22; GenBank; № по каталогу J02029)

4574-4730	Сигналы донора/акцептора сплайсинга интрона из SV40 16S, 19S (Okayama and Berg, 1983, <i>Mol. Cell. Biol.</i> 3: 280-9, GenBank; № по каталогу J02400)
4755-6158	кДНК тяжелой цепи rVh/hCh1 между сайтами <i>Xba</i> I и <i>Sal</i> I. Эта последовательность фрагмента тяжелой цепи показана ниже (SEQ ID NO: 51), где подчеркнуты последовательности сайтов рестрикции: <i>Xba</i> I TCTAG ACCACCATGG ACATCAGGCT CAGCTTAGTT TTCCTTGTCC TTTTCATAAA AGGTGTCCAG TGTGAGGTAG AACTGGTGGA GTCTGGGGGC GGCTTAGTAC AACCTGGAAG GTCCATGACA CTCTCTGTG CAGCCTCGGG ATTCACTTC AGAACCTATG GCATGGCCTG GGTCCGCCAG GCCCAACGA AGGGTCTGGA GTGGGTCTCA TCAATTACTG CTAGTGGTGG TACCACCTAC TATCGAGACT CCGTGAAGGG CCGCTTCACT ATTTTATAGGG ATAATGCAAA AAGTACCCTA TACCTGCAGA TGGACAGTCC GAGGTCTGAG GACACGGCCA CTTATTTCTG TACATCAATT <i>Bsm</i>BI TCGGAATACT GGGGCCACGG AGTCATGGTC ACCGICTCTA GTGCCTCCACCAAGGGCCCA TCGGTCTTCC CCCTGGCACC CTCCTCCAAG AGCACCTCTGGGGCAGAGC GGCCCTGGGC TGCTTGGTCA AGGACTACTT CCCCGAACCG GTGACGGTGT CGTGGAATC AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT CCCGGCTGTC CTACAGTCTT CAGGACTCTA CTCCCTCAGC AGCGTGGTGACCGTGCCCTC CAGCAGCTTG GGCACCCAGA OCTACATCTG CAACGTGAATCACAAGCCCA GCAACACCAA GGTGGACAAAG AAAGTTGAGC CCAAATCTTG TGACAAAAC CACACATGCC CACCGTGCCC AGCACCTGAA CTCCTGGGGG GACCGTCAGT CTCTCTCTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC TCCCGGACCC CTGAGGTGAC ATGCGTGGTG GTGGACGTGA GCCACGAAGACCTGAGGTC AAGTTCAACT GGTACGTGGA CGGCGTGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG GAGCAGTACA ACAGCACGTA CGGTGTGGTC AGCGTCTCA CGTCTCTGCA CCAGGACTGG CTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAAG CCCTCCAGC CCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAAGCCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC CCTGCCCCA TCCCGGGATG AGCTGACCAA GAACCAAGTC AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAT CCCAGCGACA TCGCGTGGGA GTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGGAGAACAA CTACAAGACC ACGCCTCCCG TGCTGGACTC CGACGGCTCC TTCTCTCTCT ATAGCAAGCT CACCGTGGAC AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC AACCACTACA CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCCGGGA <i>Sal</i>I AATGATAAGT CGAC

Линейную плазмиду pDSR α 19:hIgG1C_H получили путем ферментативного гидролиза плазмиды pDSR α 19: вариабельный участок антитела крысы/константный участок человеческого IgG1, ферментами рестрикции *Xba*I и *Bsm*BI для удаления вариабельного участка антитела крысы и очищали, используя набор для выделения QIAquick. Эту линейную плазмиду pDSR α 19:hIgG1C_H, содержащую 1 к.о. домен константного участка человеческого IgG1 использовали для распознавания вариабельных участков антитела α IL-1R, полученного из гибридомы.

Клонирование тяжелой цепи анти-IL-1R1 15C4 Mab.

Тяжелые цепи для десяти гибридом, экспрессирующих связывающие α IL-1R1 моноклональные антитела 15C4, 27F2 и 26F5, клонировали в экспрессионном векторе клеток млекопитающих pDSR α 19. Конструирование плазмиды, кодирующей тяжелую цепь 15C4, подробно описано; клонирование других видов тяжелой цепи осуществляли, используя подобные методики. Вариабельный участок тяжелой цепи α IL-1R1 15C получили, используя ПЦР-амплификацию, с первой нити кДНК, полученной из суммарной РНК гибридомы α IL-1R1 15C4, полученной с использованием реагента TRIzol®. Первую нить кДНК синтезировали, используя случайный праймер с адаптером элонгации (5'-GGC CGG ATA GGC CTC CAN NNN NNT -3'; SEQ ID NO: 44) и проводили 5' RACE (быстрая амплификация концов кДНК), используя набор GeneRacer™. Для тяжелой цепи частичной длины прямой праймер представлял собой внутренний праймер GeneRacer™ (5' GGA CAC TGA CAT GGA CTG AAG GAG TA -3'; SEQ ID NO: 45), а обратный праймер представлял собой 5'- TGA GGA CGC TGA CCA CAC G -3' (SEQ ID NO: 52). Продукты RACE клонировали в pCR4-TOPO и определяли последовательности ДНК. Согласованную последовательность ДНК вариабельного участка тяжелой цепи 15C4 использовали для дизайна праймеров для ПЦР-амплификации вариабельного участка тяжелой цепи. Праймер для ПЦР 5' тяжелой цепи кодировал аминоконечную сигнальную последовательность, сайт фермента рестрикции *Xba*I и оптимизированную последовательность Козака (5'- CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC CAT GGG GTC AAC CGC CAT CCT CG -3'; SEQ ID NO: 53). Праймер 3' кодировал карбокси-конец вариабельного участка, включая встречающийся в природе сайт смысловой нити *Bsm*BI (5'- GTG GAG GCA CTA GAG ACG GTG ACC AGG GTT CC-3'; SEQ ID NO: 54).

Праймер тяжелой цепи 5'αIL-1R1 15C4 (SEQ ID NO: 53):

5'- CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC C ATG GGG TCA ACC GCC

XbaI Kozak M G S T A

ATC CTCG-3'

I L (SEQ ID NO: 55)

Праймер тяжелой цепи 5'αIL-1R1 15C4 (SEQ ID NO: 54):

5'- GTG GAG GCA CTA GAG ACG GTG ACC AGG GTT CC-3'

T S A S S V T V L T G

(SEQ ID NO: 56) BsmBI

Конструирование экспрессионного клона тяжелой цепи анти-IL-1R1 IgG1.

Клон полноразмерной тяжелой цепи αIL-1R1 15C4 получили из клона тяжелой цепи pCR4: 15C4 с помощью ПЦР амплификации с 5'- и 3'-праймерами тяжелой цепи αIL-1R1 15C4. В реакции ПЦР образовался продукт длиной 442 пар оснований, кодирующий 137 аминокислотных остатков (включая 19 аминокислот сигнальной последовательности тяжелой цепи) варибельного участка тяжелой цепи αIL-1R1 15C4. Продукт ПЦР очищали, используя набор ПЦР очистки QIAquick, в затем подвергали ферментативному гидролизу XbaI и BsmBI, выделяли из геля и очищали, используя набор для выделения из геля QIAquick. Затем этот фрагмент, содержащий полноразмерный варибельный участок тяжелой цепи αIL-1R1 15C4, лигировали в экспрессионный вектор млекопитающих pDSRα19:hIgG1C_H. ДНК экспрессионного клона тяжелой цепи IgG1 15C4 секвенировали, чтобы подтвердить, что он кодирует тот же пептид варибельного участка тяжелой цепи, который идентифицирован в гибридоме 15C4. Конечный экспрессионный вектор pDSRα19: 15C4 тяжелая цепь IgG1 имеет длину 6173 пар оснований и содержит семь функциональных участков, описанных в табл. 8.

Таблица 8

Номер пары оснований плазмиды	
2-881	Сигнал терминации транскрипции/полиаденилирования из α-субъединицы бычьего гликопротеинового гормона надпочечников (α-FSH) (Goodwin et al., 1983, <i>Nucleic Acids Res.</i> 11 : 6873-82; GenBank; № по каталогу X00004)
882-2027	Миниген мышинной дигидрофолатредуктазы (DHFR), содержащий эндогенный мышинный промотор DHFR, кодирующие последовательности кДНК и сигналы терминации транскрипции/полиаденилирования DHFR (Gasser et al., 1982, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 79 : 6522-6; Nunberg et al., 1980, <i>Cell</i> 19 : 355-64; Setzer et al., 1982, <i>J. Biol. Chem.</i> 257 : 5143-7; McGrogan et al., 1985, <i>J. Biol. Chem.</i> 260 : 2307-14)
2031-3947	Последовательности pBR322, содержащие маркерный ген устойчивости к ампициллину и точку начала репликации плазмиды в <i>E. coli</i> (GenBank; № по каталогу J01749)
3949-4292	Ранний промотор SV40, энхансер и точка начала репликации
	(Takebe et al., 1988, <i>Mol. Cell. Biol.</i> 8 : 466-72, GenBank; № по каталогу J02400)
4299-4565	Транскрипционный энхансерный элемент из домена LTR HTLV-1 (Seiki et al., 1983, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 80 : 3618-22; GenBank; № по каталогу J02029)
4574-4730	Сигналы донора/акцептора сплайсинга интрона из SV40 16S, 19S (Okayama and Berg, 1983, <i>Mol. Cell. Biol.</i> 3 : 280-9, GenBank; № по каталогу J02400)
4755-6173	кДНК тяжелой цепи IgG1 15C4 между сайтами XbaI и SalI

Конструирование pDSR19:hIgG2C_H.

Сконструировали экспрессионную плазмиду pDSRα19: варибельный участок антитела человека/константный участок человеческого IgG2 (hVh/hCh2) MAb - в результате лигирования трех фрагментов: оканчивающийся XbaI и BsmBI продукт ПЦР варибельного участка антитела человека, продукт ПЦР константного участка человеческого IgG2 (домены C_{H1}, замковый, C_{H2} и C_{H3}) с концами BsmBI и SalI и линейаризованная pDSRα19 с концами XbaI и SalI. Конечный экспрессионный вектор pDSRα19: варибельный участок антитела человека /константный участок человеческого IgG2 (hVh/hCh2) (см. со-

вместно утвержденную и совместно поданную временную патентную заявку США № 60/370407, поданную 5 апреля 2002, "Human anti-OPGL Neutralizing Antibodies As Selective OPGL Pathway Inhibitors") имеет длину 6164 пары оснований и содержит 7 функциональных участков, описанных в табл. 9.

Таблица 9

Номер пары оснований плазмиды	
2-881	Сигнал терминации транскрипции/полиаденилирования из α -субъединицы бычьего гликопротеинового гормона надпочечников (α -FSH) (Goodwin et al., 1983, <i>Nucleic Acids Res.</i> 11: 6873-82; GenBank; № по каталогу X00004)
882-2027	Миниген мышинной дигидрофолатредуктазы (DHFR), кодирующие последовательности кДНК и сигналы терминации транскрипции/полиаденилирования DHFR (Gasser et al., 1982, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 79: 6522-6; Nunberg et al., 1980, <i>Cell</i> 19: 355-64; Setzer et al., 1982, <i>J. Biol. Chem.</i> 257: 5143-7; McGrogan et al., 1985, <i>J. Biol. Chem.</i> 260: 2307-14)
2031-3947	Последовательности pBR322, содержащие маркерный ген устойчивости к ампициллину и точку начала репликации плазмиды в <i>E. coli</i> (GenBank; № по каталогу J01749)
3949-4292	Ранний промотор SV40, энхансер и точка начала репликации (Takebe et al., 1988, <i>Mol. Cell. Biol.</i> 8: 466-72, GenBank; № по каталогу J02400)
4299-4565	Транскрипционный энхансерный элемент из домена LTR HTLV-1 (Seiki et al., 1983, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 80: 3618-22; GenBank; № по каталогу J02029)
4574-4730	Сигналы донора/акцептора сплайсинга интрона из SV40 16S, 19S (Okayama and Berg, 1983, <i>Mol. Cell. Biol.</i> 3: 280-9, GenBank; № по каталогу J02400)
4755-6164	кДНК тяжелой цепи hVh/hCh2 между сайтами <i>Xba</i> I и <i>Sal</i> I. Эта последовательность фрагмента тяжелой цепи показана ниже (SEQ ID NO:57), причем последовательности сайтов рестрикции подчеркнуты: <i>Xba</i> I <u>TCTAGA</u> CCACCATGGA CATGAGGGTC CCCGCTCAGC TCCTGGGGCT CCTGCTATTG TGGTTGAGAG GTGCCAGATG TGAGGTCAG CTGGTGCACTCTGGGGGAGG CTGTGTACAT CTTGGGGGGT CCCTGAGACT CTCCTGTGCAGGCTCTGGAT TCACCTTCAG TGGCCATGCT TTGCACTGGG TTCGCCAGGCTCCAGGAAAA GGTCTGGAGT GGGTATCAGG TATTGGTACT CATGGTGGGACATACTATGC AGACTCCGTG AAGGGCCGAT TCACCATCTC CAGAGACAATGCCAAGAACT CCTTGTTCCT TCAAATGAAC AGCCTGAGCG CCGAGGACATGGCTGTGTAT TACTGTACAA GAAGAAACTG <i>Bsm</i>BI GGGACAATTT GACTACTGGGGCCAGGGAAC CCTGGTCACC <u>GTCTCTAGTG</u> CCTCCACCAA GGGCCCATCGGTCTTCCCC TGGCGCCCTG CTCCAGGAGC ACCTCCGAGA GCACAGCGGCCCTGGGCTGC CTGGTCAAGG ACTACTTCCC CGAACCGGTG ACGGTGTCTGGAACCTCAGG CGCTCTGACC AGCGGCGTGC ACACCTTCCC AGCTGTCTACAGTCCTCAG GACTCTACTC CCTCAGCAGC GTGTGACCG TGCCCTCCAGCACTTGGGC ACCCAGACCT ACACCTGCAA CGTAGATCAC AAGCCCAGCAACCAAGGT GGACAAGACA GTTGAGCGCA AATGTTGTGT CGAGTGCCACCGTGCCAG CACCACCTGT GGCAGGACCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCCAAAACCAAG GACACCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG GTCACGTGCGTGGTGGTGA CGTGAGCCAC GAAGACCCCG AGGTCCAGTT CAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG ACAAGCCAC GGGAGGAGCAGTTCAACAGC ACGTTCGCTG TGTGACGCGT CCTACCGTT GTGCACCAGGACTGGCTGAA CGGCAAGGAG TACAAGTGCA AGGTCTCAA CAAAAGGCTCCAGCCCCA TCGAGAAAAC CATCTCCAAA ACCAAAGGC AGCCCGAGAACCAAGGTG TACACCTGC CCCATCCCG GGAGGAGATG ACCAAGAACAGGTCAGCCT GACCTGCCTG GTCAAAGGCT TCTACCCAG CGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG AACAACTACA AGACCACACCTCCCATGCTG GACTCCGACG GCTCCTTCTT CCTCTACAGC AAGCTCACCGTGAGCAAGAG CAGGTGGCAG CAGGGGAACG TCTTTCATG CTCCGTGATGCATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACGCAG <i>Sal</i>I <u>AAGAGCCTCT CCCTGTCCTCCGGGTAAATGA TAA<u>GTGAC</u></u>

Линейную плазмиду pDSR α 19:hIgG2_H получили путем ферментативного гидролиза плазмиды pDSR α 19: варибельный участок антитела человека /константный участок человеческого IgG2 ферментами рестрикции *Xba*I и *Bsm*BI для удаления варибельного участка антитела человека и очищали, используя набор для выделения QIAquick. Эту линейную плазмиду pDSR α 19:hIgG2_H, содержащую 1 к.о. домен константного участка человеческого IgG2 использовали для распознавания варибельных участков антитела α IL-1R, полученного из гибридомы.

Конструирование экспрессионного клона тяжелой цепи IgG2 анти-IL-1R1. Фрагмент варибельного участка тяжелой цепи α IL-1R1 15C4, описанный выше, лигировали в экспрессионный вектор млекопитающих pDSR α 19:hIgG2_H. ДНК экспрессионного клона тяжелой цепи IgG2 15C4 секвенировали, чтобы подтвердить, что он кодирует тот же пептид варибельного участка тяжелой цепи, который идентифицирован в гибридоме 15C4. Конечный экспрессионный вектор pDSR α 19:15C4 тяжелая цепь IgG2 имеет длину 6161 пар оснований и содержит семь функциональных участков, описанных в табл. 10.

Таблица 10

Номер пары оснований плазмиды	
2-881	Сигнал терминации транскрипции/полиаденилирования из α -субъединицы бычьего гликопротеинового гормона надпочечников (α -FSH) (Goodwin et al., 1983, <i>Nucleic Acids Res.</i> 11: 6873-82; GenBank; № по каталогу X00004)
882-2027	Миниген мышинной дигидрофолатредуктазы (DHFR), содержащий эндогенный мышинный промотор DHFR, кодирующие последовательности кДНК и сигналы терминации транскрипции/полиаденилирования DHFR (Gasser et al., 1982, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 79: 6522-6; Nunberg et al., 1980, <i>Cell</i> 19: 355-64; Setzer et al., 1982, <i>J. Biol. Chem.</i> 257: 5143-7; McGrogan et al., 1985, <i>J. Biol. Chem.</i> 260: 2307-14)
2031-3947	Последовательности pBR322, содержащие маркерный ген устойчивости к ампициллину и точку начала репликации плазмиды в <i>E. coli</i> (GenBank; № по каталогу J01749)
3949-4292	Ранний промотор SV40, энхансер и точка начала репликации (Takebe et al., 1988, <i>Mol. Cell. Biol.</i> 8: 466-72, GenBank; № по каталогу J02400)
4299-4565	Транскрипционный энхансерный элемент из домена LTR HTLV-1 (Seiki et al., 1983, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 80: 3618-22; GenBank; № по каталогу J02029)
4574-4730	Сигналы донора/акцептора сплайсинга интрона из SV40 16S, 19S (Okayama and Berg, 1983, <i>Mol. Cell. Biol.</i> 3: 280-9, GenBank; № по каталогу J02400)
4755-6161	кДНК тяжелой цепи IgG2 15C4 между сайтами XbaI и SalI

Конструирование pDSR19:hIgG4C_H.

Экспрессионную плазмиду pDSR α 19: варибельный участок антитела человека/константный участок человеческого IgG4 (hVh/hCh4) MAb сконструировали в результате лигирования трех фрагментов: оканчивающийся XbaI и BsmBI продукт ПЦР варибельного участка антитела человека, выделенный из геля рестрицированный BsmBI и SalI фрагмент константного участка человеческого IgG4 (домены C_{H1}, замковый, C_{H2} и C_{H3}) с концами BsmBI и SalI и линейаризованная pDSR α 19 с концами XbaI и SalI. Конечный экспрессионный вектор pDSR α 19: варибельный участок антитела человека/константный участок человеческого IgG4 (hVh/hCh4) (см. совместно утвержденную и совместно поданную временную патентную заявку США № 60/370407, поданную 5 апреля 2002, "Human anti-OPGL Neutralizing Antibodies As Selective OPGL Pathway Inhibitors") имеет длину 6167 пар оснований и содержит 7 функциональных участков, описанных в табл. 11.

Таблица 11

Номер пары оснований плазмиды	
2-881	Сигнал терминации транскрипции/полиаденилирования из α -субъединицы бычьего гликопротеинового гормона надпочечников (α -FSH) (Goodwin et al., 1983, <i>Nucleic Acids Res.</i> 11: 6873-82; GenBank; № по каталогу X00004)
882-2027	Миниген мышинной дигидрофолатредуктазы (DHFR), содержащий эндогенный мышинный промотор DHFR, кодирующие последовательности кДНК и сигналы терминации транскрипции/полиаденилирования DHFR (Gasser et al., 1982, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 79: 6522-6; Nunberg et al., 1980, <i>Cell</i> 19: 355-64; Setzer et al., 1982, <i>J. Biol. Chem.</i> 257: 5143-7; McGrogan et al., 1985, <i>J. Biol. Chem.</i> 260: 2307-14)
2031-3947	Последовательности pBR322, содержащие маркерный ген устойчивости к ампициллину и точку начала репликации плазмиды в <i>E. coli</i> (GenBank; № по каталогу J01749)
3949-4292	Ранний промотор SV40, энхансер и точка начала репликации (Takebe et al., 1988, <i>Mol. Cell. Biol.</i> 8: 466-72, GenBank; № по каталогу J02400)
4299-4565	Транскрипционный энхансерный элемент из домена LTR HTLV-1 (Seiki et al., 1983, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 80: 3618-22; GenBank; № по каталогу J02029)
4574-4730	Сигналы донора/акцептора сплайсинга интрона из SV40 16S, 19S (Okayama and Berg, 1983, <i>Mol. Cell. Biol.</i> 3: 280-9, GenBank; № по каталогу J02400)
4755-6167	кДНК тяжелой цепи hVh/hCh4 между сайтами XbaI и SalI. Эта последовательность фрагмента тяжелой цепи показана ниже (SEQ ID NO:58), причем последовательности сайтов рестрикции подчеркнуты:

	<i>XbaI</i> <u>TCTAGACCA</u>CCAT GGACATGAGG GTCCCCGCTC AGCTCCTGGG GCTCCTGCTA TTGTGGTTGA GAGGTGCCAG ATGTGAGGTC CAGCTGGTGCAGTCTGGGGG AGGCTTGGTA CATCCTGGGG GGTCCCTGAG ACTCTCCTGTGCAGGCTCTG GATTCACCTT CAGTGGCCAT GCTTTGCACT GGGTTCGCCAGGCTCCAGGA AAAGGTCTGG AGTGGGTATC AGGTAATTGGT ACTCATGGTGGGACATACTA TGCAGACTCC GTGAAGGGCC GATTCACCAT CTCAGAGACAATGCCAAGA ACTCCTTGT TCTCAAATG AACAGCCTGA GCGCCGAGGACATGGCTGTG TAITACTGTA CAAGAAGAAA CTGGGGACAA TTGACTACTGGGGCCAGGG <i>BsmBI</i> <u>AACCC</u>TGGTC ACGTCTCTA GTGCCAGCAC CAAGGGGCCATCCGTCTTCC CCTGGCGCC CTGCTCCAGG AGCACTCCG AGAGCACAGCCGCCCTGGGC TGCTGGTCA AGGACTACTT CCCCGAACCG GTGACGGTGTCTGGAACTC AGGCGCCCTG ACCAGCGCGC TGACACCTT CCGGCTGTCTACAGTCTT CAGGACTCTA CTCCCTCAGC AGCGTGGTGA CCGTGGCTCCAGCAGCTTG GGCACGAAGA CCTACACCTG CAACGTAGAT CACAAGCCAGCAACACCAA GGTGGACAAG AGAGTTGAGT CCAAATATGG TCCCCATGCCATCATGCC CAGCACCTGA GTTCTGTGGG GGACCATCAG TCTCCTGTCCCCCAAAA CCCAAGGACA CTCTCATGAT CTCCCGACC CCTGAGGTCACGTGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCAGGAAG ACCCGAGGT CCAGTTCAACTGGTACGTGG ATGGCGTGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGAGGAGCAGTTC AACAGCAGCT ACCGTGTGGT CAGCGTCTC ACCGTCTGCACCAGGACTG GCTGAACGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCACAAAGGCCCTCCGT CCTCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA AAGGGCAGCCCCGAGAGCCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCAGGAG GAGATGACCAAGAACCAAGT CAGCCTGACC TGCTGTGTC AAGGCTTCTA CCCCAGGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGACCAGCCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTCTCTCTC TACAGCAGGCTAACCGTGA CAAGAGCAGG TGGCAGGAGG GGAATGTCTT CTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC <i>SalI</i> <u>ACACAGA</u>AGA GCCTCTCCCTGTCTCTGGGT AAATGATAAG TCGAC
--	--

Линейную плазмиду pDSR α 19:hIgG4_H получили путем ферментативного гидролиза плазмиды pDSR α 19: варибельный участок антитела человека /константный участок человеческого IgG4 ферментами рестрикции XbaI и BsmBI для удаления варибельного участка антитела человека и очищали, используя набор для выделения QIAquick. Эту линейную плазмиду pDSR α 19:hIgG4_H, содержащую 1 кб домен константного участка человеческого IgG4, использовали для распознавания варибельных участков антитела α IL-1R, полученного из гибридомы.

Конструирование экспрессионного клона тяжелой цепи IgG4 анти-IL-1R1. Фрагмент варибельного участка тяжелой цепи α IL-1R1 15C4, описанный выше, лигировали в экспрессионный вектор млекопитающих pDSR α 19:hIgG4_H. ДНК экспрессионного клона тяжелой цепи IgG4 15C4 секвенировали, чтобы подтвердить, что он кодирует тот же пептид варибельного участка тяжелой цепи, который идентифицирован в гибридоме 15C4. Конечный экспрессионный вектор pDSR α 19: тяжелая цепь 15C4 IgG4 имеет длину 6164 пары оснований и содержит семь функциональных участков, описанных в табл. 12.

Таблица 12

Номер пары оснований плазмиды	
2-881	Сигнал терминации транскрипции/полиаденилирования из α -субъединицы бычьего гликопротеинового гормона надпочечников (α -FSH) (Goodwin et al., 1983, <i>Nucleic Acids Res.</i> 11: 6873-82; GenBank; № по каталогу X00004)
882-2027	Миниген мышинной дигидрофолатредуктазы (DHFR), содержащий эндогенный мышинный промотор DHFR, кодирующие последовательности кДНК и сигналы терминации транскрипции/полиаденилирования DHFR (Gasser et al., 1982, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 79: 6522-6; Nunberg et al., 1980, <i>Cell</i> 19: 355-64; Setzer et al., 1982, <i>J. Biol. Chem.</i> 257: 5143-7; McGrogan et al., 1985, <i>J. Biol. Chem.</i> 260: 2307-14)
2031-3947	Последовательности pBR322, содержащие маркерный ген устойчивости к ампициллину и точку начала репликации плазмиды в <i>E. coli</i> (GenBank; № по каталогу J01749)
3949-4292	Ранний промотор SV40, энхансер и точка начала репликации (Takebe et al., 1988, <i>Mol. Cell. Biol.</i> 8: 466-72, GenBank; № по каталогу J02400)
4299-4565	Транскрипционный энхансерный элемент из домена LTR HTLV-1 (Seiki et al., 1983, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 80: 3618-22; GenBank; № по каталогу J02029)
4574-4730	Сигналы донора/акцептора сплайсинга интрона из SV40 16S, 19S (Okayama and Berg, 1983, <i>Mol. Cell. Biol.</i> 3: 280-9, GenBank; № по каталогу J02400)
4755-6164	кДНК тяжелой цепи IgG4 15C4 между сайтами XbaI и SalI

Пример 7.

Экспрессия анти-IL-1R1 антител в клетках яичника китайского хомячка (CHO).

Рекомбинантные анти-IL-1R1 антитела получали в клетках яичника китайского хомячка, конкретно в клетках CHO AM-1/D, как раскрыто в патенте США № 6210924 (включен сюда путем ссылки). Коротко: последовательности ДНК, кодирующие полноразмерную тяжелую или легкую цепь каждого анти-IL-1R1 антитела по изобретению клонировали в экспрессионных векторах. Клетки CHO AM-1/D совместно трансфецировали экспрессионным вектором, способным экспрессировать полноразмерную тяжелую цепь, и экспрессионным вектором, экспрессирующим полноразмерную легкую цепь соответствующего анти-IL-1R1 антитела. Например, для получения антитела 26F5 клетки совместно трансфецировали вектором, способным экспрессировать полноразмерную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 38, и вектором, способным экспрессировать полноразмерную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 24. Для получения антитела 27F2 клетки совместно трансфецировали вектором, способным экспрессировать полноразмерную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 38, и вектором, способным экспрессировать полноразмерную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 30. Для получения антитела 15C4 клетки совместно трансфецировали вектором, способным экспрессировать полноразмерную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 40, и вектором, способным экспрессировать полноразмерную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 36. В табл. 13 суммированы полноразмерные тяжелые и полноразмерные легкие цепи для различных антител анти-IL-1R1. Обозначение ".../IgG_" описывает последовательность константного участка для конкретного антитела.

Таблица 13

Антитело	Вариабельный участок тяжелой цепи + Константный участок тяжелой цепи	Полноразмерная тяжелая цепь
26F5/IgG1 (нуклеотиды)	SEQ ID NO:9 + SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:19
26F5/IgG1	SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:20

(аминокислоты)		
26F5/IgG2 (нуклеотиды)	SEQ ID NO:9 + SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:21
26F5/IgG2 (аминокислоты)	SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:22
26F5/IgG4 (нуклеотиды)	SEQ ID NO:9 + SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:23
26F5/IgG4 (аминокислоты)	SEQ ID NO:10 + SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:24
27F2/IgG1 (нуклеотиды)	SEQ ID NO:13 + SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:25
27F2/IgG1 (аминокислоты)	SEQ ID NO:14 + SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:26
27F2/IgG2 (нуклеотиды)	SEQ ID NO:13 + SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:27
27F2/IgG2 (аминокислоты)	SEQ ID NO:14 + SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:28
27F2/IgG4 (нуклеотиды)	SEQ ID NO:13 + SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:29
27F2/IgG4 (аминокислоты)	SEQ ID NO:14 + SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:30
15C4/IgG1 (нуклеотиды)	SEQ ID NO:15 + SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:31
15C4/IgG1 (аминокислоты)	SEQ ID NO:16 + SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:32
15C4/IgG2 (нуклеотиды)	SEQ ID NO:15 + SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:33
15C4/IgG2 (аминокислоты)	SEQ ID NO:16 + SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:34
15C4/IgG4 (нуклеотиды)	SEQ ID NO:15 + SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:35
15C4/IgG4 (аминокислоты)	SEQ ID NO:16 + SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:36
Антитело	Вариабельный участок легкой цепи + Константный участок легкой цепи	Полноразмерная легкая цепь
26F5/27F2 (нуклеотиды)	SEQ ID NO:11 + SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:37
26F5/27F2 (аминокислоты)	SEQ ID NO:12 + SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:38
15C4 (нуклеотиды)	SEQ ID NO:17 + SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:39
15C4 (аминокислоты)	SEQ ID NO:18 + SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:40

Стабильной экспрессии антител анти-IL-1R1 достигали путем совместной трансфекции клеток CHO AM-1/D, дефектных по дигидрофолатредуктазе (DHFR⁻), экспрессионными векторами. Трансфекцию проводили, используя стандартные методики (кальций-фосфатная совместная преципитация) и отбор по DHFR. Трансфецированные колонии выделяли и выращивали до конfluence в 24-луночных планшетах. Антитела, продуцируемые трансфецированными клетками, анализировали на правильную укладку и нейтрализующую активность. Клоны с повышенной продукцией правильно уложенных антител анти-IL-1R1 изотипов IgG1, IgG2 и IgG4, отбирали, и антитела очищали, как описано ниже.

Пример 8.

Продуцирование анти-IL-1R1 антитела.

Антитела анти-IL-1R1 продуцируют путем экспрессии в клональной линии клеток CHO. Для каждого цикла продуцирования клетки из одного флакона оттаивают в свободной от сыворотки среде для клеточных культур. Клетки растят сначала в Т-образном флаконе и серийно рассевая через серию центрифужных флаконов до образования достаточного инокулята для засева 20-л биореактора. Затем, после роста в течение 5-10 суток, эту культуру используют для инокуляции 300-л биореактора. После роста в течение следующих 5-10 суток эту культуру используют для инокуляции 2000-л биореактора. Продуцирование осуществляют в 2000-л биореакторе, используя обогащенную серийную культуру, в которую добавлены компоненты среды, содержащие питательные вещества, для поддержания роста клеток и жизнеспособности культуры. Продуцирование продолжают в течение примерно 2 недель, и в течение этого времени анти-IL-1R1 антитело конститутивно продуцируется клетками и секретируется в среду культивирования клеток.

Реактор для продуцирования контролируют при установленных значениях pH, температуры и уровня растворенного кислорода: pH регулируют с помощью газа диоксида углерода и добавления карбоната натрия; растворенный кислород регулируют с помощью газовых потоков воздуха, азота и кислорода.

В конце продуцирования клеточный бульон загружают в центробежный сепаратор и супернатант культуры отделяют от клеток. Концентрат дополнительно очищают через многослойный фильтр, затем через 0,2-мкм фильтр. Затем очищенную кондиционную среду концентрируют путем ультрафильтрации в тангенциальном потоке. Кондиционную среду концентрируют в 15-30 раз. Полученную в результате

концентрированную кондиционную среду либо обрабатывают путем очистки, либо замораживают для более позднего срока очистки.

Пример 9.

Картирование эпитопов с использованием слитых белков с авидином.

Для конструирования слитых белков с авидином кДНК, кодирующую авидин цыпленка (с эндогенной сигнальной последовательностью) соединяют с 5' концом кДНК, кодирующих зрелые внеклеточные домены последовательности человеческого IL-1R1 или IL-1R1 обезьян cynomolgus, слитые с последовательностью FLAG-метки при 3'конце. Эти слитые, меченые FLAG гены собирали в векторе pALTER-MAX, используя общепринятые молекулярные методики. Аминокислотная последовательность слитого белка авидин-IL-1R1 человека показана на фиг. 23 (SEQ ID NO: 59). Аминокислотная последовательность слитого белка авидин-IL-1R1 cynomolgus показана на фиг. 24 (SEQ ID NO: 60). Панель мутантных белков авидин-cynoIL-1R1-FLAG, в которых человеческие аминокислоты были замещены соответствующими остатками cynomolgus, конструировали, используя систему Altered Sites II Mammalian In Vitro Mutagenesis System (Promega Corp.). Эти мутации проиллюстрированы на фиг. 24.

Плазмиды, кодирующие мутантные белки авидин-cynoIL-1R1 и белки дикого типа, а также белок авидин-huIL-1R1-FLAG, подвергали временной трансфекции в клетки 293T, используя реагент для трансфекции Cytofectine (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Трансфектанты Mock использовали в качестве отрицательного контроля. Связывание моноклонального антитела анти-huIL-1R1 (MAb) с этими белками оценивали с помощью Вестерн-блоттинга и анализов связывания на основе гранул, используя кондиционную среду (CM), собранную с трансфицированных клеток.

Для Вестерн-блот-анализа CM разводили 1:3 в не восстанавливающем буфере для образца с ДСН, кипятили в течение 5-10 мин и наносили на 10% Трис-глициновые гели. После ДСН-ПААГ электрофореза и переноса по Вестерну мембраны блокировали 3% БСА/1% овальбумином в ФСБ/0,1% Твин-20 (ФСБТ) и окрашивали MAb анти-huIL-1R1. Антитело IgG-Fc HRP козы против человека (Pierce Chemical Co.), разведенное 1:15000 в ФСБТ, использовали для вторичного обнаружения. Обнаружение анти-FLAG использовали для нормализации по нагрузке белка. Съемку изображения и денситометрию осуществляли, используя цифровую систему визуализации FluorChem 8000 (Alpha Innotach Corp.). Интенсивности сигнала для MAb анти-huIL-1R1 нормализовали против значений для антитела анти-FLAG для оценки вариации в нагрузке белка. Связывание антитела выражали в виде процента связывания с авидин-IL-1R1 человека-FLAG.

Результаты Вестерн-блоттинга представлены на фиг. 25A. На фиг. 25B показан денситометрический анализ дубликата серии экспериментов по Вестерн-блоттингу. Человеческими остатками, критическими для связывания антитела, являются те, которые восстанавливают сигнал, когда замещают cynoIL-1R1. В целом мутации 1 и 2 (проиллюстрированные на фиг. 24), одни или в комбинации, восстанавливали связывание со многими антителами (15C4/IgG2, 5B8, 1C2, 24H2, 16B9, 26E4 и 20G1), тогда как мутации 10.1 и 10.2 его не восстанавливали. Ни одно из этих антител не связывалось с cynoIL-1R1 дикого типа. Два антитела (27F2 и 19C8), последовательно связывались как со всеми мутантными белками, так и с cynoIL-1R1 дикого типа. Это позволило предположить, что эпитоп 4 (остатки Y279-V281 cynoIL-1R1), идентифицированный в паралогичных белках крысы/человека и незаменимые в IL-1R1 cynomolgus, является доминантным эпитопом для этих антител. Эпитоп 4 выделен жирным шрифтом, курсивом и подчеркнут в аминокислотной последовательности, показанной на фиг. 24.

Во множественных анализах связывания на гранулах слитые белки с авидином захватывали путем инкубации CM с покрытыми биотином флуоресцентными гранулами, используя один набор гранул на слитый белок (Beadlyte Multi-Biotin 10plex Bead Kit; Upstate Biotechnologies). Гранулы промывали и объединяли в ФСБТ и делили на аликвоты в лунки 96-луночного планшета с дном-фильтром (Millipore Corp.). Антитела (MAb анти-HuIL-1R1 или MAb анти-FLAG) добавляли в концентрации 25 мкг/мл и инкубировали в течение 1 ч. Гранулы снова промывали, и смесь конъюгированного с фикоэритрином антитела IgG против мыши и IgG (Fab')₂ против человека использовали для обнаружения связывания антител. После 1 ч инкубации гранулы отмывали и ресуспендировали в ФСБТ. Средние интенсивности флуоресценции (MFI, mean fluorescence intensities) измеряли, используя Luminex 100 (Luminex Corp.). Данные нормализовали, используя значения MFI для связывания Mab анти-FLAG для оценки вариации по нагрузке белка. Связывание антитела выражали в виде процента связывания авидин-huIL-1R1-FLAG (фиг. 26). Паттерн связывания антител анти-IL-1R1 с белками авидин-cynoIL-1R1-FLAG, мутированными человеческими остатками, а также с белками дикого типа IL-1R1 cynomolgus и человека соответствовал анализу иммуноблоттинга, показанному на фиг. 25.

Должно быть понятно, что приведенное выше описание подчеркивает некоторые конкретные воплощения изобретения и что все модификации или альтернативы, эквивалентные им, находятся в пределах сущности и объема изобретения, изложенных в прилагаемой формуле изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Изолированная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело человека или его антиген-связывающий фрагмент, которое специфично связывается с рецептором интерлейкина-1 типа 1 (IL-1R1) и ингибирует связывание интерлейкина-1 β (IL-1 β) с IL-1R1, при этом антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

(а) каркасные участки тяжелой цепи антитела человека, участок CDR1 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 63, участок CDR2 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 66, и участок CDR3 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 69, и

(б) каркасные участки легкой цепи антитела человека, участок CDR1 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 71, участок CDR2 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 73, и участок CDR3 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 75.

2. Изолированная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело человека или его антиген-связывающий фрагмент, которое специфично связывается с IL-1R1 и ингибирует связывание IL-1 β с IL-1R1, при этом антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

(а) каркасные участки тяжелой цепи антитела человека, участок CDR1 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 62, участок CDR2 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 65, и участок CDR3 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 68, и

(б) каркасные участки легкой цепи антитела человека, участок CDR1 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 70, участок CDR2 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 72, и участок CDR3 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 74.

3. Изолированная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело человека или его антиген-связывающий фрагмент, которое специфично связывается с IL-1R1 и ингибирует связывание IL-1 β с IL-1R1, при этом антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

(а) каркасные участки тяжелой цепи антитела человека, участок CDR1 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 61, участок CDR2 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 64, и участок CDR3 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 67, и

(б) каркасные участки легкой цепи антитела человека, участок CDR1 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 70, участок CDR2 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 72, и участок CDR3 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 74.

4. Изолированная молекула нуклеиновой кислоты по п.1, отличающаяся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

(а) вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 85, и

(б) вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 86.

5. Изолированная молекула нуклеиновой кислоты по п.2, отличающаяся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

(а) вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 87, и

(б) вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 88.

6. Изолированная молекула нуклеиновой кислоты по п.3, отличающаяся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

(а) вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 89, и

(б) вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 88.

7. Изолированная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-6, кодирующая антитело, которое представляет собой антитело подкласса IgG2.

8. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-7.

9. Первая молекула нуклеиновой кислоты и вторая молекула нуклеиновой кислоты, кодирующие антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфично связывается с IL-1R1 и ингибирует связывание IL-1 β с IL-1R1, причем:

(а) первая молекула нуклеиновой кислоты кодирует вариабельный участок тяжелой цепи антитела человека, содержащий каркасные участки тяжелой цепи антитела человека, участок CDR1 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 63, участок CDR2 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 66, и участок CDR3 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 69, и

(б) вторая молекула нуклеиновой кислоты кодирует вариабельный участок легкой цепи антитела человека, содержащий каркасные участки легкой цепи антитела человека, участок CDR1 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 71, участок CDR2 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 73, и участок CDR3

легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 75.

10. Первая и вторая молекулы нуклеиновых кислот по п.9, отличающиеся тем, что первая молекула нуклеиновой кислоты содержит SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 85, а вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 86.

11. Первая молекула нуклеиновой кислоты и вторая молекула нуклеиновой кислоты, кодирующие антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфично связывается с IL-1R1 и ингибирует связывание IL-1 β с IL-1R1, причем:

(а) первая молекула нуклеиновой кислоты кодирует вариабельный участок тяжелой цепи антитела человека, содержащий каркасные участки тяжелой цепи антитела человека, участок CDR1 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 62, участок CDR2 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 65, и участок CDR3 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 68, и

(б) вторая молекула нуклеиновой кислоты кодирует вариабельный участок легкой цепи антитела человека, содержащий каркасные участки легкой цепи антитела человека, участок CDR1 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 70, участок CDR2 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 72, и участок CDR3 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 74.

12. Первая и вторая молекулы нуклеиновых кислот по п.11, отличающиеся тем, что первая молекула нуклеиновой кислоты содержит SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 87, а вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 88.

13. Первая молекула нуклеиновой кислоты и вторая молекула нуклеиновой кислоты, кодирующие антитело человека или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфично связывается с IL-1R1 и ингибирует связывание IL-1 β с IL-1R1, причем:

(а) первая молекула нуклеиновой кислоты кодирует вариабельный участок тяжелой цепи антитела человека, содержащий каркасные участки тяжелой цепи антитела человека, участок CDR1 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 61, участок CDR2 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 64, и участок CDR3 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 67, и

(б) вторая молекула нуклеиновой кислоты кодирует вариабельный участок легкой цепи антитела человека, содержащий каркасные участки легкой цепи антитела человека, участок CDR1 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 70, участок CDR2 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 72, и участок CDR3 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 74.

14. Первая и вторая молекулы нуклеиновых кислот по п.13, отличающиеся тем, что первая молекула нуклеиновой кислоты содержит SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 89, а вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 88.

15. Первый вектор экспрессии и второй вектор экспрессии, содержащие первую и вторую молекулы нуклеиновых кислот по любому из пп.9-14, отличающиеся тем, что первый вектор содержит первую молекулу нуклеиновой кислоты, а второй вектор содержит вторую молекулу нуклеиновой кислоты.

16. Изолированная клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по п.8 или первый и второй векторы экспрессии по п.15.

17. Изолированная клетка-хозяин по п.16, представляющая собой эукариотическую клетку.

18. Изолированная клетка-хозяин по п.16, представляющая собой прокариотическую клетку.

19. Клеточная линия, содержащая вектор экспрессии по п.8 или первый и второй векторы экспрессии по п.15.

20. Способ получения антитела, специфично связывающегося с IL-1R1, включающий обеспечение экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-7 или первой и второй молекул нуклеиновых кислот по любому из пп.9-14 в клетке-хозяине.

21. Способ получения антитела, специфично связывающегося с IL-1R1, включающий обеспечение экспрессии вектора по п.8 или первого и второго векторов экспрессии по п.15 в клетке-хозяине.

Константный участок тяжелой цепи IgG1

```

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
ggcacagcgg cctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgctg 120
tggaactcag gcgcctcgac cagcggcgctg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgcctccca gcagcttggg caccagacc 240
tacatctgca acgtgaatca caagcccgag aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300
aaatcttctg acaaaactca cacatgccca cctgcccag cacctgaact cctgggggga 360
ccgtcagctc tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc cgggaccctc 420
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
tacgtggagc gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcttcacc gtccctgacc aggactgggt gaatggcaag 600
gagtacaagt gcaaggcttc caacaaagcc ctcccagccc ccacgagaa aacctctcc 660
aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc cggggatgag 720
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaag gcttctatcc cagcgacatc 780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
ctggactccg acggctcctt cttctcttat agcaagctca cgtggacaa gagcaggtgg 900
cagcagggga acgtctctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
cagaagagcc tctccctgtc tcgggtaaa

```

Фиг. 1А

ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	60
GLYSLSSSVT	VPSSSLGTQT	YICNVNHKPS	NTKVDKKVEP	KSCDKTHTCP	PCPAPELLGG	120
PSVFLFPPKP	KDTLMISRTP	EVTCVVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN	180
STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ	VYTLPPSRDE	240
LTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTTPPV	LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW	300
QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSPGK				330

Фиг. 1B

Константный участок каппа-цепи

cgaactgtgg	ctgcaccatc	tgtcttcac	ttcccggccat	ctgatgagca	gttgaaatct	60
ggaaactgcct	ctgttggtgtg	cctgctgaat	aacttctatc	ccagagaggc	caaagtacag	120
tggaaggtgg	ataacgccct	ccaatcgggt	aactcccagg	agagtgtcac	agagcaggac	180
agcaaggaca	gcacctacag	cctcagcagc	accctgacgc	tgagcaaagc	agactacgag	240
aaacacaaag	tctacgcctg	cgaagtcaac	catcagggcc	tgagctcgcc	cgtcacaaag	300
agcttcaaca	ggggagagtg	t				321

Фиг. 2A

RTVAAPSVFI	FPPSDEQLKS	GTASVVCLLN	NFYPREAKVQ	WKVDNALQSG	NSQESVTEQD	60
SKDSTYSLSS	TLTSLKADYE	KHKVYACEVT	HQGLSSPVTK	SFNRGEC		107

Фиг. 2B

Константный участок тяжелой цепи IgG2

gcctccacca	agggcccatc	ggtcttcccc	ctggcgccct	gctccaggag	cacctccgag	60
agcacagcgg	ccctgggctg	cctggtcaag	gactacttcc	ccgaaccggg	gacgggtgtcg	120
tggaactcag	gcgctctgac	cagcggcggtg	cacaccttcc	cagctgtcct	acagtcctca	180
ggactctact	ccctcagcag	cgtggtgacc	gtgccctcca	gcaacttcgg	caccagacc	240
tacacctgca	acgtagatca	caagcccagc	aacaccaaag	tggaacaagac	agttgagcgc	300
aaatgttgtg	tcgagtgcct	accgtgcccc	gcaccacctg	tggaaggacc	gtcagtcctc	360
ctcttcccc	caaaacccaa	ggacaccctc	atgatctccc	ggacccctga	ggtcacgtgc	420
gtggtggtgg	acgtgagcca	cgaagacccc	gaggtccagt	tcaactggta	cgtggagcgg	480
gtggaggtgc	ataatgcca	gacaaagcca	cgggaggagc	agttcaacag	cacgttccgt	540
gtggtcagcg	tcctcaccgt	tgtgcaccag	gactggctga	acggcaagga	gtacaagtgc	600
aaggtctcca	acaaaggcct	cccagcccc	atcgagaaaa	ccatctccaa	aaccaaagg	660
cagccccgag	aaccacaggt	gtacaccctg	cccccatccc	gggaggagat	gaccaagaac	720
caggtcagcc	tgacctgcct	ggtcaaaggc	ttctacccca	gcgacatcgc	cgtggagtg	780
gagagcaatg	ggcagccgga	gaacaactac	aagaccacac	ctcccatgct	ggactccgac	840
ggctccttct	tcctctacag	caagctcacc	gtggacaaga	gcaggtggca	gcaggggaac	900
gtcttctcat	gctccgtgat	gcatgaggct	ctgcacaacc	actacacgca	gaagagcctc	960
tcctgtctc	cgggtaaa					978

Фиг. 3A

ASTKGPSVFP	LAPCSRSTSE	STAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	60
GLYSLSSSVT	VPSSNFGTQT	YTCNVNDHKPS	NTKVDKTVET	KCCVECPPCP	APPVAGPSVF	120
LFPPPKPDTL	MISRTPPEVTC	VVVDVSHEDP	EVQFNWYVDG	VEVHNAKTKP	REEQFNSTFR	180
VVSVLTVVHQ	DWLNGKEYKC	KVSNKGLPAP	IEKTISKTKG	QPREPQVYTL	PPSREEMTKN	240
QVSLTCLVKG	FYPSDIAVEW	ESNGQPENNY	KTTPPMLDSD	GSFFLYSKLT	VDKSRWQQGN	300
VFSCSVMHEA	LHNHYTQKSL	SLSPGK				326

Фиг. 3B

Константный участок тяжелой цепи IgG4

gccagcacca	agggggccatc	cgtcttcccc	ctggcgccct	gctccaggag	cacctccgag	60
agcacagccg	ccctgggctg	cctgggtcaag	gactacttcc	ccgaaccggg	gacggtgtcg	120
tggaactcag	gcgcccctgac	cagcggcgctg	cacaccttcc	cggtgtgtcct	acagtccctca	180
ggactctact	ccctcagcag	cgtgggtgacc	gtgccctcca	gcagcttggg	cacgaagacc	240
tacacctgca	acgtagatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggacaagag	agttgagtc	300
aaatatggtc	ccccatgccc	atcatgcccc	gcacctgagt	tcctgggggg	accatcagtc	360
ttcctgttcc	ccccaaaacc	caaggacact	ctcatgatct	cccggacccc	tgaggtcacg	420
tgcgtgggtg	tggacgtgag	ccaggaagac	cccagggtcc	agttcaactg	gtacgtggat	480
ggcgtggagg	tgcataatgc	caagacaaag	ccgcgggagg	agcagttcaa	cagcacgtac	540
cgtgtgggtca	gcgtcctcac	cgtcctgcac	caggactggc	tgaacggcaa	ggagtacaag	600
tgcaaggctc	ccaacaaagg	cctcccgctc	tccatcgaga	aaaccatctc	caaagccaaa	660
gggcagcccc	cgagccaca	ggtgtacacc	ctgcccccat	ccaggagga	gataccaag	720
aaccagggtca	gcctgacctg	cctgggtcaaa	ggcttctacc	ccagcgacat	cgcggtggag	780
tgggagagca	atgggcagcc	ggagaacaac	tacaagacca	cgctcccgt	gctggactcc	840
gacgggtcct	tcttcctcta	cagcaggcta	accgtgraca	agagcagggtg	gcaggagggg	900
aatgtcttct	catgtccgt	gakgcatgag	gctctgcaca	accactacac	acagaagagc	960
ctctccctgt	ctctgggtaa	a				981

Фиг. 4А

ASTKGPSVFP	LAPCSRSTSE	STAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	60
GLYSLSSVVT	VPSSSLGTKT	YTCNVDHKPS	NTKVDKRVES	KYGPPCPSCP	APEFEGGPSV	120
FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSQED	PEVQFNWYVD	GVEVHNAKTK	PREEQFNSTY	180
RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKGLPS	SIEKTISKAK	GQPREPQVYT	LPPSQEEMTK	240
NQVSLTCLVK	GFYPSTIAVE	WESNGQFENN	YKTTTPVLDS	DGSFFLYSRL	TVDKSRWQEG	300
NVFSCSVME	ALHNNHYTQKS	LSLSLGK				327

Фиг. 4В

26F5 тяжелая цепь

atggagtttg	ggctgagctg	ggtcttcttc	gttgcctctt	taagaggtgt	ccagtgtcag	60
gtgcagctgg	tggagtctgg	gggaggcggt	gtccagcctg	ggaggtccct	gagactctcc	120
tgtgcagcgt	ctggattcac	cttcagcaac	tatggcatgc	actgggtccg	ccaggctcca	180
ggcaaggggc	tggagtgggt	ggcaggcatt	tggaatgatg	gaattaataa	ataccatgca	240
cactccgtga	ggggccgatt	caccatctcc	agagacaatt	ccaagaacac	gctgtatctg	300
caaatgaaca	gcccagagagc	cgaggacacg	gctgtgtatt	actgtgagag	agcacgggtc	360
ttcgactggc	tattatttga	gttctggggc	cagggaaacc	tggtcacccg	ctctagt	417

Фиг. 5А

MEFGLSWVFL	VALLRGVQCQ	VQLVESGGGV	VQPGRSRLRLS	CAASGFTFSN	YGMHWVRQAP	60
GKGLEWVAGI	WNDGINKYHA	HSVRGRFTIS	RDNSKNTLYL	QMNSPRAEDT	AVYYCARARS	120
FDWLLFEFWG	QGTILTVSS					139

Фиг. 5В

26F5 каппа-цепь

atggaagccc	cagctcagct	tctcttcttc	ctgctaactct	ggctcccaga	taccaccgga	60
gaaattgtgt	tgacacagtc	tccagccacc	ctgtctttgt	ctccagggga	aagagccacc	120
ctctcctgca	gggcccagtc	gagtgttagc	agctacttag	cctggtagca	acagaaacct	180
ggccaggctc	ccaggctcct	catctatgat	gcaccaaca	gggcccactg	catcccagcc	240
aggttcagtg	gcagtgggtc	tgggacagac	ttcactctca	ccatcagcag	cctagagcct	300
gaagattttg	cagtttatta	ctgtcagcag	cgtagcaact	ggcctccgct	cactttcggc	360
ggagggaacca	aggtggagat	caaa				384

Фиг. 6А

MEAPAQLLFL	LLLWLPTDTG	EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SYLAWYQQKP	60
GQAPRLLIYD	ASNRTGIPA	RFSGSGSGTD	FTLTISLLEP	EDFAVYQCQ	RSNWPPLTFG	120
GGTKVEIK						128

Фиг. 6В

27F2 тяжелая цепь

atggagtttg	ggctgagctg	ggttttcctc	gttgctcttt	taagaggtgt	ccagtgtcag	60
gtgcagctgg	tggagtcttg	gggaggcggtg	gtccagcctg	ggaggtccct	gagactctcc	120
tgtgcagtg	ctggattcac	cttcagtaac	tatggcatgc	actgggtccg	ccaggctcca	180
ggcaaggggc	tggagtgggt	ggcagctata	tggaatgatg	gagaaaataa	acaccatgca	240
ggctccgtga	ggggccgatt	caccatctcc	agagacaatt	ccaagaacac	gctgtatctg	300
caaatgaaca	gcctgagagc	cgaggacacg	gctgtgtatt	actgtgctgag	aggacgatat	360
tttgactgg	tattatttga	gtattggggc	cagggaaccc	tggtcaccgt	ctctagt	417

Фиг. 7A

MEFGLSWVFL	VALLRGVQCQ	VQLVESGGGV	VQPGRSLRLS	CAVSGFTFSN	YGMHWVRQAP	60
GKGLEWVAAL	WNDGENKHHH	GSVRGRFTIS	RDNSKNTLYL	QMNSLRAEDT	AVYYCARGRY	120
FDWLLFEYWG	QGTLVTVSS					139

Фиг. 7B

15C4 тяжелая цепь

atgggggtcaa	ccgccatcct	cgcctcctc	ctggctgttc	tccaaggagt	ctgtgccgag	60
gtgcagctga	tgcagtcttg	agcagaggtg	aaaaagcccg	gggagtctct	gaagatctcc	120
tgtaaaggtt	ctggatacag	cttttccttc	cactggatcg	cctgggtgcg	ccagatgcc	180
gggaaaggcc	tggagtggat	ggggatcatc	catcctgggtg	cctctgatac	cagatacagc	240
ccgtccttcc	aaggccaggt	caccatctca	gccgacaact	ccaacagcgc	cacctacctg	300
cagtggagca	gcctgaaggc	ctcggacacc	gccatgtatt	tctgtgctgag	acaaagggaa	360
ctcgactact	ttgactactg	ggggcaggga	accctgggtca	ccgtctctag	t	411

Фиг. 8A

MGSTAILALL	LAVLQGVCAE	VQLMQSGAEV	KKPGESLKIS	CKGSGYSFSF	HWIAWVRQMP	60
GKGLEWMGII	HPGASDTRY	PSFQGQVTIS	ADNSNSATYL	QWSSLKASDT	AMYFCARQRE	120
LDYFDYWGQG	TLVTVSS					137

Фиг. 8B

15C4 каппа-цепь

atgtcgccat	cacaactcat	tgggtttctg	ctgctctggg	ttccagcctc	caggggtgaa	60
attgtgctga	ctcagtctcc	agactttcag	tctgtgactc	caaaggagaa	agtcaccatc	120
acctgccggg	ccagtcagag	catttgtagt	agcttacact	ggtaccagca	gaaaccagat	180
cagtctccaa	agctcctcat	caagtatgct	ttccagtcct	tctcaggggt	cccctcgagg	240
ttcagtggca	gtggatctgg	gacagatttc	accctcacca	tcaatagcct	ggaagctgaa	300
gatgctgcag	cgtattactg	tcattcagag	agtagtttac	ctctcacttt	cggcggaggg	360
accaaggtgg	agatcaaa					378

Фиг. 9A

MSPSQLIGFL	LLWVPASRGE	IVLTQSPDFQ	SVTPKEKVTI	TCRASQSIGS	SLHWYQQKPD	60
QSPKLLIKYA	SQSFSGVPSR	FSGSGSGTDF	TLTINSLEAE	DAAAYYCHQS	SSLPLTFGGG	120
TKVEIK						126

Фиг. 9B

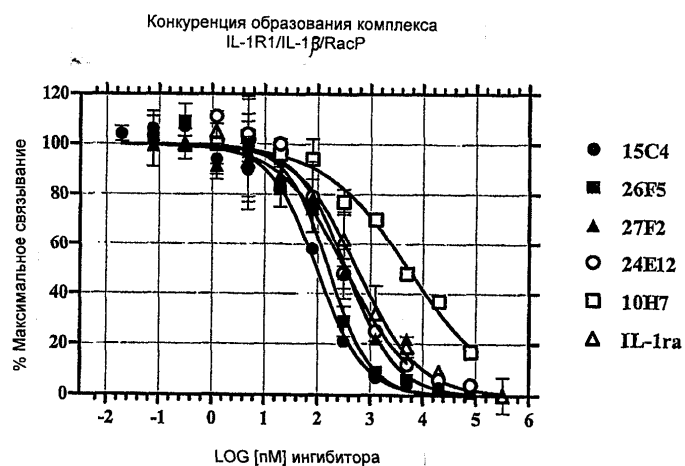
			CDR1		CDR2	
26F5	QVQLVESGGG	VQPGRSLRL	SCAASGFTFS	NYGMHWVRQA	PGKGLEWVAG	IWNDGINKYH
27F2	QVQLVESGGG	VQPGRSLRL	SCAVSGFTFS	NYGMHWVRQA	PGKGLEWVAA	IWNDGENKHH
15C4	EVQLMQSGAE	VKKPGESLKI	SCKGSGYSFS	FHWIAWVRQM	PGKGLEWMGI	IHPGASDTRY

			CDR3			
26F5	AHSVRGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSPRAED	TAVYYCARAR	SFDWLLFEFW	GQGTILVTVSS
27F2	AGSVRGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGR	YFDWLLFEYW	GQGTILVTVSS
15C4	SPSFQGQVTI	SADNSNSATY	LQWSSLKASD	TAMYFCARQR	ELDYFDYWGQ	GTILVTVSS

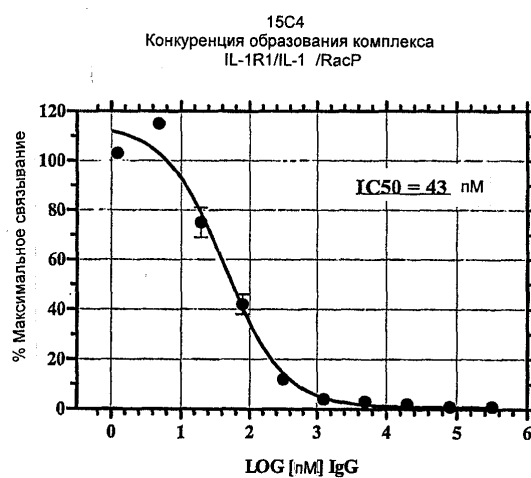
Фиг. 10

		CDR1	
26F5/27F2	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQOKP GQAPRLLIYD		
15C4	EIVLTQSPDF QSVTPKEKVT ITCRASQSIG SSLHWYQOKP DQSPKLLIKY		
		CDR2	CDR3
26F5/27F2	ASNRTGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPLTFG		
15C4	ASQSFSGVPS RFSGSGSGTD FTLTINSLEA EDAAAYYCHQ SSSLPLTFGG		
26F5/27F2	GGTKVEIK		
15C4	GTKVEIK		

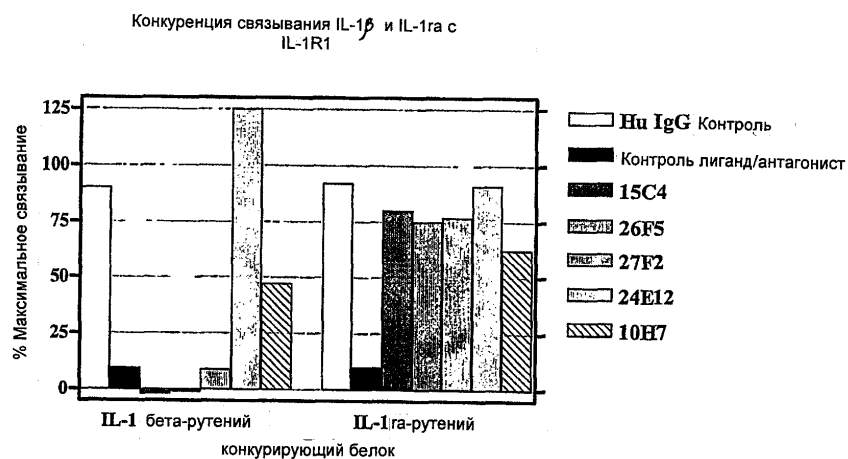
Фиг. 11



Фиг. 12

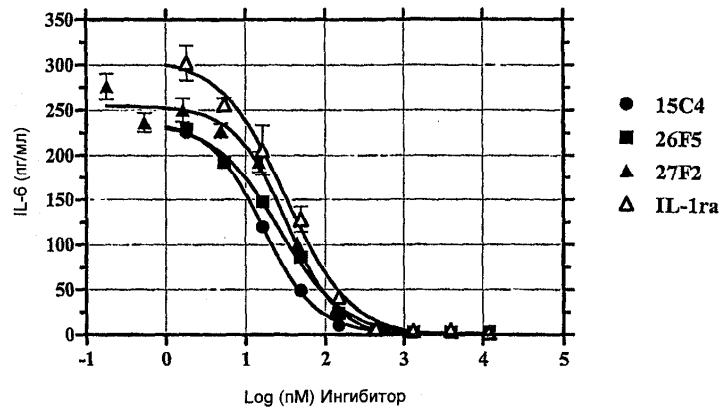


Фиг. 13



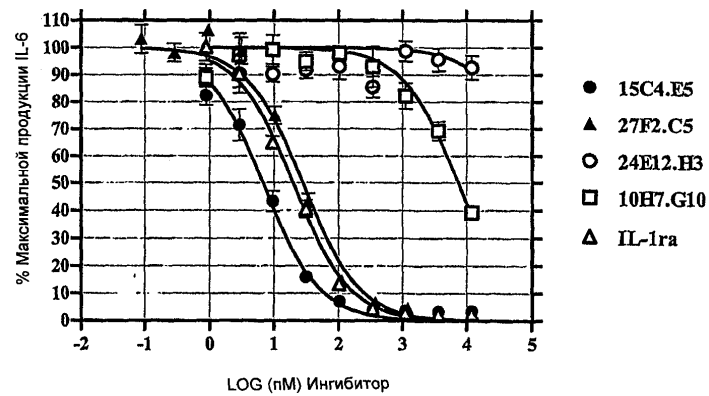
Фиг. 14

Ингибирование IL-1-индуцированного продуцирования
IL-6 в первичных человеческих хондроцитах



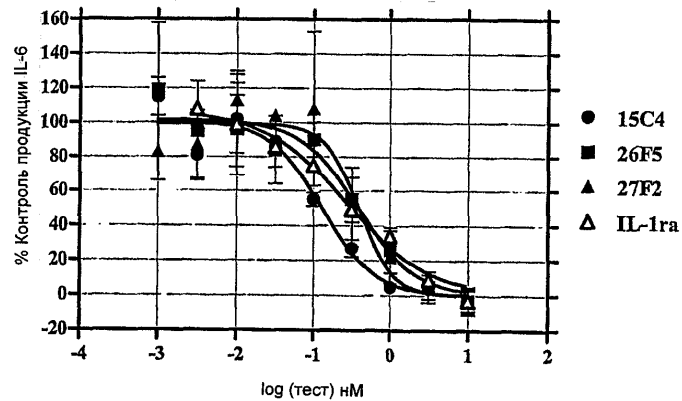
Фиг. 15А

Ингибирование IL-1-индуцированного IL-6
в первичных человеческих хондроцитах



Фиг. 15В

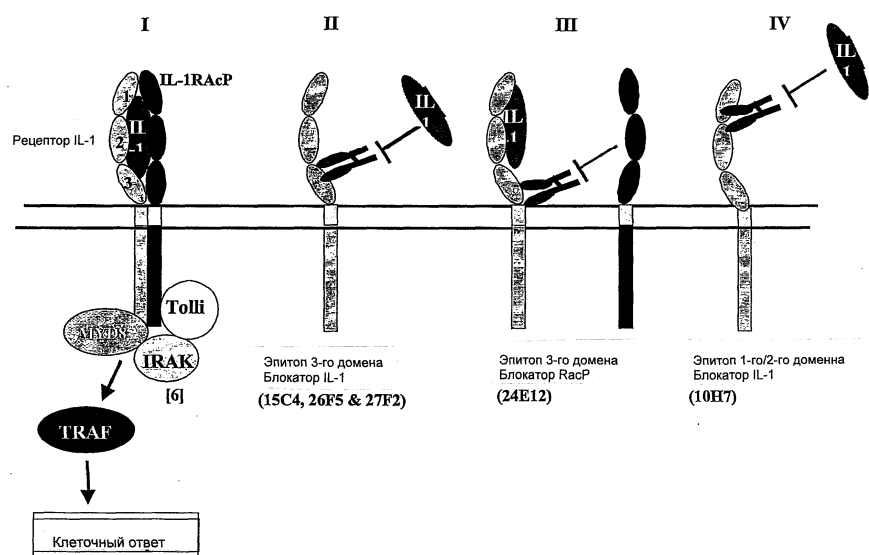
Ингибирование IL-1-индуцированного продуцирования
IL-6 в цельной крови человека (собираетельно)



Фиг. 16

Figure 1 is a Western blot analysis showing the expression of mutant human IL-1R proteins. The blot is organized into three rows, each corresponding to a different antibody used for detection: 15C4 (top row), 27F2 (middle row), and 24E12 (bottom row). The columns are labeled 1 through 15, plus a positive control (+) and a negative control (-). Lane 1 contains a molecular weight marker. Lanes 2 and 3 show no bands. Lanes 4 through 15 show bands of varying intensity, indicating the expression of different mutant IL-1R proteins. The positive control (+) shows a strong band in all three antibody rows, while the negative control (-) shows no bands.

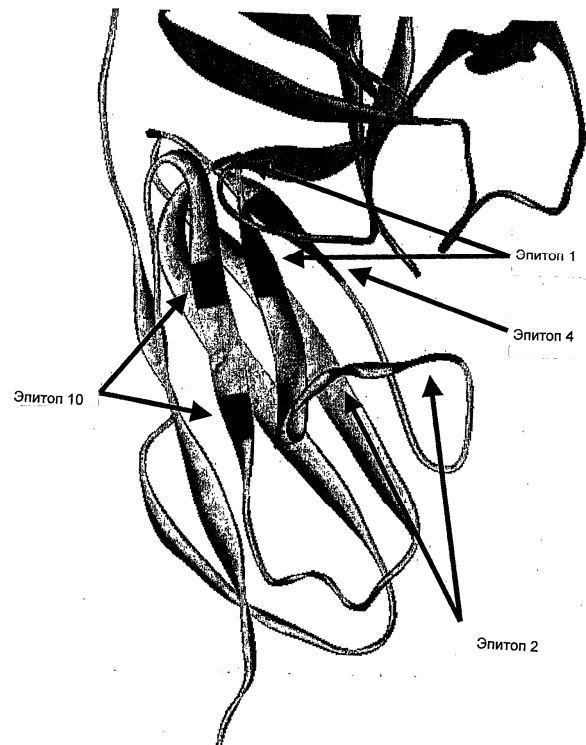
- 52 -



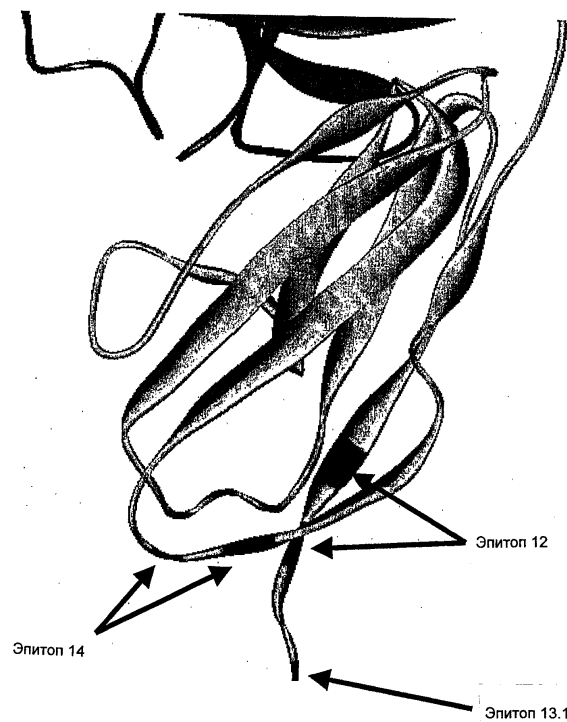
Фиг. 19



Фиг. 20



Фиг. 21



Фиг. 22

MVHATSPLLL	LLLLSLALVA	PGLSARKCSL	TGKWINDLGS	NMTIGAVNSK	GEFTGTYTTA	60
VTATSNEIKE	SPLHGTQNTI	NKRTQPTFGF	TVNWKFSSEST	TVFTGQCIFD	RNGKEVLKTM	120
WLLRSSVNDI	GDDWKATRVG	INIFTRLRTQ	KEQLLASLLE	ADKCKEREK	IILVSSANEI	180
DVRPCPLNPN	EHKGTITWYK	DDSKTPVSTE	QASRIHQHKE	KLWFPAMVE	DSGHYYCVVR	240
NSSYCLRIKI	SAKFVENEEN	LCYNAQAIFK	QKLPVAGDGG	LVCPYMEFFK	NENNELPKLQ	300
WYKDCKPLLL	DNIHFGSVKD	RLIVMNVAEK	HRGNYTCHAS	YTYLGKQYPI	TRVIEFITLE	360
ENKPTRPVIV	SPANETMEVD	LGSQIQLICN	VTGQLSDIAY	WKWNGSVIDE	DDPVLGEDYY	420
SVENPANKRR	STLITVLNIS	EIESRFYKHP	FTCFAKNTHG	IDAAYIQLIY	PVTNFOKDYG	480
DDDDK						485

Фиг. 23

1 MVHATSPLLL LLLLSLALVA PGLSARKCSL TGKWTNDLGS NMTIGAVNSK GEFTGTYTTA
61 VTATSNEIKE SPLHGTQNTI NKRTQPTFGF TVNWKFSSEST TVFTGQCFID RNGKEVLKTM
121 WLLRSSVNDI GDDWKATRVG INIFTRLRTQ KEQLLASLLE ADKCNEREEK IILVSSANEI
181 DVRPCPLNPN EYKGTITWYK NDSKTIPISTE QASRIHQHKK KLWFVPAKVE DSGHYVCVVR
241 NSSYCLRIKI TAKFVENEPN LCYNAEAIKF QRLPVAGDGG LVCPYMEFFK DENNELPKLL
301 WYKDCKPLLL DNIHFSGVKD RLIVMNVAEK HRGNYTCHAS YTYLGKQYPI TRVIEFITLE

мутация 1 мутация 2

↓ ↓

361 ENKPTRPVIV SPANETIEVD LGSQIQLICN VTGQLSDTAY WKWNGSFIDE DDPVLGEDYY
человеческий I V

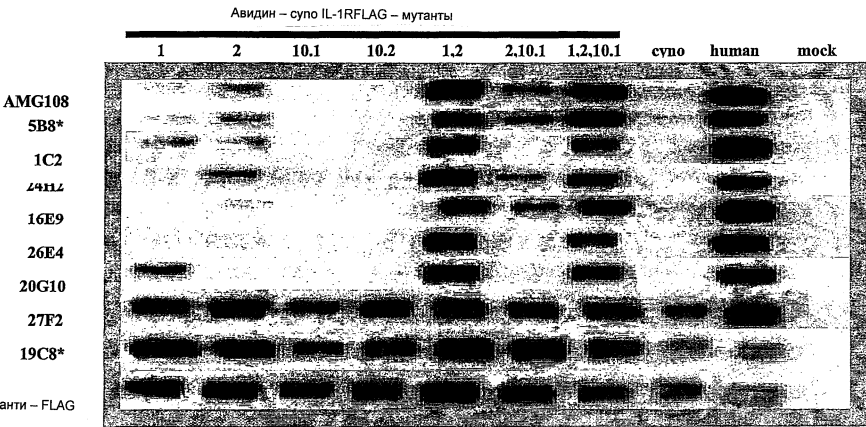
мутация 10.1 мутация 10.2

↓ ↓

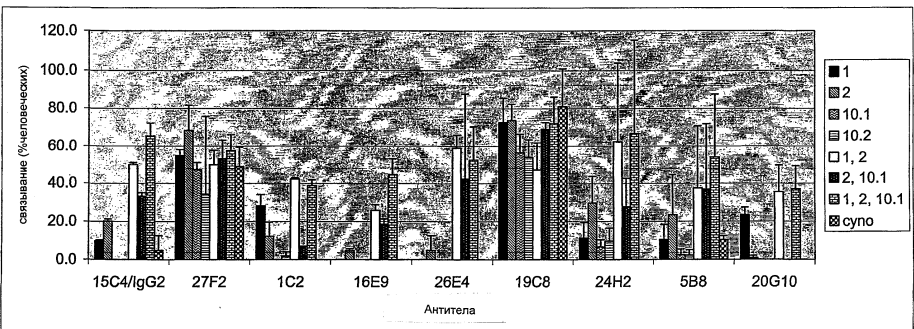
421 SVENPANKRR SLITITVLNIS ETESRFYKHP FTCLARNTHG MDAAYVQLIY PVTKFQKDYK
человеческий F K

481 DDDDK

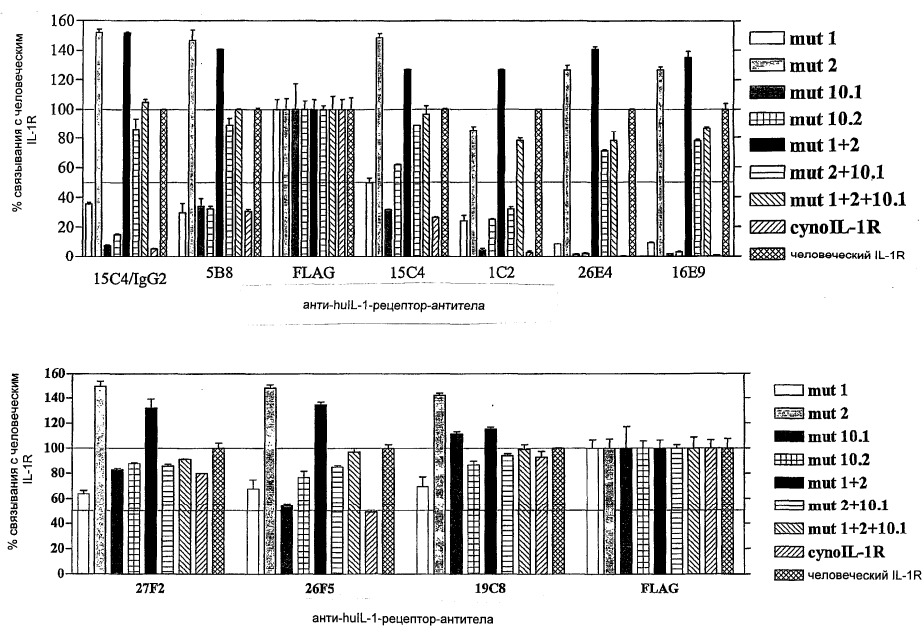
Фиг. 24



Фиг. 25А



Фиг. 25В



Фиг. 26

