

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045234**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.07

(21) Номер заявки
201890078

(22) Дата подачи заявки
2015.10.22

(51) Int. Cl. **G01N 33/68** (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/525 (2006.01)
C07D 401/14 (2006.01)
C07D 471/00 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА, СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С КОМПЛЕКСОМ, ВКЛЮЧАЮЩИМ ТРИМЕРНЫЙ TNF α , ИХ ПРИМЕНЕНИЕ И КОДИРУЮЩИЙ АНТИТЕЛА ПОЛИНУКЛЕОТИД

(31) 1510758.4

(32) 2015.06.18

(33) GB

(43) 2018.06.29

(86) PCT/EP2015/074527

(87) WO 2016/202414 2016.12.22

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЮСБ БАЙОФАРМА СРЛ (BE)

(72) Изобретатель:
**О'Коннелл Джеймс Филип, Портер
Джон Роберт, Лоусон Аластер,
Лайтвуд Даниел Джон, Вуттон
Ребекка Джейн (GB)**

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(56) SHI HU ET AL.: "COMPARISON OF THE INHIBITION MECHANISMS OF ADALIMUMAB AND INFlixIMAB IN TREATING TUMOR NECROSIS FACTOR ALFA-ASSOCIATED DISEASES FROM A MOLECULAR VIEW", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US vol. 288, no. 38 20 September 2013 (2013-09-20), pages 27059-27067, XP003033999, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.M113.491530 Retrieved from the Internet:URL:http://www.jbc.org/content/288/38/27059[retrieved on 2013-08-13], the whole document

TRACEY ET AL.: "Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review", PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, ELSEVIER, GB, vol. 117, no. 2, 26 October 2007 (2007-10-26), pages 244-279, XP022432143, ISSN: 0163-7258, DOI:10.1016/J.PHARMTHERA.2007.10.001, the whole document
US-A1-2009022659
WO-A1-2014009295
WO-A1-2013186229
WO-A1-2014001557

(57) В изобретении описаны антитела, которые связываются с комплексом, включающим (i) тримерный TNF α и (ii) соединение и выделенный полинуклеотид, кодирующий эти антитела. Эти антитела можно использовать в качестве биомаркера, связывающегося с мишенью, для определения комплекса соединение-тример в образце, для обнаружения взаимодействия мишени с соединением-тример TNF α и для определения идентификации соединения, способного связываться с TNF α .

045234 B1

045234 B1

Область настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам, которые можно использовать для скрининга низкомолекулярных модуляторов суперсемейства TNF, и которые образуют комплексы с членами суперсемейства TNF. Прежде всего, изобретение относится к антителам, которые селективно связываются с такими комплексами, и к применению таких антител. Настоящее изобретение также относится к способам анализа для идентификации новых модуляторов суперсемейства TNF с использованием таких антител.

Предпосылки создания настоящего изобретения

Суперсемейство фактора некроза опухоли (TNF) представляет собой семейство белков, которые проявляют общую регуляторную функцию выживания клеток и их гибели. Члены суперсемейства TNF характеризуются общим аминокислотным мотивом ядра молекулы, которое состоит из двух антипараллельных β -складчатых слоев с антипараллельными β -цепями, формирующих β -структуру типа "рулета". Другой общий признак членов суперсемейства TNF заключается в формировании гомо- или гетеротримерных комплексов. Именно эти тримерные формы членов суперсемейства TNF связываются со специфическими рецепторами суперсемейства TNF и активируют их.

TNF α является исходным членом суперсемейства TNF. Разрегуляция продуцирования TNF α принимает участие в развитии ряда патологических состояний, имеющих большое значение в медицине. Например, TNF α принимает участие в развитии ревматоидного артрита, воспалительного заболевания кишечника (включая болезнь Крона), псориаза, болезни Альцгеймера (AD), болезни Паркинсона (PD), боли, эпилепсии, остеопороза, астмы, системной красной волчанки (SLE) и рассеянного склероза (MS). Другие члены суперсемейства TNF также принимают участие в развитии патологических состояний, включая аутоиммунные заболевания.

Стандартные антагонисты членов суперсемейства TNF являются высокомолекулярными и действуют за счет ингибирования связывания члена суперсемейства TNF с его рецептором. Примеры стандартных антагонистов включают антитела анти-TNF α , прежде всего моноклональные антитела, такие как инфликсимаб (Remicade®), адалимумаб (Humira®) и цертолизумаб пегол (Cimzia®), или растворимые гибридные белки на основе рецептора TNF α , такие как этанерцепт (Enbrel®).

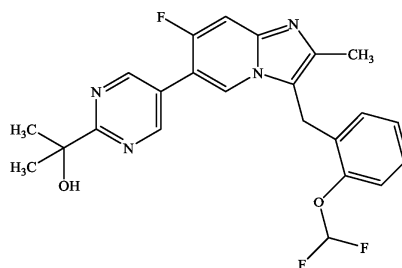
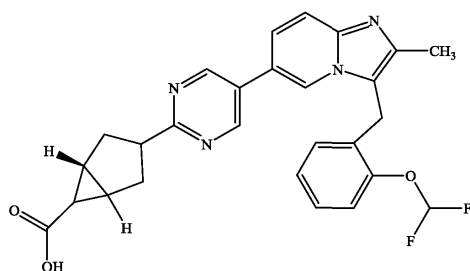
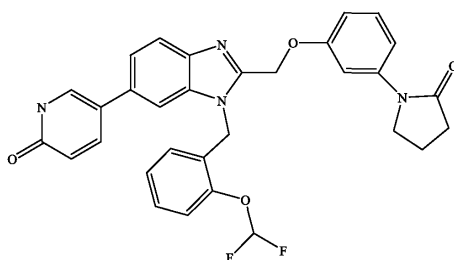
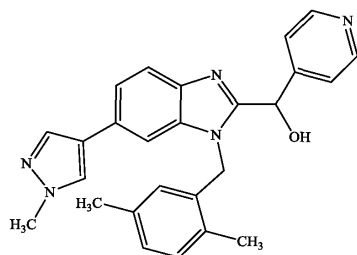
Краткое описание настоящего изобретения

Авторы настоящего изобретения идентифицировали классы низкомолекулярных соединений (SME), которые модулируют TNF α . Эти соединения действуют при связывании с гомотримерной формой TNF α и приводят к индукции и/или стабилизации конформационного изменения в структуре гомотримера. Например, гомотримеры TNF α со связанным соединением могут связываться с рецепторами TNF α , но способны в меньшей степени или вообще не способны индуцировать передачу сигнала в следующих сигнальных путях рецептора TNF α . Эти соединения можно использовать при лечении состояний, опосредованных TNF α .

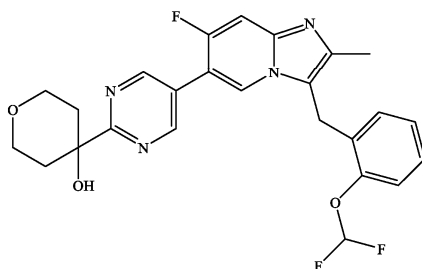
Авторы настоящего изобретения также сконструировали антитела, которые селективно связываются с комплексами, включающими такие соединения и члены суперсемейства TNF. Эти антитела можно использовать для идентификации других соединений, которые способны ингибировать TNF α указанным способом, и можно также использовать в качестве биомаркеров связывания с мишенью.

Соответственно, в настоящем изобретении предлагается антитело, которое селективно связывается с комплексом, включающим (i) тримерный TNF α , и (ii) соединение, выбранное из группы, состоящей из соединений (1)-(5) или солей, или их сольватов:

045234



или

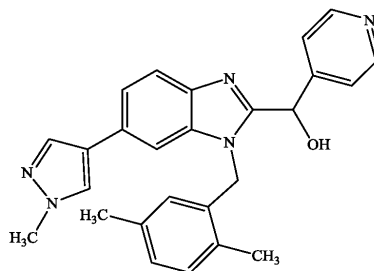


где антитело включает комбинацию последовательностей HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 SEQ ID NOs: 4/5/6/1/2/3.

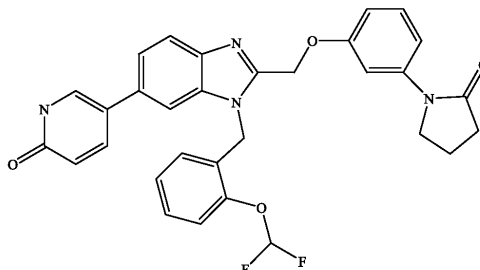
Указанное антитело предпочтительно содержит пару последовательностей HCVR и LCVR SEQ ID NO: 8 и 7.

В другом предпочтительном варианте оно содержит тяжелую цепь SEQ ID NO: 12 или 13 и легкую цепь SEQ ID NO: 11.

Еще одним вариантом данного изобретения является антитело, которое селективно связывается с комплексом, содержащим (i) тримерный TNF α , и (ii) соединение, выбранное из группы, состоящей из соединений (1)-(2) или солей, или их сольватов:



или



где антители содержит комбинацию последовательностей HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 SEQ ID NO: 19/20/21/1/17/18.

Предпочтительно указанное антители содержит пару последовательностей HCVR и LCVR SEQ ID NO: 23 и 22.

В предпочтительном варианте оно содержит тяжелую цепь SEQ ID NO: 27 или 28 и легкую цепь SEQ ID NO: 26.

Заявленные антители предпочтительно селективно связываются с комплексом тример-соединение по сравнению со связыванием с соединением в отсутствие тримера TNF α и/или с соединением в отсутствие тримера TNF α .

Причем величина K_{D-ab} при связывании антителя с комплексом тример-соединение может снижаться по меньшей мере в 100 раз, или по меньшей мере в 200 раз по сравнению с величиной K_{D-ab} для связывания с тримером TNF α в отсутствие соединения и/или для связывания с соединением в отсутствие TNF α .

Антители согласно изобретению могут представлять собой:

- (а) гуманизованное антители; или
- (б) фрагмент Fab, модифицированный Fab, Fab', модифицированный Fab', F(ab')₂, Fv, единственный домен антителя или scFv.

Еще одним объектом данного изобретения является полинуклеотид, кодирующий вышеуказанные антители.

Другим объектом данного изобретения является применение заявленных антителей в качестве биомаркера связывания с мишенью для определения комплекса соединение-тример в образце, полученном у субъекта, при этом указанное антители поддается обнаружению, а указанный комплекс включает тримерный TNF α и соединение, которое способно связываться с тримерным TNF α , и тем самым комплекс соединение-тример связывается с необходимым рецептором с TNF и модулирует передачу сигнала, индуцированную тримером через рецептор. Кроме того, объектом данного изобретения является способ обнаружения взаимодействия мишени с соединением-тример TNF α , тем самым комплекс соединение-тример связывается с TNF рецептором и модулирует передачу сигнала, индуцированного тримером через рецептор, причем указанный способ включает:

- (а) получение образца у субъекта, которому вводили указанное соединение,
- (б) контактирование антителя с указанным образцом и контрольным образцом, при этом указанное антители поддается обнаружению,
- (в) определение уровня связывания указанного подпадающего обнаружению антителя с указанным образцом и указанным контрольным образцом,

где связывание указанного подпадающего обнаружению антителя с указанным образцом выше, чем связывание указанного подпадающего обнаружению антителя с указанным контрольным образцом, что указывает на взаимодействия мишени с указанным соединением при связывании с указанным тримером TNF α .

Еще одним объектом, описанным в данном изобретении, является применение вышеуказанных антителей для выявления соединения, которое вызывает конформационное изменение в тримере TNF α , при этом указанное конформационное изменение модулирует передачу сигнала через рецептор TNF при свя-

звании с тримером TNF α .

Наконец последним объектом данного изобретения способ идентификации соединения, способного связываться с TNF α , и модулировать передачу сигнала тримера TNF α через рецептор, который включает следующие стадии:

(а) проведение анализа связывания для измерения связывающей активности исследуемого комплекса соединение-тример TNF α и исследуемого соединения, в отношении антитела,

(б) сравнение связывающей активности, измеренной на стадии (а), со связывающей активностью различных комплексов соединение-тример, для которых известно, что они связываются с высокой активностью с антителом, указанным на стадии (а), и

(в) отбор соединения, присутствующего в комплексе соединение-тример на стадии (а), если измеренная связывающая активность является приемлемой по данным сравнения, указанным на стадии (б),

В предпочтительном варианте способ является высокоскоростным методом анализа.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлена кристаллическая структура TNF α человека, в которой выделены остатки N168, 1194, F220 и A221.

На фиг. 2 представлены результаты хроматографии ВЭЖХ фрагмента CA185_01974 mFab и соединения (1). Пики соответствуют избытку Fab 1,5 \times и 2,0 \times . Таким образом, для тримера определен стехиометрический состав 1 Fab: 1 TNF α .

На фиг. 3 представлены результаты хроматографии ВЭЖХ фрагмента CA185_01979 mFab и соединения (1). И опять, пики соответствуют избытку Fab 1,5 \times и 2,0 \times . Таким образом, для тримера определен стехиометрический состав 1 Fab: 1 TNF α .

На фиг. 4 представлены результаты суммарного анализа TNF α -ИФА с использованием соединений (3), (4) и (5) и коммерческих поликлональных антител анти-TNF α .

На фиг. 5 показаны результаты конформационно специфичного анализа TNF α -ИФА с использованием антитела CA185_01974.0 и соединений (3), (4) и (5). В этом анализе сигнал не наблюдается для апо-TNF α , что свидетельствует о специфической природе связывания антитела CA185_01974 с соединением, связанным с TNF α .

На фиг. 6 показаны графики гистограмм FACS после окрашивания антителами CA185_01974 и CA185_01979 в концентрации 1 и 10 мкг/мл. Эти графики свидетельствуют о том, что антитела распознают только TNF α , который предварительно инкубировали с соединением (1). В случае контроля ДМСО окрашивание не наблюдается.

На фиг. 7 показаны графики гистограмм FACS после окрашивания антителами CA185_01974 для родительской клеточной линии NS0 и сконструированной клеточной линии NS0, в которой наблюдается сверхэкспрессия мембранного TNF α . Клетки инкубировали с соединением (1) или ДМСО и проявляли фрагментом антитела Fab. И снова результаты свидетельствуют об отсутствии окрашивания в случае контроля ДМСО (как в случае родительской, так и сконструированной клеточной линии). Однако в присутствии соединения (1) наблюдается окрашивание в случае сконструированной клеточной линии.

На фиг. 8 показаны сенсограммы для определения значений аффинности в случае антитела CA185_01974 с использованием TNF α яванских макак. В качестве контролей использовали TNF α яванских макак и ДМСО (верхние графики). На нижних графиках показаны повторные эксперименты для комплекса TNF α яванских макак с соединением (4).

На фиг. 9 показаны сенсограммы для определения значений аффинности в случае антитела CA185_01974 с использованием TNF α человека. В качестве контролей использовали TNF α человека и ДМСО (верхние графики). На нижних графиках показаны повторные эксперименты для комплекса TNF α человека с соединением (4).

На фиг. 10 показаны структуры соединений (1)-(6).

Краткое описание перечня последовательностей

SEQ ID NO: 1 представляет последовательность LCDR1 антитела CA185_01974.0.

SEQ ID NO: 2 представляет последовательность LCDR2 антитела CA185_01974.0.

SEQ ID NO: 3 представляет последовательность LCDR3 антитела CA185_01974.0.

SEQ ID NO: 4 представляет последовательность HCDR1 антитела CA185_01974.0.

SEQ ID NO: 5 представляет последовательность HCDR2 антитела CA185_01974.0.

SEQ ID NO: 6 представляет последовательность HCDR3 антитела CA185_01974.0.

SEQ ID NO: 7 представляет аминокислотную последовательность LCVR антитела CA185_01974.0.

SEQ ID NO: 8 представляет аминокислотную последовательность HCVR антитела CA185_01974.0.

SEQ ID NO: 9 представляет нуклеотидную (ДНК) последовательность LCVR антитела CA185_01974.0.

SEQ ID NO: 10 представляет нуклеотидную (ДНК) последовательность HCVR антитела CA185_01974.0.

SEQ ID NO: 11 представляет аминокислотную последовательность каппа-легкой цепи антитела

CA185_01974.0.

SEQ ID NO: 12 представляет аминокислотную последовательность mIgG1 тяжелой цепи антитела CA185_01974.0.

SEQ ID NO: 13 представляет аминокислотную последовательность mFab (без шарнирного участка) тяжелой цепи антитела CA185_01974.0.

SEQ ID NO: 14 представляет нуклеотидную (ДНК) последовательность каппа-легкой цепи антитела CA185_01974.0.

SEQ ID NO: 15 представляет нуклеотидную (ДНК) последовательность mIgG1 тяжелой цепи антитела CA185_01974.0.

SEQ ID NO: 16 представляет нуклеотидную (ДНК) последовательность mFab (без шарнирного участка) тяжелой цепи антитела CA185_01974.0.

SEQ ID NO: 17 представляет последовательность LCDR2 антитела CA185_01979.0.

SEQ ID NO: 18 представляет последовательность LCDR3 антитела CA185_01979.0.

SEQ ID NO: 19 представляет последовательность HCDR1 антитела CA185_01979.0.

SEQ ID NO: 20 представляет последовательность HCDR2 антитела CA185_01979.0.

SEQ ID NO: 21 представляет последовательность HCDR3 антитела CA185_01979.0.

SEQ ID NO: 22 представляет аминокислотную последовательность LCVR антитела CA185_01979.0.

SEQ ID NO: 23 представляет аминокислотную последовательность HCVR антитела CA185_01979.0.

SEQ ID NO: 24 представляет нуклеотидную (ДНК) последовательность LCVR антитела CA185_01979.0.

SEQ ID NO: 25 представляет нуклеотидную (ДНК) последовательность HCVR антитела CA185_01979.0.

SEQ ID NO: 26 представляет аминокислотную последовательность каппа-легкой цепи антитела CA185_01979.0.

SEQ ID NO: 27 представляет аминокислотную последовательность mIgG1 тяжелой цепи антитела CA185_01979.0.

SEQ ID NO: 28 представляет аминокислотную последовательность mFab (без шарнирного участка) тяжелой цепи антитела CA185_01979.0.

SEQ ID NO: 29 представляет нуклеотидную (ДНК) последовательность каппа-легкой цепи антитела CA185_01979.0.

SEQ ID NO: 30 представляет нуклеотидную (ДНК) последовательность mIgG1 тяжелой цепи CA185_01979.0.

SEQ ID NO: 31 представляет нуклеотидную (ДНК) последовательность mFab (без шарнирного участка) тяжелой цепи антитела CA185_01979.0.

SEQ ID NO: 32 представляет аминокислотную последовательность TNF α крысы.

SEQ ID NO: 33 представляет аминокислотную последовательность TNF α мыши.

SEQ ID NO: 34 представляет аминокислотную последовательность TNF α человека.

SEQ ID NO: 35 представляет аминокислотную последовательность растворимой формы TNF α человека.

SEQ ID NO: 36 представляет аминокислотную последовательность растворимой формы TNF α человека, но без исходного остатка "S" (что является ошибкой клонирования последовательности SEQ ID NO: 35).

Подробное описание настоящего изобретения

Модуляторы членов суперсемейства TNF.

Авторы настоящего изобретения идентифицировали исследуемые соединения, которые связываются с тримерными формами членов суперсемейства TNF. Эти соединения могут представлять собой низкомолекулярные соединения (SME) с молекулярной массой 1000 Да или менее, в основном 750 Да или менее, более предпочтительно 600 Да или менее. Их молекулярная масса может находиться в интервале от приблизительно 50 до приблизительно 1000 Да, или от приблизительно 100 до приблизительно 1000 Да. Эти соединения стабилизируют конформацию тримерного члена суперсемейства TNF, который связывается с необходимым рецептором суперсемейства TNF и модулирует передачу сигнала через рецептор. Примеры таких соединений включают соединения формул (1)-(6).

Стабилизирующий эффект этих соединений на тримерные формы членов суперсемейства TNF можно оценивать количественно при измерении средней точки температурного перехода (T_m) тримеров в присутствии и отсутствии соединения. T_m означает температуру, при которой 50% биомолекул характеризуются развернутой структурой. Соединения, которые стабилизируют тримеры членов суперсемейства TNF, повышают T_m тримеров. T_m можно определять с использованием соответствующего метода, известного в данной области техники, например, с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) или метода термической денатурации с флуоресцентным зондом.

Соединения могут связываться во внутреннем центральном пространстве тримера члена суперсемейства TNF (то есть в ядре тримера).

Эти соединения могут превращать член суперсемейства TNF в антагониста рецептора суперсемейства TNF. Следовательно, эти соединения способны блокировать передачу сигнала через член суперсемейства TNF и при этом не конкурировать с высокоаффинным взаимодействием между членом суперсемейства TNF и его рецептором.

Они могут стабилизировать конформацию тримерного члена суперсемейства TNF, который связывается с необходимым рецептором суперсемейства TNF и усиливает передачу сигнала через рецептор. Следовательно, эти соединения способны повышать передачу сигнала через член суперсемейства TNF и при этом не конкурировать с высокоаффинным взаимодействием между членом суперсемейства TNF и его рецептором.

В тех случаях, когда в данном контексте соединения описаны как антагонисты, то следует понимать, что соединения могут в равной степени представлять собой агонисты и повышать передачу сигнала с участием рецептора суперсемейства TNF, который связывается с комплексом тримерного члена суперсемейства TNF, и таким образом могут являться соединением-агонистом. Аналогичным образом, если в другом контексте указаны антагонистические соединения, то в данном описании методы идентификации таких соединений и применение таких соединений могут в равной степени относиться к соединениям-агонистам.

Соединения, описанные в данном контексте, являются аллостерическими модуляторами, которые связываются с природными агонистами рецепторов суперсемейства TNF, то есть с тримерными формами членов суперсемейства TNF, и которые приводят к тому, что эти тримеры принимают конформацию, которая все еще сохраняет способность связываться с необходимым рецептором суперсемейства TNF и модулировать передачу сигнала через рецептор. Следует понимать, что термин "модуляция" означает, что соединение может обладать антагонистическим действием, то есть снижать передачу сигнала через рецептор суперсемейства TNF, или оказывать стимулирующий эффект, то есть увеличивать или повышать передачу сигнала через рецептор суперсемейства TNF.

Эти соединения могут превращать природные агонисты членов суперсемейства TNF в антагонисты. И наоборот, стандартные антагонисты членов суперсемейства TNF связываются с членом суперсемейства TNF или рецептором суперсемейства TNF и предотвращают связывание члена суперсемейства TNF с необходимым рецептором. Они могут повышать передачу сигнала через рецептор суперсемейства TNF, когда член суперсемейства TNF находится в связанном состоянии, по сравнению с уровнем сигнала через рецептор суперсемейства TNF, когда член суперсемейства TNF находится в связанном состоянии в отсутствие соединения. Следовательно, соединения могут превращать природные агонисты членов суперсемейства TNF в так называемые "суперагонисты". Следовательно, соединения могут быть известны как аллостерические модуляторы лигандной активности (AMLA).

Соединения не ограничены в отношении их химической формулы или структуры, при условии, что они связываются по крайней мере с одним членом суперсемейства TNF и стабилизируют конформацию тримерного члена суперсемейства TNF, который связывается с необходимым рецептором суперсемейства TNF и модулируют передачу сигнала через рецептор суперсемейства TNF. Следовательно, соединения можно идентифицировать с использованием антител и способов, описанных в данном контексте. Соединения могут включать остаток бензимидазола или его изостерные аналоги.

Соединения могут повышать связывающую аффинность членов суперсемейства TNF (в форме комплекса соединение-тример) с необходимым рецептором по сравнению со связывающей аффинностью членов суперсемейства TNF с необходимым рецептором в отсутствие соединений.

Соединения связываются с тримерными формами членов суперсемейства TNF. Такие соединения связываются специфически (или селективно) с тримерными формами одного или более членов суперсемейства TNF. Соединение может связываться специфически (селективно) только с одним членом суперсемейства TNF, но не с любым другим членом суперсемейства TNF. Соединение может также связываться специфически с двумя, тремя, четырьмя или вплоть до всех членов суперсемейства TNF. Следует понимать, что термин "специфически (или селективно)" означает, что соединения связываются с исследуемой молекулой или молекулами, и в этом случае тримерная форма члена суперсемейства TNF характеризуется отсутствием значительной перекрестной реактивности в отношении любой другой молекулы, которая может включать другие члены суперсемейства TNF. Перекрестную реактивность можно оценивать любым пригодным методом, например, поверхностного плазмонного резонанса. Перекрестную реактивность соединения в отношении тримерной формы члена суперсемейства TNF с молекулой, которая отличается от тримерной формы этого конкретного члена суперсемейства TNF, можно рассматривать как значительную, если связывание соединения с другой молекулой выше по крайней мере на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 100% по сравнению со связыванием соединения с тримерной формой исследуемого члена суперсемейства TNF. Например, перекрестную реактивность можно рассматривать как значительную, если степень связывания соединения с другой молекулой превышает на величину в интервале от приблизительно 5% до приблизительно 100%, обычно от приблизительно 20% до приблизительно 100%, или приблизительно 50% до приблизительно 100%, по сравнению со связыванием соединения с тримерной формой исследуемого члена суперсемейства TNF. Соединение, которое является специфичным (или селективным) в отношении тримерной формы члена супер-

семейства TNF, может связываться с другой молекулой, при этом степень связывания снижается на величину приблизительно 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25 или 20% по сравнению со связыванием соединения с тримерной формой исследуемого члена суперсемейства TNF (до нулевого связывания). Если соединение соответственно связывается с другой молекулой, при этом степень связывания снижается приблизительно на 20%, приблизительно на 15%, приблизительно на 10% или приблизительно на 5%, приблизительно на 2% или приблизительно на 1% по сравнению со связыванием соединения с тримерной формой исследуемого члена суперсемейства TNF (до нулевого связывания).

Скорость, с которой исследуемое соединение связывается с членом суперсемейства TNF, в данном контексте называется "скоростью ассоциации" или "on-gate, или $k_{\text{on-c}}$ ", а скорость, с которой исследуемое соединение диссоциирует, то есть отделяется от члена суперсемейства TNF, называется "скоростью диссоциации" или "off-gate или $k_{\text{off-c}}$ ". Использованный в данном контексте символ K_{D-c} означает связывающую аффинность (константа диссоциации) исследуемого соединения в отношении члена суперсемейства TNF. K_{D-c} означает $k_{\text{off-c}}/k_{\text{on-c}}$. Исследуемые соединения могут снижать скорость "on-gate", которую можно измерить в минутах методом масс-спектрометрического анализа по интенсивности пиков комплекса соединение-тример члена суперсемейства TNF. Величины K_{D-c} для исследуемого соединения можно оценивать при повторении этого измерения в присутствии различных соотношений член суперсемейства TNF/комплекс соединение-тример. Обычно, связывание описанных в изобретении соединений с тримерами суперсемейства TNF характеризуется высокими скоростями ассоциации, в идеальном случае на уровне $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, и низкими скоростями диссоциации, например, на уровне 10^{-3} c^{-1} , 10^{-4} c^{-1} , или величина скорости диссоциации не измерима.

Использованный в данном контексте символ " $k_{\text{on-r}}$ " означает скорость ассоциации, с которой комплекс соединение-тример связывается с рецептором суперсемейства TNF. Использованный в данном контексте символ " $k_{\text{off-r}}$ " означает скорость диссоциации, с которой комплекс соединение-тример диссоциирует, то есть отделяется от рецептора суперсемейства TNF. Использованный в данном контексте символ " K_{D-r} " означает связывающую аффинность (константа диссоциации) комплекса соединение-тример в отношении рецептора суперсемейства. Символ K_{D-r} означает $k_{\text{off-r}}/k_{\text{on-r}}$.

Величина K_{D-r} для члена суперсемейства TNF при связывании с его рецептором в присутствии исследуемого соединения (то есть в форме комплекса соединение-тример) может снижаться по крайней мере приблизительно в 1,5 раза, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 10 раз, в 20 раз, в 30 раз, в 40 раз, в 50 раз, в 60 раз, в 70 раз, в 80 раз, в 90 раз, в 100 раз, по сравнению с величиной K_{D-r} для члена суперсемейства TNF при связывании с его рецептором в отсутствие исследуемого соединения. Величина K_{D-r} для комплекса соединение-тример при связывании с членом суперсемейства TNF может снижаться по крайней мере приблизительно в 1,5 раза, в основном по крайней мере приблизительно в 3 раза, более предпочтительно по крайней мере приблизительно в 4 раза по сравнению с величиной K_{D-r} для связывания тримера суперсемейства TNF с рецептором суперсемейства TNF в отсутствие исследуемого соединения, то есть связывающую аффинность комплекса соединение-тример для суперсемейства TNF можно повысить по крайней мере приблизительно в 1,5 раза, в основном по крайней мере приблизительно в 3 раза, более предпочтительно по крайней мере приблизительно в 4 раза по сравнению со связывающей аффинностью тримера суперсемейства TNF в отсутствие исследуемого соединения.

Описанное в данном контексте соединение может повысить связывающую аффинность члена суперсемейства TNF в отношении его рецептора на величину приблизительно в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 10 раз, в 20 раз, в 30 раз, в 40 раз, в 50 раз, в 60 раз, в 70 раз, в 80 раз, в 90 раз, в 100 раз или более по сравнению со связывающей аффинностью члена суперсемейства TNF в отношении его рецептора в отсутствие исследуемого соединения.

Связывающую аффинность можно представить в виде константы связывающей аффинности (K_{D-r}), а также в любых других единицах, таких как мкМ, нМ или пМ. Чем меньше величина K_{D-r} , тем больше связывающая аффинность члена суперсемейства TNF в отношении его рецептора.

Величину K_{D-r} для члена суперсемейства TNF при связывании с его рецептором в присутствии исследуемого соединения можно снизить приблизительно в 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, в 5 раз, в 10 раз, в 20 раз, в 30 раз, в 40 раз, в 50 раз, в 60 раз, в 70 раз, в 80 раз, в 90 раз, в 100 или более по сравнению с величиной K_{D-r} для связывания члена суперсемейства TNF с его рецептором в отсутствие исследуемого соединения.

Снижение величины K_{D-r} для комплекса соединение-тример при связывании с рецептором суперсемейства TNF по сравнению с величиной K_{D-r} для только одного тримера суперсемейства TNF с рецептором суперсемейства TNF может происходить в результате увеличения скорости связывания " $k_{\text{on-r}}$ " комплекса соединение-тример с рецептором суперсемейства TNF по сравнению с только одним тримером суперсемейства TNF, или в результате снижения скорости диссоциации по сравнению только с одним тримером суперсемейства TNF. В основном скорость " $k_{\text{on-r}}$ " связывания комплекса соединение-тример с рецептором суперсемейства TNF повышается по сравнению с только одним тримером. В основном скорость " $k_{\text{off-r}}$ " связывания комплекса соединение-тример с рецептором суперсемейства TNF снижается по сравнению с только одним тримером. Наиболее предпочтительно " $k_{\text{on-r}}$ " связывания комплекса соединение-тример с рецептором суперсемейства TNF повышается, а скорость " $k_{\text{off-r}}$ " связывания комплекса со-

единение-тример с рецептором суперсемейства TNF снижается по сравнению с только одним тримером суперсемейства TNF. Величину k_{on-r} для связывания комплекса соединение-тример с требуемым рецептором суперсемейства TNF можно повысить по крайней мере приблизительно в 1,5 раза или по крайней мере приблизительно в 2 раза и предпочтительно по крайней мере приблизительно в 3 раза, по сравнению с величиной k_{on-r} для связывания тримера с его рецептором в отсутствие соединения и/или величину k_{off-r} для связывания комплекса соединение-тример с требуемым рецептором суперсемейства TNF можно снизить по крайней мере приблизительно в 1,2 раза, по крайней мере приблизительно в 1,6 раза, по крайней мере приблизительно в 2 раза, более предпочтительно по крайней мере приблизительно в 2,4 раза по сравнению с величиной k_{off-r} для связывания тримера суперсемейства TNF с его рецептором в отсутствие соединения.

Скорость "on-rate" связывания соединения с тримером суперсемейства TNF (k_{on-c}) обычно выше, чем скорость "on-rate" связывания комплекса соединения-тример с рецептором суперсемейства TNF (k_{on-r}). Скорость "off-rate" для связывания комплекса соединения-тример с рецептором суперсемейства TNF (k_{off-r}) также обычно выше, чем скорость "off-rate" для связывания соединения с тримером суперсемейства TNF (k_{off-c}). Наиболее предпочтительно, скорость "on-rate" связывания соединения с тримером суперсемейства TNF (k_{on-c}) обычно выше, чем скорость "on-rate" связывания комплекса соединения-тример с рецептором суперсемейства TNF (k_{on-r}), а скорость "off-rate" для связывания комплекса соединения-тример с рецептором суперсемейства TNF (k_{off-r}) выше, чем скорость "off-rate" для связывания соединения с тримером суперсемейства TNF (k_{off-c}). Величина K_{D-c} для связывания соединения с тримером суперсемейства TNF в основном ниже, чем величина K_{D-r} для связывания комплекса соединения-тример с рецептором суперсемейства TNF, то есть соединение характеризуется более высокой связывающей активностью в отношении тримера, чем комплекс соединение-тример в отношении рецептора.

Величины k_{on-r} , k_{off-r} и K_{D-r} как для комплекса соединение-тример, так и для тримера суперсемейства TNF в отношении необходимого рецептора суперсемейства TNF можно определить с использованием соответствующего метода, например, поверхностного плазмонного резонанса, масс-спектрометрии и изотермической калориметрии. Величина K_{D-r} члена суперсемейства TNF для связывания с его рецептором в присутствии исследуемого соединения может составлять 1 мкМ, 100 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 1 нМ, 100 пМ, 10 пМ или менее (обычно вплоть до самой низкой величины приблизительно 1 пМ). Величина K_{D-r} члена суперсемейства TNF для связывания с его рецептором в присутствии исследуемого соединения (то есть в составе комплекса соединение-тример) может составлять 1 нМ или менее. Величина K_{D-r} комплекса соединение-тример для связывания с необходимым рецептором суперсемейства TNF может составлять менее 600 пМ, более предпочтительно менее 500 пМ, менее 400 пМ, менее 300 пМ, менее 200 пМ, менее 100 пМ или менее 50 пМ (опять вплоть до самой низкой величины 1 пМ). Величина K_{D-r} комплекса соединение-тример для связывания с необходимым рецептором суперсемейства TNF может составлять менее приблизительно 200 пМ (приблизительно до 1 пМ).

Соединения можно идентифицировать методом анализа, который включает определение величины K_{D-r} тримерной формы члена суперсемейства TNF в образце члена суперсемейства TNF и соединения при сравнении величины K_{D-r} тримерной формы члена суперсемейства TNF в образце с контрольным образцом, и выбор соединения.

Соединения стабилизируют тримерную форму члена суперсемейства TNF. Полагают, что стабилизация происходит, если исследуемое соединение повышает долю тримера по сравнению с количеством тримера, наблюдаемым в образце, содержащем член суперсемейства TNF и дестабилизирующий агент в отсутствие исследуемого соединения. Исследуемое соединение может повысить количество тримера приблизительно на 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 300, 400% или более по сравнению с количеством тримера, присутствующим в образце, содержащем член суперсемейства TNF и дестабилизирующий агент в отсутствие исследуемого соединения.

Исследуемое соединение может также увеличить количество тримера по сравнению с количеством, наблюдаемым в образце члена суперсемейства TNF в отсутствие обоих компонентов, дестабилизирующего агента и исследуемого соединения. Исследуемое соединение может повысить количество тримера приблизительно на 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 300, 400% или более по сравнению с количеством тримера, присутствующего в образце, содержащем член суперсемейства TNF в отсутствие обоих компонентов, дестабилизирующего агента и исследуемого соединения.

Исследуемое соединение может повысить количество члена суперсемейства TNF, связанного с его рецептором, приблизительно на 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 300, 400% или более по сравнению с количеством члена суперсемейства TNF, связанного с его рецептором в образце, содержащем член суперсемейства TNF в отсутствие исследуемого соединения.

Исследуемое соединение может повысить стабильность тримерной формы члена суперсемейства TNF. Полагают, что повышение стабильности тримерной формы члена суперсемейства TNF происходит, если исследуемое соединение повышает среднюю температуру термического перехода (T_m) тримерной формы члена суперсемейства TNF по сравнению с T_m тримерной формы члена суперсемейства TNF, наблюдаемой для образца, содержащего член суперсемейства TNF и дестабилизирующий агент в отсут-

вии исследуемого соединения. T_m тримерной формы члена суперсемейства TNF означает температуру, при которой 50% биомолекул находятся в развернутом состоянии. T_m тримерной формы члена суперсемейства TNF в присутствии и/или отсутствии исследуемого соединения можно измерять с использованием любого соответствующего метода, известного в данной области техники, например, с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) или термической денатурации с флуоресцентным зондом.

Исследуемое соединение может повысить величину T_m тримерной формы члена суперсемейства TNF по крайней мере на 1°C, по крайней мере на 2°C, по крайней мере на 5°C, по крайней мере на 10°C, по крайней мере на 15°C, по крайней мере на 20°C или более по сравнению с величиной T_m тримерной формы члена суперсемейства TNF в образце, содержащем член суперсемейства TNF в отсутствие исследуемого соединения. Исследуемое соединение может повысить величину T_m тримерной формы члена суперсемейства TNF по крайней мере на 1°C, обычно по крайней мере на 10°C, и более предпочтительно в интервале от 10°C до 20°C.

Соединения могут полностью или частично ингибировать передачу сигнала через рецептор TNF, если член суперсемейства TNF в форме комплекса соединение-тример связывается с рецептором. Соединение может оказывать действие при снижении передачи сигнала через рецептор суперсемейства TNF по крайней мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%. В другом варианте соединения могут повысить передачу сигнала через рецептор TNF, если член суперсемейства TNF в форме комплекса соединение-тример связывается с рецептором. Соединение может также оказывать действие при увеличении передачи сигнала через рецептор суперсемейства TNF по крайней мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или 200%. Любое изменение уровня передачи сигнала можно измерить любым соответствующим методом, включая измерение активности репортерного гена с использованием щелочной фосфатазы или люциферазы, транслокации NF-κB с использованием систем, таких как Cellomics Aqarius, фосфорилирования эффекторов, расположенных в следующих сигнальных путях, притока соединений, связанных с передачей сигнала, или гибели клеток.

Соединения могут модулировать по крайней мере один из эффектов передачи сигнала, наблюдаемых в следующих путях передачи сигнала, через рецептор TNF, если член суперсемейства TNF в форме комплекса соединение-тример связывается с рецептором. Такие эффекты обсуждаются в данном контексте и включают индуцированное суперсемейством TNF продуцирование IL-8, IL17A/F, IL2 и VCAM, индуцированные суперсемейством TNF активация NF-κB и приток нейтрофилов. Стандартные методы известны в данной области техники для измерения эффектов членов суперсемейства TNF, наблюдаемых в следующих сигнальных путях. Соединения могут модулировать по крайней мере 1, 2, 3, 4, 5, 10 или вплоть до всех эффектов передачи сигнала через рецептор TNF, наблюдаемых в следующих сигнальных путях.

Активность соединений можно определять количественно с использованием стандартной терминологии, такой как величины IC_{50} или половины максимальной эффективной концентрации (EC_{50}). Величины IC_{50} означают концентрацию соединения, которая требуется для 50%-ного ингибирования специфической биологической или биохимической функции. Величины IC_{50} означают концентрацию соединения, которая требуется для достижения 50% его максимального эффекта. Величины IC_{50} или EC_{50} соединений могут составлять 500 нМ, 400 нМ, 300 нМ, 200 нМ, 100 нМ, 90 нМ, 80 нМ, 70 нМ, 60 нМ, 50 нМ, 40 нМ, 30 нМ, 20 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 1 нМ, 100 пМ или менее (вплоть до самой низкой величины приблизительно 10 пМ или 1 пМ).

Величины IC_{50} и EC_{50} можно измерить с использованием любого соответствующего метода, например, можно количественно измерить продуцирование цитокинов методом ИФА. Величины IC_{50} и EC_{50} можно оценивать с использованием стандартной 4-х параметрической логистической модели, известной как сигмоидная модель зависимости между дозой и эффектом.

Как указано выше, примеры соединений, которые способны связываться с TNF и модулировать передачу сигнала, включают соединения формул (1)-(6).

Комплексы модулятор-член суперсемейства TNF.

Авторы настоящего изобретения установили, что связывание соединений, описанных в данном контексте, с тримерными формами членов суперсемейства TNF приводит к изменению конформации тримера суперсемейства TNF. Прежде всего, конформация тримера члена суперсемейства TNF деформируется или искажается при связывании с соединением, как описано выше.

Например, если соединения (1)-(6) связываются с растворимым доменом TNFα, TNF сохраняет свою тримерную структуру, но субъединицы A и C удаляются друг от друга, а субъединица C поворачивается с образованием кармана между этими субъединицами.

Не ограничиваясь теорией, можно полагать, что в отсутствие соединения тримерные члены суперсемейства TNF, включая тримеры TNFα, способны связываться с тремя отдельными димерами рецепторов члена суперсемейства TNF. Каждый димер рецептора члена суперсемейства TNF способен связываться с двумя отдельными тримерами суперсемейства TNF. Такое связывание приводит к агрегации множества тримерных членов суперсемейства TNF и димеров рецептора члена суперсемейства TNF, соз-

давая сигнальный блок, который инициирует передачу сигнала в следующих сигнальных путях.

Если тримерный TNF α связывается с соединением, конформация образующегося комплекса претерпевает деформацию. Соответственно, не ограничиваясь теорией, можно полагать, что в присутствии соединения, описанного в данном контексте, тримерные члены суперсемейства TNF, включая тримеры TNF α , способны связываться только с двумя отдельными димерами рецепторов члена суперсемейства TNF. Тот факт, что только два, а не три, отдельных димеров рецепторов членов суперсемейства TNF связываются с тримерным членом суперсемейства TNF, приводит к снижению или ингибированию агрегации множества тримерных членов суперсемейства TNF и димеров рецепторов членов суперсемейства TNF. Такое явление снижает или ингибирует образование сигнальных блоков и таким образом снижает или ингибирует передачу сигнала в следующих сигнальных путях.

Описанные в изобретении антитела можно использовать для определения членов суперсемейства TNF с деформированной конформацией, которая произошла в результате связывания соединения, как описано в данном контексте. Обычно членом суперсемейства TNF с деформированной или нарушенной конформацией является тримерный член суперсемейства TNF. Однако эти антитела могут также связываться с другими формами члена суперсемейства TNF. Например, они могут связываться с мономерами суперсемейства TNF.

Обычно членом суперсемейства TNF является TNF α и может являться тримерный TNF α (прежде всего TNF α_s).

Соответственно, в изобретении предлагается комплекс, включающий тримерный белок, который является членом суперсемейства TNF, и связанное с ним соединение, тем самым комплекс тример-соединение связывается с необходимым рецептором суперсемейства TNF и модулирует передачу сигнала, индуцированную тримером через рецептор, при этом указанный комплекс связывается с антителом с аффинностью по крайней мере 1 нМ (то есть 1 нМ или менее, вплоть до приблизительно 1 пМ). Обычно членом суперсемейства TNF является TNF α , прежде всего TNF α_s .

Более того, антитело в основном связывается с комплексом с аффинностью, которая снижена по крайней мере приблизительно в 100 раз (аффинность улучшается по крайней мере приблизительно в 100 раз), предпочтительно приблизительно в 200 раз, по сравнению с аффинностью связывания с соединением в отсутствие тримера TNF и/или связывания с тримером TNF в отсутствие соединения.

В изобретении также описано соединение, которое способно связываться с тримерным белком, который является членом суперсемейства TNF, при этом образуется комплекс, и тем самым комплекс соединение-тример связывается с необходимым рецептором суперсемейства TNF и модулирует передачу сигнала, индуцированного тримером через рецептор, причем константа K_{D-ab} связывания комплекса соединение-тример с антителом составляет 1 нМ или менее (вплоть до приблизительно 1 пМ). Обычно членом суперсемейства TNF является TNF α , наиболее предпочтительно TNF α_s .

Обычно аффинность связывания антитела с комплексом снижается по крайней мере приблизительно в 100 раз (аффинность улучшается по крайней мере приблизительно в 100 раз), предпочтительно приблизительно в 200 раз, по сравнению с аффинностью связывания с соединением в отсутствие тримера TNF и/или связывания с тримером TNF в отсутствие соединения.

Комплекс соединение-тример может связываться с антителом, включающим описанные в данном контексте аминокислотные последовательности.

Описанные в данном контексте соединение или комплекс можно использовать при лечении и/или профилактике патологического состояния. Соответственно, предлагается соединение или комплекс для применения на практике в способе медикаментозного лечения организма человека или животного и способ лечения, включающий введение соединения или комплекса. Соединение или комплекс можно использовать для лечения любого терапевтического показания и/или для получения фармацевтической композиции, описанных в данном контексте.

Антитела.

В изобретении описаны антитела, которые селективно связываются по крайней мере с одним комплексом соединение-тример, включающим по крайней мере одно описанное в данном контексте соединение и тримерный член суперсемейства TNF.

Обычно, селективное связывание антитела с комплексом соединение-тример измеряют относительно связывания антитела с соединением в отсутствие члена суперсемейства TNF или с членом суперсемейства TNF в отсутствие соединения или связывания с другими (различными) комплексами соединение-тример.

Прежде всего, в изобретении описано антитело, которое селективно связывается с комплексом, включающим (i) тримерный белок, который является членом суперсемейства TNF, и (ii) соединение, которое способно связываться с тримерным белком, который является членом суперсемейства TNF, тем самым комплекс соединение-тример связывается с необходимым рецептором суперсемейства TNF и модулирует передачу сигнала, индуцированного тримером через рецептор. Обычно указанное антитело селективно связывается с указанным комплексом по сравнению с его связыванием с членом суперсемейства TNF в отсутствие соединения, или с соединением в отсутствие члена суперсемейства TNF.

Соединение может представлять собой любое соединение, описанное выше, включая соединения (1)-(6) (или их соли или сольваты). Как будет обсуждено ниже, член суперсемейства TNF может являться любым членом суперсемейства, но обычно TNF α . Более конкретно, TNF α представляет собой TNF α человека, прежде всего растворимый TNF α (TNF α_s). TNF α_s могут характеризоваться последовательностями SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 36, или могут представлять собой варианты последовательностей SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 36. Такие варианты обычно сохраняют по крайней мере приблизительно 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94 или 95% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 36 (или даже приблизительно 96, 97, 98 или 99% идентичности). Другими словами такие варианты могут сохранять приблизительно 60% - приблизительно 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 36, предпочтительно приблизительно 80% - приблизительно 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 36, более предпочтительно приблизительно 90% - приблизительно 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 36 и наиболее предпочтительно приблизительно 95% - приблизительно 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 36. Варианты более подробно описаны ниже.

Термин "соответствующая последовательность" означает, что TNF α может характеризоваться аминокислотной последовательностью дикого типа любого известного TNF α животного или человека, прежде всего TNF α человека, например, последовательностью SEQ ID NO: 36. TNF α может включать растворимый TNF α (sTNF α) или мембранно-связанный TNF α или оба типа белка. Растворимый гомотримерный TNF α (sTNF) высвобождается из мембранно-связанного гомотримерного TNF α (mTNF) в результате протеолитического расщепления под действием TNF α -превращающего фермента (TACE/ADAM17; хотя другие протеиназы также могут высвобождать sTNF, такие как ADAM10, ADAM19, матричные металлопротеиназа 7 и протеиназа 3, после расщепления которыми образуются соответствующие последовательности растворимого TNF α , которые могут быть удлиненными или укороченными на 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных остатков по сравнению с sTNF (таким как последовательность SEQ ID NO: 36), полученным после расщепления ферментом TACE). Растворимый тримерный sTNF, мол.масса 52 кДа, имеет форму тетраэдра. Последовательность человека, названная mTNF, представлена в последовательности SEQ ID NO: 34, а последовательность человека, названная sTNF (продукт действия фермента TACE на последовательность SEQ ID NO: 34), представлена в последовательности SEQ ID NO: 36. Соответствующие последовательности mTNF α крысы и мыши представлены в последовательностях SEQ ID NO: 32 и 33, соответственно. Соответствующие последовательности TNF α других животных (или известные варианты последовательности человека) можно просто совмещать с последовательностью SEQ ID NO: 36 и присваивать нумерацию, аналогичную SEQ ID NO: 36 (использованную в данном контексте для нумерации аминокислотных остатков TNF α). Например, последовательности различных животных можно найти в базе данных Uniprot database (www.uniprot.org), включая последовательности человека P01375 и Q5STB3. Соответствующие последовательности sTNF α могут включать C-концевой фрагмент последовательности mTNF α (такой как SEQ ID NO: 36), содержащий 157 аминокислотных остатков, или могут быть укороченными или удлиненными на один, два или три аминокислотных остатка (последовательности крысы и мыши включают 156 аминокислотных остатков). Соответствующая последовательность sTNF α может включать 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 аминокислотных замен по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 36. Соответствующая последовательность sTNF α может характеризоваться 80, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% аминокислотной идентичностью по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 36 по всей длине последовательности SEQ ID NO: 36.

Как обсуждалось выше, несмотря на то, что настоящее описание в основном относится к связыванию антител с тримерами членов суперсемейства TNF, антитела могут также связываться с другими формами члена суперсемейства TNF. Для иллюстрации, в разделе Примеры настоящего изобретения показано, что антитело CA185_0179 связывается с тримерным TNF. Однако, как показано на фиг. 1 (кристаллическая структура антитела CA185_0179), связанного с мономером TNF α в присутствии соединения (1)), антитело также связывается с мономерным TNF α . Не ограничиваясь какой-либо теорией, можно полагать, что в присутствии соединения растворимый домен TNF сохраняет свою тримерную структуру. Однако, субъединицы А и С отодвигаются друг от друга (а субъединица С поворачивается), при этом образуется карман между этими двумя субъединицами. Таким образом, хотя антитела связываются с нарушенными тримерами, существует так же возможность того, что антитела все еще могут связываться, если мономеры в тримерной структуре раздвигаются.

Что касается субъединиц А и С, если смотреть на кристаллическую структуру тримера TNF α со стороны, то она принимает форму, подобную пирамиде/конусу. Если вы будете смотреть вдоль оси тримера, так чтобы N- и С-концевые остатки мономера указывали на вас, когда вы смотрите от "плоского конца" тримера. При нарушении структуры соединением, как полагают без ограничения какой-либо теорией, открывается карман между субъединицами А и С, в котором антитела связываются с тримером.

Расположение цепей А, В или С можно определить при измерении трех расстояний между тремя α -

атомами углерода трех идентичных остатков, например, P117 в каждой цепи (можно также использовать остаток G121).

Три расстояния образуют треугольник, который является равносторонним в случае апоTNF, но искажаются при связывании с соединением. Самое укороченное расстояние наблюдается между ВС, а самое удлиненное расстояние наблюдается между АС (например, $AC=13,8 \text{ \AA}$, $AB=12,3 \text{ \AA}$, $BC=10,2 \text{ \AA}$), и таким образом, если смотреть вдоль оси молекулы, когда N/C-концевые остатки указывают на вас, то самое длинное расстояние определяет цепь С, затем цепи А по направлению против часовой стрелки, затем цепи В и С опять по направлению против часовой стрелки.

Следовательно, также предлагаются антитела, которые селективно связываются с комплексом, включающим TNF α человека и соединение, выбранное из группы, включающей соединения (1)-(6) или их соли или сольваты. TNF α обычно является растворимым TNF α (TNF α_s). TNF α_s может включать последовательность SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 36, или их варианты. Такие варианты могут сохранять по крайней мере приблизительно 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичность с последовательностью SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 36 (см. выше или способы идентификации вариантов, описанные ниже). TNF α может являться тримерным.

Термин "антитело", использованный в данном контексте, включает целые антитела и любой антигенсвязывающий фрагмент (то есть "антигенсвязывающую часть") и его отдельные цепи. Антитело означает гликопротеин, включающий по крайней мере две тяжелых цепи (H) и две легких цепи (L), связанные между собой дисульфидными связями, или их антигенсвязывающую часть. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращенно в данном контексте HCVR или V_H) и консервативной области тяжелой цепи. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращенно в данном контексте LCVR или V_L) и консервативной области легкой цепи. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на гиперпервариабельные области, так называемые области, определяющие комплементарность (CDR), и перемежающиеся с более консервативными областями, так называемыми каркасными областями (FR).

Консервативные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Антитело может представлять собой моноклональное антитело или поликлональное антитело и обычно представляет собой моноклональное антитело. Антитело может представлять собой химерное антитело, CDR-привитое антитело, наноантитело, человеческое или гуманизированное антитело или антигенсвязывающую часть любого из указанных антител. Для продуцирования обоих типов антител - моноклональных и поликлональных, обычно в качестве экспериментальных животных используют млекопитающих, не относящихся к человеку, таких как коза, кролик, крыса или мышь, но антитело можно также продуцировать в организме животных других видов.

Поликлональные антитела можно продуцировать стандартными методами, такими как иммунизация пригодного животного исследуемым антигеном. Затем можно отбирать кровь у животного и очищать фракцию IgG.

Антитела, продуцированные против комплексов соединения-тример, можно получить, если необходима иммунизация животного, при введении полипептидов животному, например, млекопитающему, не относящемуся к человеку, с использованием известных и стандартных протоколов, см., например, справочник Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (ed.), Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England (1986). Можно иммунизировать множество теплокровных животных, таких как кролики, мыши, крысы, овцы, крупный рогатый скот, верблюды или свиньи. Однако наиболее пригодными являются мыши, кролики, свиньи и крысы.

Моноклональные антитела можно получить любым известным в данной области техники методом, таким как метод гибридом (Kohler & Milstein, Nature, 256:495-497 (1975)), метод триом, метод гибридом на основе В-клеток человека (Kozbor и др., Immunology Today, 4:72 (1983)) и метод гибридом EBV (Cole и др., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, сс.77-96, Alan R Liss, Inc., (1985)).

Антитела можно также получить методом антител из отдельных лимфоцитов при клонировании и экспрессии кДНК вариабельной области иммуноглобулина, полученной из отдельных лимфоцитов, выбранных для продуцирования специфических антител, например, по методике, описанной в публикациях Babcook, J. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(15): 7843-78481 (1996), WO92/02551, WO2004/051268 и WO2004/106377.

Антитела можно получить с использованием различных методов фагового дисплея, известных в данной области техники, включая методы, описанные в следующих статьях и заявках: Brinkman и др., J. Immunol. Methods, 182: 41-50 (1995), Ames и др., J. Immunol. Methods, 184:177-186 (1995), Kettleborough и др., Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994), Persic и др., Gene, 187 9-18 (1997), Burton и др., Advances in Immunology, 57:191-280 (1994) и WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982, WO 95/20401 и US 5698426, 5223409, 5403484, 5580717, 5427908, 5750753, 5821047, 5571698,

5427908, 5516637, 5780225, 5658727, 5733743 и 5969108.

Целые антитела человека представляют собой антитела, в которых источником всех переменных и консервативных областей (если присутствуют) обеих легкой и тяжелой цепей являются антитела человека, или они в основном идентичны последовательностям антител человека, но не обязательно одному и тому же антителу. Примеры целых антител человека могут включать антитела, продуцированные, например, методами фагового дисплея, описанными выше, и антитела, продуцированные в организме мыши, в которых гены переменных и необязательно консервативных областей иммуноглобулина мыши заменены на соответствующие аналоги человека, например, как в основных чертах описано в следующих патентах: EP 0546073, US 5545806, US 5569825, US 5625126, US 5633425, US 5661016, US 5770429, EP 0438474 и EP 0463151.

В другом варианте антитела можно получить по методике, включающей: иммунизацию млекопитающего, не относящегося к человеку, иммуногеном, содержащим комплекс соединения-тример члена суперсемейства TNF и соединения, описанное в данном контексте, получение препарата антитела из указанного млекопитающего, получение из него моноклональных антител, которые селективно распознают указанный комплекс, и скрининг популяции моноклональных антител, которые связываются с членом суперсемейства TNF только в присутствии соединения.

Молекулы антител могут включать целую молекулу антитела, содержащую полноразмерные тяжелую и легкую цепи или их фрагмент или антигенсвязывающую часть. Термин "антигенсвязывающая часть" антитела означает один или более фрагментов антитела, которые сохраняют способность селективно связываться с антигеном. Было установлено, что антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами полноразмерного антитела. Антитела и фрагменты, и их антигенсвязывающие части могут представлять собой, но не ограничиваясь только ими, Fab, модифицированный Fab, Fab', модифицированный Fab', F(ab')₂, Fv, отдельные домены антител (например, VH или VL или VHH), scFv, двух-, трех- или четырехвалентные антитела, Bis-scFv, диатела, триатела, тетраатела и эпитопсвязывающие фрагменты любой из указанных частей антитела (см., например, Holliger и Hudson, Nature Biotech. 23(9): 1126-1136 (2005), Adair и Lawson, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217 (2005)). Методы конструирования и получения этих фрагментов антител широко известны в данной области техники (см., например, Verma et al., Journal of Immunological Methods, 216, 165-181 (1998)). Другие фрагменты антител включают фрагменты Fab and Fab', описанные в международных заявках WO 2005/003169, WO 2005/003170 и WO 2005/003171, и фрагменты Fab-dAb, описанные в международной заявке WO 2009/040562. Мультивалентные антитела могут включать множество специфичностей или могут быть моносpezifичными (см., например, WO 92/22853 и WO 05/113605). Эти фрагменты антител можно получить по известным в данной области техники методикам, а фрагменты можно подвергать скринингу с использованием метода, аналогичного для скрининга интактных антител.

Домены консервативных областей молекулы антитела, если присутствуют, можно выбрать с учетом предполагаемой функции молекулы антитела, и прежде всего, эффекторных функций, которые могут потребоваться. Например, домены консервативных областей могут включать домены IgA, IgD, IgE, IgG или IgM человека. Прежде всего, можно использовать домены консервативной области IgG, прежде всего изоформы IgG1 и IgG3, если молекула антитела предназначена для терапевтического применения и требуются эффекторные функции антитела. В другом варианте можно использовать изоформы IgG2 и IgG4, если молекула антитела предназначена для терапевтических целей и эффекторные функции антитела не требуются.

Антитело можно получить, экспрессировать, сконструировать или выделить рекомбинантными методами, такими как (а) антитела, выделенные из организма животного (например, мыши), которая является трансгенной или трансхромосомальной в отношении генов исследуемых иммуноглобулинов, или из гибридомы, полученной из них, (б) антитела, выделенные из клеток-хозяина, трансформированных для экспрессии исследуемого антитела, например, из трансфектомы, (в) антитела, выделенные из комбинаторной библиотеки рекомбинантных антител, и (г) антитела, полученные, экспрессированные, сконструированные или выделенные любым другим способом, который включает сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулинов с образованием других последовательностей ДНК.

Антителом может являться антитело человека или гуманизированное антитело. Предполагается, что термин "антитело человека", использованный в данном контексте, включает антитела, содержащие переменные области, в которых обе каркасная и CDR области получены из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Более того, если антитело содержит консервативную область, то консервативная область получена из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Антитела человека могут включать аминокислотные остатки, которые не кодируются последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфичным мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*). Однако предполагается, что термин "антитело человека", использованный в данном контексте, не включает антитела, в которых последовательности CDR получены из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, которые привиты на каркасные последовательности человека.

Такое антитело человека может представлять собой моноклональное антитело человека. Такое мо-

ноклональное антитело человека можно продуцировать в гибридоме, которая включает В клетку, полученную из трансгенного животного, не относящегося к человеку, например, из трансгенной мыши, включающей геном, содержащий трансген тяжелой цепи человека и трансген легкой цепи человека, гибридизированные в бессмертной клетке.

Антитела человека можно получить иммунизацией *in vitro* лимфоцитов человека с последующей трансформацией лимфоцитов вирусом Эпштейна-Барр.

Термин "производные антитела человека" означает любую модифицированную форму антитела человека, например, конъюгат антитела человека и другого агента или антитела.

Предполагается, что термин "гуманизованное антитело" означает CDR-привитые молекулы антитела, в которых последовательности CDR получены из зародышевой линии другого вида млекопитающего, такого как мышь, которые привиты на каркасные последовательности человека. Дополнительные модификации каркасной области можно осуществлять в каркасных последовательностях человека.

Использованный в данном контексте термин "CDR-привитые молекулы антитела" означает молекулу антитела, в которой тяжелая и/или легкая цепь содержит один или более фрагментов CDR (включая, при необходимости, один или более модифицированных фрагментов CDR) из антитела донора (например, моноклональное антитело мыши или крысы), привитых на переменную каркасную область тяжелой и/или легкой цепи антитела акцептора (например, антитело человека). См. обзор Vaughan и др., *Nature Biotechnology*, 16, 535-539, (1998). В одном варианте вместо трансфектирования целого фрагмента CDR, в каркасный фрагмент антитела человека трансфектируют только один или более определяющих специфичность остатков из любого фрагмента CDR, описанных в данном контексте выше (см., например, статью Kashmiri и др., *Methods*, 36, 25-34 (2005)). В одном варианте в каркасную область антитела человека трансфектируют только определяющие специфичность остатки из одного или более фрагментов CDR, описанных выше. В другом варианте в каркасную область антитела человека трансфектируют только определяющие специфичность остатки из каждой области CDR, описанной в данном контексте выше.

Если прививают фрагменты CDR или остатки, определяющие специфичность, можно использовать любую соответствующую последовательность каркасной переменной области акцептора с учетом класса/типа антитела донора, из которого получены CDR, включая каркасные области мыши, примата и человека. Соответственно, CDR-привитое антитело содержит переменный домен, включающий каркасные области человека-акцептора, а также один или более CDR или остатков, определяющих специфичность, описанных выше. Таким образом, предлагается нейтрализующее CDR-привитое антитело, в котором переменный домен включает каркасные области человека-акцептора и CDR животного-донора, не относящегося к человеку.

Примеры каркасных областей человека включают KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY и POM (Kabat и др., см. выше). Например, области KOL и NEWM можно использовать для тяжелой цепи, область REI можно использовать для легкой цепи, а области EU, LAY и POM можно использовать для обеих тяжелой и легкой цепей. В другом варианте можно использовать последовательности зародышевой линии человека, которые можно найти, например, на сайте: <http://www.vbase2.org/> (см. статью Retter и др., *Nucl. Acids Res.* 33 (supplement 1), D671-D674 (2005)).

В случае CDR-привитого антитела человека, тяжелые и легкие цепи акцептора необязательно должны быть получены из одного и того же антитела, и при необходимости они могут включать смешанные цепи, содержащие каркасные области из различных цепей.

Аналогичным образом, в CDR-привитом антителе нет необходимости использовать каркасные области акцептора с точно такой же последовательностью как и антитело акцептора. Например, нетипичные остатки можно заменить на более распространенные остатки для цепи акцептора этого класса или типа. В другом варианте выбранные остатки в каркасных областях акцептора можно заменить на остатки, которые соответствуют остаткам, расположенным в тех же положениях в антителе донора (см. статью Reichmann и др., *Nature*, 332, 323-324 (1998)). Такие изменения следует свести к минимуму, чтобы сохранить аффинность антитела донора. Протокол выбора остатков в каркасных областях акцептора, необходимых для замены, представлен в заявке WO 91/09967.

Специалисту в данной области техники известно, что антитела могут подвергаться различным посттрансляционным модификациям. В большинстве случаев тип и степень этих модификаций зависят от линии клетки-хозяина, использованной для экспрессии антитела, а также от условий культивирования. Такие модификации могут включать вариации в гликозилировании, окислении метионина, образовании diketопиперазина, изомеризации аспартата и дезаминировании аспарагина. К наиболее частым модификациям можно отнести потерю С-концевого основного аминокислотного остатка (такого как лизин или аргинин) за счет действия карбоксипептидаз (как описано в статье Harris RJ., *Journal of Chromatography* 705:129-134 (1995)).

В одном варианте тяжелая цепь антитела включает домен CH1, а легкая цепь антитела включает домен CL, либо каппа либо лямбда.

Биологические молекулы, такие как антитела или фрагменты, содержат кислотные и/или основные функциональные группы, которые придают молекуле суммарный положительный или отрицательный

заряд. Количество общего "наблюдаемого" заряда зависит от полной аминокислотной последовательности молекулы, локального расположения заряженных групп в трехмерной структуре и окружающих молекулу условий. Изоэлектрическая точка (ИЭТ) означает pH, при котором конкретная молекула или поверхность не содержит никакого электрического заряда. В одном варианте ИЭТ антитела или фрагмента составляет по крайней мере 7. В другом варианте ИЭТ антитела или фрагмента составляет по крайней мере 8, например, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8 или 9. В еще одном варианте ИЭТ антитела составляет 8. Для предсказания величины ИЭТ антитела или фрагмента можно использовать программы **ExPASy http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html (см. справочник Walker, The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press 571-607 (2005)).

Антитело может включать по крайней мере один, два или все три последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NOs: 4-6 (HCDR1/HCDR2/HCDR3, соответственно). Последовательности антитела CA185_01974, описанного в разделе Примеры, включают последовательности HCDR1/HCDR2/HCDR3.

Более того, антитело может включать две или все три последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NOs: 1-3 (LCDR1/LCDR2/LCDR3, соответственно). Такие последовательности антитела CA185_01974, описанного в разделе Примеры, включают последовательности LCDR1/LCDR2/LCDR3.

Антитела предпочтительно включают по крайней мере HCDR3, последовательность SEQ ID NO: 6.

Обычно антитело включает по крайней мере одну из последовательностей CDR тяжелой цепи SEQ ID NOs: 4-6 и по крайней мере одну из последовательностей CDR легкой цепи SEQ ID NOs: 1-3. Антитело может включать по крайней мере две последовательности CDR тяжелой цепи, выбранные из SEQ ID NOs: 4-6 и по крайней мере две последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NOs: 1-3. Обычно антитело включает все три последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NOs: 4-6 (HCDR1/HCDR2/HCDR3, соответственно) и все три последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NOs: 1-3 (LCDR1/LCDR2/LCDR3, соответственно). Антитела могут представлять собой химерные, гуманизированные антитела и антитела человека.

Антитело может также включать по крайней мере одну, по крайней мере две или все три последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NOs: 19-21 (HCDR1/HCDR2/HCDR3, соответственно). Последовательности антитела CA185_01979, описанного в разделе Примеры, включают последовательности HCDR1/HCDR2/HCDR3.

Обычно антитело включает HCDR3 последовательность SEQ ID NO: 21.

Антитело может также включать по крайней мере одну, по крайней мере две или все три последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NOs: 1, 17, 18 (LCDR1/LCDR2/LCDR3, соответственно). Последовательности антитела CA185_01979, описанного в разделе Примеры, включают последовательности LCDR1/LCDR2/LCDR3.

Обычно антитело включает по крайней мере одну последовательность CDR тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NOs: 19-21, и по крайней мере одну последовательность CDR легкой цепи, выбранную из SEQ ID NOs: 1, 17, 18. Антитело может включать по крайней мере две последовательности CDR тяжелой цепи, выбранные из SEQ ID NOs: 19-21, и по крайней мере две последовательности CDR легкой цепи, выбранные из SEQ ID NOs: 1, 17, 18. Антитело обычно включает все три последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NOs: 19-21 (HCDR1/HCDR2/HCDR3, соответственно) и все три последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NOs: 1, 17, 18 (LCDR1/LCDR2/LCDR3, соответственно). Антитела могут представлять собой химерные, гуманизированные антитела и антитела человека.

Антитела могут включать любую комбинацию последовательностей CDR антитела CA185_01974 и антитела CA185_01979. Прежде всего, антитело может включать по крайней мере одну последовательность HCDR, выбранную из SEQ ID NOs: 4-6 и 19-21 и/или по крайней мере одну последовательность LCDR, выбранную из SEQ ID NOs: 1-3, 17 и 18.

Антитело может включать:

HCDR1, выбранную из SEQ ID NOs: 4 и 19, и/или

HCDR2, выбранную из SEQ ID NOs: 5 и 20, и/или

HCDR3, выбранную из SEQ ID NOs: 6 и 21; и/или

LCDR1 SEQ ID NO: 1, и/или

LCDR2, выбранную из SEQ ID NOs: 2 и 17, и/или

LCDR3, выбранную из SEQ ID NOs: 3 и 18.

Антитело может также включать переменную область тяжелой цепи (HCVR), последовательность SEQ ID NO: 8 (область HCVR антитела CA185_01974). Антитело может также включать переменную область легкой цепи (LCVR), последовательность SEQ ID NO: 7 (область LCVR антитела CA185_01974). Предпочтительно антитело по изобретению включает переменную область тяжелой цепи, последовательность SEQ ID NO: 8, и переменную область легкой цепи, последовательность SEQ ID NO: 7.

Антитело может также включать переменную область тяжелой цепи (HCVR), последовательность SEQ ID NO: 23 (область HCVR антитела CA185_01979). Антитело может включать переменную область легкой цепи (LCVR), последовательность SEQ ID NO: 22 (область LCVR антитела CA185_01979). Антитело предпочтительно включает переменную область тяжелой цепи, последовательность SEQ ID NO: 23, и переменную область легкой цепи, последовательность SEQ ID NO: 22.

Антитела могут включать комбинацию переменных областей тяжелой и легкой цепи антител CA185_01974 и CA185_01979. Другими словами, антитело может включать переменную область тяжелой цепи, последовательность SEQ ID NO: 8 или 23, и/или переменную область легкой цепи, последовательность SEQ ID NO: 7 или 22.

Антитело может включать последовательность тяжелой цепи (H-цепь), SEQ ID NO: 12 (CA185_01974 mIgG1) или 13 (CA185_01974 mFab (без шарнирного участка)). Антитело может включать последовательность легкой цепи (L-цепь), SEQ ID NO: 11 (каппа-легкая цепь CA185_01974). Антитело обычно включает последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 12/13 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 11. Антитела могут представлять собой химерные, гуманизированные антитела и антитела человека.

Антитела могут включать последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 27 (CA185_01979 mIgG1) или 28 (CA185_01979 mFab (без шарнирного участка)). Антитела могут включать последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 26 (CA185_01979 легкая каппа-цепь). В основном антитело включает последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 27/28 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 26. Антитела могут представлять собой химерные, гуманизированные антитела и антитела человека. И опять последовательности из антител CA185_01974 и CA185_01979 можно комбинировать.

В другом варианте антитело может представлять собой вариант или включать вариант одной из конкретных перечисленных выше последовательностей. Например, вариант может включать замену, делецию или вставку любой из перечисленных выше последовательностей.

Вариант антитела может включать 1, 2, 3, 4, 5, вплоть до 10, вплоть до 20 или более (обычно максимум вплоть до 50) замен и/или делеций аминокислотных остатков в перечисленных выше конкретных последовательностях. Термин "делеция" может означать удаление индивидуальных аминокислотных остатков, удаление малых групп аминокислотных остатков, таких как 2, 3, 4 или 5 аминокислотных остатков, или удаление больших областей аминокислотных остатков, таких как удаление конкретных аминокислотных доменов или других признаков. Варианты "замещения" обычно включают замену одного или более аминокислотных остатков на то же число аминокислотных остатков, при условии замены только консервативных аминокислотных остатков. Например, аминокислоту можно заменять на другую аминокислоту со сходными свойствами, например, другую основную аминокислоту, другую кислотную аминокислоту, другую нейтральную аминокислоту, другую заряженную кислоту, другую гидрофильную аминокислоту, другую гидрофобную аминокислоту, другую полярную аминокислоту, другую ароматическую аминокислоту или другую алифатическую аминокислоту. Некоторые свойства наиболее распространенных аминокислот, которые можно выбрать для пригодных замен, представлены в следующей таблице:

Ala	алифатический, гидрофобный, нейтральный	Met	гидрофобный, нейтральный
Cys	полярный, гидрофобный, нейтральный	Asn	полярный, гидрофильный, нейтральный
Asp	полярный, гидрофильный, нейтральный (-)	Pro	Гидрофобный, нейтральный
Glu	полярный, гидрофильный, заряженный (-)	Gln	полярный, гидрофильный, нейтральный
Phe	ароматический, гидрофобный, нейтральный	Arg	полярный, гидрофильный, заряженный (+)
Gly	алифатический, нейтральный	Ser	полярный, гидрофильный, нейтральный
His	ароматический, полярный, гидрофильный, заряженный (+)	Thr	полярный, гидрофильный, нейтральный
Pe	алифатический, гидрофобный, нейтральный	Val	алифатический, гидрофобный, нейтральный
Lys	полярный, гидрофильный, заряженный(+)	Trp	ароматический, гидрофобный, нейтральный
Leu	алифатический, гидрофобный, нейтральный	Tyr	ароматический, полярный, гидрофобный

"Производные" или "варианты" в основном включают замены, в которых природная аминокислота заменена на ее структурный аналог. Аминокислоты, использованные в последовательностях, можно изменять или модифицировать, например, включить метку, при условии отсутствия значительного отрицательного действия на функцию антитела.

Производные и варианты, описанные выше, можно получить в ходе синтеза антитела или его модификации после продуцирования, или антитело получают в рекомбинантной форме с использованием известных методов сайт-направленного мутагенеза, неспецифического мутагенеза или ферментативного расщепления и/или лигирования нуклеиновых кислот.

Варианты антител могут включать аминокислотную последовательность, которая характеризуется аминокислотной идентичностью на уровне приблизительно более 60%, предпочтительно более 70%, например, 75 или 80%, предпочтительно приблизительно более 85%, например, приблизительно более 90 или 95% по сравнению с аминокислотными последовательностями, описанными в данном контексте (прежде всего последовательности HCVR/LCVR и последовательности Н- и L-цепей). Более того, антитело может представлять собой вариант, который характеризуется аминокислотной идентичностью на уровне приблизительно более 60%, или приблизительно более 70%, например, приблизительно 75% или 80%, обычно приблизительно более 85%, например, приблизительно более 90 или 95% по сравнению с аминокислотными последовательностями HCVR/LCVR и последовательности Н- и L-цепей, описанными в данном контексте, и при этом сохраняются полные CDR области, описанные для этих последовательностей. Варианты могут сохранять по крайней мере приблизительно 90, 91, 92, 93, 94%, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности по сравнению с последовательностями HCVR/LCVR и последовательностями Н- и L-цепей, описанными в данном контексте (в некоторых случаях при этом сохраняются полные области CDR).

В вариантах обычно сохраняется приблизительно 60% - приблизительно 99% идентичности, приблизительно 80% - приблизительно 99% идентичности, приблизительно 90% - приблизительно 99% идентичности или приблизительно 95% - приблизительно 99% идентичности. Такой уровень аминокислотной идентичности можно наблюдать вдоль всей длины соответствующей последовательности SEQ ID NO или части последовательности, такой как 20, 30, 50, 75, 100, 150, 200 или более аминокислотных остатков, в зависимости от размера полной длины полипептида.

Что касается аминокислотных последовательностей, термин "идентичность последовательности" относится к последовательностям, для которых величина идентичности установлена при оценке с использованием программы ClustalW (Thompson и др., 1994, см. выше) со следующими параметрами:

Параметры попарного выравнивания: Method: accurate (точный), Matrix (матрица): PAM, Gap open penalty (штраф за открытие гэпа (пропуска)): 10.00, Gap extension penalty (штраф за продление гэпа): 0.10.

Параметры множественного выравнивания: Matrix (матрица): PAM, Gap open penalty (штраф за открытие гэпа (пропуска)): 10.00, % identity for delay (идентичность за счет задержки): 30, Penalize end gaps (штраф за внесение конечного гэпа): on (вкл), Gap separation distance (расстояние между гэпами): 0, Negative matrix (отрицательная матрица): no (нет), Gap extension penalty (штраф за продление гэпа): 0.20, Residue-specific gap penalties (штраф за пропуск (гэп) специфического аминокислотного остатка): on (вкл.), Hydrophilic gap penalties (штраф за гидрофильный гэп): on (вкл.), Hydrophilic residues (гидрофильные остатки): GPSNDQEKR. Предполагается, что идентичность последовательности для конкретного остатка включает идентичные остатки, которые были просто модифицированы.

В настоящем изобретении предлагается также выделенная последовательность ДНК, кодирующая переменные области тяжелой и/или легкой цепей молекулы антитела. Таким образом, в настоящем изобретении описана выделенная последовательность ДНК SEQ ID NO: 10, кодирующая переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 8, а также выделенная последовательность ДНК SEQ ID NO: 9, кодирующая переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 7.

Описана также выделенная последовательность ДНК SEQ ID NO: 25, кодирующая переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 23 и выделенная последовательность ДНК SEQ ID NO: 24, кодирующая переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 22.

Кроме того, раскрыты выделенная последовательность ДНК SEQ ID NO: 15 или 16, кодирующая тяжелые цепи SEQ ID NO: 12 и 13, соответственно, а также выделенная последовательность ДНК SEQ ID NO: 14, кодирующая легкую цепь SEQ ID NO: 11.

В изобретении описана выделенная последовательность ДНК SEQ ID NO: 30 или 31, кодирующая тяжелые цепи SEQ ID NO: 27 и 28, соответственно, а также выделенная последовательность ДНК SEQ ID NO: 29, кодирующая легкую цепь SEQ ID NO: 26.

В другом варианте пригодной полинуклеотидной последовательностью может являться вариант одной из этих специфических полинуклеотидных последовательностей. Например, вариант может представлять собой вариант любой из перечисленных выше нуклеотидных последовательностей с заменой, делецией или вставкой. Вариант полинуклеотида может включать 1, 2, 3, 4, 5, вплоть до 10, вплоть до 20, вплоть до 30, вплоть до 40, вплоть до 50, вплоть до 75 или более нуклеотидных замен и/или делеций в последовательностях, указанных в перечне последовательностей. В основном вариант включает 1- 20, 1-50, 1-75 или 1-100 замен и/или делеций.

Гомология пригодных вариантов с полинуклеотидом любой одной из нуклеотидных последовательностей, описанных в данном контексте, может составлять по крайней мере приблизительно 70%, обычно по крайней мере приблизительно 80 или 90% и наиболее предпочтительно приблизительно 95, 97 или 99%. Идентичность вариантов может сохраняться на уровне по крайней мере приблизительно 90%, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%. Идентичность вариантов может сохраняться на уровне приблизительно 60% -приблизительно 99%, приблизительно 80% - приблизительно 99%, приблизительно 90% - приблизительно 99% или приблизительно 95% -приблизительно 99%. Гомология и идентичность на этом уровне в основном относятся по крайней мере к кодирующим областям полинуклеотидов. Методы рас-

чета гомологии широко известны в данной области техники, и специалистам в данной области техники представляется очевидным, что гомологию рассчитывают на основании нуклеотидной идентичности. Такая гомология может относиться к области, включающей по крайней мере приблизительно 15, по крайней мере приблизительно 30, например, по крайней мере приблизительно 40, 60, 100, 200 или более непрерывных нуклеотидов (в зависимости от длины). Такая гомология может относиться ко всей длине немодифицированной полинуклеотидной последовательности.

Методы расчета полинуклеотидной гомологии или идентичности известны в данной области техники. Например, в пакете программ UWGCG предлагается программа BESTFIT, которую можно использовать для расчета гомологии (например, с использованием параметров по умолчанию) (см. Devereux и др., *Nucleic Acids Research* 12, сс. 387-395 (1984)).

Алгоритмы PILEUP и BLAST можно также использовать для расчета гомологии и выравнивания последовательностей (обычно с использованием параметров по умолчанию), например, как описано в статьях Altschul S.F., *J Mol Evol* 36:290-300 (1993), Altschul S. F. и др., *J Mol Biol* 215:403-10 (1990).

Программное обеспечение для проведения анализа BLAST является общедоступным в центре National Centre for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Этот алгоритм включает первую идентификацию пары последовательностей с высоким показателем сходства (HSP) при выявлении коротких слов длиной W в запрашиваемой последовательности, которые совпадают с определенным пороговым уровнем положительных значений T или удовлетворяют этому показателю при выравнивании слова той же длины в последовательности из базы данных. T означает пороговый уровень положительных значений соседнего слова (Altschul и др., см. выше). Такие совпадения исходных соседних слов инициируют поиск HPS, содержащих их. Совпадения слов распространяются в обоих направлениях вдоль каждой последовательности до тех пор, пока можно увеличивать кумулятивный показатель выравнивания. Распространение совпадений слов в каждом направлении останавливается, когда кумулятивный показатель выравнивания снижается до нуля или ниже за счет накопления одного или более выравниваний остатков с отрицательной оценкой, или когда достигается конец одной из последовательностей. Параметры алгоритма BLAST W , T и X определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLAST в качестве параметров по умолчанию используются длина слова (W) 11, матрица для оценки BLOSUM62 (см. статью Henikoff и Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915-10919 ((1992)), число выравниваний (B) 50, ожидание (E) 10, $M=5$, $N=4$, и сравнение обеих цепей.

Программа BLAST может осуществлять статистический анализ сходства двух последовательностей, см., например, статью Karlin и Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877 (1993). В качестве одной меры сходства, определяемого алгоритмом BLAST, используется наименьшая суммарная вероятность ($P(N)$), которая позволяет оценить вероятность случайного совпадения между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями. Например, последовательность можно рассматривать сходной с другой последовательностью, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении первой последовательности со второй последовательностью составляет менее приблизительно 1, обычно менее приблизительно 0,1, предпочтительно менее приблизительно 0,01, и наиболее предпочтительно менее приблизительно 0,001. Например, наименьшая суммарная вероятность может находиться в интервале от приблизительно 1 до приблизительно 0,001, в большинстве случаев от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,001.

Гомологичная последовательность может отличаться от последовательности в соответствующем полинуклеотиде наличием менее приблизительно 3, 5, 10, 15, 20 или более мутаций (в каждом случае, замещений, делеций или вставок). Например, гомологичная последовательность может отличаться наличием 3-50 мутаций, в большинстве случаев 3-20 мутаций. Эти мутации можно выявлять в области, включающей по крайней мере 30, например, по крайней мере 40, 60 или 100 или более непрерывных нуклеотидов в гомологичной последовательности.

Вариант последовательности может отличаться от конкретных последовательностей, указанных в перечне последовательностей, за счет избыточности генетического кода. Код ДНК содержит три первичных нуклеотидных остатков (А, Т, С и G) и использует эти основания для "чтения" трехбуквенных кодонов, которые представляют аминокислоты белков, кодируемые генами организма. Линейная последовательность кодонов вдоль молекулы ДНК транслируется в линейную аминокислотную последовательность белка (белков), кодируемую этими генами. Код является высоко вырожденным и включает 61 кодон, кодирующих 20 природных аминокислот, и 3 кодона, представляющих собой "стоп"-сигналы. Таким образом, большинство аминокислот кодируется более чем одним кодоном - действительно, несколько аминокислот кодируется четырьмя или более различными кодонами. Следовательно, вариант полинуклеотида может кодировать одну и ту же полипептидную последовательность, так же как другой полинуклеотид, но характеризоваться другой нуклеотидной последовательностью за счет использования различных кодонов для кодирования тех же самых аминокислот.

Последовательность ДНК может включать синтетическую ДНК, например, полученную с использованием химического процессинга, кДНК, геномную ДНК или любую их комбинацию.

Последовательности ДНК, кодирующие молекулу антитела, можно получить методами, которые хорошо известны специалисту в данной области техники. Например, последовательности ДНК, коди-

рующие часть или все последовательности тяжелых и легких цепей антитела, можно синтезировать при необходимости из определенных последовательностей ДНК или на основе соответствующих аминокислотных последовательностей.

Стандартные методы, с помощью которых можно сконструировать векторы, методы трансфекции, а также методы культивирования хорошо известны специалисту в данной области техники. Указанные способы описаны в книге "Current Protocols in Molecular Biology", под ред. F. M. Ausubel, изд. Wiley Interscience, New York (1999) и в руководстве Maniatis Manual, изд. Cold Spring Harbor.

В изобретении описана также клетка-хозяина, которая содержит один или более векторов клонирования или экспрессии, содержащих одну или более последовательностей ДНК, кодирующих антитело. Для экспрессии последовательностей ДНК, кодирующих антитело, можно использовать любую пригодную систему клетка-хозяина/вектор. Можно использовать бактериальные системы, например, *E. coli* и другие микробные системы, а также можно использовать экспрессионные системы на основе эукариотических клеток-хозяина, например, на основе клеток млекопитающих. Пригодные клетки-хозяина из млекопитающих включают клетки линии СНО, клетки миеломы или гибридомы.

В изобретении описан также способ получения антитела, включающий культивирование клеток-хозяина, содержащих вектор, в условиях, пригодных для экспрессии белка с участием ДНК, кодирующей антитело, а также выделение антитела.

Методы скрининга, как описано в данном контексте, можно использовать для идентификации пригодных антител, которые способны связываться с комплексом соединение-тример. Таким образом, методы скрининга, описанные в данном контексте, можно использовать для тестирования исследуемых антител.

Оценку связывания антител с комплексом соединение-тример можно осуществлять, например, с помощью стандартного твердофазного ИФА или вестерн-блоттинга. Метод ИФА можно использовать также для скрининга гибридом, которые характеризуются положительной реактивностью в отношении целевого белка. Селективность связывания антител можно также определять, контролируя связывание антител с клетками, экспрессирующими целевой белок, например, с помощью проточной цитометрии. Таким образом, способ скрининга может включать стадию идентификации антител, которые способны связываться с комплексом соединение-тример, методами ИФА или вестерн-блоттинга или проточной цитометрии.

Антитела селективно (или специфически) распознают по крайней мере один комплекс соединение-тример, т.е. эпитопы в составе комплекса соединение-тример. Антитело или другое соединение "селективно связывается" или "селективно распознает" белок, если оно преимущественно связывается с белком или характеризуется высокой аффинностью к белку, в отношении которого оно является селективным, но практически не связывается или характеризуется низкой аффинностью к другим белкам. Селективность антитела в отношении целевого комплекса соединение-тример можно в свою очередь оценивать по связыванию антитела с комплексами других подобных соединений с тримером, как описано выше, или по отсутствию такого связывания или по способности антитела различать один комплекс от другого.

Антитело может специфически (или селективно) связываться с комплексами соединение-тример, содержащими тримерные формы одного или более членов суперсемейства TNF. Например, антитело может связываться с комплексами соединение-тример, содержащими TNF α , комплексами соединение-тример, содержащими TNF β , а также комплексами соединение-тример, содержащими CD40L. В другом варианте антитело может специфически (или селективно) связываться с комплексами соединение-тример, содержащими только один из членов суперсемейства TNF, но не с комплексами соединение-тример, содержащими любые другие члены суперсемейства TNF. Например, антитело может связываться с комплексами соединение-тример, содержащими TNF α , но не с комплексами соединение-тример, содержащими TNF β , или комплексами соединение-тример, содержащими CD40L. Антитело может специфически (или селективно) связываться с комплексами соединение-тример, содержащими до двух, трех, четырех или вплоть до всех членов суперсемейства TNF.

Следует понимать, что термин специфически (или селективно) обозначает, что антитело связывается с исследуемыми комплексами соединение-тример и при этом не проявляет существенную перекрестную реактивность с любым другим соединением, которое может включать исследуемые соединения в отсутствие тримера суперсемейства TNF или тримеры членов суперсемейства TNF в отсутствие исследуемого соединения. Перекрестную реактивность можно оценивать любым способом, описанным в данном контексте. Перекрестную реактивность антитела в отношении комплекса соединение-тример с другим соединением, отличающимся от комплекса соединение-тример, можно рассматривать как значительную, если степень связывания антитела с другим соединением повышается по крайней мере приблизительно на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 100% по сравнению со связыванием с исследуемым комплексом соединение-тример. Степень связывания антитела, которое специфически (или селективно) связывается с комплексом соединение-тример, с другим соединением может составлять менее приблизительно 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25 или 20% по сравнению со степенью связывания с комплексом соединение-тример.

Степень связывания антитела с другим соединением может составлять менее приблизительно 20%, менее приблизительно 15%, менее приблизительно 10% или менее приблизительно 5%, менее приблизительно 2% или менее приблизительно 1% по сравнению со степенью его связывания с комплексом соединение-тример. Антитело специфически (или селективно) связывается с комплексом соединение-тример по сравнению с (i) тримерной формой члена суперсемейства TNF в отсутствие соединения и/или (ii) с соединением в отсутствие тримера члена суперсемейства TNF.

Скорость, с которой антитело связывается с комплексом соединение-тример, в данном контексте называется "скоростью ассоциации" или on-rate, k_{on-ab} , а скорость, с которой антитело диссоциирует, т.е. отделяется от ассоциата с комплексом соединение-тример, называется в данном контексте "скоростью диссоциации" или off-rate, k_{off-ab} . Символ " K_{D-ab} ", использованный в данном контексте, обозначает аффинность связывания (константа диссоциации) антитела с комплексом соединение-тример. K_{D-ab} означает k_{off-ab}/k_{on-ab} . Антитела могут характеризоваться малыми значениями on-rate, которую можно измерить в минутах по данным масс-спектрометрического анализа комплекса соединение-тример и интенсивности пика, соответствующего антителу. Значения K_{D-ab} для антитела можно оценивать при повторении указанного измерения при различных соотношениях антитело/комплекс соединение-тример.

Значения K_{D-ab} антител при связывании с комплексом соединение-тример могут снижаться по крайней мере приблизительно в 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз, 200 раз, 300 раз или 400 раз или еще больше по сравнению со значением K_{D-ab} антитела при связывании с тримерным членом суперсемейства TNF в отсутствие соединения и/или значением K_{D-ab} антитела при связывании с соединением в отсутствие тримерного члена суперсемейства TNF. Значение K_{D-ab} антитела при связывании с комплексом соединение-тример может снижаться по крайней мере приблизительно в 10 раз, по крайней мере приблизительно в 100 раз, по крайней мере приблизительно в 200 раз, по крайней мере приблизительно в 300 раз по сравнению со значением K_{D-ab} тримера суперсемейства TNF при связывании с рецептором суперсемейства TNF в отсутствие исследуемого соединения, т.е. связывающая аффинность антител с комплексом соединение-тример обычно увеличивается по крайней мере приблизительно в 10 раз, предпочтительно по крайней мере приблизительно в 100 раз, более предпочтительно по крайней мере приблизительно в 200 раз, еще более предпочтительно по крайней мере приблизительно в 300 раз по сравнению со связывающей аффинностью антитела с тримерным членом суперсемейства TNF в отсутствие соединения и/или со связывающей аффинностью антитела с соединением в отсутствие тримерного члена суперсемейства TNF.

Связывающую аффинность можно представить в виде константы аффинности связывания (K_{D-ab}) в любых пригодных единицах, таких как мкМ, нМ или пМ. Чем меньше значение K_{D-ab} , тем больше связывающая аффинность антитела с комплексом соединение-тример.

Значение K_{D-ab} антитела при связывании с комплексом соединение-тример может снижаться по крайней мере приблизительно в 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз или более по сравнению со значением K_{D-ab} антитела при связывании с тримерным членом суперсемейства TNF в отсутствие соединения и/или значением K_{D-ab} антитела при связывании с соединением в отсутствие тримерного члена суперсемейства TNF.

Снижение значения K_{D-ab} связывания антитела с комплексом соединение-тример по сравнению со значением K_{D-ab} связывания антитела с тримерным членом суперсемейства TNF в отсутствие соединения и/или со значением K_{D-ab} связывания антитела с соединением в отсутствие тримерного члена суперсемейства TNF может происходить в результате увеличения скорости on-rate (k_{on-ab}) связывания антитела с комплексом соединение-тример по сравнению со связыванием антитела с тримерным членом суперсемейства TNF в отсутствие соединения и/или со связыванием антитела с соединением в отсутствие тримерного члена суперсемейства TNF, и/или может происходить в результате снижения скорости off-rate (k_{off-ab}) по сравнению со связыванием антитела с тримерным членом суперсемейства TNF в отсутствие соединения и/или со связыванием антитела с соединением в отсутствие тримерного члена суперсемейства TNF.

Скорость on-rate (k_{on-ab}) связывания антитела с комплексом соединение-тример обычно увеличивается по сравнению со скоростью on-rate связывания антитела с тримерным членом суперсемейства TNF в отсутствие соединения и/или связывания антитела с соединением в отсутствие тримерного члена суперсемейства TNF. Скорость off-rate (k_{off-ab}) связывания антитела с комплексом соединение-тример обычно снижается по сравнению со скоростью off-rate связывания антитела с тримерным членом суперсемейства TNF в отсутствие соединения и/или при связывании антитела с соединением в отсутствие тримерного члена суперсемейства TNF. Чаще всего скорость on-rate (k_{on-ab}) связывания антитела с комплексом соединение-тример увеличивается, а скорость off-rate (k_{off-ab}) связывания антитела с комплексом соединение-тример снижается по сравнению со связыванием антитела с тримерным членом суперсемейства TNF в отсутствие соединения и/или при связывании антитела с соединением в отсутствие тримерного члена суперсемейства TNF.

Значение k_{on-ab} связывания антитела с комплексом соединение-тример может повышаться по крайней мере приблизительно в 1,5 раза или по крайней мере в два раза, и обычно по крайней мере в три раза по сравнению со значением k_{on-ab} связывания антитела с тримерным членом суперсемейства TNF в отсут-

ствии соединения и/или связывания антитела с соединением в отсутствие тримерного члена суперсемейства TNF, и/или значение $k_{\text{off-ab}}$ связывания антитела с комплексом соединение-тример может снижаться по крайней мере приблизительно в два раза, по крайней мере приблизительно в 10 раз, по крайней мере приблизительно в 20 раз, по крайней мере приблизительно в 30 раз, по крайней мере приблизительно в 40 раз, по крайней мере приблизительно в 50 раз, по крайней мере приблизительно в 60 раз, по крайней мере приблизительно в 70 раз, по крайней мере приблизительно в 80 раз, более предпочтительно по крайней мере приблизительно в 90 раз по сравнению со значением $k_{\text{off-ab}}$ связывания антитела с тримерным членом суперсемейства TNF в отсутствие соединения и/или связывания антитела с соединением в отсутствие тримерного члена суперсемейства TNF.

Значения $k_{\text{on-ab}}$, $k_{\text{off-ab}}$ и $K_{\text{D-ab}}$ можно определить любым пригодным методом, например, методом поверхностного плазмонного резонанса, масс-спектрометрии, а также изотермической калориметрии.

Значение $K_{\text{D-ab}}$ связывания антитела с комплексом соединение-тример может составлять 1 нМ, 900 пМ, 700 пМ, 500 пМ, 100 пМ, 10 пМ или менее (обычно вплоть до приблизительно 1 пМ). Описанные антитела предпочтительно связываются с комплексами соединение-тример по изобретению с высокой аффинностью, например, в пиколярном диапазоне. Значение $K_{\text{D-ab}}$ связывания антитела с комплексом соединение-тример может составлять 1 нМ или менее, 900 пМ или менее, 700 пМ или менее, 500 пМ или менее, 400 пМ или менее, 300 пМ или менее, 200 пМ или менее, 100 пМ или менее, 90 пМ или менее, 80 пМ или менее, 70 пМ или менее, 60 пМ или менее, 50 пМ или менее, 40 пМ или менее, 30 пМ или менее, 20 пМ или менее, 10 пМ или менее (опять, вплоть до приблизительно 1 пМ).

После идентификации и отбора пригодных антител аминокислотную последовательность антител можно определить способами, известными специалисту в данной области техники. Гены, кодирующие аминокислотную последовательность антител, можно клонировать, используя вырожденные праймеры. Рекombинантные антитела можно получить с использованием стандартных методов.

Антитела могут конкурировать за связывание с TNF α или связываться с теми же эпитопами, что и описанные выше для Н-цепи/Л-цепи, последовательностей HCVR/LCVR или CDR. Прежде всего, антитела могут конкурировать за связывание с TNF α или связываться с теми же эпитопами, что и антитела, содержащие комбинацию последовательностей HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3, SEQ ID NO: 4/5/6/1/2/3 или SEQ ID NO: 19/20/21/1/17/18. Антитела могут конкурировать за связывание с TNF α или связываться с теми же эпитопами, что и антитела, содержащие пару последовательностей, HCVR и LCVR, SEQ ID NO: 8/7 или SEQ ID NO: 23/22.

Термин "эпитоп" обозначает область антигена, с которой связывается антитело. Эпитопы могут представлять собой структурные или функциональные эпитопы. Функциональные эпитопы обычно представляют собой подмножество структурных эпитопов и содержат аминокислотные остатки, которые напрямую влияют на аффинность взаимодействия. Эпитопы могут представлять собой конформационные эпитопы, т.е. состоящими из "нелинейных аминокислот" (т.е. которые не расположены непосредственно друг за другом). В определенных вариантах эпитопы могут включать детерминанты, которые представляют собой химически активные поверхностные группировки молекул, такие как аминокислоты, сахаридные боковые цепи, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и в определенных вариантах могут характеризоваться специфическими трехмерными структурными характеристиками и/или специфическими характеристиками заряда.

Связывание антитела с тем же эпитопом или конкуренцию за связывание с эталонным антителом можно легко определить по стандартным методикам, известным в данной области техники. Например, для определения связывания исследуемого антитела с тем же эпитопом, что и эталонное антитело оценивают связывание эталонного антитела с белком или пептидом в "условиях насыщения". Затем оценивают способность исследуемого антитела связываться с белком или пептидом. Если исследуемое антитело способно связаться с белком или пептидом после связывания с эталонным антителом в "условиях насыщения", то можно сделать вывод, что исследуемое антитело связывается с другим эпитопом, чем эталонное антитело. С другой стороны, если исследуемое антитело не способно связываться с белком или пептидом после связывания эталонного антитела в "условиях насыщения", то исследуемое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эталонное антитело по изобретению.

Для оценки конкурентного связывания антитела с эталонным антителом описанную выше методику связывания осуществляют в двух вариантах. В первом варианте осуществляют связывание эталонного антитела с белком/пептидом в "условиях насыщения", с последующей оценкой способности исследуемого антитела связываться с указанным белком/пептидом. Во втором варианте осуществляют связывание исследуемого антитела с белком/пептидом в "условиях насыщения", с последующей оценкой способности эталонного антитела связываться с указанным белком/пептидом. Если в обоих вариантах только первое (условия насыщения) антитело способно связываться с белком/пептидом, то можно сделать вывод, что исследуемое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание с белком/пептидом. Специалисту в данной области техники представляется очевидным, что антитело, которое конкурирует за связывание с антигеном с эталонным антителом, не обязательно связывается с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, но может стерически блокировать связывание эталонного антитела в результате свя-

звания с перекрывающимся или соседним эпитопом.

Два антитела связываются с одним и тем же или перекрывающимся эпитопом, если каждый из них конкурентно ингибирует (блокирует) связывание другого с антигеном. То есть 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого по крайней мере на 50, 75, 90 или даже 99% согласно данным конкурентно-связывающего анализа (см., например, статью Junghans и др., *Cancer Res.*, 50, 1495-1502 (1990)). В другом варианте, два антитела связываются с одним и тем же эпитопом, если по существу все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или исключают связывание одного антитела, уменьшают или исключают связывание другого. Два антитела связываются с перекрывающимися эпитопами, если некоторые аминокислотные мутации, которые уменьшают или исключают связывание одного антитела, уменьшают или исключают связывание другого.

Затем можно провести дополнительный стандартный эксперимент (например, пептидная мутация и анализ связывания), чтобы подтвердить, что наблюдаемое отсутствие связывания исследуемого антитела на самом деле объясняется связыванием с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, или что стерическая блокировка (или другое явление) отвечает за наблюдаемое отсутствие связывания. Такие эксперименты можно проводить с использованием ИФА, РИА, поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антител, доступного специалисту в данной области техники.

Антитела можно использовать для идентификации соединений, как описано в данном контексте. Антитела можно использовать также в качестве биомаркеров связывания с мишенью. Биомаркер связывания с мишенью можно использовать для обнаружения связывания, т.е. связывания лиганда с исследуемой мишенью. В данном случае антитела связываются только с комплексами соединений с тримерными формами членов суперсемейства TNF. Таким образом, если антитело способно связываться с комплексом соединения-тример, то это свидетельствует о связывании лиганда с исследуемой мишенью (тримером члена суперсемейства TNF). Антитела можно модифицировать при введении детектируемого маркера, как описано в данном контексте. Таким образом, взаимодействие соединения с мишенью, т.е. с целевым членом суперсемейства TNF, можно детектировать с использованием таких антител.

Использование антител в качестве биомаркеров связывания с мишенью может найти применение в клинических и доклинических испытаниях, в которых образец получают у субъекта, проходящего курс лечения согласно настоящему изобретению. Образец, полученный у субъекта, можно обработать антителами, чтобы оценить связывание соединения, используемого для лечения субъекта, с мишенью - членом суперсемейства TNF. Образец, полученный у субъекта, может представлять собой любую пригодную ткань или жидкость, такую как кровь, плазма крови или моча. Субъект может представлять собой млекопитающее, обычно человека.

Соответственно, предлагается применение антитела в качестве биомаркера связывания с мишенью для обнаружения комплекса соединения-тример, содержащего тримерный белок, который является членом суперсемейства TNF, а также соединение, которое способно связываться с тримерным белком, который является членом суперсемейства TNF, тем самым комплекс соединения-тример связывается с необходимым рецептором суперсемейства TNF и модулирует передачу сигнала, индуцированную тримером через рецептор в образце, полученном у субъекта. Членом суперсемейства предпочтительно является TNF α и/или модуляция является антагонизмом передачи сигнала через рецептор TNFR1.

Кроме того, предлагается способ обнаружения связывания с мишенью соединения с тримерным членом суперсемейства TNF, тем самым комплекс соединения-тример связывается с необходимым рецептором и модулирует передачу сигнала, индуцированную тримером через рецептор, при этом способ включает:

- (а) получение образца у субъекта, которому вводили указанное соединение,
- (б) контактирование антитела с указанным образцом и контрольным образцом, при этом детектируют антитела,
- (в) определения количества связавшегося указанного детектируемого антитела с указанным образцом и указанным контрольным образцом,

где более высокий уровень связывания указанного детектируемого антитела с указанным образцом, по сравнению с уровнем связывания указанного детектируемого антитела с указанным контрольным образцом, свидетельствует о связывании указанного соединения с мишенью - указанным тримерным членом суперсемейства TNF.

Способы обнаружения антител, а также определения количества связавшихся антител с мишенью хорошо известны в данной области техники. Обычно в состав антител включают метки. Указанные метки включают ферменты, биотин/стрептавидин, флуоресцентные белки и флуоресцентные красители.

Связывание антител с мишенью можно измерить, например, методом иммунохимическим методом анализа. Иммунохимический анализ включает вестерн-блоттинг, твердофазный ИФА, иммунофлуоресцентный анализ, иммуногистохимический анализ, а также проточную цитометрию. Для оценки связывания антител с членом суперсемейства TNF можно использовать любую пригодную методику.

В способе, описанном выше, связывание детектируемого антитела с образцом, полученным у субъекта, которому вводили соединение, сравнивают со связыванием антитела с контрольным образцом.

Контрольным образцом может являться любой пригодный образец. Контрольный образец обычно представляет собой "отрицательный контроль", где связывание антител с членом суперсемейства TNF осуществляют в отсутствие соединения. Например, образец можно получить у пациента до введения соединения. Контроль также можно получить на основе образцов, использованных в ранее проведенных анализах, например, выбрать из ряда образцов у разных субъектов, которым не вводили соединение. При определении контрольного значения можно использовать данные анализов образцов, которые получены у 5, 10, 20, 50 или 100 субъектов. Контрольное значение может представлять собой среднее значение или диапазон всех полученных значений.

В экспериментах используют одинаковые условия, например, методы определения для образца, полученного у субъекта, которому вводили соединение, и для контрольного образца. Аналогичным образом, в обоих случаях используют одни и те же антитела.

Большая степень связывания (повышенное связывание) детектируемого антитела с образцом у пациента, которому вводили соединение, по сравнению со связыванием антитела с контрольным образцом, указывает на связывание соединения с мишенью - тримерным членом суперсемейства TNF. Другими словами, эквивалентная или сниженная степень связывания (сниженное связывание) в образце у пациента, которому вводили соединение, по сравнению с контролем, указывает на отсутствие связывания указанного соединения с мишенью. Другими словами, если не наблюдается никакой существенной разницы между двумя степенями связывания, то это указывает на отсутствие связывания с мишенью.

Специалист в данной области техники может легко определить, когда наблюдается повышенное связывание по сравнению с контролем. Например, если контроль представляет собой диапазон данных, взаимодействие с мишенью можно определить на основе разброса данных, разности между данными контроля и детектируемого уровня связывания антитела в исследуемом образце и рассчитанных доверительных интервалов. Можно также идентифицировать взаимодействие с мишенью, если детектируемый уровень связывания в исследуемом образце выше максимального уровня связывания, детектируемого в любом отрицательном контроле.

Связывание с мишенью можно детектировать, если уровень связывания антител увеличивается приблизительно на 30% или более по сравнению с наибольшим уровнем связывания в контрольном диапазоне. Связывание с мишенью также можно детектировать, если уровень связывания антител увеличивается приблизительно на 40% или более, или приблизительно на 50% или более относительно контрольного диапазона. То же самое относится к вариантам, когда контроль представляет собой среднее значение или одно значение, полученное на основе анализа образца у пациента, который получен до введения соединения. Следует понимать, что отсутствует верхний предел увеличения связывания (в процентах) по сравнению с контролем.

Антитела можно использовать для скрининга соединения, которое вызывает изменение конформации тримерного члена суперсемейства TNF, при этом указанное конформационное изменение модулирует передачу сигнала через требуемый рецептор суперсемейства TNF при связывании тримерного члена суперсемейства TNF. Член суперсемейства обычно представляет собой TNF α и/или модуляция является антагонизмом передачи сигнала через рецептор TNFR1.

Антитела можно использовать для лечения и/или профилактики патологического состояния. Соответственно, предлагается антитело для использования в способе лечения человека или животного. Предлагается также способ лечения, который заключается во введении субъекту антитела. Антитело можно использовать в любом терапевтическом показании и/или в фармацевтической композиции, описанной в данном контексте.

Анализ антител.

Как описано в данном контексте, предлагаются антитела, которые селективно связываются по крайней мере с одним комплексом соединения-тример, как описано в данном контексте, по сравнению со связыванием только с одним соединением или с членом суперсемейства TNF в отсутствие соединения. Указанные антитела можно использовать для идентификации других соединений или классов соединений, обладающих идентичными свойствами.

Моноклональные антитела против члена суперсемейства TNF можно получить с использованием стандартных методик, как описано в данном контексте. Затем можно провести скрининг указанных антител против члена суперсемейства TNF на наличие антител, которые связываются с комплексами соединение-тример, или моноклональных антител, связывание которых с членом суперсемейства TNF ингибируется соединениями, как описано в данном контексте.

В другом варианте можно получить моноклональные антитела против конкретных комплексов тример члена суперсемейства TNF-соединение. Затем можно провести скрининг указанных антител на наличие моноклональных антител, которые селективно связываются с членом суперсемейства TNF в присутствии соединения, по сравнению с его связыванием с членом суперсемейства TNF в отсутствие соединения.

Когда получено антитело, которое селективно связывается по крайней мере с одним комплексом соединение-тример, по сравнению со связыванием только с соединением или с членом суперсемейства TNF в отсутствие соединения, такие соединения можно использовать в скрининге других соединений,

обладающих той же активностью, что и исследуемые соединения.

Таким образом, предлагается анализ для идентификации соединения по изобретению, который включает следующие стадии:

а) проведение анализа связывания для оценки связывающей аффинности исследуемого комплекса соединение-тример с антителом,

б) сравнение связывающей аффинности, измеренной на стадии (а), со связывающей аффинностью другого комплекса соединение-тример, для которого известно, что он связывается с антителом, указанным на стадии (а), с высокой аффинностью, а также

в) выбор соединения, присутствующего в комплексе соединение-тример на стадии (а), если его измеренная связывающая аффинность характеризуется приемлемым значением с учетом сравнения, проводимого на стадии (б).

Следует понимать, что термин "другой" комплекс соединение-тример, использованный выше при описании стадии (б), обычно обозначает комплекс, содержащий тот же тример, что и комплекс соединение-тример, используемый на стадии (а), но другое соединение. Соединением может представлять собой любые соединения (1)-(б).

Термин "приемлемый", использованный при описании стадии (в), обозначает, что связывающая аффинность комплекса соединение-тример, использованного на стадии (а), и связывающая аффинность другого комплекса соединение-тример, использованного на стадии (б), являются практически сопоставимыми.

Селективность связывания указанного антитела с указанным комплексом обычно измеряют относительно связывания указанного антитела с членом суперсемейства TNF в отсутствие соединения или соединения в отсутствие члена суперсемейства TNF.

Связывающая аффинность комплекса соединение-тример, использованного на стадии (а), обычно превышает связывающую аффинность другого комплекса соединение-тример, использованного на стадии (б). Соответственно, повышение связывающей аффинности комплекса соединение-тример, использованного на стадии (а), по сравнению со связывающей аффинностью другого комплекса соединение-тример, использованного на стадии (б), находится в пределах 10-, 20-, 50-, 100-, 200- или 500-кратного диапазона.

Библиотеки соединений можно анализировать с использованием антител.

Соединения библиотеки можно инкубировать в присутствии указанного антитела в присутствии или отсутствие члена суперсемейства TNF. Соединения, образующие часть комплекса соединение-тример, которая связывается с антителом только в присутствии, как члена суперсемейства TNF, так и соединения, являются кандидатами, которые характеризуются той же активностью, что и соединения, описанные в данном контексте. Описанные в данном контексте соединения можно использовать для выявления исследуемого соединения, которое является соединением, описанным в данном контексте.

В анализе можно использовать одно или более антител. В анализе антител можно использовать генерическое антитело, которое способно связываться с комплексами любого соединения с конкретным членом суперсемейства TNF.

В анализе антител можно использовать панель нескольких антител, которые специфически связываются с различными комплексами соединение-тример. Панель антител может включать по крайней мере 5, по крайней мере 10, по крайней мере 15, по крайней мере 20, по крайней мере 30, по крайней мере 40 или по крайней мере 50 антител (например, до 75 антител).

Анализ антител может представлять собой высокоскоростной анализ, который обеспечивает скрининг множества исследуемых соединений в течение короткого периода времени для идентификации соединений.

Члены суперсемейства TNF и их рецепторы можно очищать или они могут присутствовать в смесях, таких как культивируемые клетки, образцы тканей, биологические жидкости или культуральная среда. Можно разработать анализы, которые являются качественными или количественными анализами, при этом последний пригоден для определения параметров связывания (констант аффинности и кинетических констант) исследуемого соединения с тримерными формами членов суперсемейства TNF, а также параметров связывания комплекса соединение-тример с необходимым рецептором TNF.

Образец, содержащий член суперсемейства TNF и соединение, может дополнительно содержать дестабилизирующий агент. Дестабилизирующие агенты, другое название хаотропные агенты, включают агенты, такие как мочевины, гуанидин или ацетонитрил, используемые в низких молярных концентрациях (например, 1 М), при этом использование указанных агентов в высоких концентрациях (например, 6 М или более) приводит к полной диссоциации тримера TNF α и разворачиванию входящих в его состав мономерных субъединиц TNF α . В качестве дестабилизирующего агента можно использовать ДМСО, обычно в концентрации 5, 10% или более.

Исследуемые соединения могут характеризоваться любыми/всеми свойствами, описанными выше.

Суперсемейство TNF и его рецепторы.

В настоящее время известно 22 члена суперсемейства TNF:

TNF α

(TNFSF1A), TNF β (TNFSF1B), CD40L (TNFSF5), BAFF (TNFSF 13B/BlyS), APRIL (TNFSF 13), OX40L (TNFSF4), RANKL (TNFSF 11/TRANCE), TWEAK (TNFSF 12), TRAIL (TNFSF 10), TL1A (TNFSF15), LIGHT (TNFSF 14),

лимфотоксин, лимфотоксин β (TNFSF3), 4-1BBL (TNFSF9), CD27L (TNFSF7), CD30L (TNFSF8), EDA (эктодисплазин), EDA-A1 (эктодисплазин A1), EDA-A2 (эктодисплазин A2), FASL (TNFSF6), NGF и GITRL (TNFSF 18).

Членом суперсемейства TNF обычно является TNF α . TNF α существует как в растворимой форме (TNF α_s), так и мембрано-связанной форме (TNF α_m). Термин TNF α , использованный в данном контексте, включает (обе) TNF α_s и TNF α_m формы. Наиболее пригодным TNF α является TNF α_s форма. TNF α_s может содержать последовательность SEQ ID NO: 35 или SEQ ID NO: 36, или их варианты (как описано выше).

Анализ можно использовать для идентификации модуляторов по крайней мере одного из любых членов суперсемейства TNF, включая 22 известных члена суперсемейства TNF. Более подробно, анализ можно использовать для идентификации соединений, которые связываются с любым членом суперсемейства TNF, прежде всего с тримерными формами членов суперсемейства TNF, а также соединений, которые стабилизируют указанные тримеры в конформации, при которой они способны связываться с необходимым рецептором TNF, и которые модулируют передачу сигнала через указанный рецептор. Прежде всего, анализ по изобретению используют для идентификации модуляторов TNF α или CD40L, прежде всего TNF α или даже TNF α_s .

Соединение, описанное в данном контексте, может являться модулятором по крайней мере одного из любых членов суперсемейства TNF, включая 22 известных члена суперсемейства TNF. Более подробно, член суперсемейства TNF представляет собой TNF α или CD40L, прежде всего TNF α или даже TNF α_s .

Комплекс соединение-тример может включать тримерную форму любого члена суперсемейства TNF, включая 22 известных членов суперсемейства TNF. Член суперсемейства TNF обычно представляет собой TNF α или CD40L. Член суперсемейства TNF может представлять собой TNF α , наиболее предпочтительно TNF α_s .

Члены суперсемейства TNF связываются с рецепторами TNF и инициируют передачу сигнала через них. В настоящее время известно 34 рецептора TNF:

4-

1BB (TNFRSF9/CD137), NGF R (TNFRSF16), BAFF R (TNFRSF13C),
остеопротегерин (TNFRSF1 IB), BCMA (TNFRSF 17), OX40 (TNFRSF4), CD27
(TNFRSF7), RANK (TNFRSF1 IA), CD30 (TNFRSF8), RELT (TNFRSF 19L), CD40
(TNFRSF5), TACI (TNFRSF 13B), DcR3 (TNFRSF6B), TNFRH3 (TNFRSF26),
DcTRAIL R1 (TNFRSF23), DcTRAIL R2 (TNFRSF22), TNF-R1 (TNFRSF 1 A),
TNF-R2 (TNFRSF IB), DR3 (TNFRSF25), TRAIL R1 (TNFRSF 1 OA), DR6
(TNFRSF21), TRAIL R2 (TNFRSF 1 OB), EDAR, TRAIL R3 (TNFRSF IOC), Fas
(TNFRSF6/CD95), TRAIL R4 (TNFRSF 10D), GITR (TNFRSF 18), TROY (TNFRSF
19), HVEM (TNFRSF 14), TWEAK R (TNFRSF 12A), TRAMP (TNFRSF25),

лимфотоксин β R (TNFRSF3), а также XEDAR.

Пригодным рецептором TNF является TNF-R1 (TNFR1) или TNF-R2 (TNFR2). Термин TNF-R, использованный в данном контексте, включает TNF-R1 и TNF-R2, включая внеклеточный домен (ECD) TNF-R1 и TNF-R2. Анализ можно использовать для идентификации соединений, которые модулируют передачу сигнала членами суперсемейства TNF через любой требуемый рецептор суперсемейства TNF. Анализ можно использовать для идентификации соединений, которые модулируют передачу сигнала членами суперсемейства TNF через TNF-R1, TNF-R2 или CD40. Член суперсемейства TNF может представлять собой TNF α , а рецептор TNF может представлять собой TNF-R1 или TNF-R2. Прежде всего, член суперсемейства TNF может представлять собой TNF α , а рецептор TNF может представлять собой TNF-R1. Прежде всего, член суперсемейства TNF может представлять собой TNF α_s , а рецептор TNF может представлять собой TNF-R1. Анализ можно использовать для идентификации соединений, действие которых осуществляется за счет специфической модуляции передачи сигнала членами суперсемейства TNF через TNF-R1. Прежде всего, соединения могут оказывать воздействие в результате модуляции передачи сигнала членами суперсемейства TNF через TNF-R1, но не оказывать влияния на передачу сигнала членами суперсемейства TNF через TNF-R2.

Комплекс соединение-тример может модулировать передачу сигнала членами суперсемейства TNF через по крайней мере один рецептор TNF, включая 34 известных рецепторов TNF. Рецептором TNF обычно является TNF-R1, TNF-R2 или CD40L.

Прежде всего, член суперсемейства TNF представляет собой TNF α , а рецептор TNF представляет собой TNF-R1 или TNF-R2. Еще более предпочтительно член суперсемейства TNF представляет собой TNF α , а рецептор TNF представляет собой TNF-R1. Наиболее пригодным членом суперсемейства TNF является TNF α , а рецептором TNF является TNF-R1.

Терапевтические показания.

TNF α является исходным членом суперсемейства TNF. TNF α является плеiotропным цитокином, который опосредует иммунную регуляцию и воспалительные реакции. Известно также, что TNF *in vivo* принимает участие в развитии ответных реакций на бактериальные, паразитарные и вирусные инфекции. Прежде всего, известно, что TNF α принимает участие в развитии ревматоидного артрита (RA), воспалительных заболеваний кишечника (включая болезнь Крона), псориаза, болезни Альцгеймера (AD), болезни Паркинсона (PD), боли, эпилепсии, остеопороза, астмы, сепсиса, лихорадки, системной красной волчанки (SLE) и рассеянного склероза (MS), а также рака. Известно также, что TNF α принимает участие в развитии амиотрофического бокового склероза (ALS), ишемического инсульта, иммунокомплексного гломерулонефрита, волчаночного нефрита (LN), гломерулонефрита, ассоциированного с антителами против компонентов цитоплазмы нейтрофилов (ANCA-), липоидного нефроза, диабетической нефропатии (DN), острой почечной недостаточности (АКИ), обструктивной уропатии, отторжения аллотрансплантата почек, цисплатин-индуцируемой АКИ и обструктивной уропатии.

Известно, что другие члены суперсемейства TNF принимают участие в развитии аутоиммунного заболевания и иммунодефицитных состояний. Прежде всего, известно, что члены суперсемейства TNF принимают участие в развитии RA, SLE, рака, MS, астмы, ринита, остеопороза и множественной миеломы (MM). Известно, что TL1A принимает участие в развитии отторжения трансплантата органа.

Соединение, описанное в данном контексте, можно использовать для лечения, профилактики или снижения интенсивности симптомов любых состояний, которые можно вылечить, предотвратить или снизить интенсивность его симптомов стандартным модулятором члена суперсемейства TNF. Соединение можно использовать в отдельности или в комбинации со стандартным модулятором члена суперсемейства TNF. Любое состояние, которое развивается в результате частичной или полностью патогенной передачи сигнала членом суперсемейства TNF через рецептор TNF или из-за недостаточной передачи сигнала членом суперсемейства TNF через рецептор TNF, в принципе можно вылечить, предотвратить или снизить интенсивность его симптомов. Патогенная передача сигнала членом суперсемейства TNF через рецептор TNF включает повышенную передачу сигнала через рецептор TNF, т.е. превышающую нормальный физиологический уровень передачи сигнала, включает передачу сигнала через рецептор TNF, которая была инициирована нормально, но которая не останавливается в ответ на нормальные физиологические сигналы, а также передачу сигнала через рецептор TNF, которая находится в пределах нормального физиологического диапазона величин, но которая была инициирована нефизиологическими факторами. В предпочтительном варианте это относится к лечению, профилактике или снижению интенсивности симптомов состояний, опосредование которых происходит в результате действия TNF α или CD40L или на их развитие влияют TNF α или CD40L.

Соединения, которые взаимодействуют с TNF α , соответственно будут оказывать благоприятное действие при лечении и/или профилактике различных заболеваний человека. К ним относятся аутоиммунные и воспалительные заболевания, неврологические и нейродегенеративные расстройства, боль и ноцицептивные расстройства, а также нарушения сердечно-сосудистой системы.

Воспалительные и аутоиммунные нарушения включают системные аутоиммунные нарушения, аутоиммунные эндокринные расстройства и органоспецифические аутоиммунные нарушения. Системные аутоиммунные нарушения включают системную красную волчанку (SLE), псориаз, васкулит, полимиозит, склеродермию, рассеянный склероз, анкилозирующий спондилоартрит, ревматоидный артрит и синдром Шегрена. Аутоиммунные эндокринные расстройства включают тиреоидит. Органоспецифические аутоиммунные расстройства включают болезнь Аддисона, гемолитическую или пернициозную анемию, гломерулонефрит (включая синдром Гудпасчера), болезнь Грейвса, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, инсулинозависимый сахарный диабет, юношеский диабет, увеит, воспалительное заболевание кишечника (включая болезнь Крона и язвенный колит), пемфигус, атопический дерматит, аутоиммунный гепатит, первичный билиарный цирроз, аутоиммунную пневмонию, аутоиммунный кардит, тяжёлую псевдопаралитическую миастению, спонтанное бесплодие, остеопороз, астму, а также мышечную дистрофию (включая мышечную дистрофию Дюшенна).

Неврологические и нейродегенеративные расстройства включают болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, инсульт, боковой амиотрофический склероз, повреждение спинного мозга, травму головы, судороги и эпилепсию.

Нарушения сердечно-сосудистой системы включают тромбоз, гипертрофию сердца, гипертензию, нерегулярную сократительную способность сердца (например, при сердечной недостаточности), а также сексуальные расстройства (включая эректильную дисфункцию и женскую сексуальную дисфункцию).

Прежде всего, соединение можно использовать для лечения или профилактики воспалительных заболеваний, расстройств ЦНС, иммунных расстройств и аутоиммунных заболеваний, боли, остеопороза,

лихорадки и отторжения трансплантата. Соединение можно использовать для лечения или профилактики ревматоидного артрита, воспалительных заболеваний кишечника (включая болезнь Крона), псориаза, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, эпилепсии, астмы, сепсиса, системной красной волчанки, рассеянного склероза, астмы, ринита, рака и остеопороза. Соединение можно использовать для лечения или профилактики ревматоидного артрита (RA), неспецифического воспалительного артрита, эрозивного заболевания костей, хондрита, дегенерации и/или деградации хряща, юношеского воспалительного артрита, болезни Стилла (у детей и/или взрослых), юношеского идиопатического артрита, юношеского идиопатического артрита (как олигоартикулярные, так и полиартикулярные формы), воспалительные заболевания кишечника (включая болезнь Крона, язвенный колит, неопределенный колит, воспаление в области илеоанального резервуара), псориаза, псориатической артропатии, анкилозирующего спондилоартрита, болезни Шегрена, болезни Альцгеймера (AD), болезни Бехчета, болезни Паркинсона (PD), амиотрофического бокового склероза (ALS), ишемического инсульта, боли, эпилепсии, остеопороза, остеопении, анемии при хроническом заболевании, кахексии, диабета, дислипидемии, метаболического синдрома, астмы, хронического обструктивного заболевания дыхательных путей (или заболевания легких), сепсиса, лихорадки, респираторного дистресс-синдрома, системной красной волчанки (SLE), рассеянного склероза (MS), иммунокомплексного гломерулонефрита, волчаночного нефрита (LN), гломеруло-нефрита, ассоциированного с антителами против компонентов цитоплазмы нейтрофилов (ANCA-), липидного нефроза, диабетической нефропатии (DN), острой почечной недостаточности (AKI), обструктивной уропатии, отторжения аллотрансплантата почек, цисплатин-индуцируемой АКІ и обструктивной уропатии, заболеваний глаз (включая диабетическую ретинопатию, диабетический макулярный отек, ретинопатию недоношенных, возрастную дегенерацию макулы, макулярный отек, пролиферативную и/или непролиферативную ретинопатию, васкуляризацию роговицы, включая неоваскуляризацию, окклюзию вены сетчатки, различные формы увеита и кератита), тиреоидита, фиброзных нарушений, включая различные формы фиброза печени, различные формы фиброза легких, системного склероза, склеродермии, рака и осложнений, связанных с раком (включая скелетные осложнения, кахексию и анемию).

Как обсуждалось выше, антитела можно использовать в качестве биомаркеров связывания с мишенью для оценки эффективности лечения соединением или комплексом, как описано в данном контексте. В одном варианте осуществления образец, взятый у субъекта, которого лечили соединением или комплексом, как описано в данном контексте, может контактировать с антителом. Затем антитело можно использовать для определения количества комплекса член суперсемейства TNF-соединение, присутствующего в образце. Количество комплекса, определенное с использованием антитела, можно использовать в качестве показателя эффективности лечения. Например, чем больше количество комплекса, определенное антителами, тем выше эффективность лечения. Количество комплекса, определенное с использованием антител, прямо пропорционально эффективности лечения. Например, двукратное повышение количества комплекса, определенного с использованием антител, может свидетельствовать о двукратном повышении эффективности лечения.

Антитело можно использовать для определения количества комплекса соединение-тример с использованием любой пригодной методики. Стандартные методики известны в данной области техники и приводятся в данном описании. Например, для определения количества комплекса соединение-тример можно использовать твердофазный ИФА и вестерн-блоттинг с использованием антител по изобретению.

Количество комплекса соединение-тример можно определить при измерении массы комплекса соединение-тример, концентрации комплекса соединение-тример и молярности комплекса соединение-тример. Указанное количество можно представить в любых соответствующих единицах. Например, концентрацию комплекса соединение-тример можно выражать в пг/мл, нг/мл или мкг/мл. Массу комплекса соединение-тример можно выражать в пг, нг или мкг.

Количество комплекса соединение-тример в исследуемом образце можно сравнить с уровнем комплекса соединение-тример в другом образце, таком как контрольный образец, как описано в данном контексте. Согласно этой методике можно оценить фактическое количество комплекса соединение-тример, например, массу, молярное количество, концентрацию или молярность комплекса соединение-тример в образцах. Количество комплекса соединение-тример можно сравнить с количеством в другом образце без количественного определения массы, молярного количества, концентрации или молярности комплекса соединение-тример. Таким образом, количество комплекса соединение-тример в образце можно оценить в виде относительного количества, такого как относительная масса, относительное молярное количество, относительная концентрация или относительная молярность комплекса соединение-тример при сравнении двух или более образцов.

Фармацевтические композиции, дозировки и режимы дозирования.

Антитело, соединение или комплекс можно перерабатывать в фармацевтическую композицию. Фармацевтическая композиция в норме является стерильной и обычно включает фармацевтически приемлемый носитель и/или адъювант. Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый адъювант и/или носитель.

Термин "фармацевтически приемлемый носитель", используемый в данном контексте, включает любые и все физиологически совместимые растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактери-

альные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие абсорбцию и т.п. В качестве носителя можно использовать носитель, пригодный для парентерального введения, например, такого как внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, внутриглазной, внутрибрюшинный, подкожный, спинномозговой или другие парентеральные способы введения, например, инъекция или вливание. В другом варианте, в качестве носителя можно использовать носитель, пригодный для непарентерального введения, такого как местный, эпидермальный способ введения или способ введения через слизистые. В качестве носителя можно использовать носитель, пригодный для перорального введения.

В зависимости от способа введения на модулятор можно наносить покрытие из материала для защиты соединения от воздействия кислот и других природных условий, которые могут инактивировать соединение.

Фармацевтические композиции могут включать одну или несколько фармацевтически приемлемых солей. Термин "фармацевтически приемлемая соль" обозначает соль, которая сохраняет требуемую биологическую активность исходного соединения и не вызывает никаких нежелательных токсикологических эффектов. Примеры указанных солей включают кислотнo-аддитивные соли и основнo-аддитивные соли.

Фармацевтически приемлемые носители включают носители или разбавители на водной основе. Примеры пригодных носителей на водной основе, которые можно использовать в фармацевтических композициях включают воду, водные буферные растворы и солевой раствор. Примеры других носителей включают этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их пригодные смеси, растительные масла, такие как оливковое масло и органические сложные эфиры для инъекций, такие как этилолеат. Во многих случаях в состав композиции желательно включать изотонические агенты, например, сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия.

Терапевтические композиции обычно должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композицию можно получать в виде раствора, микроэмульсии, липосом или в виде другой упорядоченной структуры, пригодной для включения лекарственного средства в высокой концентрации.

Фармацевтические композиции могут содержать дополнительные активные ингредиенты.

В изобретении описаны наборы, содержащие антитела, соединения и/или комплексы по изобретению и инструкции по применению. Набор может дополнительно содержать один или более дополнительных реагентов, таких как дополнительное лекарственное или профилактическое средство, как описано выше.

Соединения, идентифицированные способами и/или антителами, и антитела или их составы или композиции можно вводить для профилактики и/или лечения.

При лечении соединения вводят субъекту, уже страдающему от нарушения или состояния, как описано выше, в количестве, достаточном для лечения, облегчения или частичной приостановки развития состояния или снижения интенсивности одного или нескольких его симптомов. Указанное лечение может привести к снижению тяжести симптомов заболевания или увеличению частоты или продолжительности периодов без симптомов. Количество, достаточное для достижения указанных целей, определяется как "терапевтически эффективное количество".

При профилактическом лечении составы вводят субъекту из группы риска развития нарушения или состояния, как описано выше, в количестве, достаточном для предотвращения или уменьшения последующего осложнения состояния или одного или нескольких его симптомов. Количество, достаточное для достижения указанных целей, определяется как "профилактически эффективное количество". Эффективные количества для достижения каждой цели будут зависеть от тяжести заболевания или повреждения, а также от массы тела и общего состояния субъекта.

Субъектом, которому вводят лекарственное средство, является человек или животное, не относящееся к человеку. Термин "животное, не относящееся к человеку" включает всех позвоночных, например, млекопитающих и не млекопитающих, таких как приматы, не относящиеся к человеку (низшие приматы), овцы, собаки, кошки, лошади, крупный рогатый скот, куры, амфибии, рептилии и т.д. Обычно субъектом, которому осуществляют введение, является человек.

Соединение или фармацевтическую композицию можно вводить одним или несколькими путями введения с использованием одного или более способов из множества способов, известных в данной области техники. Специалисту в данной области техники представляется очевидным, что путь и/или способ введения можно изменять в зависимости от требуемых результатов.

Примеры путей введения соединений или фармацевтических композиций включают внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, внутриглазной, внутрибрюшинный, подкожный, спинномозговой или другие парентеральные способы введения, например, инъекция или вливание. Термин "парентеральное введение", использованный в данном контексте, обозначает способы введения, которые отличаются от энтерального и местного введения, и обычно осуществляется путем инъекции. В другом варианте, соединение или фармацевтическую композицию можно вводить непарентеральным способом, таким как местный, эпидермальный способ введения или способ введения через слизистые. Соединение или фармацевтическая композиция можно использовать и для перорального введения.

Практикующий врач может определить пригодную дозу соединения или фармацевтической компо-

зиции. Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях можно изменять, чтобы получить композиции, содержащие активный ингредиент в количестве, эффективном для достижения требуемого терапевтического ответа для конкретного пациента, при этом композиция и способ введения не должны оказывать токсичный эффект на пациента. Выбираемый уровень дозировки зависит от множества фармакокинетических факторов, включая активность конкретных композиций, способ введения, время введения, скорость выведения конкретного используемого соединения, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в комбинации с конкретными используемыми комбинациями, возраст, пол, масса тела, состояние, общее состояние и медицинский анамнез пациента, нуждающегося в таком лечении, и другие подобные факторы, хорошо известные в медицине.

Пригодную дозу можно выбрать, например, из диапазона от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 1000 мг/кг массы тела, обычно от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 1000 мг/кг массы тела пациента, нуждающегося в таком лечении. Например, пригодная доза может составлять от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг массы тела в сут или от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг массы тела в сут.

Режимы дозирования можно корректировать для обеспечения оптимального требуемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно вводить однократную дозу, несколько разделенных доз можно вводить в течение определенного промежутка времени или дозу можно пропорционально уменьшать или увеличивать в зависимости от терапевтической ситуации. Термин "стандартная лекарственная форма", использованный в данном контексте, обозначает физически дискретные формы, пригодные для использования в качестве единых доз, вводимых субъектам, нуждающимся в таком лечении, при этом каждая форма содержит предварительно определенное количество активного соединения, рассчитанное для получения требуемого терапевтического эффекта в смеси с необходимым фармацевтическим носителем.

Лекарственное средство можно вводить в виде однократной дозы или многократных доз. Многократные дозы можно вводить одним и тем же или различными способами, а также в один или разные участки тела. В другом варианте, дозы можно получать в виде препарата с замедленным высвобождением, и в этом случае требуется менее частое введение. Дозировку и частоту введения можно корректировать в зависимости от полупериода выведения антагониста у пациента и требуемой продолжительности лечения.

Как описано выше, соединения или фармацевтическую композицию можно вводить совместно с одним или более другими терапевтическими агентами. Например, другой агент может представлять собой обезболивающее средство, анестетик, иммунодепрессант или противовоспалительное средство.

Комбинированное введение двух или более агентов можно осуществлять рядом различных способов. Оба агента можно вводить совместно в составе одной композиции, или их можно вводить в отдельных композициях в ходе комбинированной терапии. Например, один агент можно вводить до, после введения другого агента или одновременно с ним.

Следующие примеры представлены только для иллюстрации настоящего изобретения.

Примеры

Пример 1.

Синтез соединений.

Синтез соединения (1) описан в заявке WO 2013/186229 (пример 44).

Синтез соединения (2) описан в заявке WO 2013/186229 (пример 89).

Синтез соединения (3) описан в заявке WO 2014/009295 (пример 129).

Синтез соединения (4) описан в заявке WO 2014/009295 (пример 173).

Синтез соединения (5) описан в заявке WO 2014/009295 (пример 319). Синтез соединения (6) описан в заявке WO 2013/186229 (пример 490).

Пример 2.

Получение антител.

После иммунизации 5 крыс Sprague Dawley комплексом TNF α человека с соединением, бензимидазолом (1), иммунные В-клетки культивировали в 96-луночных планшетах, чтобы индуцировать клонирование и секрецию антител (см. статью Tickle S. и др., High throughput screening for high affinity antibodies, Journal of Laboratory Automation, 14, 303-307 (2009)). Затем проводили скрининг культуральных супернатантов на наличие IgG антител, которые преимущественно связываются с TNF α человека в комплексе с соединением (1) (с 50-кратным молярным избытком) по сравнению с TNF α человека методом FМAT-анализа на основе гомогенных частиц (Fluorescent Microvolumetric Assay Technology). TNF α человека (\pm соединение (1)) сорбировали на поверхности частиц (частицы фирмы Bangs, покрытые авидином, superavidin-coated Bangs Beads, номер по каталогу CP01N) с использованием системы связывания и гибридного белка TNF-рецептор I-Fc человека (фирмы R & D Systems, номер по каталогу 372- R1-050), связанного с биотинилированными антителами против Fc человека (фирмы Jackson, номер по каталогу 109-066-098).

Антитела, которые характеризовались преимущественным связыванием с комплексом TNF α -

соединение (1), были названы "конформационно-селективными" и их использовали для дальнейшего клонирования. Метод флуоресценции фокусов (см. патент US 7993864/EP1570267B1) использовали для идентификации и выделения антигенспецифических В-клеток из положительных лунок, и специфические гены варибельной области антитела выделяли из отдельных клеток с помощью метода ПЦР с обратной транскрипцией (RT).

Аминокислотные последовательности двух типичных антител, CA185_01974 и CA185_01979, которые характеризуются конформационно-селективным связыванием с TNF α человека и мыши + соединение, представлены ниже:

CA185_01974.0 (VR0001837).

Варибельная область легкой цепи (LCVR), SEQ ID NO: 7 (CDR подчеркнуты)

DIQMTQSPASLPASPEEIVTITCQASQDIGNWLSWYQQKPGKSPQLLIYGATSL

ADGVPSRFSASRSGTQYSLKISRLQVEDFGIFYCLOGQSTPYTFGAGTKLELK

Варибельная область тяжелой цепи (HCVR), SEQ ID NO: 8 (CDR подчеркнуты)

DVQLVESGGGLVQPGRSLKLSAASGFTFSAYYMAWVRQAPTKGLEWVASI

NYDGANTFYRDSVKGRFTVSRDNARSSLYLQMDSLRSEDTATYYCTTEA

YGYNSNWFGYWGQGLTVTVSS

CA185_01979.0 (VR0001842)

Варибельная область легкой цепи (LCVR), SEQ ID NO: 22 (CDR подчеркнуты)

DIQMTQSPASLSASLEEIVTITCQASQDIGNWLSWYQQKPGKSPHLLIYGTTSL

ADGVPSRFSGSRSGTQYSLKISGLQVADIGIYVCLQAYSTPFTFGSGTKLEIK

Варибельная область тяжелой цепи (HCVR), SEQ ID NO: 23 (CDR подчеркнуты)

EVHLESVGPGLVKPSQSLTCSVTGYSITNSYWDWIRKFPGNKMEWMGYIN

YSGSTGYNPSLKSRSISRDTSNQFFLQLNSITTEDTATYYCARGTYGYNAYH

EDYWGRGVMVTVSS

Пример 3.

Предполагаемый эпитоп полученных антител.

Учитывая способность антител, полученных из крысы, связываться как с TNF α человека, так и мыши в присутствии соединений, для выявления предполагаемого эпитопа проводили подробный анализ аминокислотных последовательностей TNF α крысы, мыши и человека, а также рентгеноструктурный анализ указанных TNF α .

Источник - крыса, UniProt P16599 (SEQ ID NO: 32)

```

10          20          30          40          50          60
MSTESMIRDV ELAEEALPKK MGGLQNSRRC LCLSLFSFLL VAGATTLFCL LNFVIGIPNK

          70          80          90          100         110         120
EEKFPNGLPL ISSMAQTLTL RSSSQNSSDK PVAHVVANHQ AEEQLEWLSQ RANALLANGM

          130         140         150         160         170         180
DLKDNQLVVP ADGLYLIYSQ VLFKQGCPD YVLLTHTVSR FAISYQEKVS LLSAISKSPCP

          190         200         210         220         230
KDTPEGAELK PWYEPMYLGG VFQLEKGDLL SAEVNLPKYL DITESGQVYF GVIAL

```

Источник - мышь, UniProt P06804 (SEQ ID NO: 33)

```

10          20          30          40          50          60
MSTESMIRDV ELAEEALPQK MGGFQNSRRC LCLSLFSFLL VAGATTLFCL LNFVIGIPQR

          70          80          90          100         110         120
DEKFPNGLPL ISSMAQTLTL RSSSQNSSDK PVAHVVANHQ VEEQLEWLSQ RANALLANGM

          130         140         150         160         170         180
DLKDNQLVVP ADGLYLVYSQ VLFKQGCPD YVLLTHTVSR FAISYQEKVN LLSAVKSPCP

          190         200         210         220         230
KDTPEGAELK PWYEPYIYLG VFQLEKGDQL SAEVNLPKYL DFAESGQVYF GVIAL

```

Источник - человек, UniProt P01375 (SEQ ID NO: 34)

```

      10           20           30           40           50           60
MSTESMIRDV ELAEEALPKK TGGPQGSRRC LFLSLFSFLI VAGATTLFCL LHFGVIGPQR

      70           80           90           100          110          120
EEFPRDLSLI SPLAQAVRSS SRTFSDKQVA HVVANPQAEQ QLQWLNRRAN ALLANGVELR

      130          140          150          160          170          180
DNQLVVPSEG LYLIYSQVLF KGQGCPSTHV LLTHTISRIA VSYQTKVNLN SAIKSPCQRE

      190          200          210          220          230
TRPGAEEKPW YEPIYLGGVF QLEKGDRLSA EINRPDYLDF AESGQVYFGI IAL

```

При выравнивании и сравнении последовательностей TNF α крысы, мыши и человека из базы данных UniProt, были выявлены примеры, где аминокислотная последовательность белка крысы отличается от последовательности белка человека, а также где последовательности белка человека и мыши идентичны в зрелом расщепленном продукте, которые включают N168, I194, F220 и A221 (остатки и нумерация из последовательности белка человека).

Указанные остатки были отмечены в кристаллической структуре TNF α человека (1TNF) (см. фиг. 1). Возможно, что любой из выделенных аминокислотных остатков входит в состав эпитопа, с которым связываются антитела CA185_01974 и CA185_01979.

После клонирования вариабельных областей антител в векторы IgG и Fab (без шарнирного участка) мыши был подтвержден конформационно-селективный характер связывания антител CA185_01974 и CA185_01979 с использованием множества исследуемых соединений, связанных с TNF α , методами ВЭЖХ, ВІАсоге, твердофазного ИФА и клеточных анализов.

Пример 4.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) для определения характеристик антител

Специфическое связывание мышинных Fab фрагментов определяли по образованию комплексов антитела CA185_01974 и комплекса TNF α человека и соединения (1) с использованием эксклюзионной хроматографии. Результаты представлены на фиг. 2. Согласно данным, представленным на указанной фигуре, при использовании Fab фрагментов в 0,5-кратном молярном избытке преобладающий пик на хроматограмме соответствует Fab фрагменту, связавшемуся с комплексом соединение-тример (хотя присутствует небольшой пик, который свидетельствует о присутствии некоторого количества комплекса соединение-тример, который не связался с Fab фрагментом). При использовании Fab фрагментов в 1,0-кратном молярном избытке на хроматограмме наблюдается один высокомолекулярный пик, соответствующий Fab фрагменту, связанному с комплексом тример-соединение. При использовании Fab фрагментов в 1,5- и 2-кратном молярном избытке на хроматограмме наблюдается низкомолекулярный пик, соответствующий несвязавшемуся Fab фрагменту.

Таким образом, при 1,5- и 2-кратном молярном избытке Fab фрагментов стехиометрическое соотношение Fab: тример TNF α составляет 1:1.

Связывание CA185_01979 с комплексом TNF α человека и соединения (1) исследовали также с использованием эксклюзионной хроматографии. Результаты представлены на фиг. 3. В случае использования CA185_01974 при 1,5- и 2-кратном молярном избытке Fab фрагментов стехиометрическое соотношение Fab: тример TNF α составляет 1:1.

Пример 5.

Анализы ВІАсоге для определения характеристик антител.

Анализ на основе поверхностного плазмонного резонанса проводили при 25°C с использованием установки ВІАсоге T200 (фирмы GE Healthcare). Антитела против Fc мыши (фирмы Jackson, 115-006-071) иммобилизовали на сенсорный чип CM5 (фирмы GE Healthcare) методом конденсации аминов, при этом уровень иммобилизации составил 6000 единиц ответа. Буферный раствор HBS-EP (10 mM HEPES (pH 7,4), 0,15 M NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,05% (об./об.) детергента P20 (GE Healthcare) +1% ДМСО использовали в качестве рабочего буферного раствора. В установку закачивали 10 мкл каждого IgG (1 мкг/мл), при этом происходило их связывание с иммобилизованными антителами против Fc мышей, при этом получали TNF α -связывающую поверхность.

TNF α человека или мыши (получены в лаборатории, 50 нМ) предварительно инкубировали в буферном растворе HBS-EP+ (1% ДМСО), содержащем соединение (2 мкМ), в течение 5 ч.

Раствор TNF α человека или мыши \pm исследуемое соединение пропускали через каждый иммобилизованный IgG в течение 3 мин, при этом скорость потока составляла 30 мкл/мин. Для регенерации поверхности через ячейку прокачивали в течение 60 с раствор 40 mM HCl \times 2 и раствор 5 mM NaOH в течение 30 с, при этом скорость потока составляла 10 мкл/мин. Кривые с двойным вычитанием фона анализировали с использованием программного обеспечения T200 Evaluation (версия 1.0). Кинетические пара-

метры определяли с использованием алгоритма подбора.

Данные кинетики связывания TNF α человека и мыши в присутствии и отсутствии исследуемых соединений из двух серий химических соединений представлены ниже в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Данные анализа TNF α человека на установке BIAcore				
Антитело	TNF α человека	ka (M ⁻¹ c ⁻¹)	kd (c ⁻¹)	KD (M)
CA185_01974	+ соединение (2)	4,2×10 ⁵	3,9×10 ⁻⁵	9,4×10 ⁻¹¹
CA185_01974	+ соединение (1)	3,2×10 ⁵	3,8×10 ⁻⁵	1,2×10 ⁻¹⁰
CA185_01974	апо	6,6×10 ⁵	1,3×10 ⁻³	1,9×10 ⁻⁸
CA185_01979	+ соединение (2)	5,7×10 ⁵	3,3×10 ⁻⁵	5,8×10 ⁻¹¹
CA185_01979	+ соединение (1)	4,7×10 ⁵	1,6×10 ⁻⁵	3,4×10 ⁻¹¹
CA185_01979	апо	1,1×10 ⁵	7,1×10 ⁻⁴	6,7×10 ⁻⁹

Оба антитела, CA185_01974 и CA185_01979, характеризуются селективным связыванием (>2 log) с TNF α человека, с измененной конформацией после связывания с типичными исследуемыми соединениями из двух химических серий.

Таблица 2

Данные анализа TNF α мыши на установке BIAcore				
Антитело	TNF α человека	ka (M ⁻¹ c ⁻¹)	kd (c ⁻¹)	KD (M)
CA185_01974	+ соединение (2)	4,2×10 ⁵	3,9×10 ⁻⁵	9,4×10 ⁻¹¹
CA185_01974	+ соединение (1)	3,2×10 ⁵	3,8×10 ⁻⁵	1,2×10 ⁻¹⁰
CA185_01974	апо	6,6×10 ⁵	1,3×10 ⁻³	1,9×10 ⁻⁸
CA185_01979	+ соединение (2)	5,7×10 ⁵	3,3×10 ⁻⁵	5,8×10 ⁻¹¹
CA185_01979	+ соединение (1)	4,7×10 ⁵	1,6×10 ⁻⁵	3,4×10 ⁻¹¹
CA185_01979	апо	1,1×10 ⁵	7,1×10 ⁻⁴	6,7×10 ⁻⁹

Оба антитела, CA185_01974 и CA185_01979, характеризуются селективным связыванием (>1,5 и >2 log, соответственно) с TNF α человека, с измененной конформацией после связывания с типичными исследуемыми соединениями из двух химических серий.

Пример 6.

Твердофазный ИФА для определения характеристик антител.

Была разработана методика сэндвич-ИФА анализа для измерения концентрации TNF α , связавшегося с соединениями по изобретению, с использованием антитела CA185_01974.0, которое специфически распознает TNF α по его конформации, измененной после образования комплексов с указанными соединениями. Краткое описание анализа. Поверхность микропланшета для титрования покрывали антителами CA185_01974.0 для связывания TNF α в составе комплекса с исследуемым соединением. TNF α инкубировали в присутствии исследуемого соединения в 50-кратном молярном избытке в течение ночи при 28°C. После указанной инкубации в течение ночи получали серийные разведения TNF α в очищенной плазме крови человека, обедненной эндогенным TNF α , в присутствии блокаторов гетерофильных антител и вносили в лунки планшета с указанным покрытием. Затем получали кривые зависимости от концентрации TNF α в диапазоне от 0,78 пг/мл до 50 пг/мл. Для обнаружения связавшегося TNF α использовали конъюгаты биотинилированных поликлональных антител против TNF α со стрептавидинпероксидазой и добавляли субстрат ТМБ с последующим измерением колориметрического сигнала. Чувствительность анализа повышали за счет использования амплификации тирамидного сигнала и набора ELAST фирмы Perkin Elmer в качестве дополнительной стадии между стадиями обработки стрептавидинпероксидазой и субстратом.

Одновременно разработали также методику твердофазного ИФА анализа для определения общего содержания TNF α (TNF α в свободной форме + TNF α в составе комплекса с исследуемым соединением). При осуществлении указанного анализа антитела, использованные для получения покрытия, заменяли на коммерческие анти-TNF α -поликлональные антитела (фирмы Invitrogen, АНС3812).

Кроме того, время инкубации образца увеличили до 3 ч. Все остальные стадии проводили, как опи-

сано для конформационно-специфического анализа. Такой анализ позволяет рассчитывать количество TNF α в составе комплекса с исследуемым соединением в процентах от общего количества TNF α .

Результаты определения общего содержания TNF α методом ИФА для соединений (3), (4) и (5) представлены на фиг. 4.

Результаты конформационно-специфического ИФА анализа TNF α в составе комплексов CA185_01974.0 и соединений (3), (4) и (5) представлены на фиг. 5. Отсутствие сигнала для апо TNF α в указанном анализе указывает на специфическое связывание антитела CA185_01974 с TNF α , который связан с соединением. Указанное антитело способно распознавать TNF α , связанный с различными исследуемыми соединениями из разных химических серий.

Пример 7.

Клеточные анализы для определения характеристик антител.

Способность рекомбинантных антител связываться с TNF α с измененной конформацией после связывания с соединением исследовали также методом анализа FACS с использованием эмбриональных клеток почек (Juprln, HEK) человека, которые после индукции в присутствии доксициклина в концентрации 1 мкг/мл в течение 2,5 ч характеризуются сверхэкспрессией TNF-RI. Клетки HEK трипсинизировали и инкубировали в течение 2 ч в среде, позволяющей восстановить уровни TNFRI, снижающиеся в ходе трипсинизации. TNF α человека (2 мкг/мл) предварительно инкубировали с соединением (1) (40 мкМ) или 0,4% ДМСО в течение 1 ч при 37°C. Предварительно инкубированную смесь добавляли к клеткам в течение 1 ч на ледяной бане (разведение 1:4, конечные концентрации: TNF α человека - 0,5 мкг/мл \pm соединение (1) (10 мкМ) или 0,1% ДМСО). Клетки промывали, фиксировали (1,5% ПФА (параформальдегид)) и окрашивали антителами (1 мкг/мл или 10 мкг/мл) в течение 1 ч на ледяной бане. (Вторичные антитела: анти-мышинные-A1exa488), перед анализом для TNF α , связанного с рецептором.

Гистограммы FACS (сортировка флуоресцентно-активированных клеток) окрашивания клеток с использованием CA185_01974 и CA185_01979 (1 мкг/мл и 10 мкг/мл), представленные на фиг. 6, указывают на то, что антитела распознают только TNF α , который предварительно инкубировали с соединением (1). Окрашивание не наблюдалось при использовании ДМСО в качестве контроля.

Кроме того, было установлено, что Fab фрагменты CA185_01974 и CA185_01979 специфически связываются с мембрано-связанным TNF α , с измененной за счет связывания с соединением конформацией. Генно-инженерные клетки с нокаутом по сайту расщепления TACE клеточной линии NS0, которая характеризуется сверхэкспрессией мембранного TNF α , инкубировали с соединением (1) (0,001 - 10 мкМ) или 0,1% > ДМСО в течение 1 ч при 37°C. Клетки промывали, фиксировали и окрашивали Fab фрагментами антител (0,01 мкг/мл или 0,1 мкг/мл) в течение 1 ч на ледяной бане. (Вторичные антитела: анти-мышинные-Fab-DyeLight488 фирмы Jackson ImmunoResearch).

Гистограммы FACS окрашивания клеток с использованием Fab фрагментов CA185_01974 (см. фиг. 7) и CA185_01979 указывают на то, что антитела распознают только TNF, который предварительно инкубировали с соединением (1). Окрашивание не наблюдалось при использовании ДМСО в качестве контроля.

Пример 8.

Антитела CA185_01974 свидетельствуют о 300-кратном повышении селективности в отношении комплекса TNF человека-соединение (4)

Соединение (4) инкубировали с TNF человека и яванских макак (супо) и титровали в присутствии полноразмерного антитела мыши CA185_01974 для определения точного значения аффинности. При проведении эксперимента использовали следующие контроли: (i) TNF человека или супо + ДМСО в присутствии 1974, (ii) TNF человека или супо + ДМСО без антител и (iii) соединение TNF человека или супо + соединение (4) без антител. Анализ каждого образца и контроля проводили в двух повторах и в каждом случае исследовали четыре концентрации.

Согласно данным, представленным на фиг. 8 и 9, в ходе анализа фоновое связывание hTNF + соединение (4) и cTNF + соединение (4) увеличивалось на 5-10 RU (резонансные единицы). Об указанном эффекте свидетельствует более высокий уровень сигнала при связывании комплекса h/cTNF + соединение (4) с CA185_01974 во втором повторе. При связывании hTNF и cTNF в отсутствие соединения (4) наблюдался сигнал на очень низком уровне.

Согласно данным указанного анализа кинетика связывания hTNF + ДМСО с полноразмерными мышинными IgG, CA185_1974_P8, наблюдались сходные результаты, соответствующие описанным выше результатам, полученным для образцов с одной концентрацией. В отношении аффинности связывания TNF супо с полноразмерными мышинными IgG, CA185_1974_P8, получены аналогичные результаты, однако кинетические параметры отличаются.

В табл. 3 представлены параметры кинетики связывания каждого исследуемого образца с CA185_1974_P8. В табл. 4 представлены средние значения и кратность отношения параметров кинетики связывания различных комплексов TNF \pm соединение (4) с CA185_1974_p8. На фиг. 8 представлены сенсограммы для двух повторов cTNF \pm соединение (4). На фиг. 9 представлены сенсограммы для двух повторов hTNF \pm соединение (4).

В таблице 3 представлены параметры кинетики связывания hTNF и cTNF ± соединение (4) с антителами CA185_1974_P8.

Таблица 3

Повтор	Антитело	Исследуемый образец	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (М)	KD (пМ)
1	CA185_1974_P8	суно TNF	1,03E+05	1,87E-03	1,83E-08	18270
2	CA185_1974_P8	суно TNF	1,25E+05	1,92E-03	1,54E-08	15350
1	CA185_1974_P8	суно TNF + соединение (4)	1,84E+05	1,46E-05	7,91E-11	79,1
2	CA185_1974_P8	суно TNF + соединение (4)	2,01E+05	2,06E-03	1,03E-10	103
1	CA185_1974_P8	TNF человека	8,02E+04	1,77E-03	2,21E-08	22100
2	CA185_1974_P8	TNF человека	1,05E+05	1,67E-03	1,59E-08	15900
1	CA185_1974_P8	TNF человека + соединение (4)	3,06E+05	1,00E-05	3,27E-11	32,7
2	CA185_1974_P8	TNF человека + соединение (4)	3,07E+05	2,73E-05	8,88E-11	88,8

В таблице 4 представлены средние значения и кратность отношения параметров кинетики связывания hTNF и cTNF ± соединение (4) с CA185_1974_p8.

Таблица 4

Среднее значение двух повторов	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (М)	KD (пМ)
суно TNF	1,14E+05	1,90E-03	1,68E-08	16810
суно TNF + соединение (4)	1,93E+05	1,76E-05	9,09E-11	90,92
Кратность	1,69	107,81	184,89	184,89
TNF человека	9,27E+04	1,72E-03	1,90E-08	19000
TNF человека + соединение (4)	3,06E+05	1,86E-05	6,08E-11	60,76
Кратность	3,31	92,43	312,70	312,70

Выводы.

Было установлено, что антитела CA185_01974 и CA185_01989 специфически связываются с TNF α , с измененной после связывания с соединением конформацией, при этом их можно использовать в качестве биомаркеров связывания с мишенью для соединений по изобретению.

Установлено также, что антитела связываются с TNF α , с конформацией, специфически стабилизированной после связывания с соединениями из разных химических серий. Предполагается, что указанные антитела можно использовать в качестве стандартов при определении таких конформаций и подобных биологических конформаций тримера TNF α , стабилизированных соединениями из более широкого диапазона химических серий, чем описано в данном контексте. Основываясь на представленных данных можно считать, что тример TNF α человека стабилизируется в описанной определенной биологической конформацией, если связывание антител CA185_01974 или CA185_01989 характеризуется значением K_D менее 1 нМ, по данным анализа ВІАсоге, описанного выше.

Пример 9.

Соединения и комплексы, описанные в статье Ма и др. (2014) и Silvian и др. (2014), имеют другие характеристики по сравнению с соединениями по настоящему изобретению

Согласно данным, представленным на странице 12458 в статье Ма и др. (JBC, 289, 12457-12466 (2014)), соединение С87 было выявлено в ходе виртуального скрининга, целью которого был поиск молекул, размер которых соответствует пространству, занимаемому 7-членным пептидом из петли 2/домена 2 TNFR1, при его взаимодействии с внешней поверхностью TNF β . Соединение С87, описанное в статье Ма и др., и соединение В108898, описанное в статье Silvian и др. (ACS Chemical Biology, 6, 636-647 (2011)), были исследованы авторами настоящего изобретения.

Кратное изложение полученных результатов (отклонений).

Результаты анализа ВІасоге в отношении С87, описанные в статье Ма и др., повторить не удалось. Никаких данных специфического ингибирования TNF в клетках получить не удалось.

Кроме того, согласно данным масс-спектрометрии, чувствительность которой в отношении аффинности связывания находится на миллимолярном уровне, связывания С87 не наблюдалось.

Расширенные кристаллографические исследования проводили только в отношении апо-TNF (TNF в отсутствие соединения).

По данным поляризационного флуоресцентного (ПФ) анализа для соединения С87 не наблюдалось значительного ингибирования, превосходящего уровень интерференции соединения при считывании флуоресцентного сигнала.

По данным термического флуоресцентного анализа, который позволяет оценить стабилизацию температуры плавления TNF α , наблюдается небольшая стабилизация для С87.

Таким образом, не было найдено никаких доказательств того, что соединение С87 связывается в центре тримера.

Подавляющее большинство данных не указывало на прямое взаимодействие с TNF α . Было также обнаружено, что BI08898 не связывается с TNF α .

Анализ с использованием репортерного гена NF κ B клеток НЕК, индуцированных TNF

Перед добавлением к клеткам НЕК-293, стабильно трансфицированным SEAP под контролем NF κ B, соединение С87 предварительно инкубировали с TNF α в течение 1 ч. Проводили также соответствующий обратный скрининг для определения нецелевой активности, которая не связана с TNF. Перед оценкой уровня ингибирования по сравнению с 100%-ной блокировкой контрольным соединением, исследуемый образец инкубировали в течение ночи. Максимальная концентрация С87 составляла 10000 нМ, анализ проводили с использованием 3-кратных серийных разведений.

Ингибирующий эффект, который не относится к нецелевой активности, не наблюдался.

Анализ Biacore.

TNF иммобилизовали с использованием линкера avi-tag и соединение С87 пропускали через чип. В одном эксперименте дозозависимый эффект оценивали с использованием С87 в максимальной концентрации, которая составляла 10 мкМ. Никакого связывания обнаружить не удалось.

Во втором эксперименте скорость потока раствора С87, пропускаемого через чип, снижали. Наблюдался небольшой сдвиг сигнала, но общее связывание оставалось на пренебрежимо низком уровне.

Связывание С87 с TNF, описанное в статье Ма и др., вероятно, является супер-стехиометрическим, согласно уровню резонансного сигнала (RU) по оси Y. При стандартной плотности TNF на чипе величина указанного сигнала находилась в области значений, которые в тридцать раз превышали значения, ожидаемые при простом связывании 1:1.

В другом эксперименте исследовали взаимодействие BI08898 с иммобилизованной растворимой формой CD40L и растворимой формой TNF α методом ППП (поверхностный плазмонный резонанс) на установке Biacore 4000. При связывании с CD40L среднее геометрическое IC₅₀ составило 17 мкМ, при этом по данным указанного анализа связывание с TNF α в концентрации вплоть до 100 мкМ не наблюдалось.

Масс-спектрометрия.

Данных связывания С87 (400 мкМ) с TNF α человека (20 мкМ) получить не удалось. Оказалось, что связывание соединений с низкой молекулярной массой (~473 Да) составляет менее 5% от занятости рецептора. Молекулярная масса С87 составляет 503 Да. На основании занятости при концентрации 400 мкМ можно ожидать проявление аффинности для низкомолекулярных соединений в избытке, т.е. более 1 мМ.

Кристаллография.

В целом были проведены расширенные исследования по кристаллизации С87 с TNF α , включая условия исследований, которые обычно используют при работе с соединениями, описанными в настоящем изобретении. Указанные исследования заключались в проведении большого количества экспериментов по кристаллизации с использованием лигандов в различных концентрациях, белка в различных концентрациях, а также при разных временах инкубации. Были исследованы несколько кристаллов, которые по данным анализа представляли собой соль или TNF без соединения.

Поляризационная флуоресценция (ПФ)

Перед проведением анализа с использованием флуоресцентного соединения (зонда) С87 предварительно инкубировали с TNF α в течение 1 ч. Конкуренцию с флуоресцентным соединением при прямом (связывание с тем же сайтом) или косвенном (нарушение TNF) связывании оценивали по снижению уровня ПФ.

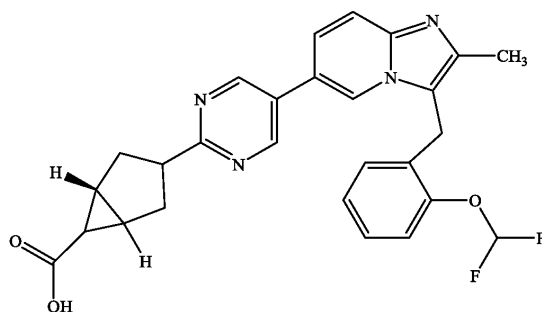
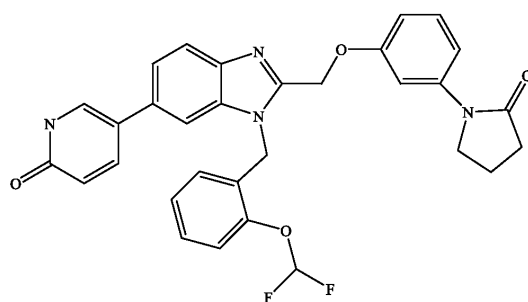
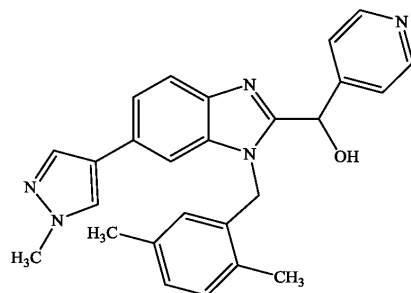
При экстраполяции кривой ингибирования было установлено, что IC₅₀ составляет приблизительно 100 мкМ. Однако тушение (снижение) флуоресценции наблюдалось при самых высоких концентрациях ингибитора, таким образом, по данным этого анализа в результате вычитания было установлено, что С87 оказывает пренебрежимо малое ингибирующее воздействие.

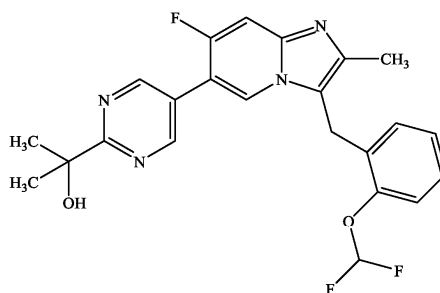
Термический флуоресцентный анализ.

Термический флуоресцентный анализ позволяет оценить изменение температуры плавления (T_m) TNF α в результате взаимодействия с соединением, стабилизирующим или изменяющим конформацию белка. Стабилизирующий эффект при использовании С87 в концентрации 500 мкМ составил 3,8°C, что указывает на возможность слабого связывания, которое может быть неспецифическим.

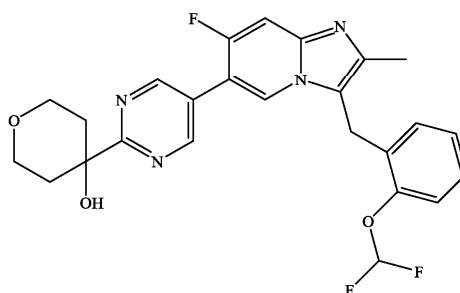
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое селективно связывается с комплексом, включающим (i) тримерный TNF α , и (ii) соединение, выбранное из группы, состоящей из соединений (1)-(5) или солей, или их сольватов:





или

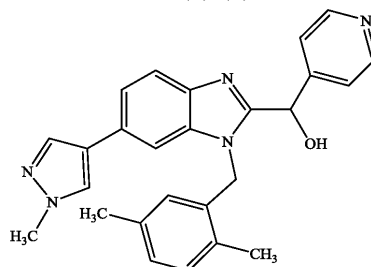


где антитело включает комбинацию последовательностей HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 SEQ ID NOs: 4/5/6/1/2/3.

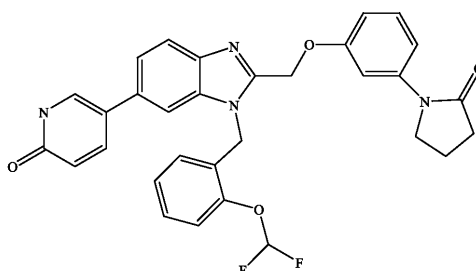
2. Антитело по п.1, где антитело содержит пару последовательностей HCVR и LCVR SEQ ID NO: 8 и 7.

3. Антитело по п.1, где антитело содержит тяжелую цепь SEQ ID NO: 12 или 13 и легкую цепь SEQ ID NO: 11.

4. Антитело, которое селективно связывается с комплексом, содержащим (i) тримерный TNF α , и (ii) соединение, выбранное из группы, состоящей из соединений (1)-(2) или солей, или их сольватов:



или



где антитело содержит комбинацию последовательностей HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 SEQ ID NO: 19/20/21/1/17/18.

5. Антитело по п.4, где антитело содержит пару последовательностей HCVR и LCVR SEQ ID NO: 23 и 22.

6. Антитело по п.4, где антитело содержит тяжелую цепь SEQ ID NO: 27 или 28 и легкую цепь SEQ ID NO: 26.

7. Антитело по любому из предшествующих пунктов, где антитело селективно связывается с комплексом тример-соединение по сравнению со связыванием с соединением в отсутствие тримера TNF α и/или с соединением в отсутствие тримера TNF α .

8. Антитело по п.7, где величина K_{D-ab} при связывании антитела с комплексом тример-соединение снижается по меньшей мере в 100 раз, или по меньшей мере в 200 раз по сравнению с величиной K_{D-ab}

для связывания с тримером TNF α в отсутствие соединения и/или для связывания с соединением в отсутствие TNF α .

9. Антитело по любому из предшествующих пунктов, которое представляет собой:

(а) гуманизированное антитело; или

(б) фрагмент Fab, модифицированный Fab, Fab', модифицированный Fab', F(ab')₂, Fv, единственный домен антитела или scFv.

10. Выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело по любому из пп.1-3.

11. Выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело по любому из пп.4-6.

12. Применение антитела по любому из пп.1-9 в качестве биомаркера связывания с мишенью для определения комплекса соединение-тример в образце, полученном у субъекта, при этом указанное антитело поддается обнаружению, а указанный комплекс включает тримерный TNF α и соединение, которое способно связываться с тримерным TNF α , и тем самым комплекс соединение-тример связывается с необходимым рецептором с TNF и модулирует передачу сигнала, индуцированную тримером через рецептор.

13. Способ обнаружения взаимодействия мишени с соединением-тример TNF α , тем самым комплекс соединение-тример связывается с TNF рецептором и модулирует передачу сигнала, индуцированного тримером через рецептор, причем указанный способ включает:

(а) получение образца у субъекта, которому вводили указанное соединение,

(б) контактирование антитела по любому из пп.1-9 с указанным образцом и контрольным образцом, при этом указанное антитело поддается обнаружению,

(в) определение уровня связывания указанного поддающегося обнаружению антитела с указанным образцом и указанным контрольным образцом,

где связывание указанного поддающегося обнаружению антитела с указанным образцом выше, чем связывание указанного поддающегося обнаружению антитела с указанным контрольным образцом, что указывает на взаимодействия мишени с указанным соединением при связывании с указанным тримером TNF α .

14. Применение антитела по любому из пп.1-9 для выявления соединения, которое вызывает конформационное изменение в тримере TNF α , при этом указанное конформационное изменение модулирует передачу сигнала через рецептор TNF при связывании с тримером TNF α .

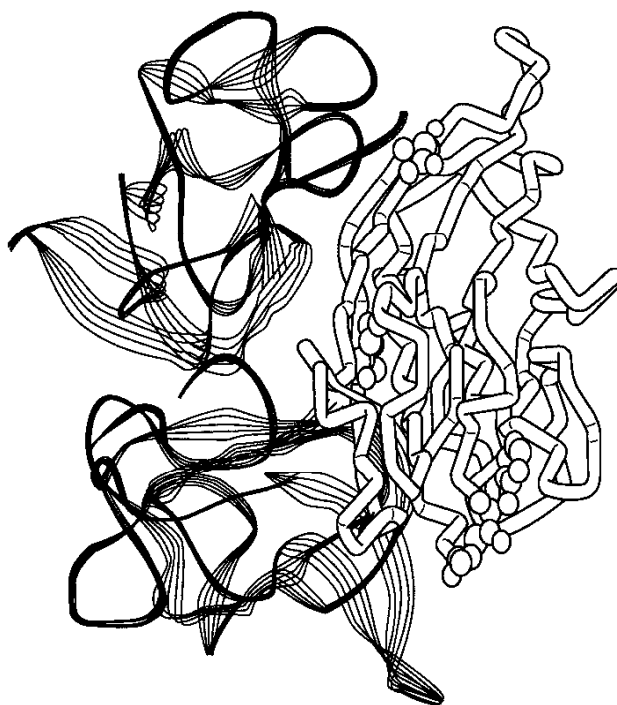
15. Способ идентификации соединения, способного связываться с TNF α , и модулировать передачу сигнала тримера TNF α через рецептор, и указанный способ включает следующие стадии:

(а) проведение анализа связывания для измерения связывающей активности исследуемого комплекса соединение-тример TNF α и исследуемого соединения, в отношении антитела по любому из пп.1-9,

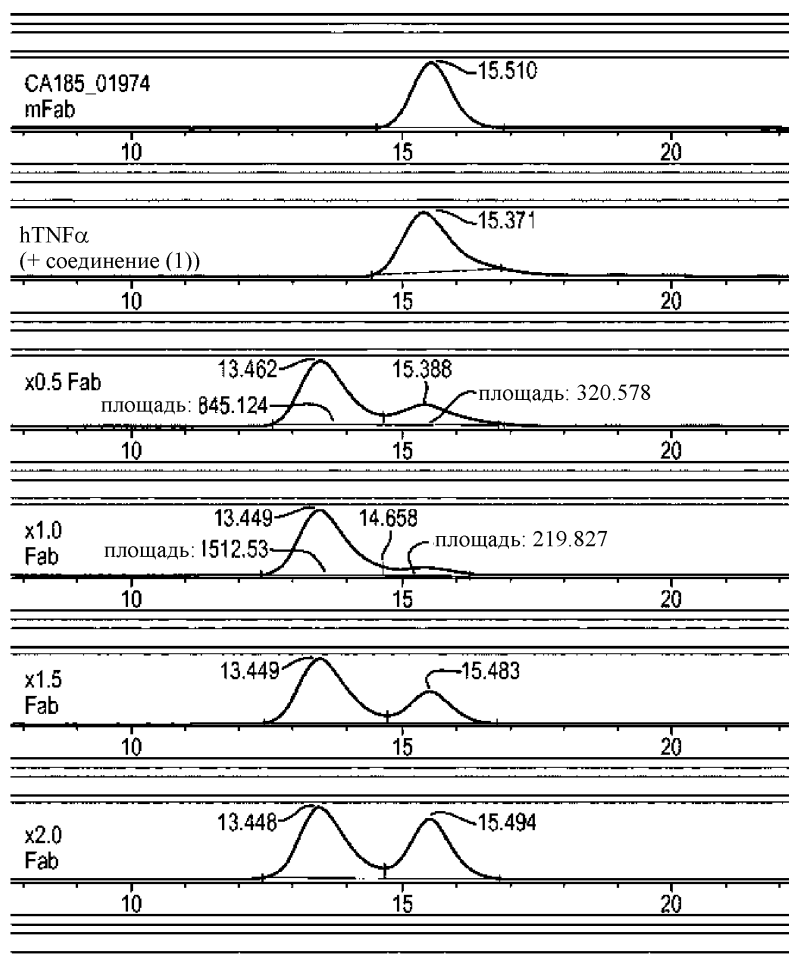
(б) сравнение связывающей активности, измеренной на стадии (а), со связывающей активностью различных комплексов соединение-тример, для которых известно, что они связываются с высокой активностью с антителом, указанным на стадии (а), и

(в) отбор соединения, присутствующего в комплексе соединение-тример на стадии (а), если измеренная связывающая активность является приемлемой по данным сравнения, указанным на стадии (б).

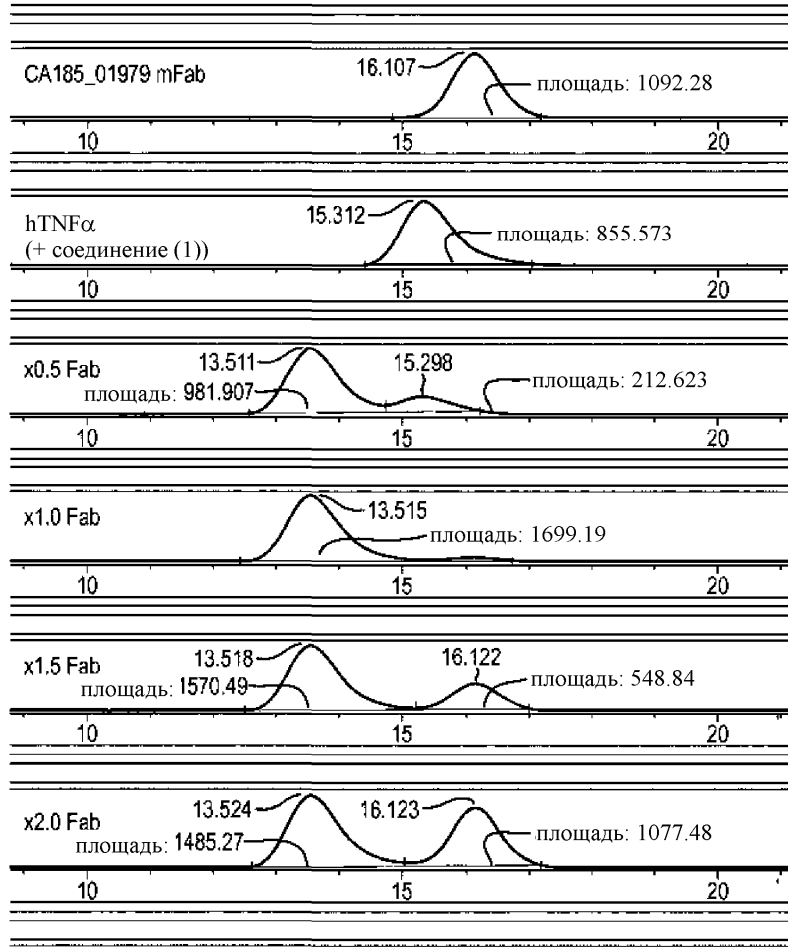
16. Способ по п.15, где способ является высокоскоростным методом анализа.



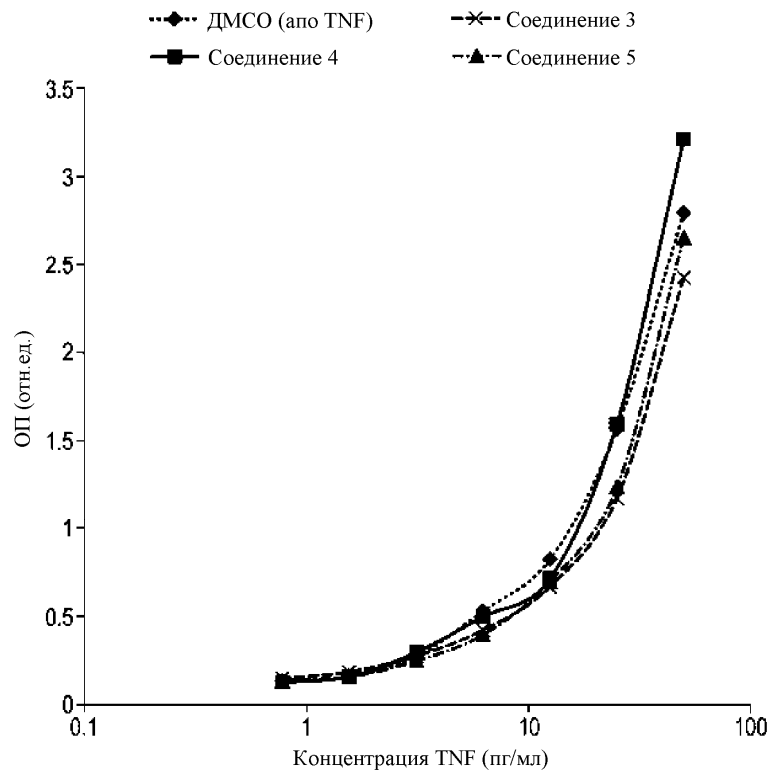
Фиг. 1



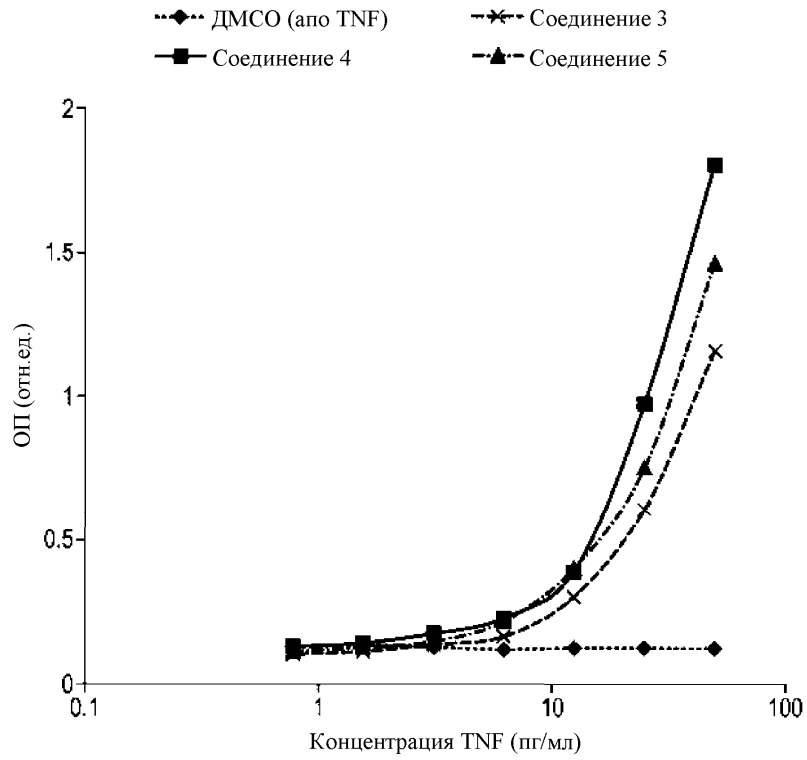
Фиг. 2



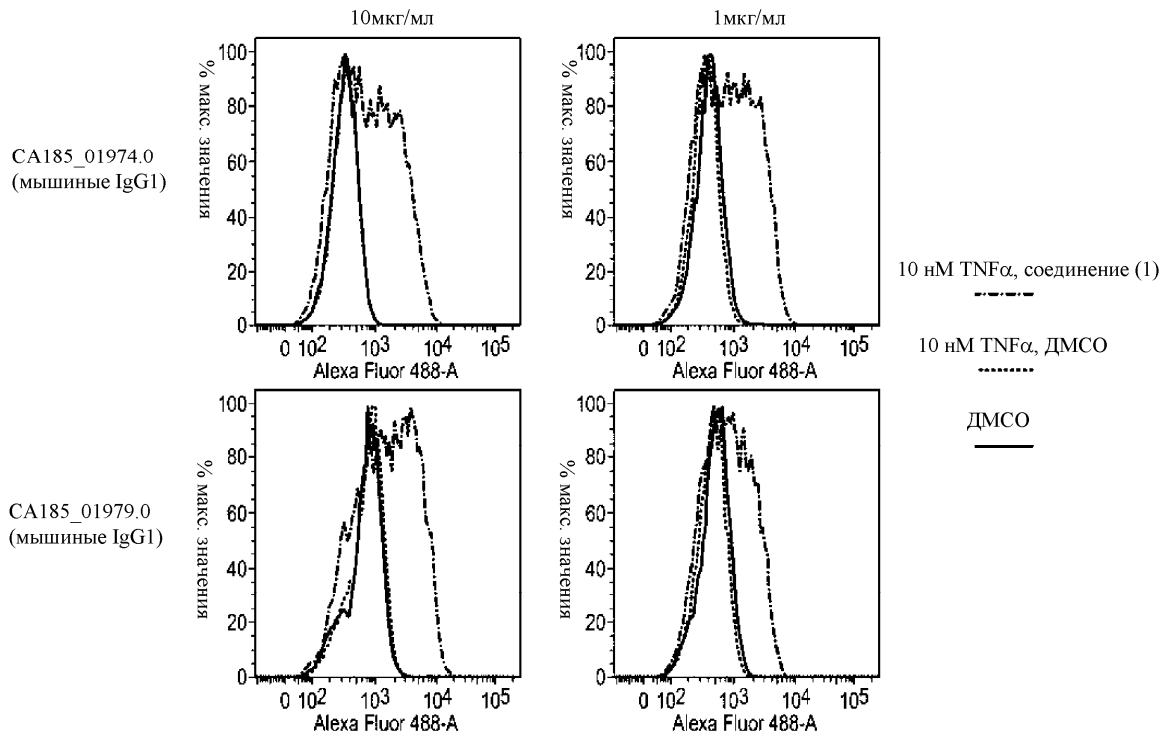
Фиг. 3



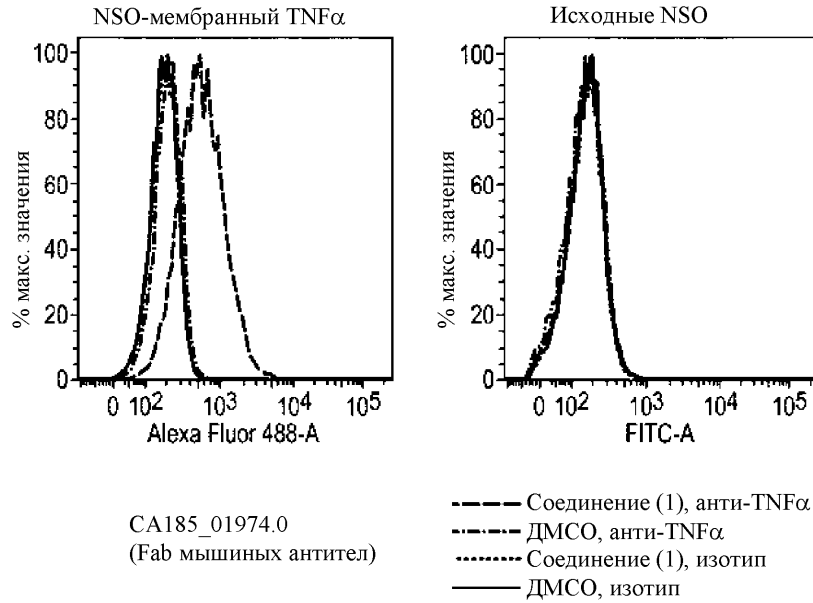
Фиг. 4



Фиг. 5



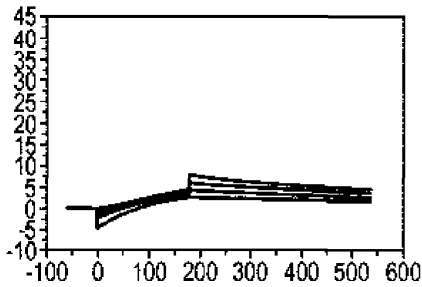
Фиг. 6



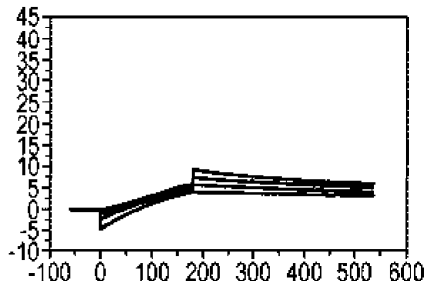
Фиг. 7

Файл: 13090601T
 Контроль: 1974 супо TNF контроль 1
 Лиганд: CA185_1974
 Кривая: Fe=2-1
 Образец: супо
 Температура: 25°C

Файл: 13090601T
 Контроль: 1974 супо TNF контроль 2
 Лиганд: CA185_1974
 Кривая: Fe=2-1
 Образец: супо
 Температура: 25°C



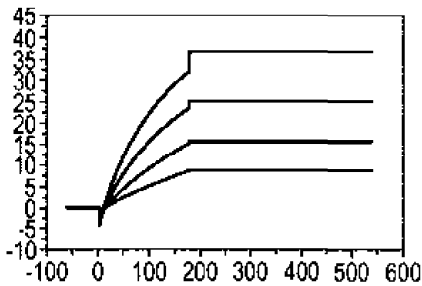
Соотношение: связывание 1:1
 Ka (1/Мс): 1,025E+5
 Kd (1/с): 0,001872



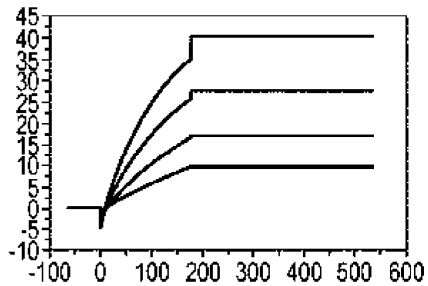
Соотношение: связывание 1:1
 Ka (1/Мс): 1,253E+5
 Kd (1/с): 0,001923

Файл: 13090601T
 Контроль: 1974 супо TNF +2080 1
 Лиганд: CA185_1974
 Кривая: Fe=2-1
 Образец: супо+NCE
 Температура: 25°C

Файл: 13090601T
 Контроль: 1974 супо TNF +2080 2
 Лиганд: CA185_1974
 Кривая: Fe=2-1
 Образец: супо+NCE
 Температура: 25°C



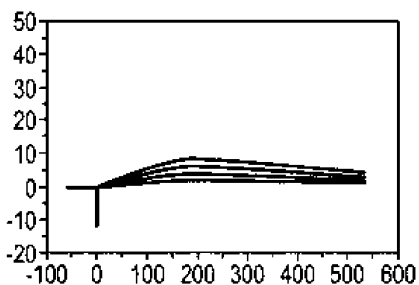
Соотношение: связывание 1:1
 Ka (1/Мс): 1,842E+5
 Kd (1/с): 1,457E-5



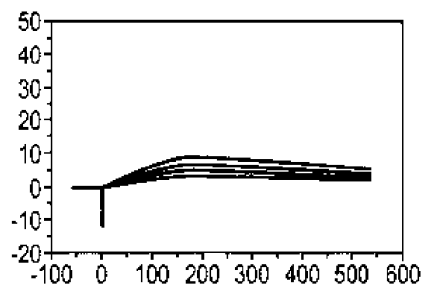
Соотношение: связывание 1:1
 Ka (1/Мс): 2,008E+5
 Kd (1/с): 2,053E-5

Фиг. 8

Файл: 13090601T	Файл: 13090601T
Контроль: 1974 TNF человека контроль 1	Контроль: 1974 TNF человека контроль 2
Лиганд: CA185_1974	Лиганд: CA185_1974
Кривая: Fe=4-3	Кривая: Fe=4-3
Образец: человек	Образец: человек
Температура: 25°C	Температура: 25°C

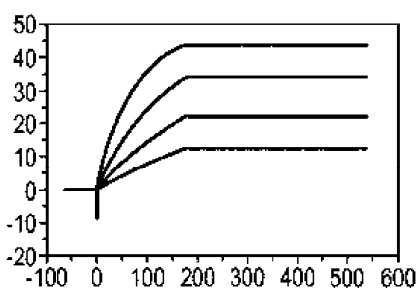


Соотношение: связывание 1:1
 Ka (1/Mc): 8,023E+4
 Kd (1/c): 0,001773



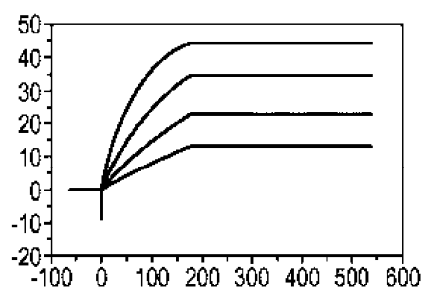
Соотношение: связывание 1:1
 Ka (1/Mc): 1,051E+5
 Kd (1/c): 0,001671

Файл: 13090601T	Файл: 13090601T
Контроль: 1974 TNF человека + 2080 1	Контроль: 1974 TNF человека + 2080 2
Лиганд: CA185_1974	Лиганд: CA185_1974
Кривая: Fe=4-3	Кривая: Fe=4-3
Образец: человек + NCE	Образец: человек + NCE
Температура: 25°C	Температура: 25°C



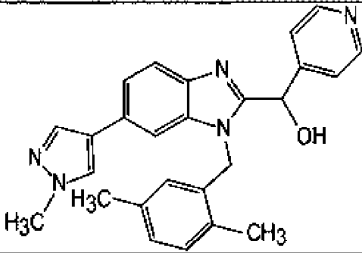
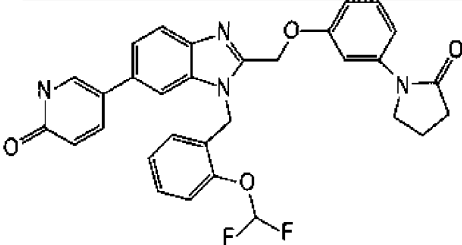
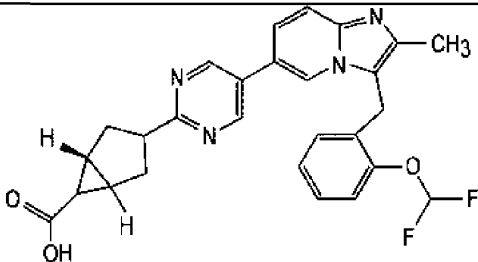
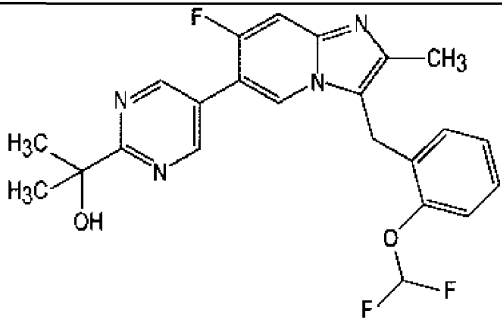
Соотношение: связывание 1:1
 Ka (1/Mc): 3,053E+5
 Kd (1/c): 1,477E-7

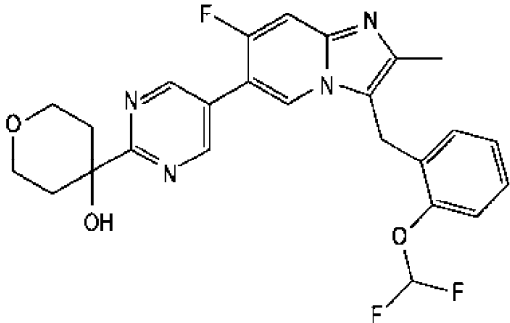
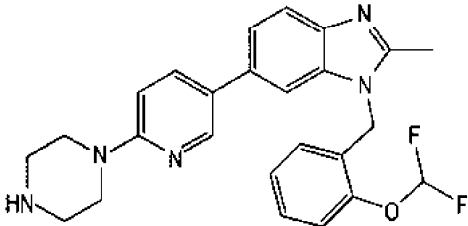
Файл: 13090601T	Файл: 13090601T
Контроль: 1974 TNF человека + 2080 2	Контроль: 1974 TNF человека + 2080 2
Лиганд: CA185_1974	Лиганд: CA185_1974
Кривая: Fe=4-3	Кривая: Fe=4-3
Образец: человек + NCE	Образец: человек + NCE
Температура: 25°C	Температура: 25°C



Соотношение: связывание 1:1
 Ka (1/Mc): 3,069E+5
 Kd (1/c): 2,726E-5

Фиг. 9

Соединение	Структура
1	
2	
3	
4	

Соединение	Структура
5	 <p>Chemical structure of compound 5: A piperidine ring with a hydroxyl group at the 2-position is connected via its nitrogen atom to a pyrimidine ring. The pyrimidine ring is further connected to a pyridine ring, which is substituted with a fluorine atom at the 6-position. The pyridine ring is also connected to an imidazole ring, which has a methyl group at the 2-position. The imidazole ring is connected via its nitrogen atom to a benzene ring, which is substituted with a difluoromethoxy group (-OCF₂) at the 3-position.</p>
6	 <p>Chemical structure of compound 6: A piperazine ring is connected via its nitrogen atom to a pyridine ring. The pyridine ring is connected to a benzimidazole ring system, which has a methyl group at the 2-position. The benzimidazole ring system is connected via its nitrogen atom to a benzene ring, which is substituted with a difluoromethoxy group (-OCF₂) at the 3-position.</p>

Фиг. 10

