



(51) МПК  
*C07K 16/28* (2006.01)  
*C12N 5/10* (2006.01)  
*C12N 15/13* (2006.01)  
*C12N 15/63* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61K 49/16* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*A61P 37/00* (2006.01)

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(52) СПК

*C07K 16/00* (2019.08); *C12N 5/16* (2019.08); *C12N 15/63* (2019.08); *A61K 39/39533* (2019.08); *A61K 39/39558* (2019.08); *A61P 1/00* (2019.08); *A61P 35/00* (2019.08); *A61P 35/02* (2019.08); *A61P 37/00* (2019.08)

(21)(22) Заявка: 2018146031, 25.12.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
25.12.2018Дата регистрации:  
27.01.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 25.12.2018

(45) Опубликовано: 27.01.2020 Бюл. № 3

Адрес для переписки:

117997, Москва, ул. Островитянова, 1, ФГАОУ  
 ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава  
 России

(72) Автор(ы):

Британова Ольга Владимировна (RU),  
 Староверов Дмитрий Борисович (RU),  
 Евстратьева Анна Валентиновна (RU),  
 Мисорин Алексей Константинович (RU),  
 Неманкин Тимофей Александрович (RU),  
 Щемелева Мария Александровна (RU),  
 Владимирова Анна Константиновна (RU),  
 Аникина Арина Витальевна (RU),  
 Иванов Роман Алексеевич (RU),  
 Морозов Дмитрий Валентинович (RU),  
 Яковлев Павел Андреевич (RU),  
 Лукьянов Сергей Анатольевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное  
 образовательное учреждение высшего  
 образования "Российский национальный  
 исследовательский медицинский университет  
 имени Н.И. Пирогова" Министерства  
 здравоохранения Российской Федерации  
 (ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова  
 Минздрава России) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
 о поиске: WO 2017/137453 A1 17.08.2017. RU  
 2539032 C2 10.01.2015. TOYABE S et. al.  
 "Biclonal expansion of T cells infected with  
 monoclonal Epstein-Barr virus (EBV) in a patient  
 with chronic, active EBV infection", *Clinical &  
 Experimental Immunology*, Vol. 135, Is. 1,  
 October 2003, pp. 92-97, 08.09.2003.

(54) Гуманизированные антитела против участка бета цепи 9-го семейства TRBV9 ТКР человека, и способы их применения

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к области иммунологии. Предложены антитело и его антигенсвязывающий фрагмент, способные к специфическому связыванию с участком бета цепи семейства TRBV9 Т-клеточного рецептора

человека. Также рассмотрены нуклеиновые кислоты, экспрессионные векторы, способ получения клетки-хозяина, клетка-хозяин, способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и

фармацевтические композиции. Кроме того, описан способ ингибирования биологической активности Т-клеточного рецептора, способ лечения заболевания или нарушения, опосредованного Т-клеточным рецептором человека, и применение антитела или

фармацевтической композиции. Данное изобретение может найти дальнейшее применение в терапии различных состояний, в частности целиакии, Т-клеточного лейкоза и Т-клеточной лимфомы. 13 н. и 7 з.п. ф-лы, 3 табл., 7 пр.

R U 2 7 1 2 2 5 1 C 1

R U 2 7 1 2 2 5 1 C 1



(51) Int. Cl.  
*C07K 16/28* (2006.01)  
*C12N 5/10* (2006.01)  
*C12N 15/13* (2006.01)  
*C12N 15/63* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61K 49/16* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*A61P 37/00* (2006.01)

**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*C07K 16/00* (2019.08); *C12N 5/16* (2019.08); *C12N 15/63* (2019.08); *A61K 39/39533* (2019.08); *A61K 39/39558* (2019.08); *A61P 1/00* (2019.08); *A61P 35/00* (2019.08); *A61P 35/02* (2019.08); *A61P 37/00* (2019.08)

(21)(22) Application: 2018146031, 25.12.2018

(24) Effective date for property rights:  
25.12.2018Registration date:  
27.01.2020

Priority:

(22) Date of filing: 25.12.2018

(45) Date of publication: 27.01.2020 Bull. № 3

Mail address:

117997, Moskva, ul. Ostrovityanova, 1, FGAOU  
VO RNIMU im. N.I. Pirogova Minzdrava Rossii

(72) Inventor(s):

Britanova Olga Vladimirovna (RU),  
 Staroverov Dmitrij Borisovich (RU),  
 Evstrateva Anna Valentinovna (RU),  
 Misorin Aleksej Konstantinovich (RU),  
 Nemankin Timofej Aleksandrovich (RU),  
 Shchemeleva Mariya Aleksandrovna (RU),  
 Vladimirova Anna Konstantinovna (RU),  
 Anikina Arina Vitalevna (RU),  
 Ivanov Roman Alekseevich (RU),  
 Morozov Dmitrij Valentinovich (RU),  
 Yakovlev Pavel Andreevich (RU),  
 Lukyanov Sergej Anatolevich (RU)

(73) Proprietor(s):

Federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe  
 obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego  
 obrazovaniya "Rossijskij natsionalnyj  
 issledovatel'skij meditsinskij universitet imeni  
 N.I. Pirogova" Ministerstva zdravookhraneniya  
 Rossijskoj Federatsii (FGAOU VO RNIMU im.  
 N.I. Pirogova Minzdrava Rossii) (RU)

**(54) HUMANISED ANTI-BETA 9 CHAIN ANTIBODIES OF HUMAN TRBV9 TKP FAMILY, AND METHODS OF USING**

(57) Abstract:

FIELD: immunology.

SUBSTANCE: present invention relates to immunology. Disclosed are an antibody and its antigen-binding fragment capable of specific binding to a segment of the beta chain of the TRBV9 family of the human T-cell receptor. Also disclosed are nucleic acids, expression vectors, a method for producing a host cell, a host cell, a method for producing an antibody or an antigen-binding fragment thereof and pharmaceutical

compositions. What is also described is a method for inhibiting the biological activity of the T-cell receptor, a method of treating a disease or disorder mediated by a human T-cell receptor, and using the antibody or pharmaceutical composition.

EFFECT: present invention can find further application in therapy of various conditions, particularly celiac disease, T-cell leukemia and T-cell lymphoma.

20 cl, 3 tbl, 7 ex

Область техники

Изобретение относится к области биотехнологии и биомедицины, а именно к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, а также их применению. Более конкретно, настоящее изобретение относится к моноклональному гуманизованному антителу, которое специфически связываются с семейством Т-клеточных рецепторов человека. Изобретение также относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей данное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вектору экспрессии, способу получения антитела и применению антитела для лечения заболеваний или нарушений, связанных с семейством Т-клеточных рецепторов человека.

Предшествующий уровень техники

Причиной возникновения аутоиммунных заболеваний являются аутореактивные Т лимфоциты (Haroon N et al. Arthritis Rheum. 2013 Oct;65(10):2645-54., Duarte J. et al. PloS One 2010 May 10;5(5):e10558; Konig M. et al. Front Immunol 2016 Jan 25;7:11). Из уровня техники известно, что маркером, позволяющим идентифицировать клон Т-лимфоцитов, вовлеченный в патогенез аутоиммунного заболевания, является последовательность Т-клеточного рецептора (ТКР). Субъединицы Т-клеточных рецепторов структурно относятся к суперсемейству иммуноглобулинов и формируются из нескольких генных сегментов. Вариабельные участки ТКР образуют антигенсвязывающий центр ТКР. Это означает, что они клоносpezifичны, т.е. отличаются у Т-лимфоцитов, реагирующих на разные антигены.

По аминокислотной гомологии вариабельных (V) генных сегментов, входящих в состав вариабельного домена ТКР, Т-клеточные рецепторы подразделяют на различные семейства. Согласно номенклатуре IMGT для бета цепи выделяют 26 различных семейств, а для альфа цепи - 41 семейство (Turner SJ et al., Nature Reviews Immunology 2006, V.6, 883-894). Для определения семейства цепи ТКР используют множественное выравнивание тестируемой аминокислотной последовательности с известными последовательностями цепей ТКР, информация о которых суммирована в базе данных IMGT («The international ImMunoGeneTics information system», Lefranc M-P, Nucl Acids Res 2001; 29:207-209), доступной в сети Интернет по адресу <http://www.imgt.org>. Множественное выравнивание и определение семейства цепи ТКР может быть осуществлено с помощью пакета программ IgBlast.

Описаны моноклональные антитела W112 и 2D1 к участкам бета цепи вариабельных доменов Т-рецептора человека, относящихся к семействам TRBV5-3 TRBV8-1 (WO 9006758), предложенные в качестве инструмента для диагностики и терапии ревматоидного артрита. Данные моноклональные антитела узнают соответственно 0.3-5% периферических Т лимфоцитов, несущих TRBV5-3 и 0.5-13% периферических Т лимфоцитов, несущих TRBV8-1. Основанием для использования моноклональных антител специфичных к участкам бета цепей Т-рецепторов послужили результаты многих исследований, демонстрирующие вовлеченность Т-лимфоцитов в патогенез ревматоидного артрита. В частности, данные статьи F.M. Brennan et al., Clin Exp Immunol. 1988 Sep; 73(3): 417-423, где было продемонстрировано увеличение процентного содержания Т-лимфоцитов, несущих TRBV5 TRBV8 в синовиальных образцах пациентов, страдающих ревматоидным артритом по сравнению со здоровыми донорами. Так же для диагностики и терапии ревматоидного артрита описаны моноклональные антитела, взаимодействующие с эпитопом вариабельной области VB3.1 Т-клеточного рецептора человека (WO 9405801), которые взаимодействуют с подсемейством ТКР V(бета)3.1.

Так же описаны моноклональные антитела, специфично узнающие бета цепь 13-го семейства ТКР крысы. На модельных животных показано, что с помощью этих антител

возможно превентивное удаление небольшой популяции Т-клеток, Т-рецептор которых содержит бета цепь VB13 (VB13+Т клетки), и показано, что такая процедура защищает от развития диабета I типа у крыс предрасположенной к этому заболеванию линии, а также значительно снижает риск развития вирус-индуцированного диабета (Zhijun Liu et al., *Diabetes*. 2012 May; 61(5): 1160-1168). В то же время, удаление Т клеток, Т-рецептор которых содержит другое семейство бета цепи (VB16), не отличается по результату от контрольных групп. Важно отметить, что уже первое введение моноклонального антитела против VB13 приводит к 60% снижению количества VB13+ Т клеток в селезенке крыс.

Описан консенсусный вариант аутоиммунных ТКР при анкилозирующем спондилите (АС или болезнь Бехтерева), показано, что он представлен у больных АС в синовиальной жидкости и периферической крови и отсутствует при той же глубине анализа у здоровых доноров независимо от статуса по аллелю HLA\*B27 (Faham M. et al., *Arthritis Rheumatol*. 2017;69(4):774-784; Komech E et al. 12th EJI-EFIS Tatra Immunology Conference; 2016 Sep 3-7; Strbske Pleso, Slovakia. Abstract book p. 39). Указанные ТКР относятся к TRBV9 семейству (согласно номенклатуре IMGT). Показано, что Т-клеточные рецепторы, несущие бета цепи семейства TRBV9, вовлечены также в развитие такого аутоиммунного заболевания как целикия (Petersen J et al., *J Immunol*. 2015; 194(12): 6112-22). Также они обнаруживаются на поверхности Т клеток, подверженных маглинизации в случае Т-клеточных лимфом и Т-клеточных лейкозий, в том числе Т-клеточной лимфомы, вызванной вирусом Эпштейн-Барр (EBV) (Toyabe S et al., *Clin Exp Immunol*. 2003; 134(1): 92-97).

Недавно описаны химерные моноклональные антитела, обладающие способностью специфически связываться с участком бета цепи семейства TRBV9 Т-рецептора человека, которые могут использоваться при терапии аутоиммунных и онкологических заболеваний, в патогенез которых вовлечены ТКР, относящиеся к TRBV9 семейству, например, АС, целиакии и некоторых Т-клеточных лимфом и Т-клеточных лейкозий (заявка на изобретение РФ 2017145662).

Указанные антитела являются единственными известными сегодня антителами, которые могут быть использованы для элиминации Т-клеток, несущих ТКР семейства TRBV9. Основным недостатком указанных антител является их относительно низкая степень гуманизации - они содержат свойственные человеку константные области и структурные компоненты, но имеют вариабельный домен, свойственный крысе. Степень гуманизации вариабельного фрагмента тяжелой цепи указанных антител составляет 72%, а вариабельного фрагмента легкой цепи - 69%.

Вышеуказанное родительское моноклональное антитело, включает:

1) вариабельный домен их тяжелой цепи (VH), который содержит 3 гипервариабельных участка HCDR1, HCDR2 и HCDR3, где

HCDR1 (согласно номенклатуре Kabat) имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1,

HCDR2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2

HCDR3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No 3;

2) вариабельный домен их легкой цепи (VL), который содержит 3 гипервариабельных участка LCDR1, LCDR2 и LCDR3, в которых:

LCDR1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4,

LCDR2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5,

LCDR3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

Вышеуказанное родительское моноклональное антитело, включает вариабельные

домены тяжелой и легкой цепей, которые имеют аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 8 и 10.

Вышеуказанное родительское моноклональное антитело, включает легкую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID No 12 и тяжелую цепь антитела, которая имеет аминокислотную последовательность - SEQ ID No 14.

Примеры нуклеотидных последовательностей, кодирующих указанные аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей вышеуказанного родительского антитела, приведены в SEQ ID NOs: 13 и 11.

Изобретение направлено на создание моноклонального антитела, которое может быть использовано для элиминации Т-клеток, несущих ТКР семейства TRBV9, в частности, для терапии АС, целиакии и злокачественных заболеваний крови, в патогенез которых вовлечены ТКР семейства TRBV9, и которое отличается высокой степенью гуманизации. Гуманизация в тоже время часто приводит к критическому снижению аффинности и/или растворимости антител. Таким образом, получение гуманизированных функциональных антител является актуальной задачей.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к гуманизированному моноклональному антителу и его антиген-связывающему фрагменту, которые обладают способностью с высокой аффинностью специфически связываться с участком бета цепи семейства TRBV9 Т-рецептора человека. Антитело, согласно изобретению, может использоваться в качестве лекарственного средства для лечения аутоиммунных и онкологических заболеваний, в патогенез которых вовлечены ТКР, относящиеся к TRBV9 семейству, например, АС, целиакии и некоторых Т-клеточных лимфом и Т-клеточных лейкозов.

В предпочтительных воплощениях антитело настоящего изобретения содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) с тремя гиперпеременными участками

1) HCDR 1 (согласно номенклатуре Kabat) имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1,

2) HCDR 2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2

3) HCDR 3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No 3;

2) переменный домен легкой цепи (VL) с тремя гиперпеременными участками LCDR1, LCDR2 и LCDR3, в которых:

LCDR 1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4,

LCDR 2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5,

LCDR 3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

Здесь и далее при определении CDR антител используется известная номенклатура Kabat, если отдельно не оговорено иное.

При этом переменные домены тяжелой и легкой цепей антитела содержат аминокислотные замены в FR фрагментах переменных доменов тяжелой и легкой цепи, повышающие степень гуманизации антитела по сравнению с родительским антителом.

В предпочтительных воплощениях переменный домен тяжелой цепи антитела настоящего изобретения имеет последовательность, показанную в SEQ ID No: 16 и отличается от переменного домена тяжелой цепи родительского антитела, аминокислотная последовательность которого показана в SEQ ID No: 8, наличием гуманизирующих аминокислотных замен.

В некоторых воплощениях переменный домен тяжелой цепи антитела настоящего изобретения содержит дополнительные аминокислотные замены, не влияющие на

специфичность антитела.

В преимущественных воплощениях переменный домен легкой цепи антитела настоящего изобретения имеет последовательность, показанную в SEQ ID NO 18, и отличается от переменного домена тяжелой цепи родительского антитела, аминокислотная последовательность которого показана в SEQ ID No: 10, наличием гуманизирующих аминокислотных замен.

В некоторых воплощениях переменный домен легкой цепи антитела настоящего изобретения содержит дополнительные аминокислотные замены, не влияющие на специфичность антитела.

В некоторых воплощениях моноклональные тела по изобретению являются полноразмерными антителами IgG человека, например, IgG1 или IgG2 или IgG3 или IgG4.

В некоторых воплощениях антитело согласно изобретению включает тяжелую цепь, аминокислотная последовательность которой идентична, по крайней мере, на 85%, или идентична, по крайней мере, на 90%, или идентична, по крайней мере, на 91%, или идентична, по крайней мере, на 92%, или идентична, по крайней мере, на 93%, или по крайней мере 94% или по крайней мере 95% или по крайней мере 96% или по крайней мере 97%, или по крайней мере 98% или по крайней мере 99% или идентична на 100% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20.

В некоторых воплощениях антитело согласно изобретению включает легкую цепь, аминокислотная последовательность которой идентична, по крайней мере, на 85%, или идентична, по крайней мере, на 90%, или идентична, по крайней мере, на 91%, или идентична, по крайней мере, на 92%, или идентична, по крайней мере, на 93%, или по крайней мере 94% или по крайней мере 95% или по крайней мере 96% или по крайней мере 97%, или по крайней мере 98% или по крайней мере 99% или идентична на 100% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22.

В некоторых воплощениях антитело имеет легкую цепь, аминокислотная последовательность которой показана в SEQ ID NO: 22, и тяжелую цепь, аминокислотная последовательность которой показана в SEQ ID NO: 20.

Также обеспечиваются нуклеиновые кислоты, которые кодируют переменные домены тяжелой и легкой цепи антитела согласно изобретению, нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелую и легкую цепи антител согласно изобретению и функциональные фрагменты антител.

Также обеспечиваются кассеты экспрессии и экспрессионные векторы, включающие нуклеиновую кислоту настоящего изобретения и регуляторные элементы, необходимые для экспрессии нуклеиновой кислоты в выбранной клетке-хозяине. Вектор или кассета экспрессии могут находиться в клетке-хозяине как внехромосомный элемент или интегрироваться в геном клетки в результате введения (путем трансфекции) указанной кассеты экспрессии или вектора в клетку.

Кроме того, обеспечиваются клетки и стабильные клеточные линии, включающие нуклеиновые кислоты, векторы или экспрессионные кассеты настоящего изобретения, и способы их получения.

Также обеспечивается способ получения вышеуказанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, заключающийся в культивировании вышеуказанной клетки-хозяина в культуральной среде в условиях, обеспечивающих продукцию указанного антитела. В некоторых воплощениях способ включает последующее выделение и очистку полученного антитела.

Также обеспечивается фармацевтическая композиция для профилактики или лечения

заболевания или нарушения, опосредуемого участком бета цепи семейства TRBV9 Т-рецептора человека, содержащая вышеуказанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

5 В одном из вариантов фармацевтическая композиция предназначена для профилактики или лечения заболевания или нарушения, выбранного из группы: анкилозирующий спондилит, целиакия, Т-клеточный лейкоз, Т-клеточная лимфома.

Также обеспечивается фармацевтическая комбинация для профилактики или лечения заболевания, или нарушения, опосредуемого Т-клеточным рецептором человека, несущим бета цепь семейства TRBV9, содержащая вышеуказанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и, по меньшей мере, одно другое терапевтически активное соединение.

15 В одном из вариантов фармацевтическая комбинация предназначена для профилактики или лечения заболевания, или нарушения, выбранного из группы: анкилозирующий спондилит, целиакия, Т-клеточный лейкоз, Т-клеточная лимфома.

В одном из вариантов фармацевтическая комбинация или композиция включает другое терапевтически активное соединение, которое выбирают из малой молекулы, антитела или стероидных гормонов, например, кортикостероидов.

20 Также обеспечивается способ ингибирования биологической активности Т-клеточного рецептора, бета цепь которого относится к семейству TRBV9, у субъекта, нуждающегося в таком ингибировании, включающий введение субъекту эффективного количества вышеуказанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

25 Также обеспечивается способ лечения заболевания или нарушения, опосредованного Т-клеточным рецептором человека, несущим бета цепь семейства TRBV9, включающий введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, вышеуказанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или вышеуказанной фармацевтической композиции, в терапевтически эффективном количестве.

30 В одном из вариантов способа лечения заболевания или нарушения, заболевание или нарушение выбрано из группы: анкилозирующий спондилит, целиакия, Т-клеточный лейкоз, Т-клеточная лимфома.

Также обеспечивается применение вышеуказанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или вышеуказанной фармацевтической композиции для лечения у субъекта, нуждающегося в таком лечении, заболевания или нарушения, опосредуемого Т-клеточным рецептором человека, несущим бета цепь семейства TRBV9.

35 В одном из вариантов применения, заболевание выбрано из группы: анкилозирующий спондилит, целиакия, Т-клеточный лейкоз, Т-клеточная лимфома.

40 Технический результат настоящего изобретения состоит в получении антител с повышенной степенью гуманизации, которые специфически с высокой аффинностью связываются с ТКР, бета цепь которых относится к TRBV9 семейству и могут быть использованы для терапии аутоиммунных и онкологических заболеваний, в патогенез которых вовлечены ТКР, бета цепь которых относится к TRBV9 семейству.

45 В преимущественных воплощениях вариабельный фрагмент тяжелой цепи антитела характеризуется степенью гуманизации - 84%. В преимущественных воплощениях вариабельный фрагмент легкой цепи антитела характеризуется степенью гуманизации - 85%.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к изолированным моноклональным антителам и их функциональным фрагментам, обладающим способностью специфически связываться

с участком бета цепи семейства TRBV9 T-рецептора человека с повышенной степенью гуманизации относительно аналогов.

Также обеспечиваются нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела и их фрагменты по изобретению, кассеты экспрессии и экспрессионные векторы, включающие нуклеиновую кислоту настоящего изобретения и регуляторные элементы, необходимые для экспрессии нуклеиновой кислоты в выбранной клетке-хозяине.

Кроме того, обеспечиваются клетки и стабильные клеточные линии, включающие нуклеиновые кислоты, векторы или экспрессионные кассеты настоящего изобретения.

Также обеспечиваются способ получения моноклонального антитела или его функционального фрагмента, фармацевтическая композиция и фармацевтическая комбинация, содержащая в эффективном количестве антитело настоящего изобретения, в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами, разбавителями или носителями и способы диагностики и терапии АС и иных заболеваний с использованием антител настоящего изобретения.

15 Определения

С целью более легкого понимания изобретения сначала определяются некоторые термины.

Следует понимать, что материалы и способы, предлагаемые в данном документе, не ограничиваются конкретными композициями или этапами способа, поскольку они могут варьироваться. Указано, что, как используется в данном описании и приложенной формуле изобретения, формы единственного числа включают и соответствующие формы во множественном числе, если контекст явно не предписывает иное.

«Т-клеточный рецептор», так же указанный как «ТРК», «Т-рецептор» или «TCR» человека представляет собой гетеродимерный белковый комплекс, расположенный на поверхности Т лимфоцита. Т-рецептор присутствует только на Т-лимфоцитах. Основная функция ТКР заключается в специфическом распознавание процессированных антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (HLA).

ТКР человека состоит из двух субъединиц,  $\alpha$  и  $\beta$ , либо  $\gamma$  и  $\delta$  цепей, связанных между собой дисульфидной связью и закрепленных в клеточной мембране. Каждая из цепей ТКР имеет N-концевой варибельный (V) домен, соединительный домен и константный (C) домен, соединенный с трансмембранным доменом, закрепляющим рецептор в плазматической мембране Т-лимфоцита. Протяженность константного домена альфа и бета цепей составляет 91 и 129 аминокислотных остатков, соответственно. Длина соединительного и трансмембранного домена альфа цепи - 30 и 17 аминокислотных остатков (а.о.), а у бета цепи - 21 и 22 а.о. Протяженность варибельных доменов Т-рецепторов варьирует от 104 до 125 а.о.

Небольшая фракция Т-лимфоцитов располагает Т-рецепторами типа  $\gamma/\delta$ . По своему устройству они аналогичны  $\alpha/\beta$  рецепторам, но отличаются по первичной структуре и имеют ряд функциональных особенностей. Их варибельность гораздо ниже (ограниченная клоноспецифичность), они распознают антигены в комплексе с «неклассическими» (не МНС) антигенпредставляющими молекулами или даже свободные антигены.

Т-рецептор взаимодействует с комплексом МНС-антиген шестью участками, определяющими его комплементарность (CDR): три участка альфа цепи и три бета цепи. Эти CDR представляют собой гиперварибельные участки, петли варибельных доменов Т-клеточного рецептора - Vальфа и Vбета.

Термины «TRBV9» или «семейство TRBV9» относятся к девятому семейству бета-цепей Т-клеточных рецепторов, выделяемому согласно номенклатуре IMGT, которое

характеризуется тем, что аминокислотная последовательность их варибельного домена включает уникальные мотивы CDR1 (последовательность аминокислот - S-G-D-L-S) и CDR2 (последовательность аминокислот - Y-Y-N-G-E-E). Термин «ТКР семейства TRBV9» обозначает Т-клеточный рецептор, бета-цепь которого относится к TRBV9 семейству.

Термин «патологический» по отношению к Т-лимфоцитам или ТКР означает, что данное ТКР или Т-лимфоцит, его несущий, ассоциированы с заболеванием или патологией и/или являются причиной заболевания и/или способствуют развитию заболевания.

Термин «аутоиммунный» по отношению к ТКР означает, что данное ТКР вовлечено в развитие аутоиммунного заболевания.

Термин «антитело», используемый здесь, предназначен для определения молекулы иммуноглобулина, состоящей из четырех полипептидных цепей (две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи), связанных дисульфидными связями. Легкие цепи классифицируют как каппа или лямбда. Тяжелые цепи классифицируют как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон, и они определяют изотип антитела, такой как IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, соответственно, и несколько из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Каждый тип тяжелой цепи характеризуется конкретным константным участком.

Каждая тяжелая цепь содержит варибельный участок тяжелой цепи (сокращенный здесь как HCVR или VH) и константный участок тяжелой цепи. Константный участок тяжелой цепи содержит три домена CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит варибельный участок легкой цепи (сокращенный здесь как LCVR или VL) и константный участок легкой цепи. Константный участок легкой цепи содержит один домен CL. Участки VH и VL могут далее подразделяться на участки гиперварибельности, называемые определяющими комплементарность участками (CDR), окруженные участками, которые являются более консервативными, называемыми скелетными участками (FR). Каждая из VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR участков, расположенных от amino- до карбоксильного конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

В данной заявке 3 CDR тяжелые цепи обозначены как «HCDR1, HCDR2 и HCDR3», а 3 CDR легкой цепи обозначены как «LCDR1, LCDR2 и LCDR3». CDR содержат большинство остатков, которые образуют специфические взаимодействия с антигеном. Нумерацию и позиционирование CDR-аминокислотных остатков в пределах HCVR и LCVR участков антител согласно данному изобретению осуществляют с хорошо известной номенклатурой Kabat, если не указано иного. В настоящей заявке используется, если не указано иного, общепринятые буквенные обозначения аминокислот.

Термины «анти-TRBV9-антитело», «антитело к TRBV9», «антитело, специфически связывающееся с бета цепью семейства TRBV9» или «антитело против бета цепи семейства TRBV9» и им подобные являются взаимозаменяемыми в контексте настоящей заявки и относятся к антителу, которое специфически связывается с эпитопом бета цепи семейства TRBV9 Т-клеточного рецептора человека.

Кроме того, «моноклональное антитело», как используется в данной заявке, может быть одноцепочечным Fv-фрагментом, который может быть получен путем связывания ДНК, кодирующей LCVR и HCVR, с линкерной последовательностью (см. Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, p. 269-315, 1994). Подразумевается, что вне зависимости от того, указаны ли фрагменты или части, термин «антитело», как используется в данной заявке,

включает такие фрагменты или части, а также одноцепочечные формы. До тех пор, пока белок сохраняет способность специфического или предпочтительного связывания своей мишени (например, эпитопа или антигена), он относится к термину «антитело». Антитела могут быть гликозилированными, или не быть таковыми, и входят в рамки изобретения.

Термины «антитело» и «моноклональное антитело» для нужд настоящей заявки относятся к моноклональному антителу против ТКР семейства TRBV9. Как используется в настоящей заявке «моноклональное антитело» относится к антителу грызуна, семейства приматов или Camelidae, предпочтительно к антителу мыши, макаки, верблюда или ламы, химерному антителу, гуманизированному антителу или полностью человеческому антителу, если не указано иное.

Популяция «моноклональных антител» относится к гомогенной или по существу гомогенной популяции антител (т.е. по крайней мере приблизительно 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96%, более предпочтительно по крайней мере приблизительно 97 или 98% или еще более предпочтительно по крайней мере 99% антител в популяции будут конкурировать в анализе ELISA за тот же антиген или эпитоп, или более предпочтительно антитела являются идентичными в аминокислотной последовательности). Антитела могут быть, а могут и не быть, гликолизированными и все еще подпадать в объем изобретения.

Моноклональные антитела могут быть гомогенными, если они имеют идентичную аминокислотную последовательность, хотя они могут отличаться по посттрансляционной модификации, например, паттерн гликолизации.

Вариабельные участки каждой из пар легкая/тяжелая цепь образуют антигенсвязывающие сайты антитела. Как используется в данной заявке, «антигенсвязывающая часть», или «антигенсвязывающий участок», или «антигенсвязывающий домен» или «антигенсвязывающий центр» относятся, взаимозаменяемо, к такой части молекулы антитела, которая содержит аминокислотные остатки, взаимодействующие с антигеном и придающие антителу его специфичность и аффинность по отношению к антигену. Эта часть антитела включает «каркасные» аминокислотные остатки, необходимые для поддержания надлежащей конформации антигенсвязывающих остатков.

Термин «человеческое антитело», используемый здесь, означает антитело, в котором последовательности переменных и константных доменов происходят от человеческих последовательностей. Человеческие антитела, соответствующие изобретению, могут включать остатки аминокислот, нехарактерные для человека (например, мутации, интродуцированные ненаправленным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR и особенно в CDR3.

Термин «гуманизированные» по отношению к антителам используются для обозначения антител, которые характеризуются наличием свойственных человеку константных областей и структурных компонентов, но имеют обуславливающие комплементарность участки (CDR), которые свойственны иммуноглобулинам иного происхождения или соответствующим фрагментам модифицированных антител.

«Родительское» антитело в данной заявке - это антитело, кодированное аминокислотной последовательностью, которая используется для получения варианта. Родительское антитело может быть из грызуна, ламы, химерным, гуманизированным или человеческим антителом.

Термин «степень гуманизации» по отношению к антителам используются для обозначения процента идентичности последовательности каркасного участка

гуманизованного антитела относительно первичного человеческого акцепторного каркасного участка, который был использован для создания гуманизованного антитела и который доступен из человеческой библиотеки. Предпочтительно, антитело изобретения содержит каркасный участок с идентичностью не менее 80%, обычно не менее 82%, чаще не менее 83%, например, не менее 84%, или не менее 85%, или не менее 86%, или не менее 87% идентичностью в отношении к каркасному участку, полученному из человеческой библиотеки.

Термин «гуманизирующие замены» относятся к аминокислотным заменам, которые увеличивают степень гуманизации антитела или его фрагмента.

Термин «химерные» по отношению к антителам настоящего изобретения используются для обозначения антител, которые характеризуются наличием собственных человеку константных областей, но имеют переменные домены иного происхождения. В таких антителах переменные домены легких и/или тяжелых цепей, имеющие нечеловеческое происхождение (например, взятые из крысы), оказываются оперативно связаны с константными доменами соответствующих цепей человеческого происхождения.

Термин «оперативно связанный» или ему подобный при описании антител относится к полипептидным последовательностям, которые находятся в физической (ковалентной, если не указано иного) и функциональной связи одна с другой. В наиболее предпочтительных воплощениях, функции полипептидных компонентов химерной молекулы не изменены по сравнению с функциональными свойствами выделенных полипептидных компонентов.

Термин «оперативно связанный» или ему подобный при описании нуклеиновых кислот означает, что нуклеиновые кислоты ковалентно связаны таким образом, что в местах их соединения отсутствуют «сбойки» рамки считывания и стоп-кодоны. Как очевидно для любого специалиста в данной области техники, нуклеотидные последовательности, кодирующие химерный белок, включающий «оперативно связанные» компоненты (белки, полипептиды, линкерные последовательности, белковые домены и т.д.), состоят из фрагментов, кодирующих указанные компоненты, где эти фрагменты ковалентно связаны таким образом, что в ходе трансляции и транскрипции нуклеотидной последовательности производится полноразмерный химерный белок, например, химерное антитело согласно изобретению.

Как здесь используется, термины «изолированный» и «выделенный» означают молекулу или клетку, которые находятся в среде, отличной от среды, в которой молекула или клетка находятся в естественных условиях.

В преимущественных воплощениях антитела настоящего изобретения являются рекомбинантными, то есть полученными с помощью техники рекомбинантных ДНК.

Термин «рекомбинантное антитело», используемый здесь, включает все антитела, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными средствами, такие как антитела, экспрессированные с использованием рекомбинантного экспрессирующего вектора, введенного в клетку-хозяин, антитела, выделенные из набора известных рекомбинантных комбинаторных человеческих антител, антитела, выделенные из животного, которое является трансгенным в отношении генов человеческого иммуноглобулина (см., например, Taylor L.D. et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295). В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные человеческие антитела подвергаются мутагенезу *in vitro* (или, если используют животное, трансгенное по последовательностям Ig человека, соматическому мутагенезу *in vivo*) и, таким образом, аминокислотные последовательности участков VH и VL рекомбинантных

антител являются последовательностями, которые, поскольку они выделены из последовательностей зародышевых VH и VL человека и близки к ним, не могут в естественных условиях существовать в зародышевом наборе антител человека *in vivo*.

5 Термин «специфически связывает», как используется в данной заявке, относится к той ситуации, при которой один участник пары специфического связывания не связывает в значительной степени молекулы, отличные от его партнера (партнеров) по специфическому связыванию.

10 Термин также применим, когда, например, антигенсвязывающий домен антитела по изобретению является специфическим для конкретного эпитопа, который переносится рядом антигенов, в таком случае специфическое антитело, имеющее антигенсвязывающий домен, будет способно к специфическому связыванию различных антигенов, несущих эпитоп. Соответственно, моноклональное антитело по изобретению специфически связывает эпитоп бета цепи T клеточного рецептора человека, относящегося к семейству TRBV9, в то время как оно специфически не связывает бета-  
15 цепи ТКР других семейств и альфа цепи ТКР.

Термин «эпитоп» относится к той части молекулы, которая способна распознаваться и связываться с антителом в одном или более антигенсвязывающих участках антитела. Эпитопы часто состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или сахарные боковые цепи, и обладают специфическими  
20 трехмерными структурными характеристиками, а также специфическими зарядовыми характеристиками.

Термин «эпитоп», как используется в данной заявке, кроме того, относится к части полипептида, которая обладает антигенной и/или иммуногенной активностью у животного, предпочтительно млекопитающего, например, мыши, крысы или человека.

25 Термин «антигенный эпитоп», как используется в данной заявке, определяется как часть полипептида, с которой может специфически связываться антитело, определенная любым способом, хорошо известным из уровня техники, например, при помощи традиционного иммунного анализа. Антигенные эпитопы не обязательно должны быть иммуногенными, но могут также быть иммуногенными. «Иммуногенный эпитоп», как  
30 используется в данной заявке, определяется как часть полипептида, который вызывает отклик антитела у животного, как устанавливается любым способом, известным из уровня техники. «Нелинейный эпитоп» или «конформационный эпитоп» содержат несмежные полипептиды (или аминокислоты) в пределах антигенного протеина, с которым антитело, специфическое к эпитопу, связывается.

35 Выражения «биологическое свойство» или «биологическая характеристика» или термины «активность» или «биоактивность по отношению к антителу и его функциональным фрагментам по изобретению используются в данной заявке как взаимозаменяемые и включают, но не ограничиваются приведенными, эпитоп/ антигенную аффинность и специфичность, способность ингибировать или быть  
40 антагонистом активности ТКР, в состав которого входит бета цепь, принадлежащая к семейству TRBV9.

Остальные идентифицируемые из уровня техники биологические свойства или характеристики антитела включают, например, перекрестную реактивность (т.е. с нечеловеческими гомологами пептида-мишени или с остальными протеинами или  
45 мишенями, в общем), и способность сохранять высокие уровни экспрессии протеина в клетках млекопитающих. Вышеуказанные свойства или характеристики могут наблюдаться, измеряться или оцениваться с использованием методик, признанных в уровне техники, включая, но не ограничиваясь, приведенными, анализ ELISA,

конкурентный анализ ELISA, BIACORE или анализ поверхностного плазмонного резонанса KINEXA, анализы ингибирования *in vitro* или *in vivo* без ограничений, рецепторного связывания, продуцирования и/или секреции цитокина или фактора роста, сигнальную трансдукцию и иммуногистохимию срезов тканей, полученных из различных источников, включая человека, примата или любой другой источник.

Термины «ингибировать» или «нейтрализовать», как используется в данной заявке, по отношению к активности антитела по изобретению, означают способность в значительной степени противодействовать, препятствовать, предотвращать, ограничивать, замедлять, прерывать, уничтожать, прекращать, уменьшать, например, развитие или тяжесть того, что ингибируют, включая, но, не ограничиваясь вышеприведенными, биологическую активность антитела или свойство, заболевание или состояние.

Как здесь используется, термин «мутант» или «вариант» относятся к антителу, раскрытому в настоящем изобретении, в котором одна или более аминокислот добавлены и/или замещены и/или удалены (делетированы) и/или вставлены (инsertированы) в N-конец и/или C-конец, и/или в пределах нативных аминокислотных последовательностей антител настоящего изобретения или их фрагментов. Как здесь используется, термин «мутант» также относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая кодирует мутантный белок. Кроме того, термин «мутант» относится к любому варианту, который короче или длиннее белка или нуклеиновой кислоты.

Термин «гомология» используется для описания взаимосвязи последовательностей нуклеотидов или аминокислот с другими последовательностями нуклеотидов или аминокислот, которая определена степенью идентичности и/или сходства между указанными сравниваемыми последовательностями.

Как здесь используется, аминокислотная или нуклеотидная последовательности «по существу сходны» или «по существу такие же» как референсная последовательность, если аминокислотная или нуклеотидная последовательности имеют, по крайней мере, 85% идентичности с указанной последовательностью внутри выбранного для сравнения региона. Таким образом, по существу сходные последовательности включают те, которые имеют, например, по крайней мере 90% идентичности, или по крайней мере 91% идентичности, или по крайней мере 92% идентичности, или по крайней мере 93% идентичности, или по крайней мере 94% идентичности, или по крайней мере 95% идентичности, или по крайней мере 96% идентичности, или по крайней мере 97% идентичности, или по крайней мере 98% идентичности, или по крайней мере 99% идентичности. Две последовательности, которые идентичны одна другой, так же по существу сходны.

Идентичность последовательностей определяется на основании референсной последовательности. Алгоритмы для анализа последовательности известны в данной области, такие как IgBLAST, описанный в Ye et al. *Nucleic Acids Res.* 2013, W34-40. Для целей настоящего изобретения для определения уровня идентичности и сходства между нуклеотидными последовательностями и аминокислотными последовательностями может быть использовано сравнение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, производимое с помощью пакета программ IgBLAST, предоставляемого National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>) с использованием содержащего разрывы выравнивания со стандартными параметрами. Для вычисления процента идентичности используется полная длина референсной последовательности, например, переменного региона.

Ссылка на нуклеотидную последовательность «кодирующую» полипептид означает,

что с нуклеотидной последовательности в ходе трансляции и транскрипции мРНК продуцируется этот полипептид. При этом может быть указана как кодирующая цепь, идентичная мРНК и обычно используемая в списке последовательностей, так и комплементарная цепь, которая используется как матрица при транскрипции. Как очевидно для любого специалиста в данной области техники, термин так же включает любые вырожденные нуклеотидные последовательности кодирующие одинаковую аминокислотную последовательность. Нуклеотидная последовательности, кодирующие полипептид, включают последовательности, содержащие интроны.

#### Антитела

Как указано выше, настоящее изобретение относится к изолированным моноклональным гуманизированным антителам и их функциональным фрагментам, обладающим способностью специфически связываться с участком бета цепи семейства TRBV9 T-рецептора человека.

Антитела согласно изобретению могут быть химерными, гуманизированными или человеческими антителами, или их антигенсвязывающими фрагментами и могут использоваться в качестве лекарственного средства для лечения АС и других заболеваний, в патогенез которых вовлечены ТКР, относящиеся к TRBV9 семейству, например, целиакии или Т-клеточной лимфомы.

Антитело согласно изобретению является моноклональным. Моноклональные антитела по изобретению могут быть получены с использованием, например, гибридомных методик, хорошо известных из уровня техники, а также рекомбинантных технологий, технологий фагового дисплея, синтетических технологий или комбинаций таких технологий или других технологий, хорошо известных из уровня техники. Термин «моноклональное антитело», используемый в данной заявке, относится к антителу, полученному из единой копии или клона, включая, например, любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон, а не к способу его получения.

Гуманизированные и химерные антитела могут быть получены пептидным синтезом или с использованием техники рекомбинантных ДНК как описано ниже в разделе «Нуклеиновые кислоты».

В некоторых воплощениях антитела настоящего изобретения являются химерными и характеризуются тем, что имеют переменные домены легкой и тяжелой цепей нечеловеческого происхождения (например, крысиного или мышиноного), а константные домены, характерные для человека.

Антитело настоящего изобретения содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) с тремя гиперпеременными участками

1) HCDR1 (согласно номенклатуре Kabat) имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1,

2) HCDR2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2

3) HCDR3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No 3;

2) переменный домен легкой цепи (VL) с тремя гиперпеременными участками LCDR1, LCDR2 и LCDR3, в которых:

LCDR 1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4,

LCDR 2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5,

LCDR 3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

Здесь и далее при определении CDR антител используется известная номенклатура Kabat, если отдельно не оговорено иное.

Во всех воплощениях переменные домены легкой и тяжелой цепи антитела настоящего изобретения гуманизированы и отличаются от переменных доменов

легкой и тяжелой цепей родительского антитела гуманизирующими аминокислотными заменами, при этом переменные домены тяжелой и легкой цепей антитела содержат аминокислотные замены в FR фрагментах переменных доменов тяжелой и легкой цепи, повышающие степень гуманизации антитела по сравнению с родительским

5 антителом.

В преимущественных воплощениях переменный домен тяжелой цепи антитела настоящего изобретения имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID No: 16, и отличается от переменного домена тяжелой цепи родительского антитела, аминокислотная последовательность которого показана в SEQ ID No: 8,

10 наличием гуманизирующих аминокислотных замен.

В некоторых воплощениях переменный домен тяжелой цепи антитела настоящего изобретения содержит дополнительные аминокислотные замены, не влияющие на специфичность антитела.

В преимущественных воплощениях переменный домен легкой цепи антитела

15 настоящего изобретения содержит аминокислотные замены и имеет последовательность, показанную в SEQ ID NO 18, и отличается от переменного домена тяжелой цепи родительского антитела, аминокислотная последовательность которого показана в SEQ ID No: 10, наличием гуманизирующих аминокислотных замен.

В некоторых воплощениях переменный домен легкой цепи антитела настоящего

20 изобретения содержит дополнительные аминокислотные замены, не влияющие на специфичность антитела.

В некоторых воплощениях моноклональные тела по изобретению являются полноразмерными антителами IgG человека, например, IgG1 или IgG2 или IgG3 или

IgG4.

В некоторых воплощениях антитело согласно изобретению включает тяжелую цепь, аминокислотная последовательность которой идентична, по крайней мере, на 85%, или

25 идентична, по крайней мере, на 90%, или идентична, по крайней мере, на 91%, или идентична, по крайней мере, на 92%, или идентична, по крайней мере, на 93%, или по крайней мере 94% или по крайней мере 95% или по крайней мере 96% или по крайней

30 мере 97%, или по крайней мере 98% или по крайней мере 99% или идентична на 100% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20.

В некоторых воплощениях антитело согласно изобретению включает легкую цепь, аминокислотная последовательность которой идентична, по крайней мере, на 85%, или

35 идентична, по крайней мере, на 90%, или идентична, по крайней мере, на 91%, или идентична, по крайней мере, на 92%, или идентична, по крайней мере, на 93%, или по крайней мере 94% или по крайней мере 95% или по крайней мере 96% или по крайней мере 97%, или по крайней мере 98% или по крайней мере 99% или идентична на 100% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22.

В некоторых воплощениях антитело имеет легкую цепь, аминокислотная

40 последовательность которой показана в SEQ ID NO: 22, и тяжелую цепь, аминокислотная последовательность которой показана в SEQ ID NO: 20.

Из уровня техники известно, что в последовательности антител, включая переменные домены, могут быть внесены мутации, которые не затрагивают по

существу способность антитела связываться с антигеном.

Антитела согласно настоящему изобретению могут также содержать дополнительные

45 мутации, которые не приводят к потере способности антитела связывать бета цепь ТКР семейства TRBV9, но могут приводить к снижению антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности или увеличению аффинности или других

биологических свойств антител. В частности, из уровня техники хорошо известно, что в последовательности антител могут быть внесены консервативные замены аминокислот. Под «консервативной заменой» в контексте заявки подразумевается замена, при которой остаток аминокислоты замещается другим остатком аминокислоты, имеющим близкую боковую цепь. Семейства остатков аминокислот, имеющих близкие боковые цепи, определены в уровне техники, в том числе основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислые боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан),  $\beta$ -разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Предпочтительно в участки CDR3 в доменах VL и/или VH делают не более пяти консервативных замен аминокислот, чаще не более трех консервативных замен. Как правило, консервативные замены не делают в положениях аминокислот, критических для связывания эпитопа бета цепи семейства TRBV9.

Описанные выше варианты (мутанты) антител согласно изобретению могут быть получены пептидным синтезом или с использованием техники рекомбинантных ДНК как описано ниже в разделе «Нуклеиновые кислоты».

В предпочтительных воплощениях антитело содержит константный участок тяжелой цепи, такой как константный участок IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM, IgD человека. Предпочтительно константным участком тяжелой цепи является константный участок тяжелой цепи IgG1 человека. Более того, антитело может содержать как константный участок легкой цепи либо каппа-константный участок легкой цепи, либо ламбда-константный участок легкой цепи. Предпочтительно антитело содержит каппа-константный участок легкой цепи.

В преимущественных воплощениях вариабельный фрагмент тяжелой цепи антитела характеризуется степенью гуманизации - 84%. В преимущественных воплощениях вариабельный фрагмент легкой цепи антитела характеризуется степенью гуманизации - 85%.

Так же обеспечиваются антигенсвязывающие фрагменты антител настоящего изобретения.

Термин «антиген-связывающий фрагмент» антитела (или «функциональный фрагмент антитела» или «активный фрагмент антитела»), используемый здесь, относится к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связывать антиген. Показано, что антиген-связывающая функция антитела может быть осуществлена фрагментами антитела полной длины.

Примеры связывающих фрагментов, охватываемые термином «антиген-связывающий фрагмент» антитела включают (а) фрагмент Fab, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (б) фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, бивалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанные дисульфидным мостиком в районе петли; (в) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; (г) фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела; (д) фрагмент dAb (Ward et al. (1989) Nature 341:544-546), который состоит из домена VH, и (е) выделенный участок (CDR), определяющий комплементарность. Более того, хотя два домена фрагмента Fv, VL и VH, кодируются отдельными генами, они могут быть рекомбинантными способами связаны с помощью синтетического линкера, который обеспечивает их получение в виде одной белковой цепи, в которой участки VL и VH спарены с образованием моновалентных молекул

(известных как Fv одной цепи (scFv); см., например, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Предполагается, что такие антитела из одной цепи также охватываются термином «антиген-связывающий фрагмент» антитела. К ним относятся также другие формы антител из одной цепи, такие как диатела. Диатела являются бивалентными, биспецифическими антителами, в которых домены VH и VL экспрессируются на одной полипептидной цепи, но с использованием линкера, который является слишком коротким, чтобы позволять спаривание двух доменов на одной и той же цепи, что заставляет домены спариваться с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антиген-связывающих сайта (см., например, Holliger P. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak R.J. et al. (1994) Structure 2:1121-1123).

Фрагменты антител, такие как Fab F(ab')<sub>2</sub>, могут быть получены из целых антител с использованием принятых способов, таких как разложение папаином или пепсином, соответственно, целых антител. Более того, антитела, фрагменты антител и молекулы иммуноадгезии могут быть получены с использованием стандартных способов с применением рекомбинантной ДНК.

Антитело или его антиген-связывающий фрагмент могут быть частью более крупных молекул иммуноадгезии, образованных ковалентной или нековалентной связью антитела или фрагмента антитела с одним или более белком или пептидом. Примеры таких молекул иммуноадгезии включают использование участка ядра стрептавидина для получения тетрамерной молекулы scFv (Kipriyanov S.M. et al. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101) и использование остатка цистеина, маркерного пептида и C-концевой полигистидиновой метки для получения бивалентных и уменьшенных биомолекул scFv (Kipriyanov S.M. et al. (1994) Mol. Immunol., 31:1047-1058). Другие химические связывания фрагментов антител также хорошо известны из уровня техники.

Антитела и их функциональные фрагменты согласно изобретению находятся в изолированной форме, то есть это означает, что данный белок по существу свободен от присутствия других белков или других природных биологических молекул, таких как олигосахариды, нуклеиновые кислоты и их фрагмента и т.п., где термин «по существу свободен» в данном случае означает, что менее чем 70%, обычно менее чем 60% и чаще менее чем 50% указанной композиции, содержащей выделенный белок, представляет собой другую природную биологическую молекулу.

В некоторых вариантах указанные белки присутствуют по существу в очищенной форме, где термин «по существу очищенная форма» обозначает чистоту, равную, по меньшей мере, 95%, обычно равную по меньшей мере 97% и чаще равную по меньшей мере 99%.

Способы очистки антитела, полученного путем рекомбинантной или гибридомной хорошо известны из уровня техники, например, очистка может быть осуществлена путем хроматографии (например, ионообменной, аффинной, особенно аффинной для специфичных антигенов - белка А или белка G, и колоночной хроматографией размеров), центрифугирования, дифференциальной растворимости, или любой другой стандартной методикой для очистки белков. Кроме того, антитела по технологии в соответствии с настоящим изобретением или их фрагменты могут быть слиты с гетерологичными полипептидными последовательностями (например, гистидиновой меткой) для облегчения очистки.

Аффинность антитела можно определять с применением стандартного анализа через определение константы диссоциации (KD). KD вычисляется через уравнение  $KD = k_{dis} / k_{on}$ , где  $k_{dis}$  - экспериментально вычисляемая константа скорости диссоциации и  $k_{on}$  -

экспериментально вычисляемая константа скорости ассоциации комплекса антитело-антиген.

Предпочтительными антителами являются те, которые связывают антиген человека со значением  $KD$  не более чем приблизительно  $1 \times 10^{-7}$  М; предпочтительно не более чем приблизительно  $1 \times 10^{-8}$  М; чаще не более чем приблизительно  $1 \times 10^{-9}$  М; более предпочтительно не более чем приблизительно  $1 \times 10^{-10}$  М, и наиболее предпочтительно не более чем приблизительно  $1 \times 10^{-11}$  М, например, не более чем приблизительно  $1 \times 10^{-12}$  М.

Антитела и их фрагменты, которые можно использовать в настоящих композициях и способах, являются биологически активными антителами и фрагментами, то есть способны связывать желаемые антигенные эпитопы и проявлять биологический эффект непосредственно или опосредованно.

Антитела и их функциональные фрагменты согласно изобретению способны специфически связывать эпитоп (участок) бета цепи семейства TRBV9. В преимущественных воплощениях в результате их специфического связывания с бета цепью семейства TRBV9 происходит ингибирование активности ТКР, включающих указанную бета цепь. Как правило, ингибирование составляет предпочтительно, по крайней мере, приблизительно 20, или 30, или 40, или 50, или 60, или 70, или 80, или 90, или 95% или выше.

В некоторых вариантах осуществления антитело против бета цепи семейства TRBV9 согласно изобретению или его фрагмент может элиминировать Т-лимфоциты, несущие ТКР, содержащий бета-цепь семейства TRBV9. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент согласно изобретению может обеспечивать, по меньшей мере, приблизительно 20%, по меньшей мере, приблизительно 30%, по меньшей мере, приблизительно 40%, по меньшей мере, приблизительно 50%, по меньшей мере, приблизительно 60%, по меньшей мере, приблизительно 70%, по меньшей мере, приблизительно 80%, по меньшей мере, приблизительно 90%, по меньшей мере, приблизительно 95% или приблизительно 100% элиминацию Т-лимфоцитов.

В преимущественном варианте изобретения антитело представляет собой антитело МА-043.

Антитело МА-043, включает переменные домены тяжелой и легкой цепей, которые имеют аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 16 и 18.

Антитело МА-043, включает тяжелую и легкую цепи, которые имеют аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 20 и 22, соответственно.

#### Нуклеиновые кислоты

Настоящее изобретение обеспечивает молекулы нуклеиновых кислот кодирующие тяжелую и легкую цепи антитела настоящего изобретения, их функциональные фрагменты и переменные домены, которые могут быть использованы для получения химерных антител, включающих переменные домены по изобретению, оперативно слитые с известными константными доменами антител человека.

В преимущественных воплощениях нуклеиновая кислота по изобретению кодирует тяжелую цепь антитела, переменный домен которой содержит 3 гиперпеременные участка HCDR1, HCDR2 и HCDR3, где

HCDR1 (согласно номенклатуре Kabat) имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No 1;

HCDR2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No 2;

HCDR3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No 3.

В преимущественных воплощениях нуклеиновая кислота по изобретению кодирует легкую цепь антитела, переменный домен которой содержит 3 гиперпеременные участка L<sub>CDR1</sub>, L<sub>CDR2</sub> и L<sub>CDR3</sub>, в которых:

L<sub>CDR1</sub> имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No 4;

5 L<sub>CDR2</sub> имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No 5;

L<sub>CDR3</sub> имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No 6.

В преимущественных воплощениях нуклеиновая кислота по изобретению кодирует переменные домены тяжелой и легкой цепей антитела, которые содержат аминокислотные замены в FR фрагментах переменных доменов тяжелой и легкой цепи, повышающие степень гуманизации антитела по сравнению с родительским антителом.

Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие гомологи и мутанты указанных цепей антител, их функциональных фрагментов и доменов также находятся в рамках настоящего изобретения.

15 В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота кодирует тяжелую цепь антитела, переменный домен которой имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 16.

В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота кодирует легкую цепь антитела, переменный домен которой имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 18.

20 В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота кодирует тяжелую цепь антитела, аминокислотная последовательность которой идентична, по крайней мере, на 85%, или идентична, по крайней мере, на 90%, или идентична, по крайней мере, на 91%, или идентична, по крайней мере, на 92%, или идентична, по крайней мере, на 93%, или по крайней мере 94% или по крайней мере 95% или по крайней мере 96% или по крайней мере 97%, или по крайней мере 98% или по крайней мере 99% или идентична на 100% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20.

В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота кодирует легкую цепь антитела, аминокислотная последовательность которой идентична, по крайней мере, на 85%, или идентична, по крайней мере, на 90%, или идентична, по крайней мере, на 91%, или идентична, по крайней мере, на 92%, или идентична, по крайней мере, на 93%, или по крайней мере 94% или по крайней мере 95% или по крайней мере 96% или по крайней мере 97%, или по крайней мере 98% или по крайней мере 99% или идентична на 100% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22.

35 Примеры нуклеиновых кислот, кодирующих легкие и тяжелые цепи по изобретению показаны в SEQ ID No: 19 и 21.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие переменные домены легкой и тяжелой цепи антитела так же представляют интерес. Нуклеиновые кислоты, кодирующих переменные домены тяжелой и легкой цепей антитела, могут быть использованы для оперативного слияния с нуклеиновыми кислотами, кодирующие соответствующие константные домены антител.

В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота кодирует переменный домен тяжелой цепи антитела, аминокислотная последовательность которого показана в SEQ ID No: 16.

45 В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота кодирует переменный домен легкой цепи антитела, аминокислотная последовательность которого показана в SEQ ID No: 18.

Примеры нуклеиновых кислот, кодирующих переменные домены тяжелой и легкой

цепей антитела, показаны в SEQ ID No: 15 и 17.

Как здесь используется, «молекула нуклеиновой кислоты» или «нуклеиновая кислота» - это молекула ДНК, такая как геномная ДНК или кДНК молекула, или молекула РНК, такая как молекула мРНК. В некоторых воплощениях, молекула нуклеиновой кислоты настоящего изобретения - это ДНК (или кДНК) молекула, содержащая открытую рамку считывания, которая кодирует антитело или фрагмент антитела настоящего изобретения и способна в подходящих условиях (например, физиологические внутриклеточные условия) быть использована для экспрессии в гетерологической системе экспрессии.

В некоторых воплощениях молекула нуклеиновой кислоты настоящего изобретения получена методами генной инженерии. Способы получения нуклеиновых кислот хорошо известны из области техники.

Например, доступность информации о последовательности аминокислот или информации о нуклеотидной последовательности дает возможность изготовить выделенные молекулы нуклеиновых кислот настоящего изобретения с помощью олигонуклеотидного синтеза.

В случае информации о последовательности аминокислот, может быть синтезировано несколько нуклеиновых кислот отличающихся друг от друга вследствие вырожденности генетического кода. Методы выбора вариантов кодонов для требуемого хозяина хорошо известны в данной области.

Синтетические олигонуклеотиды могут быть приготовлены с помощью фосфорамидитного метода, и полученные конструкторы могут быть очищены с помощью методов хорошо известных в данной области, таких как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) или других методов как описано, например, в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., (1989) Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, и по инструкции, описанной в, например, United States Dept. of HHS, National Institute of Health (NIH) *Guidelines for Recombinant DNA Research*. Длинные двухцепочечные молекулы ДНК настоящего изобретения могут быть синтезированы следующим образом: могут быть синтезированы несколько меньших фрагментов с необходимой комплементарностью, которые содержат подходящие концы, способные к когезии с соседним фрагментом. Соседние фрагменты могут быть сшиты с помощью ДНК-лигазы или метода, основанного на ПЦР.

Молекулы нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению могут быть также клонированы из биологических источников.

Настоящее изобретение так же охватывает нуклеиновые кислоты, которые гомологичны, по существу сходны, идентичны, или получены из нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды настоящего изобретения.

Нуклеиновые кислоты изобретения находятся в среде, отличной от среды, в которой они находятся в естественных условиях, например, они выделены, представлены в увеличенном количестве, находятся или экспрессированы в системах *in vitro* или в клетках или организмах, отличных от тех, в которой они находятся в естественных условиях.

Изменения или различия в нуклеотидной последовательности между высоко сходными нуклеотидными последовательностями могут представлять нуклеотидные замены в последовательности, которые возникают в процессе нормальной репликации или дупликации. Другие замены могут быть специально рассчитаны и вставлены в последовательность для определенных целей таких, как изменение кодонов определенных аминокислот или нуклеотидной последовательности регуляторного региона. Такие специальные замены могут быть произведены *in vitro* с помощью

различных технологий мутагенеза или получены в организмах-хозяевах, находящихся в специфических селекционных условиях, которые индуцируют или отбирают эти изменения. Такие специально полученные варианты последовательности могут быть названы «мутантами» или «производными» исходной последовательности.

5 Мутантные или производные нуклеиновые кислоты или варианты нуклеиновых кислот могут быть получены на матричной нуклеиновой кислоте, выбранной из вышеописанных нуклеиновых кислот, путем модификации, делеции или добавления  
10 одного или более нуклеотидов в матричной последовательности или их комбинации, для получения варианта матричной нуклеиновой кислоты. Модификации, добавления или делеции могут быть выполнены любым способом, известным в данной области (см., например, Gustin et al., *Biotechniques* (1993) 14: 22; Barany, *Gene* (1985) 37: 111-123; и Colicelli et al., *Mol. Gen. Genet.* (1985) 199:537-539, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (1989), CSH Press, pp. 15.3-15.108), включая подверженный ошибкам ПЦР (error-prone PCR), shuffling, олигонуклеотид-направленный мутагенез, ПЦР со  
15 сборкой, парный ПЦР мутагенез, мутагенез in vivo, кассетный мутагенез, рекурсивный множественный мутагенез, экспоненциальный множественный мутагенез, сайт-специфический мутагенез, случайный мутагенез, генная реассемблирование (gene reassembly), генный сайт-насыщающий мутагенез (GSSM), искусственное перестройку с лигированием (SLR) или их комбинации. Модификации, добавления или делеции могут  
20 быть также выполнены методом, включающим рекомбинацию, рекурсивную рекомбинацию последовательностей, фосфотиоат-модифицированный мутагенез ДНК, мутагенез на урацил-содержащей матрице, мутагенез с двойным пропуском, точечный восстановительный по рассогласованию мутагенез, мутагенез штамма, дефицитного по восстановлению, химический мутагенез, радиоактивный мутагенез, делетационный  
25 мутагенез, рестрикционно-избирательный мутагенез, рестрикционный мутагенез с очисткой, синтез искусственных генов, множественный мутагенез, создание химерных множественных нуклеиновых кислот и их комбинации.

Также обеспечиваются вырожденные варианты нуклеиновых кислот, которые кодируют белки настоящего изобретения. Вырожденные варианты нуклеиновых кислот  
30 включают замены кодонов нуклеиновой кислоты на другие кодоны, кодирующие те же самые аминокислоты. В частности, вырожденные варианты нуклеиновых кислот создаются, чтобы увеличить экспрессию в клетке-хозяине. В этом воплощении, кодоны нуклеиновой кислоты, которые не являются предпочтительными или являются менее предпочтительными в генах клетки-хозяина, заменены кодонами, которые обильно  
35 представлены в кодирующих последовательностях генов в клетке-хозяине, где указанные замененные кодоны кодируют ту же самую аминокислоту.

Вышеуказанные модификации не изменяют по существу свойства антител и их функциональных фрагментов, но могут облегчать белковый фолдинг в клетке-хозяине, снижать способность к агрегации или модулировать другие биохимические свойства  
40 белков, например, полупериод распада. В некоторых воплощениях, эти модификации не изменяют биохимические свойства белка. В некоторых воплощениях, эти модификации приводят к уменьшению иммуногенности антител. Все виды модификаций и мутаций, указанные выше, осуществляются на уровне нуклеиновой кислоты.

Заявленные нуклеиновые кислоты могут быть выделены и получены по существу в  
45 очищенной форме. По существу очищенная форма означает, что нуклеиновые кислоты являются, по меньшей мере, приблизительно на 50% чистыми, обычно, по меньшей мере, приблизительно на 90% чистыми и обычно являются «рекомбинантными», то есть, фланкированы одним или более нуклеотидами, с которыми она обычно не связана

в хромосоме, встречающейся в природе в ее естественном организме-хозяине.

Также обеспечиваются нуклеиновые кислоты, которые кодируют слитые белки, включающие белок настоящего изобретения, или их фрагменты, которые ниже рассматриваются более детально. Нуклеиновые кислоты, кодирующие переменные домены по изобретению могут быть оперативно слиты с нуклеиновыми кислотами, кодирующими соответствующие константные домены легкой и тяжелой цепи антитела. Нуклеиновые кислоты, кодирующие легкую и тяжелую цепи антитела, могут быть оперативно слиты с нуклеиновыми кислотами, кодирующими лидерный (сигнальный) пептид, обеспечивающий транспорт продуктов экспрессии из клетки-хозяина. Лидерный пептид впоследствии отщепляется во время созревания полипептида.

#### Вектор

Также обеспечиваются вектор и другие конструкции нуклеиновой кислоты, содержащие заявленные нуклеиновые кислоты. Термин «вектор» включает молекулу нуклеиновой кислоты, способную транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она оперативно связана. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены, в то время как остальные векторы могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина и, таким образом, реплицированы наряду с геномом-хозяином. Более того, определенные векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они оперативно связаны. Такие векторы имеют в данной заявке название «векторы рекомбинантной экспрессии» (или, упрощенно, «векторы экспрессии» или «экспрессионные векторы»), а иллюстративные векторы хорошо известны из уровня техники. Подходящие векторы включают вирусные и невирусные векторы, плазмиды, космиды, фаги и т.д., предпочтительно плазмиды, и используются для клонирования, амплификации, экспрессии, переноса и т.д., последовательности нуклеиновой кислоты настоящего изобретения в подходящего хозяина. Выбор подходящего вектора является понятным для квалифицированного специалиста в данной области.

Полноразмерная нуклеиновая кислота или ее часть обычно вставляются в вектор посредством прикрепления ДНК-лигазой к расщепленному ферментами рестрикции сайту в векторе. Альтернативно, желательная нуклеотидная последовательность может быть вставлена гомологичной рекомбинацией *in vivo*, обычно, присоединением гомологичных участков к вектору на флангах желательной нуклеотидной последовательности. Гомологичные участки добавляются лигированием олигонуклеотидов или полимеразной цепной реакцией, с использованием праймеров, включающих, например, как гомологичные участки, так и часть желательной нуклеотидной последовательности.

Вектор, как правило, имеет ориджин репликации, обеспечивающий его размножение в клетках-хозяевах в результате его введения в клетку как внехромосомного элемента. Вектор также может содержать регуляторные элементы, обеспечивающие экспрессию нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине и получение целевого полипептида. В экспрессионном векторе, указанная нуклеиновая кислота является оперативно связанной с регуляторной последовательностью, которая может включать промоторы, энхансеры, терминаторы, операторы, репрессоры и индукторы, а также стартовый кодон полипептида. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота по изобретению нуклеиновая кислота также оперативно связана с лидерным пептидом, обеспечивающим выделение продукта экспрессии из клетки-хозяина во внеклеточное пространство.

Также обеспечиваются кассеты экспрессии или системы, использованные *inter alia* для получения заявленных полипептидов (например, легкой и тяжелой цепей антитела

по изобретению или вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей антитела по изобретению) на их основе или для репликации заявленных молекул нуклеиновой кислоты.

Кассета экспрессии может существовать как внехромосомный элемент или может  
5 быть включена в геном клетки в результате введения указанной кассеты экспрессии в клетку. Для экспрессии белковый продукт, кодируемый нуклеиновой кислотой изобретения, экспрессируется в любой удобной системе экспрессии, включая, например, бактериальные системы, дрожжи, растения, насекомых, земноводных или клетки млекопитающих. В кассете экспрессии целевая нуклеиновая кислота оперативно  
10 соединяется с регуляторными последовательностями, которые могут включать промоторы, энхансеры, терминирующие последовательности, операторы, репрессоры и индукторы, а также стартовый кодон полипептида. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота по изобретению нуклеиновая кислота также оперативно связана с лидерным пептидом, обеспечивающим выделение продукта экспрессии из клетки-  
15 хозяина во внеклеточное пространство. Способы получения кассет или систем экспрессии, способных экспрессировать желательный продукт, известны специалистам в данной области.

#### Клетка-хозяин

Вышеописанные системы экспрессии могут использоваться в прокариотических или  
20 эукариотических хозяевах. Для получения белка могут использоваться клетки-хозяева, такие как *E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, клетки насекомого в комбинации с бакуловирусными векторами, или клетки высшего организма, не являющиеся эмбриональными клетками человека, такие как дрожжи, растения, позвоночные, например, CHO клетки (например, ATCC CRL-9096), NS0 клетки, SP2/0 клетки, HEK293  
25 клетки, COS клетки (например, ATCC CRL-1650, CRL-1651) и HeLa (например, ATCC CCL-2).

Для получения антитела по изобретению клетка-хозяин ко-трансформируется экспрессионным вектором, включающим нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь антитела, и экспрессионным вектором, включающим нуклеиновую кислоту,  
30 кодирующую тяжелую цепь антитела. В некоторых воплощениях используется один экспрессионный вектор, в который внедрены нуклеиновые кислоты, кодирующие и легкую, и тяжелую цепи антитела.

Для экспрессии легкой и тяжелой цепей экспрессионным вектором(ами), кодирующим тяжелую и легкую цепи, трансформируют (ко-трансформируют) в клетку-хозяина таким  
35 образом, что легкая и тяжелая цепи экспрессируются в клетке-хозяине и, предпочтительно, выделяются в среду, в которой культивируют клетки-хозяина, из этой среды могут быть выделены антитела. Различные трактовки термина «трансформация» предназначены для включения широкого ряда способов, обычно используемых при интродукции экзогенной ДНК в прокариотную или эукариотную  
40 клетку-хозяина, например, электропорацию, преципитацию фосфатом кальция, трансфекцию с помощью DEAE-декстрана и др., как описано Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds) *Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989; Ausubel F.M. et al. (eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates (1989).

45 Когда рекомбинантные экспрессирующие векторы, содержащие нуклеиновые кислоты антитела, интродуцируют в клетки-хозяева, антитела образуются при культивировании клеток-хозяев в течение периода времени, который достаточен для экспрессии антитела в клетке-хозяине, или (более предпочтительно) секреции антитела в культуральную

среду, в которой выращивают клетки-хозяина. Антитела могут быть выделены из культуральной среды с использованием стандартных способов очистки белков. Условия культивирования различных клеток хорошо известны специалистам в данной области и описаны, например, в *Current Protocols in Cell Biology*, под ред. Bonifacino J.S., Dasso M., Harford J.B., Lippincott-Schwartz J. и Yamada K.M., изд-во John Wiley & Sons, Inc., 2000.

Если используется любая вышеупомянутая клетка-хозяин или другие подходящие клетки-хозяева или организмы для репликации и/или экспрессии нуклеиновых кислот изобретения, то полученная реплицированная нуклеиновая кислота, экспрессированный белок или полипептид находятся в рамках притязания изобретения как продукт клетки-хозяина или организма. Продукт может быть выделен подходящим способом, известным в данной области.

Клеточные линии, которые устойчиво экспрессируют белки настоящего изобретения, могут быть выбраны способами, известными в данной области (например, ко-трансфекция с селектируемым маркером, таким как dhfr, gpt, неомицин, гигромицин, что делает возможным выявление и выделение трансфицированных клеток, которые содержат ген, включенный в геном).

Молекулы нуклеиновых кислот настоящего изобретения также могут применяться для определения экспрессии гена в биологическом образце. Способ, в котором исследуются клетки на наличие специфических нуклеотидных последовательностей, таких как геномная ДНК или РНК, хорошо отработан в данной области. Кратко, выделяют ДНК или мРНК из образца клетки. мРНК может быть амплифицирована ОТ-ПЦР, с использованием обратной транскриптазы для формирования комплементарной цепочки ДНК, с последующей амплификацией с помощью полимеразной цепной реакцией с использованием праймеров, специфических для заявленных последовательностей ДНК. Альтернативно, образец мРНК отделяют с помощью гель-электрофореза, переносят на подходящий носитель, например, нитроцеллюлозу, нейлон и т.д., и затем тестируют фрагментом заявленной ДНК в качестве пробы. Могут также использоваться другие способы, такие как анализы сшивания олигонуклеотидов, гибридизация *in situ* и гибридизация ДНК-пробами, иммобилизованными на твердый чип. Обнаружение мРНК, гибридизующейся с заявленной последовательностью указывает на экспрессию гена в образце.

Терапевтическое применение антител по изобретению

В одном аспекте антитело или его активный фрагмент по данному изобретению применяется в лечении нарушений, которые связаны с активностью патологических Т-лимфоцитов, несущих на поверхности ТКР семейства TRBV9, например, с активностью аутоиммунных Т-лимфоцитов при АС, целиакии, Т-клеточных лимфомах.

Термин «пациент» в данной заявке относится к млекопитающему, включая, но не ограничиваясь приведенными, мышей, обезьян, людей, млекопитающих сельскохозяйственных животных, млекопитающих спортивных животных и млекопитающих комнатных животных; предпочтительно термин относится к людям. В определенном из вариантов осуществления пациент дополнительно характеризуется заболеванием или расстройством, или состоянием, опосредованными наличием в его организме ТКР, бета цепь которого относится к семейству TRBV9. Из уровня техники известно, что ТКР, бета цепь которого относится к семейству TRBV9, ассоциированы с АС и целиакией. Также ТКР, бета цепь которого относится к семейству TRBV9, могут быть связаны с развитием ряда заболеваний крови, таких как Т клеточная лимфома, вызванная вирусом Эпштейн-Барр.

Используемые в данном документе термины «совместное назначение», «совместно

назначенный» и «в сочетании с» относящиеся антителу с одним или более другими терапевтическими агентами, как предполагается, означают, ссылаются или включают:

1) одновременное введение такой комбинации антитела по данному изобретению и терапевтического агента пациенту, который нуждается в лечении, когда такие компоненты сформулированы вместе в одной лекарственной форме, из которой указанные компоненты высвобождаются практически одновременно указанному пациенту,

2) одновременное введение такой комбинации антитела по данному изобретению и терапевтического агента пациенту, который нуждается в лечении, когда такие компоненты сформулированы отдельно в разных лекарственных формах, введение которых происходит практически в одно и то же время указанному пациенту, после чего указанные компоненты высвобождаются практически одновременно указанному пациенту,

3) последовательное введение такой комбинации антитела по данному изобретению и терапевтического агента пациенту, который нуждается в лечении, когда такие компоненты сформулированы отдельно друг от друга в отдельных лекарственных формах, которые принимаются в последовательно по времени указанным пациентом со значимым временным интервалом между каждым введением, после чего указанные компоненты высвобождаются в практически разное время указанному пациенту; а также

4) последовательное введение такой комбинации антитела по данному изобретению и терапевтического агента пациенту, который нуждается в лечении, когда такие компоненты сформулированы вместе в единой лекарственной форме, из которой высвобождение указанных компонентов происходит контролируемым образом, после чего они одновременно, последовательно или совместно высвобождаются в одно и то же время и/или разное время указанному пациенту, где каждая часть может быть введена одним или разными путями.

Антитело по данному изобретению может назначаться без дополнительного терапевтического лечения, т.е. в качестве самостоятельной терапии.

Кроме того, лечение антителом по данному изобретению может включать по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое лечение (комбинированная терапия).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело может вводиться совместно или быть сформулирована с другим медикаментом/препаратом для аутоиммунного или онкологического заболевания, в патогенез которого вовлечены ТКР, содержащие бета-цепь TRBV9, например, АС, целиакия, Т-клеточная лимфома, Т-клеточный лейкоз.

#### Дозы и пути введения

Антитело по данному изобретению будет вводиться в количестве, эффективном для лечения состояния, о котором идет речь, т.е. в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого результата.

Терапевтически эффективное количество может изменяться в зависимости от таких факторов, как конкретное состояние, по поводу которого проводится лечение, возраста, пола и веса пациента, а также является ли введение антитела самостоятельным лечением или оно проводится в комбинации с одним или более дополнительных иммуносупрессивных или противовоспалительных методов лечения.

Схемы приема лекарственных средств можно регулировать, чтобы обеспечить оптимальный желаемый ответ. Например, может быть введен один болюс, несколько разделенных доз могут быть введены в течение некоторого времени, или доза могут

быть пропорционально уменьшена или увеличена в зависимости от остроты терапевтической ситуации.

Особенно полезным является изготовление парентеральных композиций в стандартной лекарственной форме для простоты введения и однородности дозирования.

5 Стандартная лекарственная форма при использовании в данном документе, относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве единичных доз для пациентов/ субъектов, подлежащих лечению; каждая единица содержит заданное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем. Спецификация для 10 стандартных лекарственных форм по настоящему изобретению, как правило, диктуется и непосредственно зависит от (а) уникальных характеристик химиотерапевтического агента и конкретного терапевтического или профилактического эффекта, которые должны быть достигнуты, и (b) ограничений, присущих в технике компаундирования такого активного соединения для лечения чувствительности у субъектов.

15 Таким образом, квалифицированным специалистам понятно, исходя из раскрытия, представленного в данном документе, что дозы и режим дозирования корректируются в соответствии со способами, хорошо известными в терапевтической области. Это означает, что может быть легко установлена максимально переносимая доза и может быть также определено эффективное количество, обеспечивающее обнаруживаемый 20 терапевтический эффект для пациента, также как и требования к времени введения каждого агента для достижения видимого терапевтического эффекта для пациента. Таким образом, хотя некоторые дозы и схемы режима введения приведены в качестве примеров в данном документе, эти примеры никоим образом не ограничивают дозы и режимы введения, которые могут понадобиться для пациента в практике применения 25 настоящего изобретения.

Следует отметить, что значения дозировки могут изменяться, в зависимости от типа и тяжести состояния, которое следует облегчить, и может включать одну или более доз. Кроме того, необходимо понимать, что для любого конкретного пациента, конкретные 30 схемы введения должны быть скорректированы через некоторое время согласно индивидуальной потребности и на усмотрение медицинского работника, который осуществляет введение или контролирует введение композиций, и что диапазоны концентрации, приведенные в данном описании, приведены только в качестве примера и не предназначены для ограничения объема или практики заявленных композиций. Кроме того, режим дозирования с композициями по данному изобретению может быть 35 основан на различных факторах, включая тип заболевания, возраст, вес, пол, состояния здоровья пациента, тяжесть состояния, путь введения и конкретное используемое антитело. Таким образом, режим дозирования может широко варьироваться, но может определяться регулярно с помощью стандартных методов. Например, дозы могут быть скорректированы на основе фармакокинетических и фармакодинамических параметров, 40 которые могут включать клинические эффекты, такие как токсические эффекты или лабораторные значения. Таким образом, настоящее изобретение охватывает индивидуальное повышение дозы, которое определяется квалифицированным специалистом. Определение необходимой дозы и режимы хорошо известны в соответствующей области техники и будут понятны специалисту в данной области 45 после ознакомления с идеями, раскрытыми в данном документе.

Примеры подходящих способов введения предусмотрены выше.

Предполагается, что подходящая доза антитела по данному изобретению будет в диапазоне от 0,1-200 мг/кг, предпочтительно 0,1-100 мг/кг, в том числе около 0,5-50 мг/

кг, например, около 1-20 мг/кг. Антитело может быть введено, например, в дозе по меньшей мере 0,25 мг/кг, например, по меньшей мере, 0,5 мг/кг, в том числе не менее 1 мг/кг, например, по меньшей мере, 1,5 мг/кг, например, также как не менее 2 мг/кг, например, по меньшей мере 3 мг/кг, в том числе по меньшей мере 4 мг/кг, например, по меньшей мере, 5 мг/кг; и, например, вплоть до максимально 50 мг/кг, в том числе вплоть до максимально 30 мг/кг, например, вплоть до максимально 20 мг/кг, в том числе вплоть до максимально 15 мг/кг. Введение будет повторяться обычно в подходящие промежутки времени, например, раз в неделю, раз в две недели, один раз каждые три недели или один раз каждые четыре недели, и так долго, как будет сочтено целесообразным ответственным врачом, который может в некоторых случаях увеличить или уменьшить дозу при необходимости.

#### Фармацевтическая композиция

Антитело по изобретению может быть включено в фармацевтическую композицию, пригодную для введения пациенту. Антитела по изобретению могут быть введены отдельно или в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем и/или наполнителем в однократных или многократных дозах. Фармацевтические композиции для введения разработаны таким образом, чтобы соответствовать выбранному режиму введения, а фармацевтически приемлемые разбавители, носители и/или наполнители, такие как диспергирующие агенты, буфера, поверхностно-активные вещества, консерванты, солюбилизующие агенты, изотонические агенты, стабилизаторы и т.п.использованы должным образом. Указанные композиции разработаны в соответствии с традиционными методами, приведенными в, например, Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1995, где описаны различные методы получения композиций, в общем известных специалистам.

«Лекарственное средство (препарат)» - вещество или смесь веществ в виде фармацевтической композиции в виде таблеток, капсул, порошков, лиофилизатов, инъекций, инфузий, мазей и др. готовых форм, предназначенное для восстановления, исправления или изменения физиологических функций у человека и животных, а также для лечения и профилактики болезней, диагностики, анестезии, контрацепции, косметологии и прочего. Любой способ введения пептидов, белков или антител, принятый в данной области, может соответствующим образом использоваться для антитела по данному изобретению.

Термин «фармацевтически приемлемый» означает один или несколько совместимых жидких или твердых компонентов, которые подходят для введения млекопитающему, предпочтительно человеку.

Термин «эксципиент» или «вспомогательное вещество» используется в данном документе для описания любого компонента, отличающегося от ранее описанных по данному изобретению. Это вещества неорганического или органического происхождения, используемые в процессе производства, изготовления лекарственных препаратов для придания им необходимых физико-химических свойств.

Под термином «буфер», «буферная композиция», «буферный агент» понимается раствор, способный сохранять значение pH, благодаря взаимодействию кислотных и щелочных компонентов, входящих в его состав, который дает возможность препарату антитела проявлять устойчивость к изменениям pH. В общем случае, преимущественными являются значения pH фармацевтической композиции от 4,0 до 8,0. В качестве буферных агентов могут быть использованы, например, ацетатный, фосфатный, цитратный, гистидиновый, сукцинатный и т.п.буферные растворы, но, не

ограничиваясь ими.

Термины «тонический агент», «осмолитик» или «осмотический агент» в том виде, как они здесь использованы, относятся к эксципиенту, который может подводить осмотическое давление жидкого препарата антителя. «Изотоничный» препарат представляет собой препарат, который имеет осмотическое давление, эквивалентное давлению человеческой крови. Изотоничные препараты обычно имеют осмотическое давление от примерно 250 до 350 мОсм/кг. В качестве изотонических агентов могут быть использованы полиолы, моно- и дисахара, аминокислоты, соли металлов, например, хлорид натрия, и т.п., но, не ограничиваясь ими.

Под «стабилизатором» понимается вспомогательное вещество или смесь двух и более вспомогательных веществ, которые обеспечивают физическую и/или химическую стабильность активного агента. В качестве стабилизаторов могут быть использованы аминокислоты, например, аргинин, гистидин, глицин, лизин, глутамин, пролин, но, не ограничиваясь ими; поверхностно-активные вещества, например, полисорбат 20 (торговое наименование Tween 20), полисорбат 80 (торговое наименование Tween 80), полиэтилен-полипропилен гликоль и его кополимеры (торговые наименования Полоксамер (Poloxamer), Плуроник (Pluronic)), натрия додецилсульфат (SDS), но, не ограничиваясь ими; антиоксиданты, например, метионин, ацетилцистеин, аскорбиновая кислота, монотиоглицерол, соли серистых кислот, и т.п., но не ограничиваясь ими; хелатирующие агенты, например, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), диэтилентриаминпентауксусная кислота (ДТПА), цитрат натрия и т.п., но не ограничиваясь ими.

Фармацевтическая композиция является «стабильной», если активный агент сохраняет свою физическую стабильность и/или химическую стабильность и/или биологическую активность в течение заявленного срока годности при температуре хранения, например, при 2-8°C. Предпочтительно, чтобы активный агент сохранял и физическую, и химическую стабильность, а также биологическую активность. Период хранения выбирается на основании результатов исследования стабильности при ускоренном и естественном хранении.

Фармацевтическая композиция, содержащая моноклональное антители по изобретению, может быть введена пациенту, имеющему патологии, как описано в данной заявке, с использованием стандартных методов введения, включая пероральное, внутривенное, интраперитонеальное, подкожное, легочное, трансдермальное, внутримышечное, интраназальное, буккальное, сублингвальное или при помощи суппозитория.

Фармацевтическая композиция по изобретению предпочтительно содержит или является «терапевтически эффективным количеством» антителя по изобретению. «Терапевтически эффективное количество» относится к количеству, эффективному при дозировках и на протяжении периодов времени, необходимого для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество антителя может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние болезни, возраст, пол и вес индивидуума, и способности антителя или части антителя вызывать желательную реакцию у индивидуума. Терапевтически эффективное количество также представляет собой количество, при котором терапевтически полезный эффект антителя преобладает над токсическим или вредным эффектом. «Профилактически эффективное количество» относится к количеству, эффективному при дозировках и на протяжении периодов времени, необходимых для достижения желательного профилактического результата. Поскольку профилактическую дозу используют для индивидуумов до или

на ранней стадии заболевания, то, типично, профилактически эффективное количество может быть меньшим, чем терапевтически эффективное количество.

Терапевтически эффективное или профилактически эффективное количество представляет собой, по крайней мере, минимальную дозу, но меньшую, чем токсическая  
5 доза активного агента, необходимую для обеспечения терапевтической пользы пациенту. С другой стороны, терапевтически эффективное количество антитела по изобретению представляет собой количество, которое у млекопитающих, предпочтительно людей, снижает биологическую активность аутоиммунных клонов, например, через связывание  
10 ТКР, бета цепь которого относится к семейству TRBV9, где присутствие этих клонов вызывает или способствует нежелательным патологическим эффектам, или снижение уровней ТКР, бета цепь которого относится к семейству TRBV9, вызывает благоприятный терапевтический эффект у млекопитающего, предпочтительно человека.

Путь введения антитела по изобретению может быть пероральным, парентеральным, путем ингаляции или местным. Предпочтительно антитела по изобретению могут быть  
15 включены в фармацевтическую композицию, пригодную для парентерального введения. Термин «парентеральный», как используется в данной заявке, включает внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, вагинальное или интраперитонеальное введение. Преимущественным является введение путем внутривенной или интраперитонеальной, или подкожной инъекции. Подходящие носители для таких  
20 инъекций непосредственно известны из уровня техники.

Фармацевтическая композиция, как указано в соответствующих руководствах, должна быть стерильной и стабильной в условиях производства и хранения в контейнере, который обеспечивается, включая, например, герметично закрытый флакон (ампула) или шприц. Поэтому фармацевтические композиции могут быть стерильно  
25 профильтрованными после получения состава либо сделаны микробиологически пригодными иным образом. Типичная композиция для внутривенной инфузий может иметь объем в 250-1000 мл жидкости, такой как стерильный раствор Рингера, физиологический раствор, раствор декстрозы и раствор Хенка, и терапевтически эффективную дозу (например, 1-100 мг/мл или более) концентрации антитела. Доза  
30 может варьировать в зависимости от вида и тяжести заболевания. Как хорошо известно из уровня техники в области медицины, дозировки для любого из пациентов зависят от многих факторов, включая размеры пациента, площадь поверхности тела, возраст, конкретное соединение, предназначенное для введения, пол, время и путь введения, общее состояние здоровья и другие лекарства, которые вводят одновременно. Типичная  
35 доза может находиться, например, в диапазоне 0,001-1000 мкг; однако, предвидятся дозы, находящиеся ниже или выше этого иллюстративного диапазона, особенно учитывая вышеуказанные факторы. Режим дозирования ежедневного парентерального введения может составлять от 0,1 мкг/кг до 100 мг/кг от общей массы тела, предпочтительно от 0,3 мкг/кг до 10 мг/кг и более предпочтительно от 1 мкг/кг до 1  
40 мг/кг, даже более предпочтительно от 0,5 до 10 мг/кг массы тела в день.

Процесс лечения можно контролировать путем периодической оценки состояния пациента. Для повторного введения в течение нескольких дней или дольше в зависимости от состояния пациента лечение повторяют до достижения желаемого ответа или  
подавления симптомов болезни. Однако также могут применяться другие режимы  
45 дозирования, которые не описаны в данной заявке. Желаемая дозировка может быть введена путем однократного введения, множественных болюсных введений или путем непрерывного инфузионного введения антитела в зависимости от образца фармакокинетического распада, которого хочет достигнуть практикующий специалист.

Эти предположительные количества антитела в сильной степени зависят от решения терапевта. Ключевым фактором выбора соответствующей дозы и режима является желаемый результат. Факторы, рассматриваемые в данном контексте, включают конкретное заболевание, которое лечат, конкретное млекопитающее, которое лечат, клиническое состояние отдельного пациента, причину расстройства, место введения антитела, конкретный вид антитела, способ введения, режим введения и остальные факторы, известные практикующим специалистам-медикам.

Терапевтические агенты по изобретению могут быть заморожены либо лиофилизированы и восстановлены перед применением в подходящем стерильном носителе. Лиофилизирование и восстановление могут приводить к различным степеням потери активности антитела. Дозировки могут быть скорректированы для компенсации этой потери. В общем случае, преимущественными являются значения рН фармацевтической композиции от 6 до 8.

#### Изделие (продукты) и наборы

Следующим вариантом осуществления изобретения является изделие, которое содержит продукты, применяемые для лечения аутоиммунных заболеваний и родственных состояний и злокачественных заболеваний крови, в патогенез которых вовлечены ТКР, несущие бета-цепь семейства TRBV9. К таким заболеваниям относятся, например, АС, целиакия, Т-клеточный лейкоз, Т-клеточная лимфома и другие.

Изделие представляет собой контейнер с этикеткой и листовкой-вкладышем, которые могут быть размещены в блистере и/или пачке. Приемлемыми контейнерами являются, например, флаконы, ампулы, шприцы и т.д. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или полимерные материалы. Контейнер содержит композицию, эффективную для лечения определенного состояния, и может иметь стерильный входной канал). По меньшей мере одно действующее вещество в композиции представляет собой антитело, предлагаемое в изобретении. На этикетке и листовке-вкладыше в упаковке указано, что лекарственное средство применяют для лечения конкретного состояния. Этикетка и/или листовка-вкладыш в упаковке дополнительно должны содержать инструкции по введению композиции антитела пациенту, в том числе информацию о показаниях, применении, дозе, пути введения, противопоказаниях и/или мерах предосторожности, касающихся применения таких терапевтических продуктов. В одном из вариантов осуществления изобретения на листовке-вкладыше в упаковке указано, что композицию применяют для лечения указать чего.

Кроме того, изделие может включать другие продукты, необходимые с коммерческой точки зрения и с точки зрения потребителя, например, растворители, разбавители, фильтры, иглы и шприцы, но не ограничиваясь ими.

Изобретение относится также к наборам, которые можно применять для различных целей, например, для оценки способности уничтожать Т-клетки, несущие ТКР семейства TRBV9, для очистки или иммунопреципитации рецептора TRBV9 из клеток. Для выделения и очистки набор может содержать антитело связанное с гранулами (например, сефарозными гранулами). Набор содержит контейнер и этикетку и листовку-вкладыш в упаковке.

#### Диагностическое использование

Антитела по настоящему изобретению также используются в диагностических целях (например, *in vitro*, *ex vivo*). Например, антитело может использоваться для обнаружения или измерения уровня Т-лимфоцитов, содержащих ТКР семейства TRBV9 в образцах, полученных от пациента, например, образец ткани или образец жидкости тела, такой

как воспалительный экссудат, кровь, жидкость кишечника, слюна или моча. Подходящие методы обнаружения и измерения включают иммунологические методы, такие как проточная цитометрия, твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), хемиллюминесцентный анализ, радиоиммуноанализ и иммуногистология. Изобретение  
5 далее включает наборы, например, диагностические наборы, содержащие антитела, описанные в данном документе.

Для наилучшего понимания изобретения приводятся следующие примеры. Эти примеры приведены только в иллюстративных целях и не должны толковаться как ограничивающие сферу применения изобретения в любой форме.

10 Все публикации, патенты и патентные заявки, указанные в этой спецификации включены в данный документ путем отсылки. Хотя вышеупомянутое изобретение было довольно подробно описано путем иллюстрации и примера в целях исключения двусмысленного толкования, специалистам в данной области на основе идей, раскрытых в данном изобретении, будет вполне понятно, что могут быть внесены определенные  
15 изменения и модификации без отклонения от сущности и объема прилагаемых вариантов осуществления изобретения.

Экспериментальная часть

Пример 1. In silico гуманизация последовательностей переменных доменов антитела

В качестве родительских (опорных) использовались последовательности  
20 переменных доменов тяжелой и легкой цепи антитела анти-TRBV9-2, аминокислотные последовательности которого показаны в SEQ ID Nos: 8 и 10.

Аминокислотные последовательности переменных доменов тяжелой и легкой цепей сравнивали с пулом гермлайн-последовательностей переменных доменов иммуноглобулинов человека, гермлайн-последовательностей переменных доменов  
25 иммуноглобулинов крысы, последовательностей зрелых антител человека и крысы, полученных как из открытых источников, так и из донорской библиотеки, предоставленной компанией Биокад (Россия). Для анализа использовался пакет программного обеспечения Ylab (Биокад, Россия). В ходе анализа в последовательностях переменных доменов анализируемых антител были установлены позиции и их  
30 сочетания, наиболее характерные для животных и не характерные для человека. В то же время были установлены сочетания аминокислот, наиболее часто представленные в антителах человека в данных позициях. На основании полученных данных был осуществлен дизайн искусственных последовательностей переменных доменов, содержащих замены, повышающие степень гуманизации антитела. Также была  
35 проведена кодон-оптимизация нуклеотидных последовательностей, кодирующих предложенные аминокислотные варианты, для осуществления экспрессии гуманизованного антитела в клеточной линии CHO.

Гуманизированные нуклеотидные последовательности HCVR и LCVR (SEQ ID Nos: 15 и 17) были синтезированы de novo и клонированы в вектора pEE-NC, pEE-CK, формат  
40 IgG1 (Xu et al. Front. Chem. Sci. Eng. 2015, 9(3): 376-380) по сайтам рестрикции Sall/NheI и Sall/BsiWI, соответственно. Последовательности нуклеиновых полученных легкой и тяжелой цепи проверяли путем секвенирования по методу Сенгера.

Для дальнейшей работы было отобрано антитело MA-043, аминокислотные и нуклеотидные последовательности легкой и тяжелой цепей которого показаны в SEQ  
45 ID Nos: 19-22. Антитело MA-043, включает переменные домены тяжелой и легкой цепей, которые имеют аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 16 и 18.

Степень гуманизации переменного домена тяжелой цепи антитела MA-043 составила

84%, а степень гуманизации вариабельного домена легкой цепи - 85% (Таблица 1). Константный домен тяжелой цепи представлен форматом IgG1 аллотип Gm3.

**Таблица 1. Сравнение степени гуманизации вариабельных доменов родительского антитела и антитела МА-043**

Антитело	Степень гуманизации HCVR , %	Степень гуманизации LCVR, %
TRBV9-2	72	69
МА-043	84	85

Пример 2. Получение рекомбинантного антитела и определение его аффинности

Векторы, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие легкую и тяжелую цепи антитела МА-043, полученные как описано в Примере 1 нарабатывали в клетках E.coli и очищали при помощи набора реактивов для очистки плазмидной ДНК производства фирмы Qiagen (Германия) и использовали для трансфекции клеточной линии CHO-Fut8 с помощью линейного полиэтиленimina (ПЭИ «МАХ», «Polysciences», США) согласно инструкции производителя. Полученные реакционные смеси инкубировали при 37°C на качалке. Через 9 дней после трансфекции культуральную жидкость отделяли от клеток фильтрацией через фильтр с размером пор 0,5/0,22 мкм. Культуральную жидкость после фильтрации использовали для выделения антител с помощью аффинной хроматографии на колонках PreDictor RoboColumn MabSelect SuRe объемом 0,2 мл (GE Healthcare, США), уравновешенную фосфатно-солевым буфером (ФСБ, pH 7,4). Затем колонку промывали 5 объемами ФСБ. Связанный с носителем белок элюировали, используя 0,1 М глициновый буфер pH 3. Собирали основной пик, содержащий белок и доводили pH до нейтрального с помощью 1 М буфера Tris (pH 7,5). Все стадии проводили при скорости потока 110 см/ч. Далее белок переводили в ФСБ (pH 7,4) с помощью диализа, фильтровали через фильтр диаметром 0,22 мкм, переносили в новые стерильные пробирки. Качество выделения оценивали с помощью 12% ПААГ-электрофореза в денатурирующих условиях.

Количественную оценку проводили с помощью измерения на микроспектрофотометре NanoDrop2000 при 280А. Выделенный белок хранили при -70°C. Определение аффинности антитела проводили на приборе OctetRed 96 (ForteBio, США). Антиген в концентрации 20 мкг/мл иммобилизовали на поверхность AR2G сенсоров (ForteBio) по стандартному протоколу согласно инструкции производителя. Анализ проводили при 30°C с использованием ФСБ, содержащим 0,1% Твин-20 и 0,1% БСА в качестве рабочего буфера. После того как в буферном растворе прописывали базовую линию сенсоры погружали в лунки с раствором антител на 300 сек, где происходила ассоциация комплекса. Затем детектировали диссоциацию комплекса в буферном растворе в течение 600 секунд. Кривые связывания с вычетом референсного сигнала анализировали с помощью программы Octet Data Analysis (версия 9.0) согласно стандартной процедуре с использованием модели взаимодействия 1:1 Global.

Полученные данные (Таблица 2) показали, что антитело специфически и с высокой аффинностью связывается с антигеном человека.

**Таблица 2. Характеристика аффинности антитела MA-043**

Антитело	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	Full R <sup>2</sup>
MA-043	<1.0E-12	3,29E+05	<1.0E-07	0,955

Пример 3. Получение клеточной линии, стабильно продуцирующей антитело в формате IgG1, и наработка антитела.

Последовательности тяжелой и легкой цепей антитела MA-043 были получены, как описано в Примере 1, и клонированы в векторы pSX по сайтам рестрикции HindIII, XbaI. Полученные плазмиды нарабатывали в клетках E. coli и выделяли с помощью прибора BenchPro 2000 (Life Technology, США) согласно инструкции производителя в количестве 600-700 мкг. Плазмиды линеаризовали в течение ночи с помощью эндонуклеазы PvuI, затем осаждали этанолом, осадок растворяли в воде, концентрация в конечном объеме составляла 900-1100 нг/мкл. Клеточную линию CHO-K1-S культивировали в среде Ham's F12 Gibco (Thermo, США).

Трансфекцию генетическими конструкциями, содержащими кодирующие последовательности цепей MA-043 проводили с помощью электропорации на приборе Nucleofector™ (Lonza, Швейцария) согласно протоколу производителя. На следующий день после трансфекции в течение 24 дней проводили антибиотическую селекцию трансфицированных клеток, добавляя в среду пуромицин (конечная концентрация 7,2 мкг/мл) и гигромицин Б (конечная концентрация 640 мкг/мл). Далее были отобраны гомогенные по структуре устойчивые к антибиотикам клеточные клоны, экспрессирующие на высоком уровне MA-043.

Для культивирования CHO-K1-S, экспрессирующие MA-043 использовали бессывороточную среду Ham's F12 Gibco (Thermo, США) с добавлением 25-100 мкМ 2-дезоксидезокси-2-фтор-L-фукозы (CarboSynth, Великобритания).

Наработку моноклонального антитела MA-043 для доклинических исследований проводили в ферментере NuClone single-use bioreactor (Thermo Fisher Scientific) рабочим объемом 50 л. Удаление клеток продуцентов из культуральной жидкости проводили с помощью глубинного фильтра Millistak C0HC (Merck-Millipore, США). Первичную очистку антитела из осветленной культуральной жидкости проводили на аффинном сорбенте с белком А. Специфическую элюцию целевого белка проводили в кислых условиях pH 3.3-3.8 в глициновом буфере. Полученный элюат выдерживали в кислом pH в течение 30-60 минут для вирусной инактивации, а затем нейтрализовали 1М раствором Tris-HCl до значения pH 6.5-7.0. Для удаления возможных примесей (ДНК, белков клеток продуцента, отщепленного лиганда аффинного сорбента, агрегатов и фрагментов антител) финальную хроматографическую очистку в режиме проскока проводили на сорбенте CaptoAdhere (GE HealthCare LifeSciences, США) Для этого раствор белка пропускали через подготовленный сорбент, уравновешенный трис-буфером с pH 6,5-7,0 при низком значении кондуктивности (<3 мС/см<sup>2</sup>).

Очищенный белок подвергали противовирусной фильтрации с использованием набора фильтров Viresolve PRO (Millipore, США), концентрированию и диафильтрации против конечного буфера, содержащего ацетатный буфер (pH 5,0-5,5) и трегалозу.

Пример 4. Применение антитела для специфического связывания с фрагментом бета-цепи Т-клеточного рецептора семейства рецепторов TRBV9

Моноклональные антитела MA-043, полученные как описано в Примере 3,

использовали для сортировки субпопуляций лимфоцитов.

Антитела метили флуоресцином с помощью реагента флуоресцин изотиоцианат (Sigma, США) по протоколу производителя. Контроль количества флуорофоров, вступивших в реакцию с молекулами антитела, осуществляли по соотношению спектра поглощения при длинах волн 495/280 нм. Т-лимфоциты получали из периферической крови здорового донора. Кровь собирали в пробирки Vacuette с EDTA (по 2×9 мл), мононуклеарную фракцию согласно стандартной методике, описанной в (Ковальчук Л. В. и др. Иммунология: практикум - 2010. - 176 с). После выделения клетки переносили в фосфатно-солевой буфер (PBS), содержащий 0.5% бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 2 мМ ЭДТА. Суммарное количество клеток и их жизнеспособность определяли по методу окрашивания с трипановым синим как описано Лангом Н.Р. (Стимуляция лимфоцитов М.: Медицина, 1976. - 288 с). К клеточной суспензии добавляли равный объем 0,1% раствора трипанового синего, далее проводили подсчет окрашенных (мертвых) и неокрашенных синих клеток в камере Горяева. На основании этих данных делался вывод о проценте мертвых клеток в исследуемом образце.

Для подтверждения селективности связывания МА-043 с целевой популяцией Т-лимфоцитов, несущих на своей мембране ТКР, относящийся к семейству TRBV9, аликвоты клеток по 500 тыс из мононуклеарной фракции, добавляли к буферу PBS, содержащему 0.5% бычьего сывороточного альбумина (БСА), 2 мМ ЭДТА pH8, антитела МА-043, меченые FITC, CD3-eFluor405 (маркер Т-лимфоцитов) (eBioscience, США) и CD45-PC5 (eBioscience, США) (общий лейкоцитарный маркер) в концентрации 100 нг/мл. Реакционные смеси объемом 50 мкл инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин, после этого клетки промывали буфером PBS с 0.5% БСА 2 мМ ЭДТА. Клетки после процедуры окрашивания использовали для сортировки с помощью проточной цитометрии (FACSARIA III, США). Использование этих маркеров при покраске позволило изолировать клетки целевой популяции, которые несли на своей поверхности TRBV9+, CD3+, CD45+, а также получить клетки из негативной популяции, то есть соответствующие иммунофенотипу «TRBV9-, CD3+, CD45+».

Полученные в двух повторностях клетки из популяций «TRBV9+» и «TRBV9-» использовали для выделения суммарной РНК и секвенирования последовательностей бета цепей ТКР. Полученные фракции клеток помещали в RLT-буфер (Quagen, Германия) и выделяли из них РНК с помощью набора реактивов Quiagen RNAeasy mini kit #217004 (Quagen) согласно протоколу производителя. На матрице выделенной РНК синтезировали кДНК и амплифицировали фрагменты бета цепи Т-рецептора по протоколу, описанному Britanova et al (J Immunol, 2016, 196 (12) 5005-5013) с использованием набора реактивов Mint cDNA synthesis kit (Евроген, Россия). К наработанным ампликонам лигировали адаптеры Illumina (США) и секвенировали на платформе MiSeq Illumina согласно протоколу производителя секвенатора. Данные секвенирования анализировали с помощью программ MiGEC, MiXCR и VDJtools, представленных на сайте в сети Интернет: <https://milaboratory.com>. Анализ полученных репертуаров бета цепей ТКР показал, что библиотеки, полученные в результате сортировки с помощью антитела МА-043, были обогащены на 91% последовательностями, которые кодировались генным сегментом TRBV9. Тогда как в репертуарах бета цепей негативной фракции «TRBV9-» последовательностей, содержащих TRBV9, обнаружено не было.

Пример 5. Функциональная активность антитела МА-043

Моноклональное антитело МА-043 получали как описано в Примере 3. Мононуклеарную фракцию крови человека получали как описано в Примере 4.

Дополнительно из части моноклеарной фракции осуществляли выделение естественных киллеров с помощью набора реагентов для выделения НК клеток человека # 130-092-657 (Miltenyi biotec, США). Использовали протокол производителей. Качество выделения НК клеток оценивали с помощью цитофлуометрии (BD FACS ARIA III, США) с использованием меченных антител CD 16- FITC, CD56-PE, CD3-VioBlue. Обогащение НК клетками составляло 85-95%.

Для оценки цитотоксичности к аликвоте моноклеарной фракции, содержащей  $1 \times 10^6$  клеток добавляли антитела МА-043 до конечной концентрации 500 нг/мл. В качестве негативного контроля использовали антитела ремикэйд в такой же концентрации, как и МА-043. К контрольной аликвоте клеток (положительный контроль) антитела не добавляли. Также во все реакционные смеси добавляли по  $10^5$  НК клеток. Конечный объем реакции составлял 100 мкл. Реакционные смеси инкубировали при комнатной температуре один час, далее клетки отмывали несколько раз от антител и разносили по лункам 96-луночного круглого донного планшета, на столе.

Через 6 дней клетки собирали из лунок и использовали для иммунофенотипического анализа с помощью проточной цитометрии. Для детекции Т лимфоцитов были использованы следующие антитела: anti-CD3-eFluor450 (клон ОКТ3, eBioscience); anti-CD8-PC7 (клон SFC121Thy2D3, Beckman Coulter, США); МА-043, меченые Fitc. После окрашивания клетки отмывали и анализировали на приборе BD FACSAria III. Т-лимфоциты CD3+ МА-043+ в образцах, подвергшихся инкубации с МА-043 антителами настоящего изобретения, не обнаруживаются.

В то же время в контрольном образце без добавления антитела ("ноль-контроль"), а также с добавлением терапевтических антител ремикэйд детекция двойных позитивных Т-лимфоцитов по маркерам CD3+ МА-043+ сохраняется, что подтверждает специфическую элиминацию Т-клеток TRBV9+ при добавлении антител против TRBV9.

В дополнительном негативном контроле, где вместо МА-043 антител настоящего изобретения использовались нецитотоксические антитела против CD6, целевая популяция CD3+CD6+ не менялась по сравнению с "ноль-контролем". Это указывает, что экранирование эпитопа не мечеными антителами на 6 день не происходит и подтверждает способность МА-043 антител элиминировать клетки, несущие ТКР семейства TRBV9.

Пример 6. Получение фармацевтической композиции, содержащей антитело согласно изобретению

Фармацевтическую композицию получали стандартными методами, которые известны из уровня техники.

Компоненты фармацевтической композиции показаны в Таблице 3.

**Таблица 3. Концентрации компонентов фармацевтической композиции**

Компонент	Концентрация
Антитело МА-043	10-50 мг/мл
Буфер цитратный 10 мМ до рН	6,0-7,0
Хлорид натрия	50-150 мМ
Сахароза, трегалоза	0,3-0,5%
Вода для инъекций	до 1 мл.

Пример 7. Набор, содержащий фармацевтическую композицию с антителами  
 Для выпуска наборов с лекарственной формой, содержащей композицию с антителом МА-043, фармацевтическую композицию, полученную согласно примеру 6 запаивают в ампулы или шприцы объемом 1 мл в стерильных условиях, маркируют и упаковывают в контейнеры из пластикового или картонного материала.

Также в контейнер с ампулой вкладывают инструкцию по применению.

(57) Формула изобретения

1. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с участком бета цепи семейства TRBV-9 Т-клеточного рецептора человека, включающее переменный домен тяжелой цепи, аминокислотная последовательность которого показана в SEQ ID No: 16, и переменный домен легкой цепи, аминокислотная последовательность которого показана в SEQ ID No: 18.

2. Моноклональное антитело по п. 1, которое включает тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID No: 20, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID No: 22.

3. Моноклональное антитело по любому из пп. 1, 2, которое представляет собой полноразмерное антитело IgG.

4. Нуклеиновая кислота, которая кодирует тяжелую цепь антитела или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-3, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с участком бета цепи семейства TRBV9 Т-рецептора человека.

5. Нуклеиновая кислота, которая кодирует легкую цепь антитела или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-3, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с участком бета цепи семейства TRBV9 Т-рецептора человека.

6. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 4.

7. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 5.

8. Способ получения клетки-хозяина для получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-3, включающий трансформирование клетки вектором по п. 6 и вектором по п. 7.

9. Клетка-хозяин для получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-3, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 4 и нуклеиновую кислоту по п. 5.

10. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому

из пп. 1-3, заключающийся в культивировании клетки-хозяина по п. 9 в культуральной среде в условиях, обеспечивающих продукцию указанного антитела, с последующим выделением и очисткой полученного антитела.

5 11. Фармацевтическая композиция для профилактики или лечения заболевания или нарушения, опосредуемого участком бета цепи семейства TRBV9 Т-клеточного рецептора человека, содержащая в терапевтически эффективном количестве антитело по любому из пп. 1-3, в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

10 12. Фармацевтическая композиция по п. 11, где указанные заболевание или нарушение выбирают из группы: анкилозирующий спондилит, целиакия, Т-клеточный лейкоз, Т-клеточная лимфома.

13. Фармацевтическая композиция для профилактики или лечения заболевания или нарушения, опосредуемого Т-клеточным рецептором человека, несущим бета цепь семейства TRBV9, содержащая в терапевтически эффективном количестве антитело по 15 любому из пп. 1-3 и, по меньшей мере, в терапевтически эффективном количестве другое терапевтически активное соединение.

14. Фармацевтическая композиция по п. 13, где указанные заболевание или нарушение выбирают из группы: анкилозирующий спондилит, целиакия, Т-клеточный лейкоз, Т-клеточная лимфома.

20 15. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 13, 14, где другое терапевтически активное соединение выбирают из малой молекулы, антитела или стероидных гормонов.

25 16. Способ ингибирования биологической активности Т-клеточного рецептора, бета цепь которого относится к семейству TRBV9, у субъекта, нуждающегося в таком ингибировании, включающий введение субъекту эффективного количества антитела по любому из пп. 1-3.

30 17. Способ лечения заболевания или нарушения, опосредованного Т-клеточным рецептором человека, несущим бета цепь семейства TRBV9, включающий введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, антитела по любому из пп. 1-3 или фармацевтической композиции по любому из пп. 11-15 в терапевтически эффективном количестве.

18. Способ лечения заболевания или нарушения по п. 17, где заболевание или нарушение выбрано из группы: анкилозирующий спондилит, целиакия, Т-клеточный лейкоз, Т-клеточная лимфома.

35 19. Применение антитела по любому из пп. 1-3 или фармацевтической композиции по любому из пп. 11-15 для лечения у субъекта, нуждающегося в таком лечении, заболевания или нарушения, опосредуемого Т-клеточным рецептором человека, несущим бета цепь семейства TRBV9.

40 20. Применение антитела по п. 19, где заболевание выбрано из группы: анкилозирующий спондилит, целиакия, Т-клеточный лейкоз, Т-клеточная лимфома.

## ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ФНИМУ им. Н.И. Пирогова / Pirogov Russian National Research  
 Medical University  
 ФНИМУ им. Н.И. Пирогова / Pirogov Russian National Research  
 Medical University

<120> Гуманизированные антитела против участка бета цепи 9-го семейства  
 TRBV9 ТКР человека, и способы их применения

<130> MA043.docx

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Последовательность HCDR1 родительского антитела TRBV9-2

<400> 1

Asp Tyr Leu Val His  
 1 5

<210> 2  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Последовательность HCDR2 родительского антитела TRBV9-2

<400> 2

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Thr Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Glu  
 1 5 10 15

Gly

<210> 3  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Последовательность HCDR3 родительского антитела TRBV9-2

<400> 3

Ser Trp Arg Arg Gly Leu Arg Gly Ile Gly Phe Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 4  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Последовательность LCDR1 родительского антитела TRBV9-2

<400> 4

Lys Ala Ser Lys Ser Ile Asn Lys Tyr Leu Ala  
 1 5 10

<210> 5  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Последовательность LCDR2 родительского антитела TRBV9-2

<400> 5

Asp Gly Ser Thr Leu Gln Ser  
 1 5

<210> 6  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Последовательность LCDR3 родительского антитела TRBV9-2

<400> 6

Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Pro Thr  
 1 5

<210> 7  
 <211> 366  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Нуклеотидная последовательность переменного домена тяжелой цепи  
 родительского антитела TRBV9-2

<400> 7  
 caaatacaac tgggtcagag cgggccagaa ttgagagaac ccggagaatc tgtgaagctg  
 60

agttgtaagg ccagcggata cactttcact gactatctcg tgcactgggt gaaacaggct  
 120

cccggtaagg gattgaaatg gatgggatgg atcaataactt ataccggcac acctacatat  
 180

gcagacgatt tcgaggggcg atttgtgttc agtttgagg cctctgccag cacggcgaac  
240

ctgcagatat cgaatctcaa gaatgaggac accgccacgt atttctgcgc tagatcttgg  
300

agacgcggat tgagaggtat cggattcgac tactggggac aaggcgtctt cgtgactgta  
360

tcatcc  
366

<210> 8  
<211> 122  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность  
  
<220>  
<223> Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи родительского антитела TRBV9-2

<400> 8

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

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

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

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

Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Glu Ala Ser Ala Ser Thr Ala Asn  
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys  
85 90 95

Ala Arg Ser Trp Arg Arg Gly Leu Arg Gly Ile Gly Phe Asp Tyr Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Val Phe Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 9  
<211> 321  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Нуклеотидная последовательность переменного домена легкой цепи  
 родительского антитела TRBV9-2

<400> 9  
 gatgtacaga tgacacaatc accctacaac cttgctgctt cccctgggga aagtgtcagt  
 60

atcaattgca aggcatacga gtcgatcaac aagtatcttg cgtgggatca gcagaagcca  
 120

ggaaagccca acaagctcct gatctatgac ggctctacac tgcaatctgg cataccttcg  
 180

cggttttctg gctcggggtc cgggactgac ttcactctta caatacgagg acttgaacc  
 240

gaagacttcg gcctgtatta ctgccagcag cacaaatgagt atccacctac cttcggggct  
 300

ggcaccaagt tggagcttaa g  
 321

<210> 10  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Аминокислотная последовательность переменного домена легкой  
 цепи родительского антитела TRBV9-2

<400> 10

Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Tyr Asn Leu Ala Ala Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Asn Cys Lys Ala Ser Lys Ser Ile Asn Lys Tyr  
 20 25 30

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

Tyr Asp Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Gly Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Pro  
 85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100

105

<210> 11  
 <211> 639  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Нуклеотидная последовательность легкой цепи родительского антитела TRBV9-2

<400> 11  
 gacgtgcaga tgacccagtc cccctacaac ctggccgcct cccccggcga gtccgtgtcc  
 60  
 atcaactgca aggcctccaa gtccatcaac aagtacctgg cctggtacca gcagaagccc  
 120  
 ggcaagccca acaagctgct gatctacgac ggctccacc tgcaagtccg catcccctcc  
 180  
 aggttctccg gctccggctc cggcaccgac ttcaccctga ccatcagggg cctggagccc  
 240  
 gaggacttcg gcctgtacta ctgccagcag cacaacgagt accccccac cttcggcgcc  
 300  
 ggcaccaagc tggagctgaa gogaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcc  
 360  
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgtcgtgt gcctgctgaa taacttctat  
 420  
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgcc tccaatcggg taactcccag  
 480  
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg  
 540  
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gogaagtcac ccatcagggc  
 600  
 ctgtcctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagag  
 639

<210> 12  
 <211> 213  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Аминокислотная последовательность легкой цепи родительского антитела TRBV9-2

<400> 12

Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Tyr Asn Leu Ala Ala Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

RU 2712251 C1

Glu Ser Val Ser Ile Asn Cys Lys Ala Ser Lys Ser Ile Asn Lys Tyr  
 20 25 30

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

Tyr Asp Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Gly Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Pro  
 85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu  
 210

<210> 13

<211> 1365

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи родительского антитела TRBV9-2

<400> 13  
cagatccagc tgggtgcagtc cggccccgag ctgagggagc cgggcgagtc cgtgaagctg  
60  
tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc gactacctgg tgcaactgggt gaagcaggcc  
120  
cccggaagg gcctgaagtg gatgggctgg atcaacaact acaccggcac cccacacctac  
180  
gccgacgact tcgagggcag gttcgtgttc tcctggagg cctccgctc caccgccaac  
240  
ctgcagatct ccaacctgaa gaacgaggac accgccacct acttctggcg caggtcctgg  
300  
aggaggggcc tgaggggcat cggcttcgac tactggggcc agggcgtggt cgtgaccctg  
360  
tcctccgct ccaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctctc caagagcacc  
420  
tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg  
480  
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttccccgc tgtcctacag  
540  
tcctcaggac totactocct cagcagcgtg gtgactgtgc cctctagcag cttgggcacc  
600  
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagt  
660  
gagccccga aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgccccagc acctgaactc  
720  
ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaaocca aggacaccct catgatctcc  
780  
cggaccacctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacct tgaggtcaag  
840  
ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggt cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag  
900  
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg  
960  
aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa  
1020  
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacct gccccatcc  
1080  
cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaagg cttctatccc  
1140  
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccg agaacaacta caagaccacg  
1200

RU 2712251 C1

cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag  
1260

agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac  
1320

cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat gataa  
1365

<210> 14

<211> 453

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Аминокислотная последовательность тяжелой цепи родительского антитела TRBV9-2

<400> 14

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

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

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

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

Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Glu Ala Ser Ala Ser Thr Ala Asn  
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys  
85 90 95

Ala Arg Ser Trp Arg Arg Gly Leu Arg Gly Ile Gly Phe Asp Tyr Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Val Phe Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr  
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
145 150 155 160

RU 2712251 C1

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
 165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
 180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn  
 195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Pro Lys  
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln  
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys  
 450

<210> 15  
 <211> 366  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Нуклеотидная последовательность варибельного тяжелой цепи антитела МА-043

<400> 15  
 caggtgcaac ttgttcagtc ggggcctgaa cttagaagc caggggaaag tgtaaaagtg  
 60

agctgcaaag cctcaggcta cacgtttacc gattatcttg tgcattgggt tagacaggct  
 120

ccaggtaagg gactggaatg gatgggatgg atcaatacct atacagggac accacatat  
 180

gccgatgact ttgagggacg gtttgtcttc tcacttgata ccagtgcgtc cactgctaac  
 240

ctccagatat gcagcctgaa gaatgaggac accgccacct attactgogc ccgatcatgg  
 300

aggagaggcc tacgaggaat cggattcgat tactggggtc agggcacttt agtcactgtc  
 360

tctagc  
 366

<210> 16  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи родительского антитела МА-043

<400> 16

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

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

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

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

Leu Gln Ile Cys Ser Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Ser Trp Arg Arg Gly Leu Arg Gly Ile Gly Phe Asp Tyr Trp  
 100 105 110

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

<210> 17  
 <211> 321  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Нуклеотидная последовательность переменного легкого цепи  
 антитела МА-043

<400> 17  
 gacatacaga tgactcaaag cccttattcg ctcaagtgcgt cggtcgggga cagagtaacc  
 60

atcacctgca aggcgtcaaa gtcaatcaat aagtatctgg cgtggttcca gcagaagcca  
 120

ggaaagccta acaagctatt aatatacagat gggctctacc tccaatccgg ggtcccttca  
 180

cgatcttctg gaagcggctc aggaaccgat ttcacgctga ccatcagtag cttggagcct  
 240

gaggactttg coacttatta ttgccagcag cacaacgagt atcctcccac cttcggacag  
 300

ggtacaaaac tggagatcaa g  
 321

<210> 18  
 <211> 107

<212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Аминокислотная последовательность вариабельного легкой цепи антитела МА-043

<400> 18

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

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

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Asn Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Pro  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 19  
 <211> 1356  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи антитела МА-043

<400> 19

caggtgcaac ttgttcagtc ggggcctgaa cttaagaagc caggggaaag tgtaaaagtg  
 60

agctgcaaag cctcaggcta cacgtttacc gattatcttg tgcattgggt tagacaggct  
 120

ccaggtgaagg gactggaatg gatgggatgg atcaatacct atacagggac accacatat  
 180

gccgatgact ttgagggacg gtttgtcttc tcacttgata ccagtgcgtc cactgctaac  
 240

ctccagatat gcagcctgaa gaatgaggac accgccacct attactgcmc cggatcatgg  
 300

aggagagggc tacgaggaat cggattcgat tactggggtc agggcacttt agtcaactgtc  
360

tctagcgcta gcaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc  
420

tctgggggca cagcggcctt gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg  
480

gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttccccgc tgtcctacag  
540

tcctcaggac tctactcctt cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc  
600

cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaa cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt  
660

gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgccccacct gccccagcacc tgaactcctg  
720

gggggaccgt cagtcttctt cttcccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccg  
780

accctgagg tcacatgctt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc  
840

aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag  
900

tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggtgaa  
960

ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc  
1020

atctccaag ccaaaaggca gccccagaaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg  
1080

gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc  
1140

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactaaa gaccacgct  
1200

cccgtgctgg actccgacgg ctctctcttc ctctatagca agctcaccgt ggacaagagc  
1260

aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggtctt gcacaaccac  
1320

tacaagcaga aaagcctctc cctgtccccg ggtaaa  
1356

<210> 20  
 <211> 452  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>

RU 2712251 C1

<223> Аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела MA-043

<400> 20

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Ile Cys Ser Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Ser Trp Arg Arg Gly Leu Arg Gly Ile Gly Phe Asp Tyr Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr  
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn  
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser  
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu



<212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Нуклеотидная последовательность легкой цепи антитела МА-043

<400> 21  
 gacatacaga tgactcaaaг cccttattcg ctсagтgсgt сggтсgggga сagagтаacc  
 60  
 atсacctgca aggcgtcaaa gtcaatcaat aagtatctgg сgtggттсca сcagaagсca  
 120  
 ggaaagсcta аcaagctatt аatataсgat gggтсtaccс тсcaatсcgг ggtссctтca  
 180  
 сgattттctg gaagсggctc aggaaccgat ттсacгctga ссатсagтaг сttggagсct  
 240  
 gaggactттg ссacttatta ttgссagсag сacaacгagт atсctсссac сttсggagag  
 300  
 ggtacaaaac тggagatcaa гсgtacggтg гctгсacсat сtgтсттсat сttсссgсca  
 360  
 тctgatgagc агттgaaatс тggaactгсс тctгттgtgt гсctгctgaa таactтсtat  
 420  
 ссcagagagг сcaaagtaca гtggaaggтg gataacгссс тсcaatсggг таactсссag  
 480  
 gagagтgtca сagagсagga сagcaaggac агсacсtaca гсctсagсag сaccctгagс  
 540  
 сtgagсaaag сagactacga gaaacacaaa gtctacгсct гсgaagтсac ссатсagggс  
 600  
 сtgagсtгсгс ссgtсacaaa gagсттсaac aggggagagт gt  
 642

<210> 22  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Аминокислотная последовательность легкой цепи антитела МА-043

<400> 22

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Tyr Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Lys Ser Ile Asn Lys Tyr  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Asn Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

RU 2712251 C1

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210