

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042754**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.22

(21) Номер заявки
201892096

(22) Дата подачи заявки
2017.03.09

(51) Int. Cl. **C07K 16/24** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)

(54) НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К IL-25 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/309,135

(32) 2016.03.16

(33) US

(43) 2019.08.30

(86) PCT/US2017/021578

(87) WO 2017/160587 2017.09.21

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЭЙБОУМ КОРПОРЕЙШН;
ШИМКЕТС РИЧАРД А.; ДЖЕКсон
КРИСТАЛ ЛАЙЛЗ (US); БАРТЛЕТТ
НАТАН (AU); ВИНСЕНТ ТОМАС;
ЛО ЮНХУА (US)**

(72) Изобретатель:
**Шимкетс Ричард А., Джексон
Кристал Лайлз (US), Бартлетт Натан
(AU), Винсент Томас, Ло Юнхуа (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) US-A1-20110318353
WO-A1-2012175691
WO-A1-2011054007
NCBI Reference Sequence: XP 012690363.1,
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN:
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B-like
[Clupea harengus]. 12 June 2015. Version XP
012690363.1; XP 012690363.1, sequence
US-B2-7977461
US-B2-8057794
US-A1-20110287444
JIN, W. et al. IL-17 cytokines in
immunity and inflammation. Emerging Microbes and
Infections. September 18, 2013. Vol. 2, e60, DOI:
10.1038/emi.2013.58; page 1, first column, first
paragraph
US-A1-20130251723
US-A1-20110311552
US-A1-20150316552

(57) Описаны связывающая IL-25 молекула и способ лечения заболевания и состояния, характеризующего повышенной экспрессией IL-25, включающий введение указанной молекулы.

042754
B1

042754
B1

Предпосылки создания изобретения

Интерлейкин-25 (IL-25), также известный как IL-17E, относится к группе цитокинов IL-17 и секретируется Т-хелперами второго типа (Th2), а также тучными клетками. IL-25 индуцирует выработку других цитокинов, включая IL-4, IL-5 и IL-13, в различных тканях и стимулирует увеличение численности эозинофилов.

Отмечено участие IL-25 в хронических воспалительных процессах желудочно-кишечного тракта и присутствие гена IL-25 в хромосомной области, ассоциируемой с развитием аутоиммунных заболеваний кишечника, например с воспалительным заболеванием кишечника (ВЗК). Общепринятая терапия ВЗК основана на приеме антибиотиков или стероидных лекарственных средств; однако такие подходы к терапии в настоящее время не обеспечивают успешного достижения или сохранения клинической ремиссии у пациентов.

Повышенная экспрессия IL-25 отмечена в образцах, полученных от пациентов, страдающих астмой - заболеванием, которым, по оценкам специалистов, страдает более 300 миллионов человек во всем мире; из чего можно сделать вывод, что сверхэкспрессия данного цитокина способствует возникновению патофизиологии астмы и других сходных заболеваний.

Таким образом, существует необходимость получения эффективных антагонистов IL-25, которые можно применять для лечения заболеваний и состояний, характеризующихся повышенной экспрессией IL-25, включая астму и воспалительное заболевание кишечника.

Изложение сущности изобретения

В одном аспекте настоящего документа описаны относящиеся к IL-25 связывающие молекулы, которые пригодны для лечения заболеваний и расстройств, опосредованных IL-25.

В одном аспекте настоящего документа описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы, содержащие вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий одну или более областей, определяющих комплементарность (CDR), как определено в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9,

Кроме того, описаны связывающие IL-25 молекулы, содержащие вариабельный домен тяжелой цепи, причем вариабельный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 15

В одном аспекте настоящего документа описаны вариабельные домены легкой цепи, содержащие одну или более CDR, как определено в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12.

Кроме того, в настоящем документе описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы, содержащие вариабельный домен легкой цепи, причем вариабельный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO 16;

В одном аспекте описанные связывающие IL-25 молекулы могут содержать вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи или области, определяющие комплементарность, любого предшествующего аспекта.

Соответственно, в настоящем документе описаны связывающие IL-25 молекулы, содержащие одну, две или три CDR вариабельных доменов тяжелой цепи, выбранные из группы, содержащей SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, и одну, две или три CDR вариабельных доменов легкой цепи, выбранные из группы, содержащей SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12.

Кроме того, в настоящем документе описаны связывающие IL-25 молекулы, содержащие вариабельный домен тяжелой цепи, причем вариабельный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 15, и вариабельный домен легкой цепи, причем вариабельный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 16.

Дополнительно, в настоящем документе описаны гуманизированные связывающие IL-25 молекулы, содержащие вариабельный домен тяжелой цепи, причем вариабельный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 17, и вариабельный домен легкой цепи, причем вариабельный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO: 18.

В одном аспекте настоящего документа описаны способы лечения, ингибирования или предотвращения воспаления дыхательных путей вследствие риновирусной инфекции, ревматоидного артрита, остеоартрита, эрозии кости, внутрибрюшинных абсцессов и спаек, воспалительного заболевания кишечника, отторжения аллотрансплантата, псориаза, определенных форм рака, ангиогенеза, атеросклероза, кистозного фиброза и рассеянного склероза, включающие введение терапевтического количества любой из связывающих IL-25 молекул из любого предшествующего аспекта.

Краткое описание графических материалов

Сопроводительные графические материалы, которые включены в данное описание и составляют его часть, иллюстрируют некоторые варианты осуществления и вместе с описанием выступают в качестве примеров описанных композиций и способов.

На фиг. 1 показаны сводные данные по В-клеткам, полученным от мыши, иммунизированной IL-25, и их график флуоресцентной сортировки для связывания В-клеток с IL-25.

На фиг. 2 приводится гель-электрофорез с денатурацией для антител: дорожка 1: положительный

контроль человеческий IgG4, дорожка 2: калейдоскопический предварительно окрашенный стандартный белковый маркер, дорожка 3: АВМ109, дорожка 4: АВМ125, дорожка 5: АВМ109.2.

На фиг. 3 представлен анализ клеточной потенции НТ-29 моноклональных антител к IL-25.

На фиг. 4 представлен анализ клеточной потенции НТ-29 гуманизированного моноклонального антитела АВМ109.2 в изотипах IgG1, IgG2 и IgG4.

На фиг. 5 показаны данные поверхностного плазмонного резонанса (ППР) для моноклональных антител к IL25 и расчетной аффинности антител.

На фиг. 6 представлены воздействия введения АВМ125 или контрольного антитела (IgG) на общее число клеток, инфильтрирующих легкие, эозинофилы и макрофаги в модели риновирусной инфекции на аллергическую астму у мышей

На фиг. 7 показано количество обнаруживаемой РНК риновируса в легких мышей, получавших контрольное антитело (IgG) или АВМ125.

На фиг. 8 показано количество обнаруживаемой РНК IL-5 в легких мышей, получавших контрольное антитело (IgG) или АВМ125.

На фиг. 9 показана эффективность и аффинность связывания гуманизированных (CDR-привитых) версий АВМ125, называемых АВМ125.9 и АВМ125.10, по сравнению с химерным АВМ125 с полностью мышиными вариабельными областями.

Подробное описание

Прежде чем раскрывать и описывать настоящие соединения, композиции, изделия, устройства и/или способы, следует понимать, что, если не указано иное, они не ограничены конкретными синтетическими способами или конкретными способами рекомбинантной биотехнологии, или, если не указано иное, конкретными реагентами, поскольку перечисленное выше, конечно, может меняться. Следует также понимать, что применяемые в настоящем документе термины используются только в целях описания конкретных вариантов осуществления и не несут ограничительного характера.

А. Определения.

В настоящем описании и в приложенной формуле изобретения формы единственного числа включают в себя обозначения множественного числа, если иное четко не следует из контекста. Таким образом, например, обозначение "фармацевтический носитель" включает в себя смеси из двух или более носителей и т.п.

В настоящем документе диапазоны могут быть выражены как от "приблизительно" одного определенного значения и/или до "приблизительно" другого определенного значения. Когда указывается такой диапазон, другой вариант осуществления включает в себя интервал от одного конкретного значения и/или до другого конкретного значения. Аналогично, когда значения указаны как приблизительные с использованием предшествующего слова "приблизительно", следует понимать, что конкретное значение формирует другой вариант осуществления. Далее будет понятно, что конечные точки каждого из диапазонов значительны как по отношению к другой конечной точке, так и независимо от другой конечной точки. Следует также понимать, что в настоящем документе описан ряд значений и что каждое значение в настоящем документе описано также и как "приблизительно" такое конкретное значения в дополнение к самому такому значению. Например, если описано значение "10", то описано и значение "приблизительно 10". Следует также понимать, что, если описано значение, которое "меньше" определенного значения или "равное" ему, "больше" определенного значения или "равное" ему, также описаны и возможные диапазоны между значениями, что будет совершенно очевидно для специалиста в данной области. Например, если описано значение "10", описано также и значение "меньше или равно 10", а также и "больше или равно 10". Следует также понимать, что в тексте настоящего документа данные приведены в нескольких различных форматах и что такие данные представляют собой конечные точки и начальные точки и диапазоны для любой комбинации точек данных. Например, если описана конкретная точка данных "10" и конкретная точка данных "15", очевидно, что считаются описанными значения больше чем, больше или равно, меньше чем, меньше или равно и равное 10 и 15, а также значения в диапазоне от 10 до 15. Следует также понимать, что описана и каждая единица между двумя конкретными единицами. Например, если описаны 10 и 15, описаны и 11, 12, 13 и 14.

В настоящем описании и в приведенной ниже формуле изобретения будет использован ряд терминов, которые в соответствии с определениями имеют следующие значения:

"Необязательный" или "необязательно" означает, что описанное ниже событие или обстоятельство может произойти или может не произойти и что описание включает в себя случаи, когда указанное событие или обстоятельство происходит, и случаи, когда этого не происходит.

В настоящем документе приводятся ссылки на различные публикации. Содержание данных публикаций полностью включено в настоящий документ путем ссылки для более подробного описания состояния в области, к которой относится настоящее описание. Приведенные в настоящем документе ссылки также по отдельности и специально включены в текст настоящего документа путем ссылки на содержащиеся в них материалы, которые обсуждают в предложении, содержащем ту или иную ссылку.

В. Композиции.

Описаны компоненты, которые будут использованы для приготовления описанных композиций, а

также сами композиции, которые будут использованы в рамках описанных в настоящем документе способов. Эти и другие материалы описаны в настоящем документе, и следует понимать, что, когда описывают комбинации, субпопуляции, взаимодействия, группы и т.д. этих материалов, несмотря на то, что конкретная ссылка на каждую отдельную индивидуальную и совокупную комбинацию и перестановку таких соединений не может быть явно описана, каждая специально рассмотрена и описана здесь. Например, если описывают и обсуждают конкретное антитело к IL-25 и обсуждают ряд модификаций, которые могут быть применены к ряду молекул, включая антитело к IL-25, специально подразумевают все без исключения комбинации и перестановки антитела к IL-25 и все возможные модификации, если специально не указано иное. Таким образом, если описан класс молекул А, В и С, а также класс молекул D, E и F и описан пример комбинированной молекулы А-D, тогда даже, если каждая из них не упоминается в отдельности, подразумевается, что каждая из них в отдельности и в совокупности означает, что описаны комбинации А-Е, А-F, В-D, В-Е, В-F, С-D, С-Е и С-F. Аналогичным образом описана любая субпопуляция или их комбинация. Таким образом, например, подгруппа А-Е, В-F и С-Е будет считаться описанной. Данная концепция относится ко всем аспектам настоящего документа, включая, без ограничений, стадии способов получения и использования описанных композиций. Таким образом, если существует множество дополнительных шагов, которые могут быть выполнены, следует понимать, что каждый из этих дополнительных шагов может быть выполнен с любым конкретным вариантом осуществления или комбинацией вариантов осуществления описанных способов.

Как отмечено выше, повышенные уровни IL-25 ассоциировали с несколькими состояниями, заболеваниями или расстройствами, включая воспаление дыхательных путей, ревматоидный артрит ("РА"), остеоартрит, эрозия кости, внутрибрюшинные абсцессы и спайки, воспалительное заболевание кишечника ("ВЗК"), кистозный фиброз, отторжение аллотрансплантата, псориаз, определенные формы рака, ангиогенез, атеросклероз и рассеянный склероз ("РС").

В настоящее время семейство цитокинов IL-17 включает в себя IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25) и IL-17F. Все цитокины семейства IL-17 содержат четыре высококонсервативных цистеиновых остатка, которые задействованы в формировании внутрицепочечных дисульфидных связей и содержат два или более цистеиновых остатка, которые могут быть задействованы в формировании внутрицепочечных дисульфидных связей. У цитокинов семейства IL-17 отсутствует сходство последовательности с любыми другими известными цитокинами.

Цитокины 2 типа играют важную роль в опосредовании защитного иммунитета к паразитарной гельминтной инфекции, регулировании эффекторных функций, таких как рост В-клеток и секреция IgE, индуцировании гиперплазии бокаловидных клеток и связанного слизиобразования, эозинофилии, мастоцитоза и фиброза. Эти цитокины играют важнейшую роль в регулировании таких эффекторных функций, которые делают их ключевыми терапевтическими мишенями в астме. В самом деле, в мышинных моделях, в которых отмечена сверхэкспрессия таких цитокинов, наблюдают заметные признаки астмы. Таким образом, неожиданно было обнаружено, что попытки облегчения симптомов экспериментальной астмы посредством блокирования специфических цитокинов 2 типа, кроме ингибирования IL-13, не были признаны успешными.

Ингибирование IL-13 подавляет как гиперчувствительность дыхательных путей (ГДП), так и воспаление дыхательных путей, несмотря на то, что механизмы такого воздействия по-прежнему неясны. Однако, учитывая сложность патофизиологии и недостаточную изученность этиологии астмы, нет уверенности в том, что целевое воздействие на отдельные пути, в конечном счете, окажется терапевтически успешным.

Недавно было показано, что сверхэкспрессия IL-25/IL-17E индуцирует ответы 2 типа на лечение *in vivo* и усиливает отвечаемость на агонисты дыхательных путей. Мышам IL-25^{-/-} не удалось изгнать гельминтных паразитов; что было ключевым индикатором неэффективного ответа 2 типа на лечение.

Авторы настоящего изобретения получили антитела к IL-25 и идентифицировали молекулу антитела, которая связывается с IL-25 со сверхвысокой аффинностью и специфичностью. Были идентифицированы два блокирующих антитела из двадцати трех прошедших скрининг, причем одно из них отличалось чрезвычайно низкой скоростью диссоциации.

Связывающие молекулы.

При использовании в настоящем документе термин "связывающая молекула" относится к интактному иммуноглобулину, в том числе к моноклональным антителам, поликлональным антителам, химерным антителам, гуманизированным или человеческим антителам, а также фрагментам антител и функциональным вариантам, включающим антигенсвязывающий и/или вариабельный домен, содержащий фрагмент иммуноглобулина, который вступает в конфликт с интактным иммуноглобулином из-за специфического связывания с партнером иммуноглобулина по связыванию, например IL-25.

В одном аспекте описанные связывающие молекулы IL-25 могут включать в себя антитело к IL-25 (например, антитело к IL-25). Термин "антитела" в настоящем документе используется в широком смысле и включает в себя поликлональные и моноклональные антитела. При использовании в настоящем документе термин "антитело" включает в себя, без ограничений, полный иммуноглобулин (т.е. интактное антитело) любого класса. Кроме молекул интактного иммуноглобулина, в термин "антитела" также

включены фрагменты или полимеры таких молекул иммуноглобулина и человеческие или гуманизированные варианты молекул иммуноглобулина или их фрагменты при условии, что они выбраны за их способность взаимодействовать с IL-25, так что при этом ингибируется отказ IL-25 от взаимодействия с IL-17RA и/или IL-17RB. Кроме того, описаны антитела, которые связаны с описанными областями IL-25, участвующими во взаимодействии между IL-25 и IL-17RA и/или IL-17RB.

Нативные антитела обычно представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины, образованные двумя идентичными легкими (L) цепями и двумя идентичными тяжелыми (H) цепями. Описанные связывающие IL-25 молекулы, будь то моноклональные антитела, поликлональные антитела, химерные антитела, гуманизированные или человеческие антитела, а также фрагменты и функциональные варианты антител, могут содержать все легкие и тяжелые цепи или их часть.

Как правило, в полном антителе каждая легкая цепь связана с тяжелой цепью одной ковалентной дисульфидной связью, тогда как число дисульфидных связей между тяжелыми цепями в различных изоформах иммуноглобулина меняется. Каждая тяжелая и легкая цепь также обладает расположенными на равном расстоянии внутренними дисульфидными мостиками. Каждая тяжелая цепь имеет на одном конце вариабельный домен (V(H)) с последующими несколькими константными доменами (C(H)). Каждая легкая цепь имеет на одном конце вариабельный домен (V(L)), а на другом своем конце константный домен (C(L)); константный домен легкой цепи находится напротив первого константного домена тяжелой цепи, а вариабельный домен легкой цепи находится напротив вариабельного домена тяжелой цепи. Принято считать, что конкретные аминокислотные остатки формируют границу между вариабельными доменами легкой и тяжелой цепей. Легкие цепи антител любых видов позвоночных можно отнести в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов к одному из двух четко различающихся типов, называемых каппа (κ) и лямбда (λ). В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей иммуноглобулины могут быть подразделены на различные классы. Существуют пять основных классов иммуноглобулинов человека: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, а некоторые из них могут быть дополнительно подразделены на подклассы (изотипы), например IgG-1, IgG-2, IgG-3 и IgG-4; IgA-1 и IgA-2. Специалисту в данной области будут очевидны сопоставимые классы для мышей. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, обозначены как альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю соответственно.

Термин "вариабельный" в настоящем документе используют для описания определенных доменов тяжелой и легкой цепей, которые отличаются последовательностью среди антител и используются для связывания и специфичности каждого конкретного антитела с его конкретным антигеном. При этом вариабельность обычно неравномерно распределена по вариабельным доменам антител. Вариабельные домены с более высокими уровнями консервативности называют каркасами (FR). Вариабельные домены нативных тяжелых и легких цепей в каждом случае содержат четыре области FR, большей частью принимающих конфигурацию β-листа, соединенных тремя областями, определяющими комплементарность (CDR), которые формируют петли, соединяющие и в некоторых случаях образующие часть структуры β-листа. Вариабельность, как правило, сосредоточена в CDR или гипервариабельных областях, которые находятся в вариабельных доменах как легкой, так и тяжелой цепей.

CDR в каждой цепи скреплены вместе в непосредственной близости за счет областей FR и вместе с CDR другой цепи способствуют формированию антигенсвязывающего сайта антител (см. Rabat E.A. et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987)). При использовании в настоящем документе термин "области, определяющие комплементарность" означает последовательности в пределах вариабельных областей связывающих молекул, таких как иммуноглобулины, которые образуют антигенсвязывающий сайт, комплементарный по форме и распределению заряда эпитопу, распознаваемому на антигене. Области CDR могут быть специфичными по отношению к линейным эпитопам, прерывистым эпитопам или конформационным эпитопам белков или фрагментов белков, которые присутствуют на белке либо в его нативной конформации, либо в некоторых случаях на денатурированном белке, например, в результате солиubilизации в SDS. Эпитопы также могут состоять из посттрансляционных модификаций белков.

Кроме того, возможна замена одного или более остатков CDR или пропуск одной или более CDR. В научной литературе описаны случаи, когда можно обойтись без одной или двух CDR в антителах для обеспечения связывания. В работе Padlan et al. (1995 FASEB J. 9:133-139) были проанализированы контактные области между антителами и их антигенами на основании опубликованных кристаллических структур и сделан вывод, что только приблизительно треть остатков CDR на самом деле вступает в контакт с антигеном. В этой работе также обнаружено множество антител, в которых одна или две CDR не содержат аминокислот, контактирующих с антигеном (см. также Vajdos et al. 2002, J. Mol. Biol. 320:415-428).

Остатки CDR, не контактирующие с антигеном, можно определить на основании предыдущих исследований (например, остатки H60-H65 в CDRH2 часто не требуются) по областям CDR Кабата, лежащим вне CDR Чотиа, посредством молекулярного моделирования и/или эмпирическим путем. Если CDR или их остатки пропущены, они обычно замещены аминокислотами, занимающими соответствующее

положение в другой последовательности человеческого антитела, или консенсус таких последовательностей. Положения для замены в пределах CDR и аминокислот могут также быть выбраны эмпирически.

Константные домены не участвуют напрямую в связывании антитела с антигеном, но выполняют различные эффекторные функции, такие как влияние на участие антитела в антителозависимой клеточной токсичности.

В одном аспекте настоящего документа описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы, содержащие вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий одну или более областей, определяющих комплементарность (CDR), как определено в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и/или SEQ ID NO: 9. Например, в настоящем документе описаны связывающие IL-25 молекулы, содержащие вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий некоторое количество CDR, как указано в SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9. Кроме того, описаны связывающие IL-25 молекулы, содержащие вариабельный домен тяжелой цепи, причем вариабельный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO 15.

Следует понимать и иметь в виду в настоящем документе, что описанные определяющие комплементарность области вариабельных доменов тяжелой цепи в описанных связывающих IL-25 молекулах могут быть непрерывными или разделенными 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 аминокислотами. Таким образом, в настоящем документе описаны связывающие IL-25 молекулы, содержащие по меньшей мере две CDR, при этом первая CDR отделена от второй CDR 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотами. Например, в настоящем документе описаны связывающие IL-25 молекулы, содержащие по меньшей мере две CDR, причем первая CDR содержит SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7, а вторая CDR содержит SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 8, и при этом первая CDR и вторая CDR разделены 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотами. Кроме того, в настоящем документе описаны связывающие IL-25 молекулы, содержащие три CDR, причем первая CDR содержит SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7; вторая CDR содержит SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 8; и третья CDR содержит SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 9; и при этом вторая CDR и третья CDR разделены 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 аминокислотами.

Следует понимать и иметь в виду в настоящем документе, что связывающие IL-25 молекулы могут содержать вариабельный домен легкой цепи вместо вариабельного домена тяжелой цепи или в дополнение к нему. Таким образом, в одном аспекте настоящего документа описаны связывающие IL-25 молекулы, содержащие вариабельный домен легкой цепи, содержащий одну или более CDR, как определено в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и/или SEQ ID NO: 12. Например, в настоящем документе описаны связывающие IL-25 молекулы, содержащие вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR, как указано в SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12. Кроме того, в настоящем документе описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы, содержащие вариабельный домен легкой цепи, причем вариабельный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO 16.

Следует понимать и иметь в виду в настоящем документе, что описанные определяющие комплементарность области вариабельных доменов легкой цепи в описанных связывающих IL-25 молекулах могут быть непрерывными или разделенными 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 аминокислотами. Таким образом, в настоящем документе описаны связывающие IL-25 молекулы, содержащие вариабельный домен легкой цепи, причем такой вариабельный домен легкой цепи содержит по меньшей мере две CDR, при этом первая CDR отделена от второй CDR 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотами. Например, в настоящем документе описаны связывающие IL-25 молекулы, содержащие по меньшей мере две CDR, причем первая CDR содержит SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 22, а вторая CDR содержит SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 23, и при этом первая CDR и вторая CDR разделены 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотами. Кроме того, в настоящем документе описаны связывающие IL-25 молекулы, содержащие вариабельный домен легкой цепи, причем такой вариабельный домен легкой цепи содержит три CDR, при этом первая CDR содержит SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10; вторая CDR содержит SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 11; и третья CDR содержит SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 12; и при этом вторая CDR и третья CDR разделены 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 аминокислотами.

В одном аспекте следует понимать и иметь в виду в настоящем документе, что описанные связывающие IL-25 молекулы могут содержать как вариабельный домен тяжелой цепи, так и вариабельный домен легкой цепи. Следует также понимать, что указанные связывающие IL-25 молекулы могут содержать одну, две или три CDR вариабельного домена тяжелой цепи в комбинации с одной, двумя или тре-

мя CDR переменного домена легкой цепи, описанных в настоящем документе. Соответственно, связывающие IL-25 молекулы могут содержать одну, две или три CDR переменных доменов тяжелой цепи, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и/или SEQ ID NO: 9, и одну, две или три CDR переменных доменов легкой цепи, выбранные из группы, содержащей SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и/или SEQ ID NO: 12. Например, в настоящем документе описаны связывающие IL-25 молекулы, содержащие переменный домен тяжелой цепи, причем переменный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO 15, и переменный домен легкой цепи, причем переменный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 16.

Соответственно, в одном варианте осуществления представлена связывающая IL-25 молекула, обозначенная ABM109, которая содержит антигенсвязывающий сайт, содержащий по меньшей мере один переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), который содержит в своей последовательности гиперпеременные области CDR1, CDR2 и CDR3, причем указанная CDR1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (SYWIE), указанная CDR2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (QILPGIGSTNYNEKFKG) и указанная CDR3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (GYGNYGDY); или непосредственные эквиваленты их CDR. В одном аспекте связывающая IL-25 молекула (такая как, например, ABM109) может также содержать по меньшей мере один переменный домен легкой цепи иммуноглобулина (V_L), который содержит в своей последовательности гиперпеременные области CDR1', CDR2' и CDR3', причем указанная CDR1' имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (RASESVDSYGNFSM), указанную CDR2', имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (RASNLES), и указанную CDR3', имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 (QQSNEDPLT) или непосредственные эквиваленты их CDR'.

В одном аспекте также описана связывающая IL-25 молекула, обозначенная ABM125, которая содержит антигенсвязывающий сайт, содержащий по меньшей мере один переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H), который содержит в своей последовательности гиперпеременные области CDR1, CDR2 и CDR3, причем указанная CDR1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 (TSGMGVG), указанная CDR2' имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 (HIWDDVKRYNPALKS) и указанная CDR3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 (TLPHFDDY); или непосредственные эквиваленты их CDR. В одном аспекте связывающая IL-25 молекула (такая как, например, ABM125) может также содержать по меньшей мере один переменный домен легкой цепи иммуноглобулина (V_L), который содержит в своей последовательности гиперпеременные области CDR1', CDR2' и CDR3', причем указанная CDR1' имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 (SASSSVSYMY), указанная CDR2' имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 (RTSNLAS) и указанная CDR3' имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 (KQYNSYPPTWT) или непосредственные эквиваленты их CDR'.

Как отмечено выше, описанные связывающие IL-25 молекулы могут также представлять собой фрагменты антител. Используемый в настоящем документе термин "антитело или его фрагменты" охватывает химерные антитела и гибридные антитела с биспецифичностью или мультиспецифичностью к антигену или эпитопу, а также фрагменты, такие как $F(ab')_2$, Fab', Fab, Fv, sFv, dAb, фрагменты области, определяющей комплементарность (CDR), одноцепочечные антитела (scFv), бивалентные одноцепочечные антитела, диатела, триатела, тетраатела, полипептиды, которые содержат по меньшей мере фрагмент иммуноглобулина, который выполнен с возможностью обеспечивать специфическое связывание антигена полипептидом, и т.д., включая гибридные фрагменты. Таким образом, предложены фрагменты антител, которые сохраняют способность связывать свои специфические антигены. Например, фрагменты антител, которые сохраняют активность связывания IL-25, также включены в понятие термина "антитело или его фрагмент". Такие антитела и фрагменты могут быть получены с использованием методик, известных специалистам в данной области, и могут проходить скрининг на специфичность и активность в соответствии со способами, приведенными в примерах, а также в целом со способами получения антител и скрининга антител на специфичность и активность (см. Harlow and Lane. *Antibodies, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Publications, New York, (1988)).

В понятие термина "антитело или его фрагменты" также включены конъюгаты фрагментов антитела и антигенсвязывающих белков (одноцепочечные антитела). Конъюгированными антителами или фрагментами называют антитела или фрагменты, которые функционально связаны или иным образом физически или функционально ассоциированы с эффекторной функциональной группой или меткой, такими как, среди прочего, токсичное соединение, радиоактивное соединение, флуоресцентное соединение, липосома или фермент, как описано, например, в патенте США № 4704692, содержание которого путем ссылки включено в настоящий документ.

Независимо от структуры, описанные в настоящем документе антигенсвязывающие фрагменты могут связываться с тем же антигеном, который распознается интактным иммуноглобулином. Антигенсвязывающий фрагмент может содержать пептид или полипептид, содержащий аминокислотную последовательность из по меньшей мере 2 непрерывных аминокислотных остатков, по меньшей мере 5 непрерывных аминокислотных остатков, по меньшей мере 10 непрерывных аминокислотных остатков, по

меньшей мере 15 непрерывных аминокислотных остатков, по меньшей мере 20 непрерывных аминокислотных остатков, по меньшей мере 25 непрерывных аминокислотных остатков, по меньшей мере 30 непрерывных аминокислотных остатков, по меньшей мере 35 непрерывных аминокислотных остатков, по меньшей мере 40 непрерывных аминокислотных остатков, по меньшей мере 50 непрерывных аминокислотных остатков, по меньшей мере 60 непрерывных аминокислотных остатков, по меньшей мере 70 непрерывных аминокислотных остатков, по меньшей мере 80 непрерывных аминокислотных остатков, по меньшей мере 90 непрерывных аминокислотных остатков, по меньшей мере 100 непрерывных аминокислотных остатков, по меньшей мере 125 непрерывных аминокислотных остатков, по меньшей мере 150 непрерывных аминокислотных остатков, по меньшей мере 175 непрерывных аминокислотных остатков, по меньшей мере 200 непрерывных аминокислотных остатков или по меньшей мере 250 непрерывных аминокислотных остатков аминокислотной последовательности связывающей молекулы.

Такие фрагменты, независимо от того, связаны ли они с другими последовательностями или нет, могут также включать в себя вставки, делеции, замены или другие выборочные модификации определенных областей или конкретных аминокислотных остатков при условии, что активность антитела или фрагмента антитела существенно не изменяется или не ухудшается по сравнению с немодифицированным антителом или фрагментом антитела. Подобные модификации могут придавать некоторые дополнительные свойства, такие как удаление/добавление аминокислот, способных образовывать дисульфидную связь, увеличение биологической долговечности, изменение секреторных характеристик и т.д. В любом случае антитело или фрагмент антитела должны обладать биоактивным свойством, например специфически связываться со своим распознанным антигеном. Функциональные или активные области антитела или фрагмента антитела можно идентифицировать с помощью мутагенеза специфической области белка с последующей экспрессией и тестированием экспрессированного полипептида. Такие способы будут очевидны специалисту, практикующему в данной области, и могут включать в себя сайт-специфический мутагенез нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело или фрагмент антитела. (Zoller, M.J. *Curr. Opin. Biotechnol.* 3:348-354, 1992).

Используемый в настоящем документе термин "функциональный вариант" относится к связывающей молекуле, которая содержит нуклеотидную и/или аминокислотную последовательность, измененную на один или более нуклеотидов и/или аминокислот по сравнению с нуклеотидной и/или аминокислотной последовательностями исходной связывающей молекулы, и которая по-прежнему выполнена с возможностью конкурирования за связывание партнером по связыванию, например, IL-25 (включая IL-25), с исходной связывающей молекулой. Иными словами, модификации аминокислотной и/или нуклеотидной последовательности исходной связывающей молекулы существенно не влияют на характеристики связывания - или не меняют их связывающей молекулы, которая кодирована нуклеотидной последовательностью или содержит аминокислотную последовательность, т.е. связывающая молекула по-прежнему выполнена с возможностью распознавания своей мишени и связывания с ней. Функциональный вариант может иметь консервативные модификации последовательности, в том числе нуклеотидные и аминокислотные замены, добавления и делеции. Такие модификации могут быть введены с помощью стандартных методик, известных специалистам в области, таких как сайт-направленный мутагенез и случайный ПЦР-опосредованный мутагенез, и могут включать в себя природные, а также синтетические нуклеотиды и аминокислоты.

Как описано в настоящем документе, связывающие молекулы, антитела, фрагменты и варианты выполнены с возможностью специфически связываться с антигенной мишенью, такой как, например, IL-25. Используемый в настоящем документе термин "специфическое связывание" в отношении взаимодействия связывающей молекулы, например антитела, и ее партнера по связыванию, например антитела, означает, что взаимодействие зависит от наличия определенной структуры, например антигенной детерминанты или эпитопа, на партнере связывания. Иными словами, антитело предпочтительно связывается с партнером по связыванию или распознает его, даже если партнер по связыванию присутствует в смеси других молекул. Связывание может быть опосредовано ковалентными или нековалентными взаимодействиями или их комбинацией. Другими словами, термин "специфическое связывание" означает иммуноспецифическое связывание с определенным антигеном или его фрагментом, но не иммуноспецифическое связывание с другими антигенами. Связывающая молекула, которая иммуноспецифически связана с антигеном, может быть связана с другими пептидами или полипептидами с более низкой аффинностью, что определяется с помощью, например, радиоиммунного анализа (РИА), твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), ВІАсоге или других методик анализа, известных специалистам в области. Связывающие молекулы или их фрагменты, которые иммуноспецифически связаны с антигеном, могут перекрестно реагировать с родственными антигенами. Связывающие молекулы или их фрагменты, которые иммуноспецифически связаны с антигеном, предпочтительно не вступают в перекрестную реакцию с другими антигенами.

В одном аспекте описанные антитела или связывающие молекулы, описанные в настоящем документе, могут представлять собой человеческие антитела или человеческие связывающие молекулы. Термин "человеческий" в применении к связывающим молекулам в соответствии с определением в настоя-

шем документе относится к молекулам, которые либо получены непосредственно от человека, либо получены на основе человеческой последовательности. Если связывающая молекула получена от человека или получена на основе человеческой последовательности, а затем была модифицирована, ее по-прежнему следует рассматривать как человеческую, и такой подход используется во всем приведенном описании. Другими словами, термин "человеческий" в применении к связывающим молекулам призван включать в себя связывающие молекулы с переменными и константными областями, полученными из последовательностей иммуноглобулина зародышевых линий человека, на основе переменных или константных областей либо не присутствующих у человека или лимфоцитах человека, либо присутствующих в модифицированной форме. Таким образом, человеческие связывающие молекулы могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевых линий человека, содержать замены и/или делеции (например, мутации, вводимые, например, посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или посредством соматической мутации *in vivo*). Используемый в настоящем документе термин "на основе" относится к ситуации, когда последовательность нуклеиновой кислоты может быть точно скопирована с матрицы или с незначительными мутациями, например, с использованием подверженных ошибкам методов ПЦР или синтетическим путем в точном соответствии с матрицей или с незначительными модификациями. В соответствии с настоящим документом полусинтетические молекулы на основе человеческих последовательностей также считаются человеческими.

При необходимости, антитела продуцируют в организмах других видов и "гуманизируют" для введения человеку. Гуманизированные формы не относящихся к человеку (например, мышиных) антител могут представлять собой химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (например, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или другие антигенсвязывающие субпоследовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина, не относящегося к человеку. Гуманизированные антитела включают в себя человеческие иммуноглобулины (антитело-реципиент), в которых остатки из области, определяющей комплементарность (CDR), реципиента заменены остатками из области, определяющей комплементарность, не относящегося к человеку вида (антитело-донор), например мыши, крысы или кролика, обладающей желаемой специфичностью, аффинностью и способностью. В некоторых случаях остатки каркаса Fv человеческого иммуноглобулина заменяют соответствующими остатками, не относящимися к человеку. Гуманизированные антитела могут также содержать остатки, которые не присутствуют ни в антителе реципиента, ни в последовательностях импортированной CDR или каркаса. Как правило, гуманизированное антитело будет содержать по существу все по меньшей мере из одного, а обычно двух переменных доменов, в которых все или по существу все из CDR-областей соответствуют подобным в иммуноглобулине, не относящемся к человеку, а все или по существу все каркасные области соответствуют подобным консенсусным последовательностям человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело также будет оптимально содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, иммуноглобулина, который относится к человеку (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988) и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)).

Способы гуманизации антител, не относящихся к человеку, хорошо известны специалистам в данной области. Как правило, гуманизированное антитело содержит один или более аминокислотных остатков, введенных в его последовательность из источника, который не относится к человеку. Такие не относящиеся к человеку аминокислотные остатки часто называют "импортированными" остатками, которые обычно получают из "импортированной" переменной области. Гуманизация может по существу проводиться в соответствии со способом, предложенным Winter et al. (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)), посредством использования CDR грызуна или последовательностей CDR вместо соответствующих последовательностей человеческого антитела. Соответственно, такие "гуманизированные" антитела являются химерными антителами (патент США № 4816567), в которых по существу менее чем интактный человеческий переменный домен замещен соответствующей последовательности видов, не относящихся к человеку. На практике гуманизированные антитела обычно представляют собой человеческие антитела, в которых некоторые остатки CDR и, возможно, некоторые остатки FR замещены остатками из аналогичных сайтов антител грызунов.

Выбор человеческих переменных доменов как тяжелой, так и легкой цепи, которые будут использованы для приготовления гуманизированных антител, очень важен для снижения антигенности. Согласно методу "оптимального соответствия" проводят скрининг последовательности переменного домена антитела грызуна по отношению ко всей библиотеке известных человеческих последовательностей переменного домена. Человеческая последовательность, наиболее близкая к последовательности грызуна, принимается в качестве человеческого каркаса (FR) для гуманизированного антитела (Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993) и Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). В другом методе используется конкретный каркас, полученный из консенсусной последовательности всех человеческих антител конкретной подгруппы легких или тяжелых цепей. Один и тот же каркас может быть использован для нескольких различных гуманизированных антител (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992);

Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)).

В некоторых аспектах может быть важно, чтобы антитела были гуманизированы с сохранением высокой аффинности к антигену и других благоприятных биологических свойств. Для достижения этой цели и в соответствии с предпочтительным способом гуманизованные антитела получают в процессе анализа исходных последовательностей и различных концептуальных гуманизованных продуктов при помощи трехмерных моделей исходных и гуманизованных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулинов обычно доступны и хорошо известны специалистам в этой области. Существуют компьютерные программы, которые иллюстрируют и отображают возможные трехмерные конформационные структуры выбранных иммуноглобулиновых последовательностей кандидатов. Исследование этих изображений позволяет анализировать вероятную роль остатков в функционировании иммуноглобулиновой последовательности кандидата, т.е. проводить анализ остатков, которые влияют на способность иммуноглобулина кандидата связывать свой антиген. Таким образом, остатки FR могут быть выбраны и скомбинированы из консенсусной и импортированной последовательности так, чтобы получить желаемую характеристику антитела, такую как повышенную аффинность к целевому антигену(ам). Как правило, остатки CDR непосредственно и по существу имеют отношение к воздействию на связывание антигена (см. WO 94/04679, опубликованную 3 марта 1994 г.).

В одном конкретном аспекте гуманизованная версия АВМ109, обозначенная АВМ109.2, содержит некоторое количество CDR тяжелой и легкой цепи АВМ109 и сохраняет специфическое связывание и нейтрализацию IL-25 человека, мыши и обезьяны. Варибельные области тяжелой и легкой цепи приведены в SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 соответственно.

Описаны клетки гибридомы, которые продуцируют моноклональное антитело. Используемый в настоящем документе термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному по существу из однородной популяции антител, т.е. отдельные антитела, содержащие популяцию, идентичны, если не учитывать возможные мутации природного происхождения, которые могут присутствовать в незначительных количествах. В настоящем документе моноклональные антитела, как правило, включают в себя "химерные" антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных от конкретных видов или принадлежащих к определенному классу или подклассу антител, при этом остальная цепь(и) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных от других видов или принадлежащих другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител, при условии что они проявляют желаемую активность (см. патент США № 4816567 и Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)).

Моноклональные антитела могут быть получены гибридомными методами, такими как описанные в работе Kohler и Milstein, Nature, 256:495 (1975) или Harlow и Lane. Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Publications, New York (1988). В способе с гибридомой мышь или другое подходящее животное-хозяина, как правило, иммунизируют иммунизирующим агентом для выработки лимфоцитов, продуцирующих или способных продуцировать антитела, которые будут специфически связываться с иммунизирующим агентом. В альтернативном варианте осуществления лимфоциты могут быть иммунизированы *in vitro*. Иммунизирующий агент предпочтительно содержит IL-25. Генерация моноклональных антител традиционно зависела от доступности очищенного белка или пептидов для использования в качестве иммуногена. В последнее время была доказана перспективность иммунизации с использованием ДНК как способа вызвать сильные иммунные ответы и продуцировать моноклональные антитела. В рамках данного подхода можно применить иммунизации с использованием ДНК, причем ДНК, кодирующая часть IL-25, экспрессированная в виде гибрида белка с человеческим IgG1, вводят животному-хозяину в соответствии со способами, известными специалистам в области (например, Kilpatrick K.E., et al., Gene gun delivered DNA-based immunizations mediate rapid production of murine monoclonal antibodies to the Flt-3 receptor. Hybridoma. 1998 Dec; 17(6):569-76; Kilpatrick K.E. et al., High-affinity monoclonal antibodies to PED/PEA-15 generated using 5 µg of DNA. Hybridoma. 2000 Aug; 19(4):297-302, которые полностью включены в настоящий документ путем ссылки на способы продукции антител), и как описано в примерах.

Альтернативный подход к иммунизациям с использованием либо очищенного белка, либо ДНК заключается в применении антигена, экспрессированного в бакуловирусе. К преимуществам такой системы относятся простота генерации, высокие уровни экспрессии и посттрансляционные модификации, которые отличаются большим сходством по сравнению с наблюдаемыми в системах млекопитающих. Использование такой системы включает в себя экспрессию доменов антитела к IL-25 в форме гибридных белков. Антиген получают вставкой фрагмента гена в рамку считывания между сигнальной последовательностью и доменом зрелого белка нуклеотидной последовательности антитела к IL-25. Это приводит к образованию чужеродных белков на поверхности вириона. Такой способ обеспечивает иммунизацию полным вирусом, избавляя от необходимости очистки целевых антигенов.

Как правило, если необходимы клетки человеческого происхождения, в способах получения моноклональных антител используют лимфоциты периферической крови ("ЛПК"), а если необходимы источники млекопитающих, не относящихся к человеку, применяют клетки селезенки или клетки лимфатического узла. Затем выполняют слияние лимфоцитов с иммортализованной клеточной линией с использо-

ванием приемлемого вызывающего слияние агента, такого как полиэтиленгликоль, с образованием клетки гибридомы (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), p. 59-103). Иммутизированные клеточные линии обычно представляют собой трансформированные клетки млекопитающего, включая миеломные клетки, происходящие от грызуна, коровы, лошади или человека. Как правило, применяют крысиные или мышинные миеломные клеточные линии. Клетки гибридомы могут быть культивированы в приемлемой питательной среде, которая предпочтительно содержит одно или более веществ, ингибирующих рост или выживаемость неслитых, иммутизированных клеток. Например, если в исходных клетках отсутствует фермент гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансфераза (HGPRT или HPRT), питательная среда для гибридом, как правило, будет включать в себя гипоксантин, аминоптерин и тимидин ("среда HAT"), которые предотвращают рост HGPRT-дефицитных клеток. Предпочтительными иммутизированными клеточными линиями являются линии, которые обеспечивают эффективное слияние, поддерживают стабильный высокий уровень экспрессии антитела выбранными антитело-продуцирующими клетками и являются восприимчивыми к среде, такой как среда HAT. Более предпочтительными иммутизированными клеточными линиями являются мышинные миеломные линии, которые могут быть получены, например, из Центра дистрибуции клеток института Солка, г. Сан-Диего, штат Калифорния, США и Американской коллекции типовых культур, г. Роквилл, штат Мэриленд, США. Для получения человеческих моноклональных антител также описывали использование человеческих миеломных и мышино-человеческих гетеромиеломных клеточных линий (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., "Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications", Marcel Dekker, Inc., New York (1987), p. 51-63). Питательная среда, в которой культивируют клетки гибридомы, впоследствии может быть оценена на наличие моноклональных антител, направленных против IL-25. Предпочтительно специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых клетками гибридомы, определяют с помощью иммунопреципитации или с помощью анализа связывания *in vitro*, такого как радиоиммунный анализ (РИА) или иммуноферментный анализ (твердофазный ИФА). Такие методики и анализы известны специалистам в данной области и описаны далее в примерах ниже или в Harlow and Lane *Antibodies, A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Publications, New York (1988).

После идентификации желаемых клеток гибридомы клоны могут быть субклонированы посредством метода ограниченных серийных разведений или с помощью процедур цитометрии посредством сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) и выращены с помощью стандартных методов. Приемлемые питательные среды для этой цели включают, например, модифицированную по способу Дульбекко среду Игла и среду RPMI-1640. В альтернативном варианте осуществления клетки гибридомы могут быть выращены *in vivo* в виде асцитной опухоли у млекопитающего.

Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, могут быть выделены или очищены из питательной среды или асцитической жидкости посредством стандартных методов очистки иммуноглобулина, таких как, например, хроматография с белком А-сефарозой, белком G, гидроксипатитом, гелелектрофорез, диализ или аффинная хроматография.

Используемый в настоящем документе термин "выделенный" применительно к связывающим молекулам относится к связывающим молекулам, которые по существу не содержат других белков или полипептидов, в особенности не содержат других связывающих молекул, имеющих отличающиеся характеристики антигенной специфичности, а также по существу не содержат других клеточных или тканевых материалов и/или химических предшественников или других химических соединений. Например, если связывающие молекулы получены с помощью рекомбинантных технологий, они предпочтительно по существу не содержат культуральной среды, а если связывающие молекулы получены с помощью химического синтеза, они предпочтительно по существу не содержат химических предшественников или других химических веществ, т.е. они отделяются от химических предшественников или других химических веществ, которые были задействованы в синтезе белка. По существу не содержит предпочтительно означает, что связывающая молекула будет обычно содержать приблизительно 50, 60, 70, 80 или 90 вес./вес.% образца, более типично приблизительно 95% и предпочтительно будет более чем на 99% чистой.

Моноклональные антитела могут быть также получены посредством методов рекомбинантной ДНК, таких как описанные в патенте США № 4816567. ДНК, кодирующая моноклональные антитела, может быть легко выделена и секвенирована посредством стандартных методов (например, с помощью олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи мышинных антител). Клетки гибридомы выступают в качестве предпочтительного источника такой ДНК. После выделения ДНК может вводиться в экспрессионные векторы, которые затем трансфицируются в клетки-хозяина, такие как клетки COS обезьяны, клетки яичников китайского хомячка (СНО), клетки плазмцитомы или клетки миеломы, которые в иных ситуациях не продуцируют иммуноглобулиновый белок с тем, чтобы добиться синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяина. ДНК может также быть модифицирована, например, посредством замены константных доменов кодирующей последовательности тяжелых и легких цепей человека на гомологичные последовательности мыши (патент США № 4816567) или же посредством ковалентного связывания кодирующей последовательности иммуноглобулина со всей кодирующей последовательностью неиммуноглобулино-

вого полипептида или с ее частью. При необходимости такой неиммуноглобулиновый полипептид используют для замещения константных доменов антитела или переменных доменов одного антигенсвязывающего сайта антитела для создания химерного бивалентного антитела, содержащего один антигенсвязывающий сайт, имеющий специфичность к IL-25 (включая IL-25), и другой антигенсвязывающий сайт, имеющий специфичность к другому антигену.

Способы *in vitro* также пригодны для получения моновалентных антител. Расщепление антител для получения их фрагментов, в частности фрагментов Fab, может быть достигнуто посредством применения стандартных методик известных специалистам в области. Например, расщепление может быть осуществлено с использованием папаина. Примеры расщепления с использованием папаина описаны в WO 94/29348, опубликованной 22 декабря 1994 г, патенте США № 4342566 и Harlow и Lane *Antibodies, A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Publications, New York, (1988). Расщепление антител папаином, как правило, приводит к образованию двух идентичных антигенсвязывающих фрагментов, называемых фрагментами Fab, каждый из которых включает в себя один антигенсвязывающий сайт и остаточный фрагмент Fc. Обработка пепсином приводит к образованию фрагмента, называемого фрагментом F(ab')₂, который включает в себя два антигенсвязывающих сайта и по-прежнему способен к перекрестному связыванию антигена.

Фрагменты Fab, полученные в результате расщепления антитела, также содержат константные домены легкой цепи и первый константный домен тяжелой цепи. Фрагменты Fab' отличаются от фрагментов Fab добавлением нескольких остатков в карбоксильном конце домена тяжелой цепи, в том числе один или более цистеинов из шарнирной области антитела. Фрагмент F(ab)₂ представляет собой бивалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области. В настоящем документе обозначение Fab'-SH используется для Fab', в котором цистеиновый(ые) остаток(ки) константных доменов содержат свободную тиольную группу. Фрагменты антитела первоначально получались в виде пары Fab' фрагментов с шарнирными цистеинами между ними. Известны также и другие формы химической связи фрагментов антитела.

В альтернативном варианте осуществления раскрываемые антитела могут быть получены с использованием трансгенных животных (например, мышей), которые при иммунизации в состоянии продуцировать полный набор человеческих антител в отсутствие продукции эндогенного иммуноглобулина. Например, было показано, что гомозиготная делеция в гене соединительной области тяжелой цепи антитела (JH) в химерных и зародышевых линиях мутантных мышей приводит к полному ингибированию эндогенной продукции антитела. Передача генной матрицы иммуноглобулина зародышевой линии человека в таких зародышевых линиях мутантных мышей при антигенной стимуляции будет приводить к продукции человеческих антител (см., например, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551-255 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immuno.*, 7:33 (1993)). Человеческие антитела можно также продуцировать с использованием библиотек фагового дисплея (Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)). Кроме того, доступны методики, предложенные в работах Cote et al. и Voerner et al., для получения человеческих моноклональных антител (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Voerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991)).

Кроме того, приводится выделенный иммуногенно специфический паратоп или фрагмент антитела. Специфический иммуногенный эпитоп антитела может быть выделен из цельного антитела посредством химического или механического разрушения молекулы. Проводили тестирование полученных таким образом фрагментов, чтобы определить их иммуногенность и специфичность посредством способов, представленных в настоящем документе. При необходимости иммунореактивные паратопы можно синтезировать напрямую. Иммунореактивный фрагмент определяют как аминокислотную последовательность по меньшей мере из приблизительно от двух до пяти последовательных аминокислот, полученных из аминокислотной последовательности антитела.

Один из способов получения белков, содержащих антитела, включает связывание вместе двух или более пептидов или полипептидов с помощью методик химии белков. Например, пептиды или полипептиды могут быть химически синтезированы с помощью существующего в настоящее время лабораторного оборудования с использованием химических свойств Fmoc (9-флуоренилметилоксикарбонил) или Boc (трет-бутилоксикарбонил). (Applied Biosystems, Inc., г. Фостер-Сити, штат Калифорния). Специалисту в данной области будет очевидно, что пептид или полипептид, соответствующие антителу, например, можно синтезировать с помощью стандартных химических реакций. Например, пептид или полипептид могут быть синтезированы без отщепления от своей смолы для синтеза, при этом другой фрагмент антитела можно синтезировать с последующим отщеплением от смолы, тем самым обеспечивая доступ к терминальной группе, которая функционально блокирована на другом фрагменте. С помощью реакций конденсации пептидов эти два фрагмента можно ковалентно соединить посредством пептидной связи на их карбоксильных и аминных концевых группах соответственно с образованием антитела или его фрагмента. (Grant G.A. (1992), *Synthetic Peptides: A User Guide*. W.H. Freeman and Co., N.Y. (1992); Bodansky M. and Trost B., Ed. (1993), *Principles of Peptide Synthesis*. Springer-Verlag Inc., NY. В альтернативном варианте осуществления пептид или полипептид независимо синтезируют *in vivo*, как описано

выше. После выделения такие независимые пептиды или полипептиды могут быть связаны с образованием антитела или его фрагмента посредством аналогичных реакций конденсации пептидов.

Например, ферментативное лигирование клонированных или синтетических сегментов пептидов позволяет связывать сравнительно короткие фрагменты пептидов, чтобы получить большие по размерам фрагменты пептидов, полипептиды или полные домены белков (Abrahmsen L et al., *Biochemistry*, 30:4151 (1991)). В альтернативном варианте осуществления нативное химическое лигирование синтетических пептидов можно использовать для синтетического конструирования больших пептидов или полипептидов из более коротких пептидных фрагментов. Данный способ состоит из двух стадий химической реакции (Dawson et al., *Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. Science*, 266:776-779 (1994)). Первая стадия представляет собой хемоселективную реакцию незащищенного синтетического альфа-тиоэфира пептида с другим незащищенным сегментом пептида, содержащим аминоконцевой остаток Cys для получения связанного с тиоэфиром интермедиата в качестве исходного ковалентного продукта. Без изменений в условиях реакции такой интермедиат вступает в спонтанную, быструю внутримолекулярную реакцию с образованием нативной пептидной связи в сайте лигирования. Применение такого способа нативного химического лигирования для полного синтеза молекулы белка продемонстрировано на примере получения человеческого интерлейкина-8 (IL-8) (Baggiolini M. et al. (1992), *FEBS Lett.* 307:97-101; Clark-Lewis I. et al., *J. Biol. Chem.*, 269:16075 (1994); Clark-Lewis I. et al., *Biochemistry*, 30:3128 (1991); Rajarathnam K. et al., *Biochemistry*, 33:6623-30 (1994)).

В альтернативном варианте осуществления сегменты незащищенного пептида химически связаны там, где связь, образованная между сегментами пептида в результате химического лигирования, не является природной (пептидной) связью (Schnolzer, M. et al., *Science*, 256:221 (1992)). Такую методику использовали для синтеза аналогов доменов белков, а также больших количеств сравнительно чистых белков с полной биологической активностью (deLisle Milton R.C. et al., *Techniques in Protein Chemistry IV. Academic Press, New York*, p. 257-267 (1992)).

Кроме того, описаны фрагменты антител, обладающие биологической активностью. Полипептидные фрагменты могут представлять собой рекомбинантные белки, полученные клонированием нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид, в системе экспрессии, способной продуцировать их полипептидные фрагменты, такой как аденовирусная или бакуловирусная система экспрессии. Например, можно определить активный домен антитела из специфической гибридомы, который может вызывать биологический эффект, связанный со взаимодействием антитела с IL-25. Например, аминокислоты, которые, как оказалось, не способствуют активности или специфичности связывания, могут быть удалены без потери соответствующей активности. Например, в различных вариантах осуществления аминокислоты аминного или карбоксильного концевой участка последовательно удаляют из нативной или модифицированной неиммуноглобулиновой молекулы или иммуноглобулиновой молекулы и анализируют соответствующую активность посредством одного из многих имеющихся способов анализа. В другом примере фрагмент антитела включает в себя модифицированное антитело, в котором по меньшей мере одной аминокислотой заменили аминокислоту природного происхождения в конкретном положении, а часть либо аминных концевых, либо карбоксильных концевых аминокислот, либо внутренняя область антитела были заменены полипептидным фрагментом или другой функциональной группой, такой как биотин, что может упростить очистку модифицированного антитела. Например, может быть выполнено слияние модифицированного антитела со связывающим мальтозу белком с помощью либо химии пептидов, либо клонирования соответствующих нуклеиновых кислот, кодирующих два полипептидных фрагмента, в один вектор экспрессии так, что экспрессия кодирующей области приводит к образованию гибридного полипептида. Гибридный полипептид может быть афинно очищен посредством пропускания через амлозную аффинную колонку, а затем модифицированный рецептор антитела может быть отделен от связывающей мальтозу области посредством отщепления гибридного полипептида с использованием специфического протеазного фактора Ха. (См., например, *New England Biolabs Product Catalog*, 1996, p. 164.). Аналогичные процедуры очистки также существуют и для выделения гибридных белков из клеток эукариотов.

Такие фрагменты, независимо от того, связаны ли они с другими последовательностями или нет, включают в себя вставки, делеции, замены или другие выборочные модификации определенных областей или конкретных аминокислотных остатков при условии, что активность фрагмента существенно не изменяется или не ухудшается по сравнению с немодифицированным антителом или фрагментом антитела. Подобные модификации могут обеспечивать некоторые дополнительные свойства, например удаление или добавление аминокислот, способных образовывать дисульфидную связь для увеличения его биологической долговечности, для изменения секреторных характеристик и т.д. В любом случае фрагмент должен обладать биологическим свойством, таким как активность связывания, регулирование связывания в домене связывания и т.д. Функциональные или активные области антитела можно определить мутагенезом специфической области белка с последующей экспрессией и тестированием экспрессированного полипептида. Такие способы будут очевидны специалисту, практикующему в данной области, и могут включать в себя сайт-специфический мутагенез нуклеиновой кислоты, кодирующей антиген. (Zoller M.J. et al., *Nucl. Acids Res.* 10:6487-500 (1982)).

Для выбора антител, избирательно связывающихся с конкретным белком, вариантом или фрагментом, можно использовать различные форматы иммуноанализа. Например, твердофазные варианты ИФА стандартным образом используются для выбора антител, обладающих селективной иммунореактивностью по отношению к белку, варианту белка или его фрагменту. См. Harlow and Lane. *Antibodies, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Publications, New York, (1988), в котором приведено описание форматов иммуноанализа и условия, которые могут быть использованы для определения селективного связывания. Аффинность связывания моноклонального антитела может, например, быть определена с помощью анализа Скэтчарда, описанного в Munson and Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Кроме того, предлагается набор реагентов для антитела, содержащий емкости с моноклональным антителом или его фрагментами, и один или более реагентов для обнаружения связывания антитела к IL-25 или его фрагмента с молекулой IL-25. Реагенты могут включать в себя, например, флуоресцентные метки, ферментативные метки или другие метки. Реагенты также могут включать в себя вторичные или третичные антитела или реагенты для ферментативных реакций, причем ферментативные реакции приводят к образованию продукта, который можно визуализировать.

Как отмечено в тексте настоящего документа, в одном аспекте настоящего документа описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы, содержащие вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий одну или более CDR, как определено в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NO: 3.

Кроме того, описаны связывающие IL-25 молекулы из любого предшествующего аспекта, причем CDR представляет собой SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NO: 3.

В одном аспекте настоящего документа описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы из любого предшествующего аспекта, в которых вариабельный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 и/или SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3.

В одном аспекте настоящего документа описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы из любого предшествующего аспекта, в которых SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 разделены 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотами.

В одном аспекте настоящего документа описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы из любого предшествующего аспекта, в которых SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 разделены 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 аминокислотами.

В одном аспекте настоящего документа описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы из любого предшествующего аспекта, в которых вариабельный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 13.

В одном аспекте настоящего документа описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы из любого предшествующего аспекта, дополнительно содержащие вариабельный домен легкой цепи, содержащий одну или более CDR, как определено в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6.

В одном аспекте настоящего документа описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы из любого предшествующего аспекта, в которых вариабельный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 и/или SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6.

В одном аспекте настоящего документа описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы из любого предшествующего аспекта, в которых SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5 разделены 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотами.

В одном аспекте настоящего документа описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы из любого предшествующего аспекта, в которых SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 разделены 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 аминокислотами.

В одном аспекте настоящего документа описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы из любого предшествующего аспекта, в которых вариабельный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO: 14.

В одном аспекте настоящего документа описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы из любого предшествующего аспекта, содержащие вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, причем вариабельный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 13, а вариабельный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO: 14.

В одном аспекте настоящего документа описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы, содержащие вариабельный домен легкой цепи, содержащий одну или более CDR, как определено в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6.

В одном аспекте настоящего документа описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы из любого предшествующего аспекта, в которых вариабельный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 и/или SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6.

В одном аспекте настоящего документа описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы из любого предшествующего аспекта, в которых SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5 разделены 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотами.

В одном аспекте настоящего документа описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы из любого предшествующего аспекта, в которых SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 разделены 25, 26, 27, 28, 29, 30,

31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 аминокислотами.

В одном аспекте настоящего документа описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы из любого предшествующего аспекта, в которых вариабельный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO: 14.

В одном аспекте настоящего документа описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы, содержащие вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий одну или более CDR, как определено в SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9.

В одном аспекте настоящего документа описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы из любого предшествующего аспекта, в которых вариабельный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9 и/или SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9.

В одном аспекте настоящего документа описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы из любого предшествующего аспекта, в которых SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8 разделены 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотами.

В одном аспекте настоящего документа описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы из любого предшествующего аспекта, в которых SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9 разделены 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 аминокислотами.

В одном аспекте настоящего документа описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы из любого предшествующего аспекта, в которых вариабельный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 15.

В одном аспекте настоящего документа описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы из любого предшествующего аспекта, дополнительно содержащие вариабельный домен легкой цепи, содержащий одну или более CDR, как определено в SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12.

В одном аспекте настоящего документа описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы из любого предшествующего аспекта, в которых вариабельный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12 и/или SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12.

В одном аспекте настоящего документа описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы из любого предшествующего аспекта, в которых SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11 разделены 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотами.

В одном аспекте настоящего документа описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы из любого предшествующего аспекта, в которых SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12 разделены 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 аминокислотами.

В одном аспекте настоящего документа описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы из любого предшествующего аспекта, в которых вариабельный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO: 16.

В одном аспекте настоящего документа описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы из любого предшествующего аспекта, содержащие вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, причем вариабельный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 15, а вариабельный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO: 16.

В одном аспекте настоящего документа описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы, содержащие вариабельный домен легкой цепи, содержащий одну или более CDR, как определено в SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12.

В одном аспекте настоящего документа описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы из любого предшествующего аспекта, в которых вариабельный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12; и/или SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12.

В одном аспекте настоящего документа описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы из любого предшествующего аспекта, в которых SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11 разделены 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотами.

В одном аспекте настоящего документа описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы из любого предшествующего аспекта, в которых SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12 разделены 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 аминокислотами.

В одном аспекте настоящего документа описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы из любого предшествующего аспекта, в которых вариабельный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO: 16.

В одном аспекте настоящего документа описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы из любого предшествующего аспекта, в которых вариабельный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 17.

В одном аспекте настоящего документа описаны выделенные связывающие IL-25 молекулы из любого предшествующего аспекта, в которых вариабельный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO: 18.

В одном аспекте настоящего документа описан способ лечения, предотвращения и/или ингибирования воспаления дыхательных путей вследствие риновирусной инфекции, ревматоидного артрита, остеоартрита, эрозии кости, внутрибрюшинных абсцессов и спаек, воспалительного заболевания кишечника, отторжения аллотрансплантата, псориаза, определенных форм рака, ангиогенеза, атеросклероза, кистозного фиброза и рассеянного склероза, включающие введение терапевтического количества любой из связывающих IL-25 молекул из любого предшествующего аспекта.

1. Гомология/идентичность.

Следует понимать, что один из способов определения любых известных вариантов и производных или тех, что могут появиться, структуры описанных в настоящем документе генов и белков, предусматривает определение таких вариантов и производных в соответствии с гомологией с конкретными известными последовательностями. Например, в SEQ ID NO: 13 определена конкретная последовательность переменного домена тяжелой цепи IL-25. В частности, описаны варианты таких и других генов и белков, описанных в настоящем документе, которые могут иметь по меньшей мере 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% гомологии с указанной последовательностью. Специалистам в данной области будут очевидны способы определения гомологии двух белков или нуклеиновых кислот, таких как гены. Например, гомология может быть определена после выравнивания двух последовательностей таким образом, чтобы гомология находилась на самом высоком уровне.

Другой способ определения гомологии может быть выполнен с использованием опубликованных алгоритмов. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно выполнить, применяя алгоритм локальной гомологии Смита и Ватермана, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), посредством алгоритма гомологии выравнивания из работы Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), с помощью способа поиска подобия из работы Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444 (1988), с использованием вариантов компьютерной реализации таких алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., г. Мэдисон, штат Висконсин) или на основе просмотра.

Следует понимать, что, как правило, можно использовать любой из способов и что в некоторых обстоятельствах результаты таких различных способов могут отличаться, но специалисту в данной области будет понятно, что если идентичность будет установлена с помощью по меньшей мере одного из таких способов, будет считаться, что последовательности обладают заявленной идентичностью и будут описаны в настоящем документе.

Например, при использовании в настоящем документе последовательность, отмеченная как имеющая определенный процент гомологии с другой последовательностью, относится к последовательностям, которые обладают указанной гомологией в соответствии с расчетами с использованием любого одного или более методов расчета, описанных выше. Например, первая последовательность имеет 80% гомологии в соответствии с настоящим документом со второй последовательностью, если по результатам расчетов первая последовательность имеет 80% гомологии со второй последовательностью при использовании метода расчетов из работы Zuker, даже если первая последовательность не имеет 80% гомологии со второй последовательностью по результатам расчетов с использованием любых других методов расчета. В другом примере первая последовательность имеет 80% гомологии в соответствии с настоящим документом со второй последовательностью, если по результатам расчетов первая последовательность имеет 80% гомологии со второй последовательностью при использовании метода расчетов из работы Zuker и метода расчетов из работы Pearson and Lipman, даже если первая последовательность не имеет 80% гомологии со второй последовательностью по результатам расчетов с использованием метода расчетов из работы Smith and Waterman, метода расчетов из работы Needleman and Wunsch, методов расчетов из работы Jaeger или любого из других методов расчета. В еще одном примере первая последовательность имеет 80% гомологии в соответствии с настоящим документом со второй последовательностью, если по результатам расчетов первая последовательность имеет 80% гомологии со второй последовательностью при использовании каждого из методов расчетов (хотя на практике различные методы расчетов будут часто приводить к получению различных процентов расчетной гомологии).

2. Пептиды.

а) Варианты белка.

Как обсуждалось в настоящем документе, существуют множество вариантов связывающих IL-25 молекул, и связывающих IL-25 CDR, и переменных областей тяжелой и легкой цепей, описанных в настоящем документе, которые известны и рассматриваются в настоящем документе. В дополнение к известным функциональным вариантам штамма существуют производные связывающих IL-25 молекул, и связывающих IL-25 CDR, и переменных областей тяжелой и легкой цепей, которые также функционируют в описанных способах и композициях. Варианты и производные белка хорошо известны специалистам в данной области и могут включать в себя модификации аминокислотной последовательности. Например, модификации аминокислотной последовательности обычно относятся к одному или более из трех классов: заместительные, инсерционные или делеционные варианты.

Используемый в настоящем документе термин "вставки" относится к изменению в аминокислотной или нуклеотидной последовательности, приводящему к добавлению одного или более аминокислотных или нуклеотидных остатков соответственно, по сравнению с исходной молекулой, часто природного происхождения. Вставки включают в себя слияния аминных и/или карбоксильных концевых участков, а также вставки единичных или множественных аминокислотных остатков внутри последовательности. Вставки обычно будут представлять собой меньшие по масштабам вставки по сравнению с полученными от слияний аминных или карбоксильных концевых участков, например порядка от одного до четырех

остатков. Иммуногенные производные слитых белков, например, описанные в примерах, получают слиянием полипептида, достаточно большого для придания иммуногенности целевой последовательности, посредством перекрестной сшивки *in vitro* или с помощью рекомбинантной клеточной культуры, трансформированной с использованием ДНК, кодирующей слитой белок. Делеции характеризуются удалением одного или более аминокислотных остатков из последовательности белка. Как правило, из любого одного сайта в молекуле белка удаляют не более чем приблизительно от 2 до 6 остатков. Такие варианты обычно получают с помощью сайт-специфического мутагенеза нуклеотидов в ДНК, кодирующей белок, таким образом получая ДНК, кодирующую вариант, с последующей экспрессией ДНК в рекомбинантной клеточной культуре. Методики проведения мутаций по типу замены в заранее заданных сайтах в ДНК, имеющей известную последовательность, хорошо известны, например мутагенез M13 праймера и мутагенез полимеразной цепной реакции ПЦР. Аминокислотные замены обычно составлены из единичных остатков, но могут появиться в нескольких различных положениях одновременно; обычно будет проведено вставок для порядка приблизительно от 1 до 10 аминокислотных остатков; а делеции будут варьироваться приблизительно от 1 до 30 остатков. Делеции или вставки предпочтительно проводят в смежных парах, т.е. делеция 2 остатков или вставка 2 остатков. Замены, делеции, вставки или любые их комбинации могут быть скомбинированы для получения искомого конструкта. Мутации не должны выносить последовательность за пределы рамки считывания и предпочтительно не будут формировать области комплементарности, которые могли бы привести к образованию вторичной структуры мРНК. Заместительными вариантами называют такие, в которых по меньшей мере один остаток был удален, а на его место был введен другой остаток. Такие замены, как правило, проводят в соответствии с табл. 2 и называют консервативными заменами.

Таблица 1

Сокращения названий аминокислот		
Аминокислота	Сокращения	
Аланин	Ala	A
Аллоизолейцин	Ale	
Аргинин	Arg	R
Аспарагин	Asn	N
Аспарагиновая кислота	Asp	D
Цистеин	Cys	C
Глутаминовая кислота	Glu	E
Глутамин	Gln	Q
Глицин	Gly	G
Гистидин	His	H
Изолейцин	Ile	I
Лейцин	Leu	L
Лизин	Lys	K
Фенилаланин	Phe	F
Пролин	Pro	P
Пироглутаминовая кислота	pGlu	
Серин	Ser	S
Треонин	Thr	T
Тирозин	Tyr	Y
Триптофан	Trp	W
Валин	Val	V

Таблица 2

Замены аминокислот
Примеры консервативных замен
исходных остатков, остальные известны
специалистам в области.

Ala	Ser
Arg	Lys; Gln
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn; Lys
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn; Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

Значительные изменения в функции или иммунологической идентичности достигают за счет выбор замен, которые в меньшей степени консервативны по сравнению с приведенными в табл. 2, т.е. за счет выбора остатков, которые еще больше различаются по своему воздействию на сохранение (а) структуры полипептидного остова в зоне замены, например, в виде листа или спиральной конформации, (b) заряда или гидрофобности молекулы в целевом сайте или (с) объема боковой цепи. Консервативные замены аминокислот включают в себя такие замены, в которых аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком со сходными структурными или химическими свойствами. В данной области известны семейства аминокислотных остатков, имеющие аналогичные боковые цепи. Такие семейства включают в себя аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

К заменам, которые в общем случае предположительно приводят к наибольшему изменению в свойствах белков, относятся такие, при которых (а) гидрофильный остаток, например серил или треонил, замещен гидрофобным остатком, например лейцилом, изолейцилом, фенилаланилом, валилом или аланилом, или замещает его; (b) цистеин или пролин замещен любым другим остатком или замещает его; (с) остаток, имеющий электроположительную боковую цепь, например лизил, аргинил или гистидил, замещен электроотрицательным остатком, например глутамилом или аспартилом, или замещает его или (d) остаток, имеющий объемную боковую цепь, например фенилаланин, замещен остатком, не имеющим боковой цепи, например глицином в данном случае, или замещает его; (е) увеличение количества сайтов сульфирования и/или гликозилирования.

Замена аминокислотного остатка другим с биологически и/или химически сходными свойствами известна специалистам в данной области как консервативная замена. Например, консервативной заменой будет замена одного гидрофобного остатка другим или одного полярного остатка другим. Подобные замены включают в себя комбинации, такие как, например, Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; и Phe, Tyr. Такие консервативно замещенные варианты каждой явно описанной последовательности включены в мозаичные полипептиды, представленные в настоящем документе.

Заместительный или делеционный мутагенез может быть использован для вставки сайтов N-гликозилирования (Asn-X-Thr/Ser) или O-гликозилирования (Ser или Thr). Кроме того, могут быть желательны делеции цистеина или других лабильных остатков. Делеции или замены потенциальных сайтов протеолиза, например Arg, проводят посредством удаления одного из основных остатков или замены одного из них глутаминильными или гистидильными остатками.

Некоторые посттрансляционные производные являются результатом действия рекомбинантных клеток-хозяев на экспрессированный полипептид. Глутаминильные и аспарагинильные остатки часто подвержены посттрансляционному дезамидированию с образованием соответствующих глутаминильных и аспартилных остатков. В альтернативном варианте осуществления эти остатки дезамидируются в слабокислой среде. К другим посттрансляционным модификациям относятся гидроксильное пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп серильного или треонильного остатков, метилирование о-аминогрупп боковых цепей лизина, аргинина и гистидина (Т.Е. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, p. 79-86 [1983]), ацетилирование N-концевого амина и в некоторых случаях амидирование C-концевого карбоксила.

Следует понимать, что один из способов определения вариантов и производных описанных в настоящем документе генов и белков предусматривает определение вариантов и производных с учетом гомологии/идентичности с конкретными известными последовательностями, например SEQ ID NO: 13, 14, 15 и 16. В частности описаны варианты таких и других белков, описанных в настоящем документе, имеющих по меньшей мере 70, или 75, или 80, или 85, или 90, или 95% гомологии с указанной последовательностью. Специалистам в данной области будут очевидны способы определения гомологии двух белков. Например, гомология может быть определена после выравнивания двух последовательностей таким образом, чтобы гомология находилась на самом высоком уровне.

Другой способ определения гомологии может быть выполнен с использованием опубликованных алгоритмов. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно выполнить, применяя алгоритм локальной гомологии Смита и Ватермана, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), посредством алгоритма гомологии выравнивания из работы Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), с помощью способа поиска подобия из работы Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444 (1988), с использованием вариантов компьютерной реализации таких алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575, Science Dr., г. Мэдисон, штат Висконсин) или на основе просмотра.

Такие же типы гомологии можно установить для нуклеиновых кислот, например, с использованием алгоритмов, описанных в Zuker, *M. Science*, 244:48-52, 1989, Jaeger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:7706-7710, 1989, Jaeger et al., *Methods Enzymol.* 183:281-306, 1989.

Следует понимать, что описания консервативных мутаций и гомологии можно комбинировать в любых сочетаниях, таких как варианты осуществления, которые имеют по меньшей мере 70% гомологии с определенной последовательностью, причем ее варианты представляют собой консервативные мутации.

Поскольку в настоящем описании обсуждают различные белки и последовательности белков, следует понимать, что при этом также описаны нуклеиновые кислоты, которые могут кодировать такие последовательности белков. Сюда будут включены все вырожденные последовательности, относящиеся к конкретной последовательности белка, т.е. все нуклеиновые кислоты, имеющие последовательность, кодирующую одну конкретную белковую последовательность, а также все нуклеиновые кислоты, включая вырожденные нуклеиновые кислоты, кодирующие описанные варианты и производные белковых последовательностей. Таким образом, несмотря на то что в настоящем документе необязательно описана каждая конкретная нуклеотидная последовательность, следует понимать, что в настоящем документе фактически раскрыты и описаны все без исключения последовательности в свете описанной последовательности белка. Кроме того, например, включено описанное консервативное производное нескольких SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18, например замена валина (V) на изолейцин (I). Следует понимать, что для такой мутации также описаны все нуклеотидные последовательности, которые кодируют такое конкретное производное нескольких SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18.

Следует понимать, что существует множество аминокислотных и пептидных аналогов, которые могут быть включены в описанные композиции. Например, существует множество D-аминокислот или аминокислот, которые имеют другой функциональный заместитель, отличающийся от аминокислот, приведенных в табл. 1 и 2. Описаны противоположные стереоизомеры пептидов природного происхождения, а также стереоизомеры аналогов пептидов. Такие аминокислоты могут быть легко включены в полипептидные цепи посредством введения в молекулы ТРНК данных о выбранной аминокислоте и формирования генетических конструкторов, которые используют, например, амбровые кодоны для введения аналога аминокислоты в пептидную цепь сайт-специфическим способом.

Могут быть получены молекулы, которые напоминают пептиды, но не связаны природной пептидной связью. Например, связи для аминокислот или аминокислотных аналогов могут включать в себя $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (цис- и транс-), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ и $-\text{CHN}_2\text{SO}-$ (эти и другие связи можно найти в Spatola, A.F. in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, New York, p. 267 (1983); Spatola, A.F., Vega Data (March 1983), vol. 1, Issue 3, Peptide Backbone Modification (general review); Morley, Trends Pharm. Sci. (1980), p. 463-468; Hudson D. et al., Int. J. Pept. Res., 14:177-185 (1979) ($-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$); Spatola et al., Life Sci. 38:1243-1249 (1986) ($-\text{CHN}_2\text{S}-$); Hann J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 307-314 (1982) ($-\text{CH}-\text{CH}-$, цис- и транс-; Almqvist et al., J. Med. Chem. 23:1392-1398 (1980) ($-\text{COCH}_2-$); Jennings-White et al. Tetrahedron Lett. 23:2533 (1982) ($-\text{COCH}_2-$); Szelke et al., European appln., EP 45665 CA (1992); 97:39405 (1982) ($-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$); Holladay et al., Tetrahedron. Lett., 24:4401-4404 (1983) ($-\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2-$); and Hruby Life Sci., 31:189-199 (1982) ($-\text{CH}_2\text{S}-$), каждый из которых включен в настоящий документ путем ссылки. Особенно предпочтительной непептидной связью является $-\text{CH}_2\text{NH}-$. Следует понимать, что пептидные аналоги могут иметь более одного атома между атомами связи, например β -аланин, γ -аминомасляная кислота и т.п.

Аминокислотные аналоги и аналоги пептидов часто отличаются более выраженными или желательными свойствами, такими как более высокая экономичность процесса получения, большая химическая стабильность, повышенные фармакологические свойства (период полужизни, поглощение, потенция, эффективность и пр.), измененная специфичность (например, широкий спектр биологической активности), пониженная антигенность и др.

D-аминокислоты можно использовать для построения более стабильных пептидов, поскольку пептидазы и подобные им не распознают D-аминокислоты. Систематическую замену одной или более аминокислот в консенсусной последовательности на D-аминокислоту такого же типа (например, D-лизин вместо L-лизина) можно использовать для получения более стабильных пептидов. Цистеиновые остатки можно использовать для циклизации или соединения вместе двух или более пептидов. Такой подход может быть удобным для закрепления пептидов в определенных конформациях.

В одном аспекте описанные связывающие IL-25 молекулы могут дополнительно содержать метку. Используемые в настоящем документе метки могут включать в себя флуоресцентный краситель, одного из участников связывающей пары, такого как биотин/стрептавидин, металл (например, золото), радиоактивный заместитель или метку эпитопа, которая выполнена с возможностью специфически взаимодействовать с молекулой, выполненной с возможностью обнаружения, например, с образованием окрашенного субстрата или флуоресценцией. Соединения, пригодные для введения метки, выполненной с возможностью определения, в белки, включают в себя флуоресцентные красители (также известные в настоящем документе как флуорохромы и флуорофоры) и ферменты, которые реагируют с колориметрическими субстратами (например, пероксидаза из хрена). Использование флуоресцентных красителей, как правило, предпочтительно для применения настоящего изобретения на практике, поскольку они могут быть обна-

ружены в очень малых количествах.

Флуорофорами называют соединения или молекулы, которые люминесцируют. Как правило, флуорофоры поглощают электромагнитную энергию на одной длине волны и испускают электромагнитную энергию на второй длине волны. Репрезентативные примеры флуорофоров включают в себя, без ограничений, 1,5-IAEDANS; 1,8-ANS; 4-метилумбеллиферон; 5-карбоксихлорфлуоресцеин; 5-карбоксихлорфлуоресцеин (5-FAM); 5-карбоксихлорофлуоресцеин; 5-карбокситетраметилпродамин (5-TAMRA); 5-гидрокситриптамин (5-HAT); 5-ROX (карбоксихлородамин); 6-карбоксихлородамин 6G; 6-CR 6G; 6-JOE; 7-амино-4-метилкумарин; 7-аминоактиномицин D (7-AAD); 7-гидрокси-4-1-метилкумарин; 9-амино-6-хлор-2-метоксиакридин (ACMA); ABQ; фуксиновый кислотный; акридиновый оранжевый; акридиновый красный; акридиновый желтый; акрифлавин; акрифлавин для окраски по Фельгену SITSA; экворин (фотобелок); AFP - аутофлуоресцентный белок - (Quantum Biotechnologies) см. sgGFP, sgBFP; Alexa Fluor 350™; Alexa Fluor 430™; Alexa Fluor 488™; Alexa Fluor 532™; Alexa Fluor 546™; Alexa Fluor 568™; Alexa Fluor 594™; Alexa Fluor 633™; Alexa Fluor 647™; Alexa Fluor 660™; Alexa Fluor 680™; ализариновый комплексон; ализариновый красный; аллофикоцианин (APC); AMC, AMCA-S; аминметилкумарин (AMCA); AMCA-X; аминоктиномицин D; аминокумарин; анилиновый синий; антроцилстеарат; APC-Cy7; APTRA-BTC; APTS; астразоновый бриллиантовый красный 4G; астразоновый оранжевый R; астразоновый красный 6B; астразоновый желтый 7 GLL; атабрин; ATTO-TAG™ CBQCA; ATTO-TAG™ FQ; аурамин; ауорофосфин G; ауорофосфин; БАО 9 (бис-аминофенилоксадиазол); BCECF (высокий pH); BCECF (низкий pH); берберинсульфат; бета-лактамаза; BFP GFP с синим сдвигом (Y66H); синий флуоресцентный белок; BFP/GFP FRET; биман; бис-бензид; бис-бензимид (Hoechst); бис-BTC; бланкофор FFG; бланкофор SV; BOBO™-1; BOBO™-3; Bodipy 492/515; Bodipy 493/503; Bodipy 500/510; Bodipy 505/515; Bodipy 530/550; Bodipy 542/563; Bodipy 558/568; Bodipy 564/570; Bodipy 576/589; Bodipy 581/591; Bodipy 630/650-X; Bodipy 650/665-X; Bodipy 665/676; Bodipy Fl; Bodipy FL ATP; Bodipy Fl-церамид; Bodipy R6G SE; Bodipy TMR; Bodipy TMR-X конъюгат; Bodipy TMR-X, SE; Bodipy TR; Bodipy TR ATP; Bodipy TR-X SE; BO-PRO™-1; BO-PRO™-3; бриллиантовый сульфохлорофлавин FF; BTC; BTC-5N; кальцеин; кальцеиновый синий; Calcium Crimson; Calcium Green; Calcium Green-1 Ca²⁺ - краситель; Calcium Green-2 Ca²⁺; Calcium Green-5N Ca²⁺; Calcium Green-C18 Ca²⁺; Calcium Orange; калькофлуоровый белый; карбоксихлородамин (5-ROX); каскадный синий™; каскадный желтый; катехоламин; CCF2 (GeneBlazer); CFDA; CFP (голубой флуоресцентный белок); CFP/YFP FRET; хлорофилл; хромомицин А; хромомицин А; CL-NERF; CMFDA; целентеразин; целентеразин sp; целентеразин f; целентеразин fcp; целентеразин h; целентеразин hsp; целентеразин ip; целентеразин p; целентеразин O; кумарин фаллоидин; С-фикоцианин; CPM I метилкумарин; CTC; CTC формазан; Cy2™; Cy3.18; Cy3.5™; Cy3™; Cy5.18; Cy5.5™; Cy5™; Cy7™; голубой GFP; флуоросенсор цикло-АМФ (FiCRhR); дабсил; дансил; дансил амин; дансил кадаверин; дансил хлорид; дансил DHPE; дансил фторид; DAPI; дапоксил; дапоксил 2; дапоксил 3'-DCFDA; DCFH (дихлордигидрофлуоресцеин диацетат); DDAO; DHR (дигидрородоадин-123); Di-4-ANEPPS; Di-8-ANEPPS (непропорциональный); DiA (4-Di 16-ASP); дихлордигидрофлуоресцеин диацетат (DCFH); DiD липофильная метка; DiD (DiC18(5)); DIDS; дигидрородоадин 123 (DHR); Dil (DiC18(3)); I динитрофенол; DiO (DiOC18(3)); DiR; DiR (DiC18(7)); DM-NERF (высокий pH); DNP; допамин; DsRed; DTAF; DY-630-NHS; DY-635-NHS; EBFP; ECFP; EGFP; ELF 97; эозин; эритрозин; эритрозин ITC; этидий бромид; этидий гомодимер-1 (EthD-1); эукризин; EukoLight; европий (111) хлорид; EYFP; Fast Blue; FDA; Фельген (парарозанилин); FIF (индуцированная формальдегидом флуоресценция); FITC; Flazo Orange; Fluo-3; Fluo-4; флуоресцеин (FITC); флуоресцеин диацетат; Fluoro-Emerald; Fluoro-Gold (гидроксистильтбамидин); Fluor-Ruby; FluorX; FM 1-43™; FM 4-46; Fura Red™ (высокий pH); Fura Red™/Fluo-3; Fura-2; Fura-2/BCECF; генакрил бриллиантовый красный B; генакрил бриллиантовый желтый 10GF; генакрил розовый 3G; генакрил желтый 5GF; GeneBlazer; (CCF2); GFP (S65T); GFP с красным сдвигом (rsGFP); GFP нативный с возбуждением вне УФ (wtGFP); GFP нативный, УФ-возбуждение (wtGFP); GFPuv; глиоксалева кислота; гранулированный синий; гематопорфирин; Hoechst 33258; Hoechst 33342; Hoechst 34580; HPTS; гидроксикумарин; гидроксистильтбамидин (FluoroGold); гидрокситриптамин; Indo-1, высокая концентрация кальция; Indo-1, низкая концентрация кальция; индодикарбоцианин (DiD); индотрикарбоцианин (DiR); Intrawhite Cf; JC-1; JO JO-1; JO-PRO-1; LaserPro; лауродан; LDS 751 (ДНК); LDS 751 (РНК); лейкофор PAF; Leucophor SF; Leucophor WS; лиссамин родамин; лиссамин родамин B; кальцеин/этидий гомодимер; LOLO-1; LO-PRO-1; люциферовый желтый; Lyso Tracker Blue; Lyso Tracker Blue-White; Lyso Tracker Green; Lyso Tracker Red; Lyso Tracker Yellow; LysoSensor Blue; LysoSensor Green; LysoSensor Yellow/Blue; Mag Green; Magdala Red (флюксин B); Mag-Fura Red; Mag-Fura-2; Mag-Fura-5; Mag-Indo-1; Magnesium Green; Magnesium Orange; малахитовый зеленый; Marina Blue; I максилон бриллиантовый фламин 10 GFF; максилон бриллиантовый фламин 8 GFF; мероцианин; метоксикумарин; Mitotracker Green FM; Mitotracker Orange; Mitotracker Red; митрамицин; монобромбиман; монобромбиман (mBBr-GSH); монохлорбиман; MPS (метиловый зеленый пиронин-стильбен); NBD; NBD амин; нильский красный; нитробензоксадиазол; норадrenalин; ядерный быстрый красный; i ядерный желтый; нилосан бриллиантовый фламин E8G; Oregon Green™; Oregon Green™ 488; Oregon Green™ 500; Oregon Green™ 514; Pacific Blue; парарозанилин (Фельген);

PBFI; PE-Cy5; PE-Cy7; PerCP; PerCP-Cy5.5; PE-TexasRed (красный 613); флоксин В (Magdala Red); Phorwite AR; Phorwite BKL; Phorwite Rev; Phorwite RPA; фосфин 3R; PhotoResist; фикоэритрин В [PE]; фикоэритрин R [PE]; PKH26 (Sigma); PKH67; PMIA; понтохром черно-синий; POPO-1; POPO-3; PO-PRO-1; PO-I PRO-3; примулин; проционовый желтый; пропилий иодид (PI); PyMPO; пирен; пиронин; пиронин В; пирозал бриллиантовый флавин 7GF; QSY7; хиакриновый горчичный; резорурфин; RH 414; Rhod-2; родамин; родамин 110; Rhodamine 123; родамин 5 GLD; родамин 6G; родамин В; родамин В 200; родамин В extra; родамин ВВ; Rhodamine BG; родамин зеленый; родамин-фаллицидин; родамин: фаллоидин; родамин красный; Rhodamine WT; бенгальский розовый; R-фикоцианин; R-фикоэритрин (PE); rsGFP; S65A; S65C; S65L; S65T; сапфировый GFP; SBFI; серотонин; севроновый бриллиантовый красный 2В; севроновый бриллиантовый красный 4G; севроновый I бриллиантовый красный В; севроновый оранжевый; севроновый желтый L; sgBFPTM (суперинтенсивный BFP); sgGFPTM (суперинтенсивный GFP); SITS (примулин; стильбен изотиосульфоновая кислота); SNAFL кальцеин; SNAFL-1; SNAFL-2; SNARF кальцеин; SNARF1; Sodium Green; SpectrumAqua; SpectrumGreen; SpectrumOrange; Spectrum Red; SPQ (6-метокси-N-(3-сульфопропил)хинолин); стильбен; сульфородамин В и С; сульфородамин Extra; SYTO 11; SYTO 12; SYTO 13; SYTO 14; SYTO 15; SYTO 16; SYTO 17; SYTO 18; SYTO 20; SYTO 21; SYTO 22; SYTO 23; SYTO 24; SYTO 25; SYTO 40; SYTO 41; SYTO 42; SYTO 43; SYTO 44; SYTO 45; SYTO 59; SYTO 60; SYTO 61; SYTO 62; SYTO 63; SYTO 64; SYTO 80; SYTO 81; SYTO 82; SYTO 83; SYTO 84; SYTO 85; SYTOX синий; SYTOX зеленый; SYTOX оранжевый; тетрациклин; тетраметилродамин (TRITC); Texas RedTM; Texas Red-XTM конъюгат; тиадикарбоцианин (DiSC3); тиазинный красный R; тиазоловый оранжевый; тиофлавин 5; тиофлавин S; тиофлавин TON; тиолит; тиозоловый оранжевый; Tinopol CBS (калькофлуоровый белый); TIER; TO-PRO-1; TO-PRO-3; TO-PRO-5; TOTO-1; TOTO-3; Tricolor (PE-Cy5); TRITC тетраметилродаминизотиоцианат; True Blue; Tru Red; Ultralite; уранин В; увитекс SFC; wt GFP; WW 781; X-родамин; XRITC; ксилоловый оранжевый; Y66F; Y66H; Y66W; желтый GFP; YFP; YO-PRO-1; YO-PRO 3; YOYO-1; YOYO-3; Sybr Green; тиазоловый оранжевый (взаимно хелатирующие красители); полупроводниковые наночастицы, такие как квантовые точки; или каркасный флуорофор (который может быть активирован с помощью света или другого источника электромагнитной энергии), или их комбинация.

Модифицирующая группа, которая может быть включена в любые из описанных в настоящем документе соединений или напрямую присоединена к ним посредством галогенирования. Примеры радионуклидов, которые используют в настоящем варианте осуществления, включают в себя, без ограничений, тритий, иод-125, иод-131, иод-123, иод-124, астат-210, углерод-11, углерод-14, азот-13, фтор-18. В другом аспекте радионуклид может быть соединен со связывающей группой или связан хелатирующей группой, которую затем связывают с соединением напрямую или посредством линкера. Примеры радионуклидов, которые используют в данном аспекте, включают в себя, без ограничений, Tc-99m, Re-186, Ga-68, Re-188, Y-90, Sm-153, Bi-212, Cu-67, Cu-64 и Cu-62. Подобные приведенным методики введения радиоактивной метки используют в повседневной практике в радиофармацевтической отрасли.

Соединения с радиоактивной меткой используют в качестве визуализирующих агентов для диагностики нейрологического заболевания (например, нейродегенеративного заболевания) или психического расстройства, или для отслеживания прогрессирования или лечения такого заболевания у млекопитающего (например, у человека). Соединения с радиоактивной меткой, описанные в настоящем документе, можно с легкостью использовать в сочетании с методиками визуализации, такими как позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) или однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ).

Введение метки можно проводить напрямую или косвенно. При прямом введении метки обнаруживаемое антитело (антитело к рассматриваемой молекуле) или обнаруживаемая молекула (молекула, которая может быть связана антителом к рассматриваемой молекуле) включают в себя метку. Обнаружение метки указывает на присутствие обнаруживаемого антитела или обнаруживаемой молекулы, что, в свою очередь, указывает на присутствие рассматриваемой молекулы или антитела к рассматриваемой молекуле соответственно. При косвенном введении метки дополнительная молекула или функциональная группа взаимодействует с иммунокомплексом или образуется на его сайте. Например, генерирующая сигнал молекула или функциональная группа, такая как фермент, может быть связана или ассоциирована с обнаруживаемым антителом или обнаруживаемой молекулой. Затем генерирующая сигнал молекула может формировать сигнал, выполненный с возможностью обнаружения, на сайте иммунокомплекса. Например, фермент при добавлении подходящего субстрата может образовывать продукт, выполненный с возможностью видимости или обнаружения, на сайте иммунокомплекса. Такую форму непрямого введения метки используют в твердофазном ИФА.

В другом примере непрямого введения метки с иммунокомплексом взаимодействует дополнительная молекула (которую можно назвать связывающим агентом), которая может связываться с рассматриваемой молекулой или с антителом (первичным антителом) к рассматриваемой молекуле, таким как вторичное антитело к первичному антителу. Дополнительная молекула может содержать метку, или генерирующую сигнал молекулу, или функциональную группу. Дополнительная молекула может представлять собой антитело, которое можно, таким образом, назвать вторичным антителом. При связывании вторич-

ного антитела с первичным антителом может быть образован так называемый сэндвич из первого (или первичного) антитела и рассматриваемой молекулы. Иммуные комплексы могут взаимодействовать с меченым, вторичным антителом в условиях, которые эффективно способствуют и в течение определенного времени оказываются достаточными для образования вторичных иммуных комплексов. Затем, как правило, может быть произведена промывка вторичных иммуных комплексов для удаления любых неспецифически связанных меченых вторичных антител, что позволяет обнаружить оставшуюся метку во вторичных иммуных комплексах. Дополнительная молекула может также представлять собой или включать в себя одну из пары молекул или функциональных групп, которые могут связываться друг с другом, такими как пара биотин/авидин. В таком варианте обнаруживаемое антитело или обнаруживаемая молекула должны включать в себя другого партнера пары.

Другие варианты косвенного введения метки включают в себя обнаружение первичных иммуных комплексов за две стадии подхода. Например, молекулу (которую можно назвать первым связывающим агентом), такую как антитело с аффинностью связывания рассматриваемой молекулы или соответствующего антитела, можно использовать для образования вторичных иммуных комплексов, как это описано выше. После промывки вторичные иммуные комплексы могут вступать в контакт с другой молекулой (которая может быть названа вторым связывающим агентом) с аффинностью связывания с первым связывающим агентом вновь в условиях, которые эффективно способствуют и в течение определенного времени оказываются достаточными для образования иммуных комплексов (таким образом, формируя третичные иммуные комплексы). Второй связывающий агент может быть соединен с меткой, выполненной с возможностью обнаружения, или генерирующей сигнал молекулой или функциональной группой, обеспечивая обнаружение образованных таким образом третичных иммуных комплексов. Такая система может обеспечивать усиление сигнала.

3. Фармацевтические носители/доставка фармацевтических продуктов.

Как описано выше, композиции можно также вводить *in vivo* в фармацевтически приемлемом носителе (который в настоящем документе также называется фармацевтически приемлемым эксципиентом). Под "фармацевтически приемлемым" понимают материал, который не является инертным с биологической или иной точки зрения, т. е. такой материал может быть введен субъекту с нуклеиновой кислотой или вектором без каких-либо нежелательных биологических эффектов или разрушительного по своей сути взаимодействия с любым из других компонентов фармацевтической композиции, в которой он содержится. Как хорошо известно специалистам в данной области, такой носитель будет естественным образом выбран для того чтобы свести к минимуму любые разрушения активного ингредиента и свести к минимуму любые неблагоприятные побочные эффекты у субъекта. Таким образом, в одном аспекте настоящего документа описана фармацевтическая композиция, содержащая любую из связывающих ПЛ-25 молекул, описанных в настоящем документе.

Композиции могут быть введены перорально, парентерально (например, внутривенно), посредством внутримышечной инъекции, посредством внутривенной инъекции, внутрикожно, экстракорпорально, местным нанесением и т. п., включая местное интраназальное введение или введение посредством ингалятора. Используемый в настоящем документе термин "местное интраназальное введение" означает доставку композиций в нос и носовые проходы через одну или обе ноздри и может включать в себя доставку с использованием механизма распыления или механизма введения капель, или посредством аэрозолизации нуклеиновой кислоты или вектора. Введение композиций с помощью ингалятора можно осуществлять через нос или рот посредством доставки с использованием механизма распыления или механизма введения капель. Доставка также может быть проведена напрямую в любую область дыхательной системы (например, легкие) посредством интубации. Точное необходимое количество композиций будет разным для разных субъектов, в зависимости от вида, возраста, веса и общего состояния субъекта, степени серьезности аллергического расстройства, требующего лечения, конкретной используемой нуклеиновой кислоты или вектора, способа введения и т.п. Поэтому нет возможности указать точное количество для каждой композиции. Однако конкретное количество может быть определено одним из специалистов в данной области, исходя из обычных практических соображений на основе приведенных в настоящем документе идей.

Парентеральное введение композиции, если таковое используется, как правило, представляет собой инъекцию. Инъекционные композиции могут быть приготовлены в стандартных формах, либо как жидкие растворы или суспензии, либо как твердые формы, пригодные для растворения или суспендирования в жидкости перед инъекцией, либо как эмульсии. В последнее время пересмотренный подход для парентерального введения включает в себя использование системы с медленным или замедленным высвобождением таким образом, чтобы поддерживать постоянное дозирование. См., например, патент США № 3610795, который путем ссылки включен в текст настоящего документа.

Материалы могут находиться в растворе, суспензии (например, включены в микрочастицы, липосомы или клетки). Они могут быть ориентированы на конкретный тип клеток за счет использования антител, рецепторов или лигандов рецепторов. В приведенных ниже ссылках содержатся примеры использования данной технологии для целевой доставки специфических белков в опухолевую ткань (Senter, et al., *Bioconjugate Chem.*, 2:447-451, (1991); Bagshawe, K.D., *Br. J. Cancer*, 60:275-281, (1989); Bagshawe, et

al., *Br. J. Cancer*, 58:700-703, (1988); Senter, et al., *Bioconjugate Chem.*, 4:3-9, (1993); Battelli, et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 35:421-425, (1992); Pietersz and McKenzie, *Immunolog. Reviews*, 129:57-80, (1992); и Roffler, et al., *Biochem. Pharmacol.*, 42:2062-2065, (1991)). Несущие среды, такие как "невидимки" и другие конъюгированные с антителом липосомы (включая опосредованную липидом целевую доставку для карциномы толстой кишки), опосредованная рецептором направленная доставка ДНК через специфические клеточные лиганды, регулируемая лимфоцитами целевая доставка в опухоль и высокоспецифическая целевая доставка терапевтических ретровирусов в клетки мышинной глиомы *in vivo*. В приведенных ниже ссылках указаны примеры использования данной технологии для целевой доставки специфических белков в опухолевую ткань (Hughes et al., *Cancer Research*, 49:6214-6220 (1989) и Litzinger and Huang, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1104:179-187 (1992)). Как правило, рецепторы задействованы в процессах эндоцитоза, как конститутивные, так и индуцированные лигандом. Такие рецепторы скапливаются в покрытых клатрином ямках, попадают в клетку в покрытых клатрином везикулах, проходят через подкисленную эндосому, в которой происходит сортировка рецепторов, а затем либо регенерируют к клеточной поверхности, попадают в хранилище внутри клетки, либо разрушаются в лизосомах. Процессы интернализации выполняют самые различные функции, такие как поглощение питательных веществ, удаление активированных белков, выведение макромолекул, оппортунистическое введение вирусов и токсинов, диссоциация и разложение лиганда и регулирование на уровне рецептора. Для многих рецепторов характерно более одного внутриклеточного процесса в зависимости от типа клетки, концентрации рецептора, типа лиганда, валентности лиганда и концентрации лиганда. По молекулярным и клеточным механизмам опосредованного рецепторами эндоцитоза имеется обзор (Brown and Greene, *DNA and Cell Biology*, 10:6, 399-409 (1991)).

а) Фармацевтически приемлемые носители.

Композиции, в том числе антитела, можно использовать для терапии в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

Приемлемые носители и их составы описаны в Remington: *The Science and Practice of Pharmacy* (19th ed.) ed. A.R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, PA 1995. Как правило, чтобы сделать состав изотоническим, в него включают подходящее количество фармацевтически приемлемой соли. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают в себя, без ограничений, физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Значение pH предпочтительно составляет от приблизительно 5 до приблизительно 8 и более предпочтительно от приблизительно 7 до приблизительно 7,5. Дополнительные носители включают в себя препараты с замедленным высвобождением, такие как полупроницаемые матрицы твердых гидрофобных полимеров, содержащие антитело, причем матрицы находятся в форме формованных изделий, таких как пленки, липосомы или микрокапсулы. Специалистам в данной области будет очевидно, что некоторые носители могут оказаться более предпочтительными в зависимости, например, от способа введения и концентрации вводимой композиции.

Фармацевтические носители известны специалистам в данной области. Чаще всего они представляют собой стандартные носители для введения лекарственных средств человеку, включая такие растворы, как стерильная вода, физиологический раствор и буферные растворы при физиологическом pH. Композиции могут быть введены внутримышечно или подкожно. Другие соединения будут введены в соответствии со стандартными процедурами, используемыми специалистами в данной области.

В дополнение к выбранной молекуле фармацевтические композиции могут включать в себя носители, загустители, разбавители, буферные растворы, консерванты, поверхностно-активные агенты и т.п. Фармацевтические композиции также могут включать в себя один или более активных ингредиентов, таких как противомикробные агенты, анестетики и т.п.

Фармацевтическая композиция может быть введена рядом способов в зависимости от того, требуется ли местное или системное лечение, и от обрабатываемой зоны. Введение может быть местным (в том числе офтальмологическим, вагинальным, ректальным, интраназальным), пероральным, ингаляционным или парентеральным, например в форме капельной внутривенной, подкожной, внутрибрюшинной или внутримышечной инъекции. Раскрываемые антитела могут быть введены внутривенно, внутрибрюшинно, внутримышечно, подкожно, внутривенно или внутрикочно.

Препараты для парентерального введения включают в себя стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии.

Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, а также органические эфиры, выполненные с возможностью инъекционного введения, такие как этилолеат. Водные носители включают в себя воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая физиологические и буферные среды. Несущие среды для парентерального введения включают в себя раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, лактат Рингера или нелетучие масла. Несущие среды для внутривенного введения включают в себя компенсаторы потери жидкости и питательных веществ, компенсаторы электролитов (такие как на основе декстрозы Рингера) и т.п. Могут также присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, противомикробные, антиоксидантные, хелатирующие вещества и инертные газы и т.п.

Составы для местного применения могут включать в себя мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суп-

позитории, спреи, жидкости и порошки. Необходимыми или желательными могут быть традиционные фармацевтические носители, водные, порошковые или масляные основания, загустители и т.п.

Композиции для перорального введения включают в себя порошки или гранулы, суспензии или растворы в воде или неводных средах, капсулы, пакеты-саше или таблетки. Может быть желательно присутствие загустителей, ароматизаторов, разбавителей, эмульгаторов, диспергирующих агентов или связующих веществ.

Некоторые композиции могут потенциально быть введены в форме фармацевтически приемлемой кислотной или основно-аддитивной соли, образованной при взаимодействии с неорганическими кислотами, такими как соляная кислота, бромистоводородная кислота, перхлорная кислота, азотная кислота, роданистоводородная кислота, серная кислота и фосфорная кислота, а также органическими кислотами, такими как муравьиная кислота, уксусная кислота, пропионовая кислота, гликолевая кислота, молочная кислота, пировиноградная кислота, шавелевая кислота, малоновая кислота, янтарной кислотой, малеиновая кислота и фумаровая кислота, или при взаимодействии с неорганическим основанием, таким как гидроксид натрия, гидроксид аммония, гидроксид калия, а также органическими основаниями, такими как моно-, ди-, триалкил- и ариламином и замещенными этаноламинами.

4. Терапевтическое применение и способы.

Эффективные дозы и схемы введения композиций можно определить эмпирически, и такие определения могут быть осуществлены специалистами в данной области. Диапазоны дозы для введения композиций достаточно велики для достижения желаемого эффекта, при котором обеспечивается воздействие на симптомы расстройства. Доза не должна быть настолько велика, чтобы вызывать неблагоприятные побочные эффекты, такие как нежелательные перекрестные реакции, анафилактические реакции и т.п. Как правило, доза будет меняться в зависимости от возраста, состояния, пола и степени заболевания пациента, способа введения или использования других лекарств в схеме лечения и будет определена специалистом в области. При любых противопоказаниях доза может быть скорректирована индивидуально лечащим врачом. Доза может меняться и может быть введена в рамках одного или более введений дозы в день в течение одного или нескольких дней. В литературе можно найти рекомендации в отношении соответствующих доз для определенных классов фармацевтических продуктов. Например, рекомендации по выбору соответствующих дозировок для антител можно найти в литературе по терапевтическим применениям антител, например, Handbook of Monoclonal Antibodies, Ferrone et al., eds., Noyes Publications, Park Ridge, N.J., (1985), ch. 22 и p. 303-357; Smith et al., Antibodies in Human Diagnosis and Therapy, Haber et al., eds., Raven Press, New York (1977), p. 365-389. Стандартная суточная доза антитела при монотерапии может варьироваться от приблизительно 1 до 100 мкг/кг веса тела или больше в день в зависимости от перечисленных выше факторов.

В одном аспекте следует понимать и иметь в виду в настоящем документе, что описанные связывающие IL-25 молекулы можно использовать для лечения, предотвращения или ингибирования воспалительного состояния или заболевания, такого как, например, риновирусная инфекция, воспаление дыхательных путей, ревматоидный артрит ("РА"), остеоартрит, эрозия кости, внутрибрюшинные абсцессы и спайки, воспалительное заболевание кишечника ("ВЗК"), отторжение аллотрансплантата, псориаз, определенные формы рака, ангиогенез, атеросклероз и рассеянный склероз ("РС"). Таким образом, в одном аспекте настоящего документа описаны способы лечения, предотвращения или ингибирования риновирусной инфекции, воспаления дыхательных путей, ревматоидного артрита ("РА"), остеоартрита, эрозии кости, внутрибрюшинных абсцессов и спаек, воспалительного заболевания кишечника ("ВЗК"), отторжения аллотрансплантата, псориаза, определенных форм рака, ангиогенеза, атеросклероза и рассеянного склероза ("РС"), включающие введение любой из связывающих IL-25 молекул, описанных в настоящем документе. Например, в настоящем документе описаны способы лечения, предотвращения или ингибирования риновирусной инфекции, воспаления дыхательных путей, астмы, кистозного фиброза, ревматоидного артрита ("РА"), остеоартрита, эрозии кости, внутрибрюшинных абсцессов и спаек, воспалительного заболевания кишечника ("ВЗК"), отторжения аллотрансплантата, псориаза, определенных форм рака, ангиогенеза, атеросклероза и рассеянного склероза ("РС"), включающие введение субъекту одной, двух, трех или более связывающих IL-25 молекул, содержащих переменный домен тяжелой цепи, содержащий одну или более областей, определяющих комплементарность (CDR), как определено в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9. Например, в настоящем документе описаны способы лечения, ингибирования или предотвращения риновирусной инфекции, воспаления дыхательных путей, астмы, кистозного фиброза, ревматоидного артрита ("РА"), остеоартрита, эрозии кости, внутрибрюшинных абсцессов и спаек, воспалительного заболевания кишечника ("ВЗК"), отторжения аллотрансплантата, псориаза, определенных форм рака, ангиогенеза, атеросклероза и рассеянного склероза ("РС"), включающие введение субъекту одной или более связывающих IL-25 молекул, содержащих переменный домен тяжелой цепи, содержащий CDR, как определено в SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9 и/или SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9; В одном аспекте раскрываемые способы лечения, предотвращения или ингибирования могут включать вве-

дение субъекту связывающих IL-25 молекул, содержащих переменный домен тяжелой цепи, причем переменный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 27.

Следует также понимать и иметь в виду в настоящем документе, что описанные способы лечения, предотвращения или ингибирования риновирусной инфекции, воспаления дыхательных путей, астмы, кистозного фиброза, ревматоидного артрита ("РА"), остеоартрита, эрозии кости, внутрибрюшинных абсцессов и спаек, воспалительного заболевания кишечника ("ВЗК"), отторжения аллотрансплантата, псориаза, определенных форм рака, ангиогенеза, атеросклероза и рассеянного склероза ("РС") могут включать введение субъекту, страдающему указанным состоянием или заболеванием, связывающих IL-25 молекул, содержащих переменный домен легкой цепи вместо переменного домена тяжелой цепи или в дополнение к нему. В одном аспекте настоящего документа описаны способы лечения, предотвращения или ингибирования риновирусной инфекции, воспаления дыхательных путей, астмы, кистозного фиброза, ревматоидного артрита ("РА"), остеоартрита, эрозии кости, внутрибрюшинных абсцессов и спаек, воспалительного заболевания кишечника ("ВЗК"), отторжения аллотрансплантата, псориаза, определенных форм рака, ангиогенеза, атеросклероза и рассеянного склероза ("РС") у пациента, включающие введение субъекту одной, двух, трех или более связывающих IL-25 молекул, содержащих переменный домен легкой цепи, содержащий одну или более CDR, как определено в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и/или SEQ ID NO: 12. Например, в настоящем документе описаны способы лечения, предотвращения или ингибирования, включающие введение субъекту одной или более связывающих IL-25 молекул, содержащих переменный домен легкой цепи, включающий некоторое количество CDR, как определено в SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12 и/или SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12. Кроме того, в настоящем документе описаны способы, в которых связывающие IL-25 молекулы содержат переменный домен легкой цепи, причем переменный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 16.

В одном аспекте следует понимать и иметь в виду в настоящем документе, что описанные связывающие IL-25 молекулы для использования в описанных способах лечения, предотвращения и/или ингибирования могут содержать как переменный домен тяжелой цепи, так и переменный домен легкой цепи. Следует также понимать, что указанные связывающие IL-25 молекулы, используемые в описанных способах лечения, предотвращения и/или подавления могут включать одну, две или три CDR переменного домена тяжелой цепи в комбинации с одной, двумя или тремя из некоторого количества CDR переменного домена легкой цепи, описанных в настоящем документе. Соответственно, связывающая IL-25 молекула для использования в описанных способах лечения, предотвращения или ингибирования риновирусной инфекции, воспаления дыхательных путей, астмы, кистозного фиброза, ревматоидного артрита ("РА"), остеоартрита, эрозии кости, внутрибрюшинных абсцессов и спаек, воспалительного заболевания кишечника ("ВЗК"), отторжения аллотрансплантата, псориаза, определенных форм рака, ангиогенеза, атеросклероза и рассеянного склероза ("РС") может содержать одну, две или три из некоторого количества CDR переменного домена тяжелой цепи, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и/или SEQ ID NO: 9, и одну, две или три CDR переменных доменов легкой цепи, выбранные из группы, содержащей SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и/или SEQ ID NO: 12. Например, в настоящем документе описаны способы лечения риновирусной инфекции, воспаления дыхательных путей, астмы, кистозного фиброза, ревматоидного артрита ("РА"), остеоартрита, эрозии кости, внутрибрюшинных абсцессов и спаек, воспалительного заболевания кишечника ("ВЗК"), отторжения аллотрансплантата, псориаза, определенных форм рака, ангиогенеза, атеросклероза и рассеянного склероза ("РС"), включающие введение субъекту связывающих IL-25 молекул, содержащих переменный домен тяжелой цепи; причем переменный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15 и/или SEQ ID NO: 17 и переменный домен легкой цепи; причем переменный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 18.

Используемый в настоящем документе термин "лечение", "лечить" или "проведение лечения" относится к способу смягчения одного или более эффектов воздействия заболевания или состояния (такого как, например, воспалительное состояние или рак) у субъекта. Таким образом, в описанном способе лечение может относиться к 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% снижению тяжести выявленной инфекции или симптома инфекции. Например, способ проведения лечения воспалительного состояния или рака считается лечением, если наблюдают 10% смягчения одного или более симптомов состояния или рака у субъекта по сравнению с контролем. Таким образом, снижение может быть на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100% или любой процент снижения от 10 до 100% по сравнению с исходным или контрольным уровнями. Следует понимать, что такое лечение необязательно подразумевает излечение или полное устранение состояния или заболевания или симптомов состояния или заболевания. Следует понимать и иметь в виду в настоящем документе, что способы лечения, которые обсуждаются в настоящем документе, могут быть профилактическими или терапевтическими. Соответственно, в одном аспекте предложены способы лечения или смягчения тяжести воспалительного заболевания или состояния у

субъекта, включающие введение субъекту связывающей IL-25 молекулы. Кроме того, описаны способы предотвращения или замедления развития воспалительного заболевания или состояния у субъекта, включающие введение пациенту связывающей IL-25 молекулы.

Используемые в настоящем документе термины "предотвращать", "предотвращающий" и "предотвращение" по отношению к инфекции относятся к действию, например введению, терапевтического агента (например, композиции, описанной в настоящем документе), которое осуществляется до или приблизительно в то же время, когда у субъекта начинают наблюдаться один или более симптомов инфекции, и которое ингибирует или отсрочивает развитие или усугубление, или отсрочивает рецидив одного или более симптомов инфекции. Используемые в настоящем документе упоминания о снижении, смягчении или ингибировании включают в себя изменение на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% или больше по сравнению с уровнем контроля. Например, описанные способы рассматривают как предотвращение, если отмечают приблизительно 10% замедление развития, усугубления или рецидива воспалительного состояния или заболевания, или симптомов воспалительного состояния или заболевания у субъекта по сравнению с контрольными субъектами, которые не получали связывающей IL-25 молекулы для смягчения воспалительного состояния или заболевания.

Следует понимать и иметь в виду в настоящем документе, что способы лечения, предотвращения и ингибирования, описанные в настоящем документе, подразумевают как терапевтические, так и профилактические применения связывающих IL-25 молекул, описанных в настоящем документе.

С. Примеры.

Предполагается, что в приведенных ниже примерах для специалистов в данной области представлена полностью раскрытая информация и описание того, каким образом получали и оценивали соединения, композиции, изделия, устройства и/или способы, приведенные в формуле настоящего изобретения, и эти примеры предназначены чисто для иллюстрации настоящего изобретения и не ограничивают настоящее описание. Были приложены усилия для обеспечения точности чисел (например, количеств, температур и т.п.), но следует учитывать некоторые погрешности и отклонения в экспериментах. Если не указано иное, под частями понимаются части по весу, температура выражена в °C или равняется температуре окружающей среды, а давление равняется или приближается к атмосферному.

Пример 1.

Трансгенным мышам, сверхэкспрессирующим мышинный Ig-Alpha, мышинный Ig-Beta и человеческий интерлейкин 6, внутрибрюшинно вводили рекомбинантный человеческий IL-25 (R&D Systems) с двухнедельными интервалами. После формирования заметного иммунного ответа, что было зарегистрировано по результатам ИФА сыворотки, собирали лимфатические узлы, клетки селезенки и красного костного мозга, извлекали В-клетки с поверхностной экспрессией антител изотипа IgM с помощью магнитных гранул, а остальные клетки сортировали по их способности связывать IL-25, используя сортер клеток с активацией флуоресценции MoFlo (фиг. 1).

Клетки с положительным связыванием IL-25 сортировали в 96-луночные планшеты, проводили ОТ-ПЦР для отдельных клеток для амплификации переменных областей, а переменные области клонировали в векторы экспрессии, содержащие константную область тяжелой цепи человеческого IgG4 или константную область легкой цепи человеческого IgK. Полученные пары клонов тяжелой и легкой цепей трансфицировали в клетки НЕК293 и полученный белок-антитело очищали на смоле с белком А (фиг. 2) и анализировали его способность нейтрализовать активность рекомбинантного человеческого IL-25 в клетках HT-29 (фиг. 3). Гуманизированные версии АВМ109 (обозначенные АВМ109.2) также тестировались при анализе клеточной потенции для HT-29 (фиг. 4).

Аффинность антител к IL-25 измеряли с помощью поверхностного плазмонного резонанса (ППР) с использованием Biacore T-100 (GE Healthcare). (фиг. 5, 9) Антитела иммобилизовали на карбоксиметилированном декстране на проточных кюветах 2-4 на чипе CM5 (проточную кювету 1 использовали в качестве стандарта). rhIL25 или gmIL15 в буфере HBS-P прогоняли по чипу в возрастающих концентрациях (2,5, 5,0, 10, 20 и 40 нМ) со временем введения 120 с для каждой концентрации. После 5-го введения буферный раствор HBS-P прогоняли через каждую проточную кювету и в течение 20 мин давали возможность диссоциировать IL-25. Поверхность регенерировали, воздействуя в течение 30 с 10 mM глицина-HCl pH 1,5. Проводили кинетический анализ единичного цикла для каждого антитела за вычетом кюветы стандарта.

АВМ125 очищали и вводили мышам в модели риновирусной инфекции при аллергической астме. Мышей сенсibilizировали овальбумином из куриных яиц с низким содержанием LPS (OVA 50 мкг в 2 мг алюминиевого адьюванта). Затем мышей провоцировали 50 мкг овальбумина (OVA) интраназально (и/н) в течение трех последовательных дней. Непосредственно после последней провокации с OVA мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили АВМ125 или изотипический контроль (IgG). Через 4 ч после дозы моноклонального антитела мышей инфицировали и/н с помощью $2,5 \times 10^6$ TCID₅₀ RV1B. Воспалительные ответы оценивали на третий день после инъекции. Затем определяли клеточный рекрутинг в жидкости бронхоальвеолярного лаважа и экспрессию мРНК в легких для IL-5 оценивали по количественной ПЦР с химической реакцией с SYBR Green, выраженной в координатах Log₂ (кратное изменение), относительно контроля физиологического раствора/фосфатно-солевого буферного раствора (PBS) через 3 дня после

инфекции.

Полную РНК позже экстрагировали из сохраненных апикальных долей легких мышей с помощью набора РНК (Qiagen) с последующим синтезом кДНК (набор OMNISCRIPT® RT, Qiagen). Геномные праймеры РНК RV-1B и последовательности зондов: смысловая 5'-GTGAAGAGCCSCRTGTGCT-3' (SEQ ID NO: 19) 50 нм, антисмысловая 5'-GCTSCAGGGTTAAGGTTAGCC-3' (SEQ ID NO: 20) 300 нм и зонд-5'-FAM-TGAGTCCTCCGGCCCCCTGAATG-TAMRA-3' (SEQ ID NO: 21) 100 нм. Для анализа реакций ПЦР использовали ABI 7500 Taqman (ABI). РНК количественно определяли с использованием стандартной кривой, которую строили по амплификации плазмидной ДНК и экспрессировали в виде копий на мкл реакции с ДНК.

D. Последовательности.

SEQ ID NO: 1
SYWIE

SEQ ID NO: 2
QILPGIGSTNYNEKFKG

SEQ ID NO: 3
GYGNYGDY

SEQ ID NO: 4
RASESVDSYGNSFM

SEQ ID NO: 5
RASNLES

SEQ ID NO: 6
QQSNEDPLT

SEQ ID NO: 7
TSGMGVG

SEQ ID NO: 8
HIWWDDVKRYNPALKS

SEQ ID NO: 9
TLPHFFDY

SEQ ID NO: 10
SASSSVSYMY

SEQ ID NO: 11
RTSNLAS

SEQ ID NO: 12
KQYHSYPPTWT

SEQ ID NO: 13
EVKVVESGADLMKPGASVKISCKATGYTFSSYWIEWVKQRPGHLEWIGQILPGIGSTN
YNEKFKGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGYGNYGDIWGQTTVTVSS

SEQ ID NO: 14
DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYGNSFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLE
SGIPARFSGSGSRDFTLTINPVEADDVATYYCQQSNEDPLTFGAGTKLELKR

SEQ ID NO: 15
QVTLKVSQPGILQPSQTLTSLTCSFSGFSLNTSGMGVWIRQPSGKLEWLAIHWDDVK
RYNPALKSRLTISKDTSGSQVFLKIASVDTADTATYYCARTLPHFFDYWGQTTTLTVSS

SEQ ID NO: 16
DIQMTQSPAIMASAPGKVTISCSASSSVSYMYWYQQKSGSSPKPWIYRTSNLASGVPA
RFSGSGSSTSYSLTISSMEAEADAATYYCKQYHSYPPTWTFGGGKLEIKR

SEQ ID NO: 17
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFSSYWIEWVRQAPGQGLEWIGQILPGIGSTN
YNEKFKGRVTITADTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARGYGNYGDIWGQTTVTVSS

SEQ ID NO: 18
DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVDSYGNSFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLE
SGVPARFSGSGSDFTLTINPVEAQDTANYCQQSNEDPLTFGAGTKLELKR

SEQ ID NO: 19
GTGAAGAGCCSCRTGTGCT

SEQ ID NO: 20

GCTSCAGGGTTAAGGTTAGCC
 SEQ ID NO: 21
 TGAGTCCTCCGGCCCTGAATG

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенная связывающая IL-25 молекула, содержащая переменный домен тяжелой цепи, содержащий три CDR, как определено в SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, и переменный домен легкой цепи, содержащий три CDR, как определено в SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12.

2. Выделенная связывающая IL-25 молекула по п.1, где переменный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 15.

3. Выделенная связывающая IL-25 молекула по п.1, где переменный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO: 16.

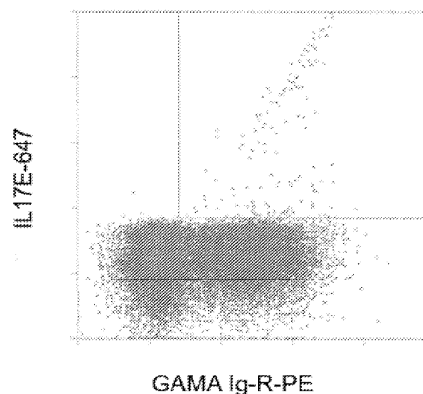
4. Выделенная связывающая IL-25 молекула по п.1, содержащая переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, причем переменный домен тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 15, а переменный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO: 16.

5. Способ лечения риновирусной инфекции, воспаления дыхательных путей, ревматоидного артрита, остеоартрита, эрозии кости, внутрибрюшинных абсцессов и спаек, воспалительного заболевания кишечника, отторжения аллотрансплантата, псориаза, определенных форм рака, ангиогенеза, атеросклероза, кистозного фиброза и рассеянного склероза, включающий введение терапевтического количества любой из связывающих IL-25 молекул по п.1.

6. Выделенная связывающая IL-25 молекула по п.1, где переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности SEQ ID NO: 15.

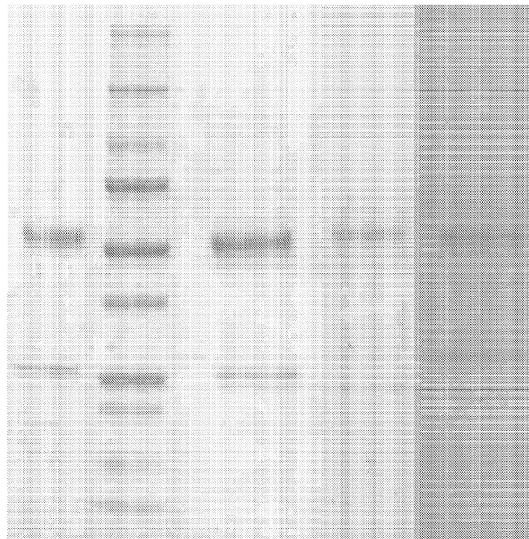
7. Выделенная связывающая IL-25 молекула по п.1, где переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности SEQ ID NO: 16.

Ткань	Лимфоциты (общие)	Лимфоциты (с истощением по IgM)	% потери	Одиночная сортировка (Ig+/IL17E+)
Селезенка/ красный костный мозг/лимфатические узлы	$2,0 \times 10^8$	$4,0 \times 10^6$	98 %	288



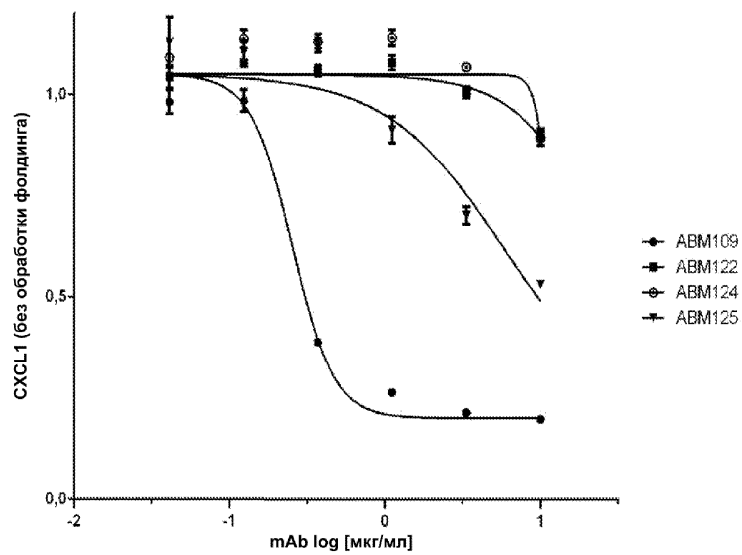
Фиг. 1

Контроль IgG Размеры маркеров АВМ109 АВМ125 АВМ109.2



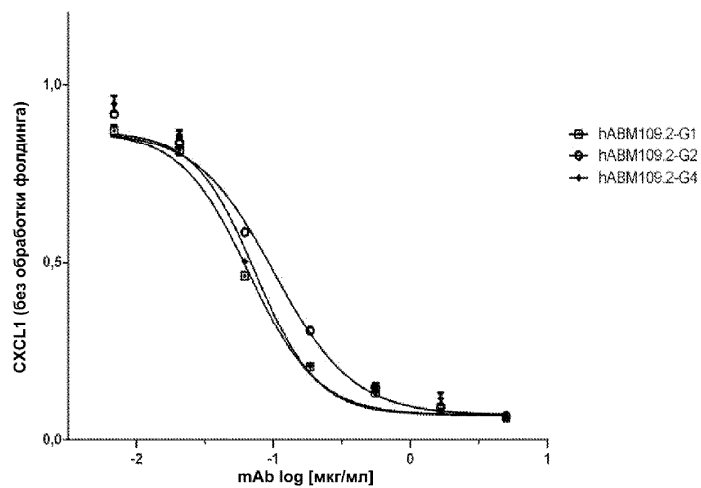
Фиг. 2

HT29: нейтрализация активности человеческого рекомбинантного IL-25 (11/25/15)



Фиг. 3

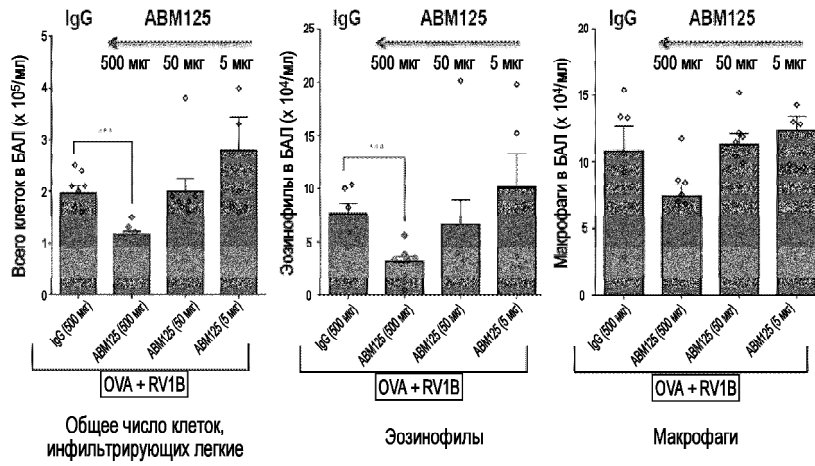
HT29: нейтрализация активности человеческого рекомбинантного IL-25 (1/27/16)



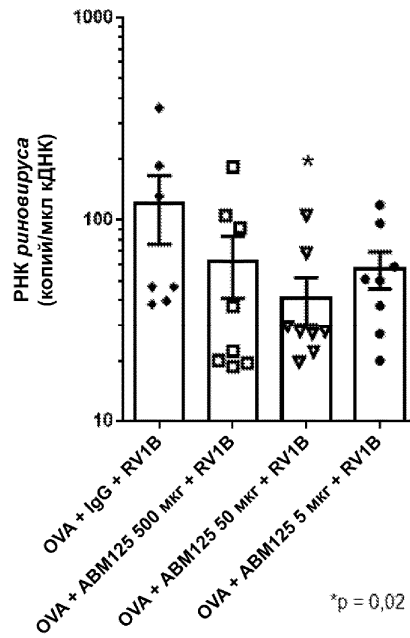
Фиг. 4

Клон	$K_{\text{асс}}$	$K_{\text{дисс}}$	K_d
	$M^{-1} \cdot s^{-1}$	S^{-1}	nM
АВМ 109.2 к человеческому IL-25	$1,50 \times 10^6$	$3,72 \times 10^{-5}$	24
АВМ 109.2 к мышиному IL-25	$7,16 \times 10^5$	$2,06 \times 10^{-5}$	28
АВМ 109 против человеческого IL-25	$9,85 \times 10^5$	$3,78 \times 10^{-6}$	4

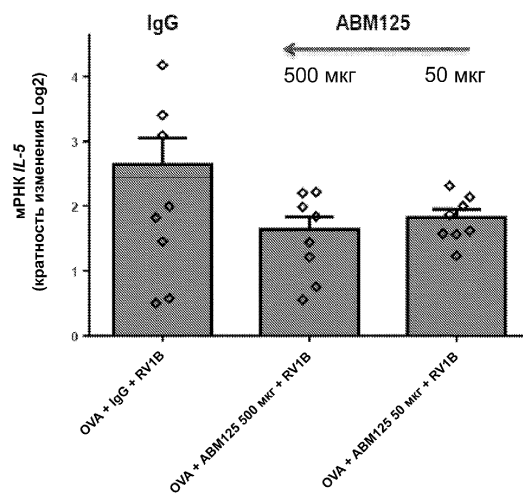
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

Нейтрализация IL-25 – IC ₅₀			Аффинность (ППР)						
mAb	человеческое	мышинное	IL-25 человека (HEK)			IL-25 мыши (NSO)			
			K _{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	K _{off} (s ⁻¹)	K _d (nM)	K _{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	K _{off} (s ⁻¹)	K _d (nM)	
ABM125	0,97 нМ	2,4 нМ	9,18 × 10 ⁴	4,85 × 10 ⁻⁷	5,3	1,34 × 10 ⁵	9,85 × 10 ⁻⁷	7,3	
hABM125.9	0,95 нМ	5,9 нМ	2,20 × 10 ⁵	1,35 × 10 ⁻⁴	61	7,87 × 10 ⁵	5,77 × 10 ⁻⁴	733	
hABM125.10	1,5 нМ	4,9 нМ	2,50 × 10 ⁵	9,35 × 10 ⁻⁵	374	8,37 × 10 ⁴	8,91 × 10 ⁻⁵	1065	

Фиг. 9

