



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **126565** (13) **C2**
(51) МПК (2022.01)

C07K 16/24 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 29/00
A61P 35/00
A61P 37/02 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2019 01976**
(22) Дата подання заявки: **18.09.2017**
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **03.11.2022**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **201610831525.9, 201610832677.0**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **19.09.2016, 19.09.2016**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **CN, CN**
(41) Публікація відомостей про заявку: **12.08.2019, Бюл.№ 15**
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: **02.11.2022, Бюл.№ 44**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/CN2017/102057, 18.09.2017**
(72) Винахідник(и): **Ван Чжені (CN),
Фан Лей (CN),
Го Бінши (CN),
Цзан Цзіну (CN)**
(73) Володілець (володільці): **Ай-Маб Байофарма (Ханчжоу) Ко., Лтд.,
6F, #3 Bld., Hexiang Technology Center,
Qiantang New Area, Hangzhou, Zhejiang,
China (CN)**

(74) Представник:
Шпакович Тетяна Іванівна, реєстр. №240
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
WO 2008141391 A1, 27.11.2008
WO 2010124163 A2, 28.10.2010
WO 2008064321 A2, 29.05.2008
WO 201071923 A1, 01.07.2010
Randomized phase 1b trial of MOR103, a human antibody to GM-CSF, in multiple sclerosis / C.S. Constantinescu, A. Asher, W. Fryze, et al. // Neurology: Neuroimmunology & Neuroinflammation. – 2015. - Vol. 2 (4). – P. e117
WO 2015028657 A1, 05.10.2015
WO 2007092939 A2, 16.08.2007
US 8268311 B2, 18.09.2012
WO 2014138862 A1, 18.09.2014
EP 2535353 A1, 19.12.2012
WO 2011153592 A1, 15.12.2011
US 2014065163 A1, 06.03.2014
Lipopolysaccharide-induced lung inflammation is inhibited by neutralization of GM-CSF / R. Puljic, E. Benediktus, Ch. Plater-Zyberk et al. // European Journal of Pharmacology. – 2007. – Vol. 557. – P. 230–235
A human monoclonal IgG1 potently neutralizing the pro-inflammatory cytokine GM-CSF / E.M. Krinner, T. Raum, S. Petsch et al. // Molecular Immunology. – 2007. – Vol. 44. – P. 916–925
First in Patient Study of Anti-GM-CSF Monoclonal Antibody (MOR103) in Active Rheumatoid Arthritis: Results of a Phase 1b/2a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial / F. Behrens, M. Ostergaard, R. Stoilov et al. // Arthritis and rheumatism. – 2012. – Vol. 64 (12). – P. 4171-4172
GM-CSF as a therapeutic target in autoimmune diseases / A. Shiomi, T. Usui, T. Mimori // Inflammation and regeneration. – 2016. - Vol. 36 (8). – P. 1-9
Hamilton J.A. GM-CSF in inflammation and autoimmunity / J.A. Hamilton // Trends in immunology. – 2002. – Vol. 23 (8). – P. 403-408

UA 126565 C2

(54) АНТИТІЛО ДО ГМ-КСФ

(57) Реферат:

Винахід стосується антитіла до ГМ-КСФ або його фрагментів, включаючи гуманізоване антитіло та його фрагменти. Винахід також стосується застосування антитіла та його фрагментів у терапевтичних, діагностичних та прогностичних цілях. Терапевтичні застосування антитіла та фрагментів, наприклад, включають лікування запальних та аутоімунних захворювань та розладів.

Гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор (ГМ-КСФ або GM-CSF), також відомий як колонієстимулюючий фактор 2 (КСФ2), являє собою мономерний глікопротеїн, який секретується макрофагами, Т-клітинами, тучними клітинами, НК-клітинами, ендотеліальними клітинами та фібробластами, що виконують функцію цитокіну. Фармацевтичні аналоги природного ГМ-КСФ також називають сарграмостимом та молграмостимом. На відміну від гранулоцитарного колонієстимулюючого фактору, який сприяє проліферації та дозріванню виключно нейтрофілів, ГМ-КСФ впливає на більшу кількість типів клітин, особливо на макрофаги та еозинофіли.

ГМ-КСФ являє собою мономерний глікопротеїн, що виконує функцію цитокіну. ГМ-КСФ стимулює стовбурові клітини до утворення гранулоцитів (нейтрофілів, еозинофілів та базофілів) та моноцитів. Моноцити виходять із кровообігу та мігрують у тканини, після чого вони дозрівають у макрофаги та дендритні клітини. Таким чином, він є частиною імунного/запального каскаду, за допомогою якого активація невеликої кількості макрофагів може швидко привести до збільшення їх числа, що є вирішальним процесом для боротьби з інфекцією. ГМ-КСФ також виявляє деяку дію на зрілі клітини імунної системи. Вона включає, наприклад, інгібування міграції нейтрофілів та ініціювання зміни експресії рецепторів на поверхні клітин.

ГМ-КСФ передає сигнали через передавач сигналів та активатор транскрипції, STAT5. Було також показано, що у макрофагах він передає сигнали через STAT3. Цитокін активує пригнічення макрофагами виживання грибків. Він викликає недостатність внутрішньоклітинного вільного цинку та збільшує вироблення активних форм кисню, що приводить до нестачі цинку та токсичності для грибка. Таким чином, ГМ-КСФ сприяє розвитку імунної системи та сприяє захисту від інфекцій. ГМ-КСФ також відіграє роль у ембріональному розвитку, виконуючи функцію ембріокіну, вироблюваного репродуктивним трактом.

ГМ-КСФ одержують із використанням технології рекомбінантних ДНК та реалізують як білковий терапевтичний засіб, який називається молграмостимом, або, коли білок експресується у клітинах дріжджів, сарграмостимом. Він використовується як лікарський засіб для стимуляції вироблення лейкоцитів і, таким чином, запобігання нейтропенії після хіміотерапії. Також у клінічних випробуваннях була проведена оцінка потенціалу ГМ-КСФ у якості ад'юванту вакцини у ВІЛ-інфікованих пацієнтів.

Інгібування ГМ-КСФ, навпаки, може бути корисним для лікування захворювань, таких як запальні захворювання та аутоімунні розлади, включаючи ревматоїдний артрит (РА), розсіяний склероз (РС) та бляшковий псоріаз. Інгібування ГМ-КСФ також може бути ефективним для лікування раку.

Даний винахід відноситься до антитіла до ГМ-КСФ, що має високу афінність зв'язування з людськими білками ГМ-КСФ, та що має високу інгібуючу активність відносно зв'язування ГМ-КСФ із його рецептором. Ці антитіла до ГМ-КСФ придатні для терапевтичних цілей, таких як лікування різних типів запальних захворювань, аутоімунних розладів та ракових захворювань, а також можуть бути використані у діагностичних та прогностичних цілях.

У одному з варіантів здійснення даного винаходу запропоноване виділене антитіло або його фрагмент, причому зазначене антитіло або його фрагмент має специфічність до людського білку ГМ-КСФ та містить CDR1 VH з послідовністю SEQ ID NO: 1, CDR2 VH з послідовністю SEQ ID NO: 2, CDR3 VH з послідовністю SEQ ID NO: 3, CDR1 VL з послідовністю SEQ ID NO: 4, CDR2 VL з послідовністю SEQ ID NO: 5 і CDR3 VL з послідовністю SEQ ID NO: 6. У деяких варіантах здійснення антитіло або його фрагмент додатково містить константну область важкого ланцюгу, константну область легкого ланцюгу, область Fc або їх комбінацію. У деяких варіантах здійснення константна область легкого ланцюгу являє собою константну область каппа-ланцюгу або лямбда-ланцюгу. У деяких варіантах здійснення антитіло або його фрагмент має ізотип IgG, IgM, IgA, IgE або IgD. У деяких варіантах здійснення ізотип являє собою IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4. У деяких варіантах здійснення антитіло або його фрагмент являє собою химерне антитіло, гуманізоване антитіло або повністю людське антитіло.

У деяких варіантах здійснення антитіло або його фрагмент являє собою гуманізоване антитіло. У деяких варіантах здійснення антитіло або його фрагмент містить варіабельну область важкого ланцюгу, що містить один або більше амінокислотних залишків, вибраних із групи, що складається з: (a) Glu у положенні 1, (b) Arg у положенні 98, (c) Ser у положенні 72, (d) Ala у положенні 68, (e) Leu у положенні 70, Ile у положенні 48, (g) Asp у положенні 26 та (h) Leu у положенні 29, згідно із системою нумерації за Kabat, та їх комбінації.

У деяких варіантах здійснення варіабельна область важкого ланцюгу містить фрагмент DYTLT (SEQ ID NO: 42) або GYTFT (SEQ ID NO: 43), що починається з положення 26 згідно із системою нумерації за Kabat.

У деяких варіантах здійснення антитіло або його фрагмент містить варіабельну область легкого ланцюгу, що містить один або більше амінокислотних залишків, вибраних із групи, що складається з: (a) Ala у положенні 46, (b) Asp у положенні 60, (c) Asp у положенні 70, (d) Ser у положенні 43 та (f) Phe у положенні 87, згідно із системою нумерації за Kabat, та їх комбінації.

5 У деяких варіантах здійснення антитіло або його фрагмент містить варіабельну область важкого ланцюгу, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO: 8-17, або пептид, послідовність якого щонайменше на 90 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній із групи, що складається з SEQ ID NO: 8-17. У деяких
10 варіантах здійснення варіабельна область важкого ланцюгу містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11, 14 або 17.

У деяких варіантах здійснення антитіло або його фрагмент містить варіабельну область легкого ланцюгу, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із групи, що складається з SEQ ID NO: 19-22, або пептид, послідовність якого щонайменше на 90 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній із групи, що складається з SEQ ID NO: 19-22. У деяких
15 варіантах здійснення варіабельна область легкого ланцюгу містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 19 або 22.

У деяких варіантах здійснення варіабельна область важкого ланцюгу містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 14, та варіабельна область легкого ланцюгу містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 22. У деяких варіантах здійснення антитіло або його фрагмент являє
20 собою біспецифічне антитіло або одноланцюговий варіабельний фрагмент.

У одному з варіантів здійснення даного винаходу запропоноване виділене антитіло або його фрагмент, причому зазначене антитіло або його фрагмент має специфічність до людського білку ГМ-КСФ та містить CDR1 VH з послідовністю SEQ ID NO: 23, CDR2 VH з послідовністю SEQ ID NO: 24, CDR3 VH з послідовністю SEQ ID NO: 25, CDR1 VL з послідовністю SEQ ID NO:
25 26, CDR2 VL з послідовністю SEQ ID NO: 27 та CDR3 VL з послідовністю SEQ ID NO: 28. У деяких варіантах здійснення антитіло або його фрагмент додатково містить константну область важкого ланцюгу, константну область легкого ланцюгу, область Fc або їх комбінацію. У деяких варіантах здійснення константна область легкого ланцюгу являє собою константну область каппа-ланцюгу або лямбда-ланцюгу. У деяких варіантах здійснення антитіло або його фрагмент
30 має ізотип IgG, IgM, IgA, IgE або IgD. У деяких варіантах здійснення ізотип являє собою IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4. У деяких варіантах здійснення антитіло або його фрагмент являє собою химерне антитіло, гуманізоване антитіло або повністю людське антитіло.

У деяких варіантах здійснення антитіло або його фрагмент являє собою гуманізоване антитіло. У деяких варіантах здійснення антитіло або його фрагмент містить варіабельну область важкого ланцюгу, яка містить один або більше амінокислотних залишків, вибраних з групи, яка складається з E1, R84, Y27, I28, I48, T68, L70 або T30, згідно з системою нумерації за Kabat, та їх комбінації.

У деяких варіантах здійснення варіабельна область важкого ланцюгу містить фрагмент GYIFT (SEQ ID NO: 44), GYIFS (SEQ ID NO: 45) або GGTFIS (SEQ ID NO: 46), який починається з
40 положення 26 згідно з системою нумерації за Kabat.

У деяких варіантах здійснення антитіло або його фрагмент містить варіабельну область легкого ланцюгу, яка містить один або більше амінокислотних залишків, вибраних з групи, яка складається з: V48, D57, Q70 або S43, згідно з системою нумерації за Kabat, та їх комбінації.

У деяких варіантах здійснення антитіло або його фрагмент містить варіабельну область важкого ланцюгу, яка містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 29-35, або пептид, послідовність якого щонайменше на 90 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній з групи, яка складається з SEQ ID NO: 29-35. У деяких
45 варіантах здійснення варіабельна область важкого ланцюгу містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 34 або 35.

У деяких варіантах здійснення антитіло або його фрагмент містить варіабельну область легкого ланцюгу, яка містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 36-41, або пептид, послідовність якого щонайменше на 90 % ідентична амінокислотній послідовності, вибраній з групи, яка складається з SEQ ID NO: 36-41. У деяких
50 варіантах здійснення варіабельна область легкого ланцюгу містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 38 або 39.

У деяких варіантах здійснення варіабельна область важкого ланцюгу містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 34, та варіабельна область легкого ланцюгу містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 38. У деяких варіантах здійснення варіабельна область важкого ланцюгу містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 35, та варіабельна область легкого ланцюгу містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 39. У деяких варіантах здійснення
60

антитіло або його фрагмент являє собою біспецифічне антитіло або одноланцюговий варіабельний фрагмент.

У одному з варіантів здійснення запропонована композиція, яка містить антитіло або його фрагмент відповідно до даного винаходу та фармацевтично прийнятний носій. У одному з варіантів здійснення також запропонована виділена клітина, яка містить один або більше полінуклеотидів, які кодують антитіло або його фрагмент відповідно до даного винаходу.

У одному з варіантів здійснення даного винаходу запропонований спосіб лікування запального або аутоімунного захворювання або стану у пацієнта, який цього потребує, що включає введення зазначеному пацієнтові антитіла, або його фрагменту, або композиції у відповідності з даним винаходом. Також запропоновані застосування антитіла, або його фрагменту, або композиції для виготовлення лікарського засобу для лікування запального або аутоімунного захворювання або стану.

У деяких варіантах здійснення запальне захворювання або стан вибрано з групи, яка складається з хвороби Альцгеймера, хвороби Аддісона, атеросклерозу, анкілозуючого спондиліту, артрити, остеоартрити (ОА), ревматоїдного артрити (РА), псоріатичного артрити (ПА), анкілозуючого спондиліту, астми, атеросклерозу, хронічної обструктивної хвороби легень (ХОХЛ), хвороби Крона, коліту, дерматиту, дивертикуліту, фіброміалгії, гепатиту, синдрому подразненого кишечника (СПК), системного червоного вовчаку (СЧВ), нефриту, хвороби Паркінсона (ХП), васкуліту та виразкового коліту.

У одному з варіантів здійснення також запропонований спосіб зменшення або полегшення болю у пацієнта, якому це необхідно, який включає введення зазначеному пацієнту антитіла або його фрагменту відповідно до даного винаходу.

У деяких варіантах здійснення аутоімунне захворювання або стан вибрано з групи, яка складається з осередкової алопеції, аутоімунної гемолітичної анемії, аутоімунного гепатиту, дерматоміозиту, діабету (1 типу), целіакії, аутоімунного ювенільного ідіопатичного артрити, гломерулонефриту, хвороби Грейвса, синдрому Гійєна-Барре, ідіопатичної тромбоцитопенічної пурпури, міастенії гравіс, аутоімунного міокардиту, розсіяного склерозу, пемфігусу/пемфігоїду, перніціозної анемії, вузликового поліартеріїту, поліміозиту, первинного біліарного цирозу, псоріазу, ревматоїдного артрити, склеродермії/системного склерозу, синдрому Шегрена, системного червоного вовчаку, аутоімунного тиреоїдиту, тиреоїдиту Хашимото, аутоімунного увеїту, вітиліго та гранулематозу з поліангіїтом (Вегенера).

Також запропонований спосіб виявлення експресії ГМ-КСФ у зразку, який включає приведення зразку у контакт з антитілом або його фрагментом в умовах, які забезпечують зв'язування антитіла або його фрагменту з ГМ-КСФ, та виявлення зв'язування, що свідчить про експресію ГМ-КСФ у зразку.

На ФІГ. 1 показані результати підтверджуючих аналізів зв'язування ELISA для відбору первинних гібридомних клонів для субклонування.

На ФІГ. 2 показані результати підтверджуючих аналізів зв'язування ELISA для відбору первинних гібридомних клонів для субклонування.

На ФІГ. 3 показане дозозалежне зв'язування тестованих антитіл з людським ГМ-КСФ.

На ФІГ. 4 приведені графічне представлення кінетики зв'язування антитіл з рекомбінантним людським ГМ-КСФ.

На ФІГ. 5 показане дозозалежне інгібування антитілами зв'язування ГМ-КСФ з альфа-субодиницею рецептору ГМ-КСФ.

На ФІГ. 6 показано, що антитіла значно знижували рівень активації pSTAT5, викликані ГМ-КСФ.

На ФІГ. 7 показане інгібування антитілами ГМ-КСФ-залежної проліферації TF-1.

На ФІГ. 8 показано, що всі гуманізовані антитіла продемонстрували високу здатність зв'язування з людським ГМ-КСФ.

На ФІГ. 9 показано, що декілька гуманізованих антитіл демонстрували найсильніше інгібування проліферації TF-1.

На ФІГ. 10 показано, що досліджені антитіла ефективно блокували передачу сигналів pSTAT5.

На ФІГ. 11 показано дозозалежне зв'язування антитіл з ГМ-КСФ макака-резусу.

На ФІГ. 12 приведені графічне представлення фармакокінетичних параметрів Hu23F4-27.

Слід зазначити, що термін у однині повною мірою відноситься до одного або більше виражених таких терміном об'єктів; наприклад, під "антитілом" маєтись на увазі одне або більше антитіл. Відповідно, терміни у однині, терміни "один", "один або більше" та "щонайменше один" у даному документі можуть використовуватися взаємозамінно.

У контексті даного документа мається на увазі, що термін "поліпептид" включає "поліпептид" у однині, а також множину "поліпептидів", та відноситься до молекули, що складається з мономерів (амінокислот), лінійно зв'язаних амідними зв'язками (також відомими як пептидні зв'язки). Термін "поліпептид" відноситься до будь-якого ланцюгу або ланцюгів із двох або більше амінокислот, та не відноситься до певної довжини продукту. Таким чином, пептиди, дипептиди, трипептиди, олігопептиди, "білок", "амінокислотний ланцюг" або будь-який інший термін, використовуваний для позначення ланцюгу або ланцюгів із двох або більше амінокислот, охоплюються визначенням "поліпептид", та термін "поліпептид" може використовуватися замість або взаємозамінно з будь-яким із цих термінів. Також мається на увазі, що термін "поліпептид" відноситься до продуктів постекспресійних модифікацій поліпептиду, у тому числі, не обмежуючись перерахованим, глікозилювання, ацетилювання, фосфорилування, амідування, дериватизації відомими захисними/блокувальними групами, протеолітизу або модифікації амінокислотами неприродного походження. Поліпептид може походити із природнього біологічного джерела або бути отриманий за допомогою рекомбінантної технології, однак він не обов'язково трансльований із заданої послідовності нуклеїнової кислоти. Він може бути отриманий за будь-яким способом, у тому числі шляхом хімічного синтезу.

У контексті даного документа термін "виділений", використовуваний відносно клітин, нуклеїнових кислот, таких як ДНК або РНК, відноситься до молекул, відділених від інших ДНК або РНК, відповідно, які присутні у природньому джерелі макромолекули. У контексті даного документа термін "виділений" також відноситься до нуклеїнової кислоти або пептиду, які по суті не містять клітинного матеріалу, вірусного матеріалу або культурального середовища, якщо вони були отримані технологією рекомбінантних ДНК, або хімічних прекурсорів або інших хімічних речовин, якщо вони були отримані шляхом хімічного синтезу. Крім того, мається на увазі, що "виділена нуклеїнова кислота" включає фрагменти нуклеїнової кислоти, які не зустрічаються у природі у вигляді фрагментів та не зустрічаються у природньому стані. Термін "виділений" також використовується у даному документі для позначення клітин або поліпептидів, виділених з інших клітинних білків або тканин. Мається на увазі, що виділені поліпептиди включають як очищені, так і рекомбінантні поліпептиди.

У контексті даного документу матися на увазі, що термін "рекомбінантний" при використанні відносно поліпептиду або полінуклеотидів означає форму поліпептиду або полінуклеотиду, що не існує у природі, необмежуючий приклад якої може бути створений шляхом об'єднання полінуклеотидів або поліпептидів, які у звичайних умовах не зустрічаються разом.

"Гомологічність", або "ідентичність", або "подібність" відноситься до подібності послідовностей між двома пептидами або між двома молекулами нуклеїнової кислоти. Гомологічність може бути визначена шляхом порівняння положення у кожній послідовності, які для цілей порівняння можуть бути вирівняні. Коли положення у порівнюваній послідовності зайняте тією самою основою або амінокислотою, молекули у цьому положенні гомологічні. Ступінь гомологічності послідовностей залежить від кількості співпадаючих або гомологічних положень, загальних для послідовностей. "Неспоріднена" або "негомологічна" послідовність ідентична менш ніж на 40 %, переважно менш ніж на 25 %, одній з послідовностей згідно із даним винаходом.

Якщо полінуклеотид або полінуклеотидна область (або поліпептид або поліпептидна область) має певний відсоток (наприклад, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % або 99 %) "ідентичності послідовностей" з іншою послідовністю, це означає, що при вирівнюванні послідовностей цей відсоток основ (або амінокислот) при порівнянні двох послідовностей є однаковим. Це вирівнювання та відсоток гомологічності або ідентичності послідовностей можуть бути визначені з використанням програмного забезпечення, відомого у даній галузі техніки, наприклад, описаного у Ausubel et al. eds. (2007) Current Protocols in Molecular Biology. Переважно для вирівнювання використовуються параметри за замовчуванням. Однією із програм для вирівнювання є BLAST, що використовує параметри за замовчуванням. Зокрема, програмами є BLASTN та BLASTP, що використовують наступні параметри за замовчуванням: Генетичний код = стандартний; фільтр = відсутній; ланцюг = обидва; відсічення = 60; очікування = 10; Матриця = BLOSUM62; Описи = 50 послідовностей; сортувати за = ВИСОКИЙ ВІДСОТОК ЗБИГУ; Бази даних = ненадлишкові, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + SwissProtein + SPupdate + PIR. Біологічно еквівалентними полінуклеотидами є полінуклеотиди, які мають зазначений вище відсоток гомологічності та кодують поліпептид, що має таку ж або схожу біологічну активність.

Термін "еквівалентна нуклеїнова кислота або полінуклеотид" відноситься до нуклеїнової кислоти, що має нуклеотидну послідовність, що має певний ступінь гомологічності або

ідентичності послідовностей з нуклеотидною послідовністю нуклеїнової кислоти або її комплементу. Мається на увазі, що гомолог дволанцюгової нуклеїнової кислоти включає нуклеїнові кислоти, що мають нуклеотидну послідовність, яка має певний ступінь гомологічності з нею або з її комплементом. У одному з аспектів гомологи нуклеїнових кислот здатні гібридизуватися з нуклеїновою кислотою або її комплементом. Аналогічним чином "еквівалентний поліпептид" відноситься до поліпептиду, що має певний ступінь гомологічності або ідентичності послідовностей з амінокислотною послідовністю референсного поліпептиду. У деяких аспектах ідентичність послідовностей становить щонайменше приблизно 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % або 99 %. У деяких аспектах еквівалентний поліпептид або полінуклеотид має одну, дві, три, чотири або п'ять вставок, делецій, замін та їх комбінацій у порівнянні з референсним поліпептидом або полінуклеотидом. У деяких аспектах еквівалентна послідовність зберігає активність (наприклад, зв'язування з епітопом) або структуру (наприклад, сольовий місток) референсної послідовності.

Реакції гібридизації можуть бути проведені в умовах різної "твердості". Як правило, реакцію гібридизації низької твердості проводять при температурі приблизно 40 °C у приблизно 10 × SSC (цитрат та хлорид натрію) або розчині з еквівалентною іонною силою/температурою. Гібридизацію середньої твердості звичайно проводять при приблизно 50 °C у приблизно 6 × SSC, та реакцію гібридизації високої твердості звичайно проводять при приблизно 60 °C у приблизно 1 × SSC. Реакції гібридизації також можуть бути проведені у "фізіологічних умовах", добре відомих фахівцям у даній галузі техніки. Необмежуваним прикладом фізіологічних умов є температура, іонна сила, pH та концентрація Mg^{2+} , що звичайно зустрічаються у клітині.

Полінуклеотид складається з певної послідовності чотирьох нуклеотидних основ: аденін (A); цитозин (C); гуанін (G); тимін (T); та урацил (U) замість тиміну, коли полінуклеотид являє собою РНК. Таким чином, термін "полінуклеотидна послідовність" є буквеним представленням молекули полінуклеотиду. Це буквенне представлення може бути введене у бази даних на комп'ютері, що має центральний процесор, та використане з метою біоінформатики, таких як функціональна геноміка та пошук гомологічних послідовностей. Термін "поліморфізм" відноситься до співіснування більш ніж однієї форми гену або його частини. Частина гену, що має щонайменше дві різні форми, тобто дві різні нуклеотидні послідовності, називається "поліморфною областю гену". Поліморфна область може являти собою один нуклеотид, який може бути різним у різних алелях.

Терміни "полінуклеотид" та "олігонуклеотид" використовуються взаємозамінно та відносяться до полімерної форми нуклеотидів будь-якої довжини, або дезоксирибонуклеотидів, або рибонуклеотидів, або їх аналогів. Полінуклеотиди можуть мати будь-яку тривимірну структуру та можуть виконувати будь-яку функцію, відому або невідому. Нижче наведені необмежувачі приклади полінуклеотидів: ген або фрагмент гену (наприклад, зонд, праймер, мітка EST або SAGE), екзони, інтрони, інформаційна РНК (іРНК), транспортна РНК, рибосомна РНК, рибозими, кДНК (комплементарна ДНК), дЛРНК (дволанцюгова РНК), міРНК (малі інтерферуючі РНК), мікроРНК, рекомбінантні полінуклеотиди, розгалужені полінуклеотиди, плазміди, вектори, виділена ДНК будь-якої послідовності, виділена РНК будь-якої послідовності, нуклеотидні зонди та праймери. Полінуклеотид може містити модифіковані нуклеотиди, такі як метильовані нуклеотиди та нуклеотидні аналоги. Модифікація структури нуклеотиду, якщо вона має місце, може бути проведена до або після складання полінуклеотиду. Послідовність нуклеотидів може бути перервана ненуклеотидними компонентами. Полінуклеотид може бути додатково модифікований після полімеризації, наприклад, шляхом кон'югації з компонентом, що мітить. Термін також відноситься як до дволанцюгових, так і до одностанцюгових молекул. Якщо інше не зазначене або не потрібно, будь-який варіант здійснення даного винаходу, який являє собою полінуклеотид, охоплює як дволанцюгову форму, так і кожен із двох комплементарних одностанцюгових форм, що утворюють або теоретично утворюють дволанцюгову форму.

Термін "кодувати" у контексті полінуклеотидів відноситься до полінуклеотиду, про який говорять, що він "кодує" поліпептид, якщо у його нативному стані або при зміні способами, добре відомими фахівцям у даній галузі техніки, він може зазнати транскрипції та/або трансляції з одержанням іРНК поліпептиду та/або його фрагменту. Антизначеннєвий ланцюг є комплементом такої нуклеїнової кислоти, та з неї може бути отримана кодуюча послідовність.

У контексті даного документу термін "антитіло" або "антигензв'язуючий поліпептид" відноситься до поліпептиду або поліпептидного комплексу, який специфічно розпізнає та зв'язується з антигеном. Антитіло може являти собою ціле антитіло та будь-який антигензв'язуючий фрагмент, або один його ланцюг. Таким чином, термін "антитіло" включає будь-яку молекулу, що містить білок або пептид, яка містить щонайменше частину молекули імуноглобуліну, що має біологічну активність зв'язування з антигеном. Їх приклади включають,

не обмежуючись перерахованими, визначальну комплементарність область (CDR) важкого або легкого ланцюгу або її ліганд-зв'язуючу частину, варіабельну область важкого ланцюгу або легкого ланцюгу, константну область важкого ланцюгу або легкого ланцюгу, каркасну (FR) область, або будь-які їх частини, або щонайменше одну частину зв'язуючого білку.

Терміни "фрагмент антитіла" або "антигензв'язуючий фрагмент" у контексті даного документу являють собою частину антитіла, таку як $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab' , Fab , Fv , $scFv$ і таке інше. Незалежно від структури фрагмент антитіла зв'язується з тим же антигеном, який розпізнається інтактним антитілом. Термін "фрагмент антитіла" включає аптамери, шпигельмери та діатіла. Термін "фрагмент антитіла" також включає будь-який синтетичний або генетично модифікований білок, що діє як антитіло, зв'язуючись із певним антигеном з утворенням комплексу.

"Одноланцюговий варіабельний фрагмент" або " $scFv$ " відноситься до злитого білку варіабельних областей важкого (V_H) та легкого (V_L) ланцюгів імуноглобулінів. У деяких аспектах області з'єднані коротким лінкерним пептидом довжиною від 10 до приблизно 25 амінокислот. Лінкер може мати високий вміст гліцину для гнучкості, а також серину або треоніну для розчинності, та може або з'єднувати N-кінець V_H з C-кінцем V_L , або навпаки. Цей білок зберігає специфічність вихідного імуноглобуліну, незважаючи на видалення константних областей та введення лінкеру. Молекули $ScFv$ відомі у даній галузі техніки та описані, наприклад, у патенті США 5892019.

Термін "антитіло" охоплює різні широкі класи поліпептидів, які є біохімічно відмінними. Фахівцям у даній галузі техніки відомо, що важкі ланцюги класифікують на гама, мію, альфа, дельта або епсилон (γ , μ , α , δ , ϵ), серед яких є деякі підкласи (наприклад, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Саме природа цього ланцюгу визначає "клас" антитіла як IgG , IgM , IgA , IgG або IgE , відповідно. Підкласи (ізотипи) імуноглобулінів, наприклад, IgG_1 , IgG_2 , IgG_3 , IgG_4 , IgG_5 і т.д., добре охарактеризовані та, як відомо, надають функціональну спеціалізацію. Модифіковані версії кожного із цих класів та ізотипів легко помітні фахівцем у даній галузі техніки з урахуванням даного опису та, відповідно, знаходяться у межах обсягу даного винаходу. Усі класи імуноглобулінів з усією очевидністю знаходяться у межах обсягу даного винаходу, при цьому наступне обговорення буде здебільшого стосуватися класу IgG молекул імуноглобулінів. Що стосується IgG , стандартна молекула імуноглобуліну містить два ідентичні поліпептиди легкого ланцюгу молекулярною масою приблизно 23000 дальтон та два ідентичні поліпептиди важкого ланцюгу молекулярною масою 53000-70000. Чотири ланцюги, як правило, з'єднані дисульфідними зв'язками у конфігурацію "Y", де легкі ланцюги включають важкі ланцюги, що починаються в усті "Y" та продовжуються через варіабельну область.

Антитіла, антигензв'язуючі поліпептиди, їх варіанти або похідні згідно із даним винаходом включають, не обмежуючись перерахованим, поліклональні, моноклональні, поліспецифічні, людські, гуманізовані, приматизовані або химерні антитіла, одноланцюгові антитіла, епітоп-зв'язуючі фрагменти, наприклад, Fab , Fab' та $F(ab')_2$, Fd , Fvs , одноланцюгові Fvs ($scFv$), одноланцюгові антитіла, дисульфід-зв'язані Fvs ($sdFv$), фрагменти, що містять VK - або VH -домен, фрагменти, отримані за допомогою експресійної бібліотеки Fab -фрагментів, та антидіотипові (анти- Id) антитіла (включаючи, наприклад, анти- Id -антитіла до антитіл $LIGHT$, розкритих у даному документі). Молекули імуноглобулінів або антитіл згідно із даним винаходом можуть бути будь-якого типу (наприклад, IgG , IgE , IgM , IgD , IgA та IgY), класу (наприклад, $IgG1$, $IgG2$, $IgG3$, $IgG4$, $IgA1$ та $IgA2$) або підкласу молекули імуноглобуліну.

Легкі ланцюги класифікують на каппа або лямбда (K , λ). Кожен клас важкого ланцюгу може бути пов'язаний з легким каппа- або лямбда-ланцюгом. Як правило, легкий та важкий ланцюги ковалентно зв'язані один з іншим, а "хвостові" частини двох важких ланцюгів зв'язані один з іншим ковалентними дисульфідними зв'язками або нековалентними зв'язками, коли молекули імуноглобулінів виробляються гібридомами, В-клітинами або генетично модифікованими клітинами-хазяями. У важкому ланцюзі амінокислотні послідовності проходять від N-кінця на роздвоєних кінцях Y-подібної конфігурації до C-кінця у нижній частині кожного ланцюгу.

Як легкі, так і важкі ланцюги діляться на області структурної та функціональної гомологічності. Терміни "константа" та "змінна" використовуються функціонально. У цьому зв'язку слід розуміти, що варіабельні домени частин як легкого (VK), так і важкого (VH) ланцюгів визначають розпізнавання антигену та специфічність. І навпаки, константні домени легкого ланцюгу (CK) та важкого ланцюгу ($CH1$, $CH2$ або $CH3$) надають важливі біологічні властивості, такі як секреція, трансплацентарний перенос, зв'язування Fc -рецептору, зв'язування комплементу і таке інше. Прийнято, що номери доменів константної області зростають при видаленні від антигензв'язуючого сайту або амінокінця антитіла. N-кінцева частина є

варіабельною областю, а С-кінцева частина є константною областю; домени CH3 та СК фактично містять карбоксикінець важкого та легкого ланцюгів, відповідно.

Як зазначено вище, варіабельна область дозволяє антитілу селективно розпізнавати та специфічно зв'язувати епітопи на антигенах. Тобто, VK-домен та VH-домен, або підмножина визначальних комплементарність областей (CDR) антитіла поєднуються, утворюючи варіабельну область, яка визначає тривимірний антигензв'язуючий сайт. Ця четвертинна структура антитіла утворює антигензв'язуючий сайт, що присутній на кінці кожного плеча Y. Більш конкретно, антигензв'язуючий сайт визначається трьома CDR на кожному з VH- та VK-ланцюгів (тобто CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 та CDR-L3). У деяких випадках, наприклад, у певних молекулах імуноглобулінів, що походять з верблюдових або отриманих на основі імуноглобулінів верблюдових за допомогою генної інженерії, повна молекула імуноглобуліну може складатися тільки з важких ланцюгів без легких ланцюгів. Див., наприклад, Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-448 (1993).

У природних антитілах шість "визначальних комплементарність областей" або "CDR", присутніх у кожному антигензв'язуючому домені, являють собою короткі несуміжні послідовності амінокислот, розташовані особливим чином, утворюючи антигензв'язуючий домен при прийнятті антитілом його тривимірної конфігурації у водному середовищі. Інші амінокислоти у антигензв'язуючих доменах, які називаються "каркасними" областями, демонструють меншу міжмолекулярну варіабельність. Каркасні області в основному приймають конформацію β -листу, а CDR утворюють петлі, які з'єднують, а у деяких випадках є частиною структури β -листу. Таким чином, каркасні області формують каркас, який забезпечує розташування CDR у правильній орієнтації за допомогою міжланцюгових нековалентних взаємодій. Антигензв'язуючий домен, утворений CDR, що зайняли свої положення, визначає поверхню, комплементарну епітопу на імунореактивному антигені. Ця комплементарна поверхня сприяє нековалентному зв'язуванню антитіла з розпізнаним епітопом. Амінокислоти, що складають CDR та каркасні області, відповідно, можуть бути легко встановлені для будь-якої даної варіабельної області важкого або легкого ланцюгу фахівцем у даній галузі техніки, оскільки вони були точно визначені (див. "Sequences of Proteins of Immunological Interest," Kabat, E., et al., U.S. Department of Health and Human Services, (1983); та Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987)).

У випадку, коли існує два або більше визначень терміну, який використовується та/або прийнятий у даній галузі техніки, мається на увазі, що визначення терміну, використовуване у даному документі, включає всі такі значення, якщо явно не зазначене інше. Конкретним прикладом є використання терміну "визначальна комплементарність область" ("CDR") для опису несуміжних антигензв'язуючих сайтів, що присутні у варіабельній області поліпептидів як важкого, так і легкого ланцюгу. Ця конкретна область була описана у джерелах Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) і Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), повністю включених у даний документ за допомогою посилання. Визначення CDR за Kabat та Chothia включають перекривання або підмножини амінокислотних залишків при порівнянні один з іншим. Проте, мається на увазі, що використання кожного з визначень у контексті CDR антитіла або його варіантів знаходиться у рамках цього терміну, як визначено та використовується у даному документі. Порівняння відповідних амінокислотних залишків, що включають CDR, як визначено у кожному із наведених вище джерел, наведене у таблиці нижче. Точні номери залишків, що включають конкретну CDR, будуть варіювати залежно від послідовності та розміру CDR. Фахівці у даній галузі техніки можуть рутинним чином визначати, які залишки утворюють конкретну CDR, при відомій амінокислотній послідовності варіабельної області антитіла.

	Kabat	Chothia
CDR-H1	31-35	26-32
CDR-H2	50-65	52-58
CDR-H3	95-102	95-102
CDR-L1	24-34	26-32
CDR-L2	50-56	50-52
CDR-L3	89-97	91-96

Kabat et al. також визначили систему нумерації для послідовностей варіабельних доменів, яка застосовна до будь-якого антитіла. Фахівець у даній галузі техніки може однозначно застосувати цю систему "нумерації за Kabat" до будь-якої послідовності варіабельного домену, не покладаючись на які-небудь експериментальні дані, крім самої послідовності. У контексті

даного документу термін "система нумерації за Kabat" відноситься до системи нумерації, встановленої Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983).

На додаток до вищенаведеної таблиці система нумерації за Kabat описує області CDR у такий спосіб: CDR-H1 починається приблизно з 31 амінокислоти (тобто приблизно через 9 залишків після першого залишку цистеїну), включає приблизно 5-7 амінокислот та закінчується на наступному залишку триптофану. CDR-H2 починається з п'ятнадцятого залишку після закінчення CDR-H1, включає приблизно 16-19 амінокислот та закінчується на наступному залишку аргініну або лізину. CDR-H3 починається приблизно із тридцять третього амінокислотного залишку після закінчення CDR-H2; включає 3-25 амінокислот; та закінчується на послідовності W-G-X-G, де X являє собою будь-яку амінокислоту. CDR-L1 починається приблизно з 24 залишку (тобто після залишку цистеїну); включає приблизно 10-17 залишків; та закінчується на наступному залишку триптофану. CDR-L2 починається приблизно із шістнадцятого залишку після закінчення CDR-L1 та включає приблизно 7 залишків. CDR-L3 починається приблизно із тридцять третього залишку після закінчення CDR-L2 (тобто після залишку цистеїну); включає приблизно 7-11 залишків та закінчується на послідовності F або W-G-X-G, де X являє собою будь-яку амінокислоту.

Антитіла, розкриті у даному документі, можуть мати походження від будь-якої тварини, включаючи птахів та ссавців. Переважно антитіла являють собою антитіла людини, миші, осла, кролика, кози, морської свинки, верблюда, лами, коня або курки. У ще одному варіанті здійснення варіабельна область може мати походження від хрящових риб (наприклад, від акул).

У контексті даного документу термін "константна область важкого ланцюгу" включає амінокислотні послідовності, отримані з важкого ланцюгу імуноглобуліну. Поліпептид, що містить константну область важкого ланцюгу, містить щонайменше одне з наступного: домен CH1, шарнірний (наприклад, верхня, середня та/або нижня шарнірна область) домен, домен CH2, домен CH3 або його варіант або фрагмент. Наприклад, антигензв'язуючий поліпептид для використання у винаході може містити поліпептидний ланцюг, що містить домен CH1; поліпептидний ланцюг, що містить домен CH1, щонайменше частину шарнірного домену та домен CH2; поліпептидний ланцюг, що містить домен CH1 та домен CH3; поліпептидний ланцюг, що містить домен CH1, щонайменше частину шарнірного домену та домен CH3, або поліпептидний ланцюг, що містить домен CH1, щонайменше частину шарнірного домену, домен CH2 та домен CH3. У ще одному варіанті здійснення поліпептид згідно з винаходом містить поліпептидний ланцюг, що містить домен CH3. Крім того, антитіло для використання у винаході може не мати щонайменше частини домену CH2 (наприклад, всього або частини домену CH2). Як зазначено вище, фахівцеві у даній галузі техніки буде ясно, що константна область важкого ланцюгу може бути модифікована таким чином, що її амінокислотна послідовність буде відрізнятися від природної молекули імуноглобуліну.

Константна область важкого ланцюгу антитіла, розкритого у даному документі, може походити з різних молекул імуноглобуліну. Наприклад, константна область важкого ланцюгу поліпептиду може містити домен CH1, що походить з молекули IgG₁, та шарнірну область, що походить з молекули IgG₃. У ще одному прикладі константна область важкого ланцюгу може містити шарнірну область, що походить частково з молекули IgG₁ та частково з молекули IgG₃. У ще одному прикладі ділянка важкого ланцюгу може містити химерний шарнір, що походить частково з молекули IgG₁ та частково з молекули IgG₄.

У контексті даного документа термін "константна область легкого ланцюгу" включає амінокислотні послідовності, що походять з легкого ланцюгу антитіла. Переважно константна область легкого ланцюгу містить щонайменше один з константного каппа-домену або константного лямбда-домену.

"Пара легкого та важкого ланцюгів" відноситься до набору легкого ланцюгу та важкого ланцюгу, які можуть утворювати димер за допомогою дисульфідного зв'язку між доменом CL легкого ланцюгу та доменом CH1 важкого ланцюгу.

Як вказувалося раніше, структури субодиниць та тривимірна конфігурація константних областей різних класів імуноглобулінів добре відомі. У контексті даного документу термін "домен VH" включає амінокінцевий варіабельний домен важкого ланцюгу імуноглобуліну, та термін "домен CH1" включає перший (найбільш амінокінцевий) домен константної області важкого ланцюгу імуноглобуліну. Домен CH1 знаходиться по сусідству із доменом VH та є амінокінцевим відносно шарнірної області молекули важкого ланцюгу імуноглобуліну.

У контексті даного документу термін "домен CH2" включає частину молекули важкого ланцюгу, який простирається, наприклад, з приблизно 244 залишку до 360 залишку антитіла, як зазначено за допомогою традиційних схем нумерації (залишки 244-360, система нумерації за

Kabat, та залишки 231-340, система нумерації EU, див. Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983)). Домен CH2 унікальний тим, що не тісно пов'язаний з іншим доменом. Скоріше, два N-зв'язані розгалужені вуглеводні ланцюги розташовані між двома доменами CH2 інтактною нативної молекули IgG. Також добре описано, що домен CH3 простирається від домена CH2 до C-кінця молекули IgG та містить приблизно 108 залишків.

У контексті даного документу термін "шарнірна область" включає частину молекули важкого ланцюгу, який з'єднує домен CH1 з доменом CH2. Ця шарнірна область містить приблизно 25 залишків та є гнучкою, що дозволяє двом N-кінцевим антигензв'язуючим областям переміщатися незалежно одна від іншої. Шарнірні області можна підрозділити на три окремі домени: верхній, середній та нижній шарнірні домени (Roux et al., J. Immunol 161:4083 (1998)).

У контексті даного документу термін "дисульфідний зв'язок" включає ковалентний зв'язок, утворений між двома атомами сірки. Амінокислота цистеїн містить тиольну групу, яка може утворювати дисульфідний зв'язок або місток із другою тиольною групою. У більшості природних молекул IgG області CH1 та СК зв'язані дисульфідним зв'язком, а два важкі ланцюги зв'язані двома дисульфідними зв'язками у положеннях, які відповідають положенням 239 та 242 у системі нумерації за Kabat (положення 226 або 229, система нумерації EU).

У контексті даного документу термін "химерне антитіло" буде означати будь-яке антитіло, у якому імунореактивна область або сайт отримані або походять із першого виду, а константна область (яка може бути інтактною, частковою або модифікованою відповідно до даного винаходу) отримана із другого виду. У деяких варіантах здійснення цільова область або сайт зв'язування будуть походити із джерела, що не є людиною (наприклад, миші або примата), а константна область є людською.

У контексті даного документу термін "відсоток гуманізації" розраховується шляхом визначення кількості відмінностей у амінокислотах каркасної області (тобто відмінностей без урахування CDR) між гуманізованим доменом та доменом зародкової лінії, вираховання цієї кількості із загальної кількості амінокислот та її наступного ділення на загальну кількість амінокислот та множення на 100.

Під "специфічно зв'язує" або "має специфічність до" звичайно мається на увазі, що антитіло зв'язується з епітопом за допомогою свого антигензв'язуючого домену, та що зв'язування сполучене з деякою комплементарністю між антигензв'язуючим доменом та епітопом. Згідно із цим визначенням антитіло, як говорять, "специфічно зв'язується" з епітопом, коли воно зв'язується із цим епітопом за допомогою свого антигензв'язуючого домену легше, ніж воно зв'язалося б з випадковим, неспорідненим епітопом. Термін "специфічність" використовується у даному документі для оцінки відносної афінності, з якою певне антитіло зв'язується з певним епітопом. Наприклад, можна вважати, що антитіло "А" має більш високу специфічність для даного епітопу, ніж антитіло "В", або про антитіло "А" можна сказати, що воно зв'язується з епітопом "С" з більш високою специфічністю, ніж його специфічність для спорідненого епітопу "D".

У контексті даного документу терміни "лікувати" або "лікування" відносяться як до терапевтичного лікування, так і до профілактичних або превентивних заходів, де метою є попередження або уповільнення (зменшення) небажаної фізіологічної зміни або розладу, наприклад, прогресування аутоімунного захворювання. Сприятливі або бажані клінічні результати включають, не обмежуючись перерахованим, часткове зняття симптомів, зменшення ступеню захворювання, стабілізований (тобто такий, що не погіршується) стан захворювання, затримку або уповільнення прогресування захворювання, зменшення інтенсивності або тимчасове ослаблення перебігу захворювання та ремісію (часткову або повну), як виявлювані, так і невиявлювані. "Лікування" також може означати збільшення виживаності у порівнянні з очікуваною виживаністю, якщо лікування не проводиться. Суб'єкти, які потребують лікування, включають тих, що вже мають стан або розлад, а також тих, хто схильний до розвитку цього стану або розладу, або тих, у кого стан або розлад необхідно попередити.

Під "суб'єктом", "індивідуумом", "твариною", "пацієнтом" або "ссавцем" мається на увазі будь-який суб'єкт, зокрема ссавець, для якого бажані діагностика, прогнозування або терапія. Суб'єкти-ссавці включають людей, свійських тварин, сільськогосподарських тварин та тварин зоопарку, тварин, що беруть участь у спорті, або свійських тварин, таких як собаки, кішки, морські свинки, кролики, щури, миші, коні, велика рогата худоба, корови і так далі.

У контексті даного документа такі фрази, як "пацієнт, який потребує лікування" або "суб'єкт, який потребує лікування", включають суб'єктів, таких як ссавці, які одержали б користь від

введення антитіла або композиції згідно із даним винаходом при використанні, наприклад, для виявлення, для процедури діагностики та/або для лікування.

Антитіла до ГМ-КСФ

- Даний винахід відноситься до антитіл до ГМ-КСФ із високою афінністю до людського білку ГМ-КСФ. Досліджені антитіла продемонстрували високу зв'язуючу та інгібуючу активність та придатні для терапевтичного та діагностичного застосування. Крім вихідних мишачих антитіл гуманізовані антитіла також показали високу афінність зв'язування із ГМ-КСФ макака-резуса та ГМ-КСФ людини, яке блокувало зв'язування ГМ-КСФ із альфа-субодиницею рецептору ГМ-КСФ та блокувало викликану ГМ-КСФ передачу сигналів pSTAT5, та інгібувало ГМ-КСФ-залежну проліферацію TF-1.

Відповідно до одного з варіантів здійснення даного винаходу запропоноване антитіло, що включає варіабельні домени важкого ланцюгу та легкого ланцюгу з областями CDR, як визначено у SEQ ID NO: 1-6 або SEQ ID NO: 23-28, як показано нижче.

Таблиця 1a

Послідовності областей CDR 23F4

Назва	Послідовності	SEQ ID NO:
CDR1 VH	SHYLH	1
CDR2 VH	WIFPGDDKTKYNEKFKG	2
CDR3 VH	GTKYLNWNFDV	3
CDR1 VL	KANQNVGTTLA	4
CDR2 VL	SASYRYS	5
CDR3 VL	HQYTTYPLT	6

Таблиця 1b

Послідовності областей CDR 50C5

Назва	Послідовності	SEQ ID NO:
CDR1 VH	PYSIH	23
CDR2 VH	YINPSTGYIEYNQHFCD	24
CDR3 VH	GGDYEGYFDY	25
CDR1 VL	RLNENIYSFLA	26
CDR2 VL	NAETLAE	27
CDR3 VL	QQHYGTPYT	28

- Як продемонстровано у прикладах здійснення, антитіла, що містили ці області CDR, незалежно від того, чи були вони мишачими, гуманізованими або химерними, мали високу активність зв'язування та інгібування ГМ-КСФ. У деяких варіантах здійснення антитіло до ГМ-КСФ згідно із даним винаходом включає VH та VL CDR, наведені у таблицях 1a-b, з однією, двома або трьома додатковими модифікаціями. Такими модифікаціями можуть бути вставка, делеція або заміна амінокислот.

- У деяких варіантах здійснення модифікація являє собою заміну не більше ніж у одному залишку у кожній з CDR. У деяких варіантах здійснення модифікація являє собою заміну у одному, двох або трьох залишках. У одному з варіантів здійснення модифікація являє собою заміну у одному із залишків. Такі заміни у деяких варіантах здійснення є консервативними замінами.

- "Консервативна амінокислотна заміна" являє собою заміну, при якій амінокислотний залишок замінюється амінокислотним залишком, що мають схожий бічний ланцюг. У даній галузі техніки були визначені сімейства амінокислотних залишків зі схожими бічними ланцюгами, у тому числі основними бічними ланцюгами (наприклад, лізин, аргінін, гістидин), кислотними бічними ланцюгами (наприклад, аспарагінова кислота, глютамінова кислота), незарядженими полярними бічними ланцюгами (наприклад, гліцин, аспарагін, глютамін, серин, треонін, тирозин, цистеїн), неполярними бічними ланцюгами (наприклад, аланін, валін, лейцин, ізолейцин, пролін, фенілаланін, метіонін, триптофан), бета-розгалуженими бічними ланцюгами (наприклад, треонін, валін, ізолейцин) та ароматичними бічними ланцюгами (наприклад, тирозин, фенілаланін, триптофан, гістидин). Таким чином, залишок заміної амінокислоти у поліпептиді імунoglobulinу переважно замінений іншим амінокислотним залишком з того ж сімейства бічних

ланцюгів. У ще одному варіанті здійснення відрізків амінокислот може бути замінений структурно схожим відрізком, що відрізняється порядком та/або складом представників сімейства бічних ланцюгів.

- 5 Необмежуючі приклади консервативних амінокислотних заміни представлені у наведеній нижче таблиці, де показник подібності, рівний 0 або вище, вказує на консервативну заміну між двома амінокислотами.

Таблиця 2

Матриця подібності амінокислот

	C	G	P	S	A	T	D	E	N	Q	H	K	R	V	M	I	L	F	Y	W
W	-8	-7	-6	-2	-6	-5	-7	-7	-4	-5	-3	-3	2	-6	-4	-5	-2	0	0	17
Y	0	-5	-5	-3	-3	-3	-4	-4	-2	-4	0	-4	-5	-2	-2	-1	-1	7	10	
F	-4	-5	-5	-3	-4	-3	-6	-5	-4	-5	-2	-5	-4	-1	0	1	2	9		
L	-6	-4	-3	-3	-2	-2	-4	-3	-3	-2	-2	-3	-3	2	4	2	6			
I	-2	-3	-2	-1	-1	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4	2	5				
M	-5	-3	-2	-2	-1	-1	-3	-2	0	-1	-2	0	0	2	6					
V	-2	-1	-1	-1	0	0	-2	-2	0	-2	-2	-2	-2	4						
R	-4	-3	0	0	-2	-1	-1	-1	0	1	2	3	6							
K	-5	-2	-1	0	-1	0	0	0	1	1	0	5								
H	-3	-2	0	-1	-1	-1	1	1	2	3	6									
Q	-5	-1	0	-1	0	-1	2	2	1	4										
N	-4	0	-1	1	0	0	2	1	2											
E	-5	0	-1	0	0	0	3	4												
D	-5	1	-1	0	0	0	4													
T	-2	0	0	1	1	3														
A	-2	1	1	1	2															
S	0	1	1	1																
P	-3	-1	6																	
G	-3	5																		
C	12																			

Таблиця 3

Консервативні амінокислотні заміни

Для амінокислоти	Заміна на
Аланін	D-Ala, Gly, Aib, β -Ala, L-Cys, D-Cys
Аргінін	D-Arg, Lys, D-Lys, Orn D-Orn
Аспарагін	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu Gln, D-Gln
Аспарагінова кислота	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Цистеїн	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr, L-Ser, D-Ser
Глутамін	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Глутамінова кислота	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Гліцин	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, β -Ala
Ізолейцин	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Лейцин	Val, D-Val, Met, D-Met, D-Ile, D-Leu, Ile
Лізін	D-Lys, Arg, D-Arg, Orn, D-Orn
Метіонін	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
Фенілаланін	D-Phe, Tyr, D-Tyr, His, D-His, Trp, D-Trp
Пролін	D-Pro
Серин	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, L-Cys, D-Cys
Треонін	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Val, D-Val
Тирозин	D-Tyr, Phe, D-Phe, His, D-His, Trp, D-Trp
Валін	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

- 10 У деяких варіантах здійснення антитіла або його фрагмент включає не більше однієї, не більше двох або не більше трьох із зазначених вище заміни.

У деяких варіантах здійснення антитіло або його фрагмент має специфічність до людського білку ГМ-КСФ та містить CDR1 VH з послідовністю SEQ ID NO: 1, CDR2 VH з послідовністю SEQ ID NO: 2, CDR3 VH з послідовністю SEQ ID NO: 3, CDR1 VL з послідовністю SEQ ID NO: 4, CDR2 VL з послідовністю SEQ ID NO: 5 та CDR3 VL з послідовністю SEQ ID NO: 6. Необмежуючі приклади VH представлені у SEQ ID NO: 7-17, з яких SEQ ID NO: 7 являє собою мишачу VH, а SEQ ID NO: 8-17 являють собою гуманізовані VH. Крім того, ці гуманізовані VH включають одну або більше зворотних мутацій у мишачу версію. Аналогічним чином необмежуючі приклади VL (VK) представлені у SEQ ID NO: 18-22. SEQ ID NO: 18 являє собою мишачу послідовність, а SEQ ID NO: 19-22 являють собою гуманізовані послідовності, серед яких SEQ ID NO: 20-22 включають одну або більше зворотних мутацій, як показано у прикладах.

Показано, що зворотні мутації ефективні для збереження певних характеристик антитіл до ГМ-КСФ. Відповідно, у деяких варіантах здійснення антитіла до ГМ-КСФ відповідно до даного винаходу, зокрема, людські або гуманізовані, включають одну або більше зворотних мутацій. У деяких варіантах здійснення зворотна мутація VH (тобто включена амінокислота у зазначеному положенні) являє собою одну або більше з (a) Glu у положенні 1 (E1), (b) Arg у положенні 98 (R98), (c) Ser у положенні 72 (S72), (d) Ala у положенні 68 (A68), (e) Leu у положенні 70 (L70), (f) Ile у положенні 48 (I48), (g) Asp у положенні 26 (D26) та (h) Leu у положенні 29 (L29), згідно з системою нумерації за Kabat, та їх комбінації.

У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло включає щонайменше зворотну мутацію VH E1. У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло включає щонайменше зворотні мутації VH E1 та R98. У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло включає щонайменше зворотні мутації VH E1 та ще одну з перерахованих вище. У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло включає щонайменше групу зворотних мутацій VH (E1, R98 та S72), (E1, R98, S72 та A68), (E1, R98, S72, A68, L70 та I48), (E1, R98, S72, A68, L70, I48, D26 та L29), (E1 та S72), (E1, S72 та L70), (E1, S72, L70, I48 та A68), (E1, S72, L70, I48, A68, D26 та L29).

У деяких варіантах здійснення варіабельна область важкого ланцюгу містить фрагмент DYTLT (SEQ ID NO: 42) або GYTFT (SEQ ID NO: 43) на N-кінці CDR1, тобто який починається з положення 26 згідно з системою нумерації за Kabat. У одному з варіантів здійснення варіабельна область важкого ланцюгу містить DYTLT (SEQ ID NO: 42). У одному з варіантів здійснення варіабельна область важкого ланцюгу містить GYTFT (SEQ ID NO: 43).

У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло включає одну або більше зворотних мутацій. У деяких варіантах здійснення зворотна мутація VL являє собою одну або більше з (a) Ala у положенні 46 (A46), (b) Asp у положенні 60 (D60), (c) Asp у положенні 70 (D70), (d) Ser у положенні 43 (S43) та (f) Phe у положенні 87 (F87), згідно з системою нумерації за Kabat, та їх комбінації.

У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло включає щонайменше дві, три або чотири зворотні мутації VL з A46, D60, D70, S43 або F87. У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло включає щонайменше зворотну мутацію VL A46. У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло включає щонайменше зворотні мутації VL A46 та D60, та ще одну з перерахованих вище. У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло включає щонайменше групу зворотних мутацій VL (A46, D60 та D70) або (A46, D60, D70, S43 та F87).

У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло включає щонайменше зворотні мутації VH (E1, R98, S72, A68, L70 та I48) та не включає зворотних мутацій VL. У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло включає щонайменше зворотні мутації VH (E1, S72, L70, I48, A68, D26 та L29) та не включає зворотних мутацій VL. У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло включає щонайменше зворотні мутації VH (E1 та S72) та зворотні мутації VL (A46, D60, D70, S43 та F87).

У деяких варіантах здійснення антитіло до ГМ-КСФ відповідно до даного винаходу включає VH з послідовністю SEQ ID NO: 8-17 та VL з послідовністю SEQ ID NO: 19-22, або їх відповідні біологічні еквіваленти. Біологічний еквівалент VH або VL являє собою послідовність, яка включає позначені амінокислоти, при цьому має загальну ідентичність послідовностей, що становить 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % або 99 %. Таким чином, біологічний еквівалент SEQ ID NO: 10 може являти собою VH, що має загальну ідентичність послідовностей з SEQ ID NO: 10, що складає 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % або 99 %, але зберігає CDR (SEQ ID NO: 1-3 або їх варіанти) та необов'язково зберігає одну або більше, або усі зворотні мутації.

У одному з варіантів здійснення VH має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11, а VL має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 19. У одному з варіантів здійснення VH має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 17, а VL має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 19. У одному з варіантів здійснення VH має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11, а VL

має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 22. Слід відмітити, що кожна з перерахованих послідовностей також може бути замінена їх біологічними еквівалентами.

У деяких варіантах здійснення антитіло або його фрагмент має специфічність до людського білку ГМ-КСФ та містить CDR1 VH з послідовністю SEQ ID NO: 23, CDR2 VH з послідовністю SEQ ID NO: 24, CDR3 VH з послідовністю SEQ ID NO: 25, CDR1 VL з послідовністю SEQ ID NO: 26, CDR2 VL з послідовністю SEQ ID NO: 27 та CDR3 VL з послідовністю SEQ ID NO: 28. Необмежуючі приклади VH представлені у SEQ ID NO: 29-35, з яких SEQ ID NO: 29 являє собою мишачу VH, а SEQ ID NO: 30-35 являють собою гуманізовані VH. Крім того, ці гуманізовані VH включають одну або більше зворотних мутацій у мишачу версію. Аналогічним чином необмежуючі приклади VL (VK) представлені у SEQ ID NO: 36-41. SEQ ID NO: 36 являє собою мишачу послідовність, а SEQ ID NO: 37-41 являють собою гуманізовані послідовності, серед яких SEQ ID NO: 38-41 включають одну або більше зворотних мутацій, як показано у прикладах.

Показано, що зворотні мутації ефективні для збереження певних характеристик антитіл до ГМ-КСФ. Відповідно, у деяких варіантах здійснення антитіла до ГМ-КСФ відповідно до даного винаходу, зокрема, людські або гуманізовані, включають одну або більше зворотних мутацій. У деяких варіантах здійснення зворотна мутація VH (тобто включена амінокислота у зазначеному положенні) являє собою одну або більше з E1, R84, Y27, I28, I48, T68, L70 або T30, згідно з системою нумерації за Kabat, та їх комбінації.

У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло включає щонайменше зворотну мутацію VH E1. У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло включає щонайменше зворотні мутації VH E1 та R84. У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло включає щонайменше зворотні мутації VH E1 та ще одну з перерахованих вище. У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло включає щонайменше групу зворотних мутацій VH (E1), (E1 та R84), (E1, R84, Y27 та I28), (E1, R84, Y27, I28 та I48), (E1, R84, Y27, I28, I48, T68 та L70) або (E1, R84, Y27, I28, I48, T68, L70 та T30).

У деяких варіантах здійснення варіабельна область важкого ланцюгу містить фрагмент GYIFT (SEQ ID NO: 44), GYIFS (SEQ ID NO: 45) або GGTFs (SEQ ID NO: 46) на N-кінці CDR1, тобто який починається з положення 26 згідно з системою нумерації за Kabat. У одному з варіантів здійснення варіабельна область важкого ланцюгу містить GYIFT (SEQ ID NO: 44). У одному з варіантів здійснення варіабельна область важкого ланцюгу містить GYIFS (SEQ ID NO: 45). У одному з варіантів здійснення варіабельна область важкого ланцюгу містить GGTFs (SEQ ID NO: 46).

У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло включає одну або більше зворотних мутацій. У деяких варіантах здійснення зворотна мутація VL являє собою одну або більше з V48, D57, Q70 або S43, згідно з системою нумерації за Kabat, та їх комбінації.

У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло включає щонайменше дві, три або чотири зворотні мутації VL з V48, D57, Q70 або S43. У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло включає щонайменше зворотну мутацію VL V48. У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло включає щонайменше зворотні мутації VL V48 та D57, та ще одну з перерахованих вище. У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло включає щонайменше групу зворотних мутацій VL (V48), (V48 та D57), (V48, D57 та Q70) або (V48, D57, Q70 та S43).

У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло включає щонайменше зворотні мутації VH (E1, R84, Y27, I28, I48, T68 та L70) та зворотну мутацію VL V48. У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло включає щонайменше зворотні мутації VH (E1, R84, Y27, I28, I48, T68, L70 та T30) та зворотні мутації VL (V48 та D57).

У деяких варіантах здійснення антитіло до ГМ-КСФ відповідно до даного винаходу включає VH з послідовністю SEQ ID NO: 30-35 та VL з послідовністю SEQ ID NO: 37-41, або їх відповідні біологічні еквіваленти. Біологічний еквівалент VH або VL являє собою послідовність, яка включає позначені амінокислоти, яка при цьому має загальну ідентичність послідовностей, що складає 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % або 99 %. Таким чином, біологічний еквівалент SEQ ID NO: 35 може являти собою VH, що має загальну ідентичність послідовностей з SEQ ID NO: 35, яка складає 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % або 99 %, але яка зберігає CDR (SEQ ID NO: 23-25 або їх варіанти) та необов'язково зберігає одну або більше або усі зворотні мутації.

У одному з варіантів здійснення VH має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 34, а VL має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 38. У одному з варіантів здійснення VH має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 35, а VL має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 39. Слід відмітити, що кожна з перерахованих послідовностей також може бути замінена їх біологічними еквівалентами.

Фахівцеві у даній галузі техніки також буде ясно, що антитіла, розкриті у даному документі, можуть бути модифіковані таким чином, що їх амінокислотна послідовність буде відрізнятися від природного зв'язуючого поліпептиду, від якого вони походять. Наприклад, поліпептидна або амінокислотна послідовність, що походить з позначеного білку, може бути схожою, наприклад, 5 мати певний відсоток ідентичності вихідної послідовності, наприклад, вона може бути на 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % або 99 % ідентична вихідній послідовності.

Антитіла та фрагменти згідно з даним винаходом у деяких варіантах здійснення можуть являти собою моноспецифічні або біспецифічні антитіла або фрагменти. Біспецифічне антитіло також може бути специфічне до іншого епітопу-мішені ГМ-КСФ або до іншого білку-мішені, 10 причому ця специфічність придатна для певного застосування, наприклад, для терапевтичного застосування. У одному з аспектів білком-мішенню є цитокін, такий як TNF-альфа (фактор некрозу пухлини-альфа), IL(інтерлейкін)-6, IL-1 та IL-17. У ще одному аспекті білок-мішень являє собою хемокін, такий як CCL2, CXCL12 та CXCL13. У ще одному аспекті білок-мішень являє собою білок клітинної поверхні, такий як CD3, CSF-1R, CD20 та CD73.

У окремих варіантах здійснення антитіло містить амінокислотну послідовність або один або 15 більше фрагментів, які звичайно не пов'язані з антитілом. Приклади модифікацій більш докладно описані нижче. Наприклад, антитіло згідно з винаходом може містити гнучку лінкерну послідовність або може бути модифіковане з додаванням функціонального фрагменту (наприклад, ПЕГ (поліетиленгліколю), лікарського засобу, токсину або мітки).

Антитіла, їх варіанти або похідні згідно з винаходом включають похідні, які є 20 модифікованими, тобто шляхом ковалентного приєднання молекули будь-якого типу до антитіла таким чином, що ковалентне приєднання не перешкоджає зв'язуванню антитіла з епітопом. Наприклад, не обмежуючись перерахованим, антитіла можуть бути модифіковані, наприклад, шляхом глікозилювання, ацетилювання, пегілювання, фосфорилування, амідуювання, 25 дериватизації відомими захисними/блокувальними групами, протеолітичного розщеплення, зв'язування із клітинним лігандом або іншим білком і т.д. Будь-яка із численних хімічних модифікацій може бути здійснена за відомими методами, включаючи, не обмежуючись перерахованим, специфічне хімічне розщеплення, ацетилювання, формілювання, метаболічний синтез тунікаміцину і т.д. Крім того, антитіла можуть містити одну або більше неканонічних амінокислот. 30

У деяких варіантах здійснення антитіла можуть бути кон'юговані або зв'язані іншими способами з іншою молекулою з утворенням біфункціональної молекули. Друга молекула може являти собою одне з терапевтичних агентів, проліків, пептидів, білків, ферментів, вірусів, ліпідів, модифікаторів біологічної відповіді, фармацевтичних агентів або ПЕГ. Деякими необмежуваними 35 прикладами є цитокіни або інші розчинні фактори, такі як IL-10, IL-25, IL-27, IL-33, IL-35 та IL-36. У деяких варіантах здійснення також запропоновані кон'югати антитіло-лікарський засіб, що включають антитіло або фрагмент відповідно до даного винаходу та низькомолекулярний лікарський засіб.

Антитіла можуть бути кон'юговані або злиті з терапевтичним агентом, який може включати 40 детектусмі мітки, такі як радіоактивні мітки, імуномодулятор, гормон, фермент, олігонуклеотид, фотоактивний терапевтичний або діагностичний агент, цитотоксичний агент, який може являти собою лікарський засіб або токсин, агент, що підсилює контраст ультразвукового зображення, нерадіоактивну мітку, їх комбінацію та інші подібні агенти, відомі у даній галузі техніки.

Антитіла можуть бути мічені з можливістю виявлення шляхом зв'язування з 45 хемілюмінесцентною сполукою. Присутність міченого хемілюмінесцентною сполукою антиген-зв'язуючого поліпептиду потім визначають шляхом виявлення люмінесценції, що виникає у ході хімічної реакції. Прикладами сполук, що особливо підходять у якості хемілюмінесцентної мітки, є люмінол, ізолюмінол, ароматичний складний ефір акридинію, імідазол, сіль акридинію та складний ефір оксалату.

Антитіла також можуть бути мічені з можливістю виявлення з використанням металів, що випромінюють флуоресцентне випромінювання, таких як ¹⁵²Eu або інші метали сімейства лантаноїдів. Ці метали можуть бути приєднані до антитіла з використанням таких груп, що утворюють комплекси з металами, як діетилентриамінпентаоцтова кислота (DTPA) або етилендіамінтетраоцтова кислота (EDTA). Методики кон'югування різних фрагментів з 50 антитілами добре відомі, див. наприклад, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (під ред.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al., (під ред.), Marcel Dekker, Inc., pp. 623- 53 (1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (під ред.), pp. 475-506 60

(1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (під ред.), Academic Press pp. 303-16 (1985), та Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.* (52:119-58 (1982)).

5 Полінуклеотиди, які кодують антитіла, та способи одержання антитіл

Даний винахід також відноситься до виділених полінуклеотидів або молекул нуклеїнової кислоти, що кодують антитіла, їх варіанти або похідні згідно з даним винаходом. Полінуклеотиди відповідно до даного винаходу можуть кодувати цілі варіабельні області важкого та легкого ланцюгів антигензв'язуючих поліпептидів, їх варіантів або похідних на одній і тій же молекулі полінуклеотиду або на окремих молекулах полінуклеотидів. Крім того, полінуклеотиди відповідно до даного винаходу можуть кодувати частини варіабельних областей важкого та легкого ланцюгів антигензв'язуючих поліпептидів, їх варіантів або похідних на одній і тій же молекулі полінуклеотиду або на окремих молекулах полінуклеотидів.

10 Способи одержання антитіл добре відомі у даній галузі техніки та описані у даному документі. У деяких варіантах здійснення як варіабельні, так і константні області антигензв'язуючих поліпептидів відповідно до даного винаходу є повністю людськими. Повністю людські антитіла можуть бути отримані з використанням методик, описаних у даній галузі техніки та у даному документі. Наприклад, повністю людські антитіла проти певного антигену можуть бути отримані шляхом введення антигену трансгенній тварині, яка була модифікована для вироблення таких антитіл у відповідь на провокацію антигеном, при цьому її власні локуси були дезактивовані. Приклади методик, які можуть бути використані для одержання таких антитіл, описані у патентах США №№ 6150584, 6458592, 6420140, повністю включених у даний документ за допомогою посилання.

У деяких варіантах здійснення отримані антитіла не будуть викликати пагубної імунної відповіді у тварини, що підлягає лікуванню, наприклад, у людини. У одному з варіантів здійснення антигензв'язуючі поліпептиди, їх варіанти або похідні згідно із даним винаходом модифіковані для зниження їх імуногенності з використанням відомих у даній галузі техніки методик. Наприклад, антитіла можуть бути гуманізованими, приматизованими, деімунізованими, або можуть бути отримані химерні антитіла. Ці типи антитіл походять від антитіла, що не є людським, звичайно від антитіла миші або примата, яке зберігає або по суті зберігає антигензв'язуючі властивості вихідного антитіла, але є менш імуногенним для людей. Це може бути досягнуте різними способами, включаючи (а) щеплення цілих варіабельних доменів, що не є людськими, на людські константні області для одержання химерних антитіл; (б) щеплення щонайменше частини однієї або більше визначальних комплементарних областей (CDR), що не є людськими, на людські каркасну та константну області зі збереженням або без збереження ключових залишків каркасної області; або (с) трансплантація цілих варіабельних доменів, що не є людськими, при цьому "маскуючи" їх схожою з людською ланкою шляхом заміни поверхневих залишків. Такі способи розкриті у Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57:6851-6855 (1984); Morrison et al., *Adv. Immunol.* 44:65-92 (1988); Verhoeyen et al., *Science* 239:1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.* 25:489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immun.* 31:169-217 (1994), та патентах США №№ 5585089, 5693761, 5693762, та 6190370, усі з яких повністю включені у даний документ за допомогою посилання.

Деімунізація також може бути використана для зниження імуногенності антитіла. У контексті даного документу термін "деімунізація" включає зміну антитіла шляхом модифікації Т-клітинних епітопів (див., наприклад, публікації міжнародних заявок №№ WO/9852976 A1 та WO/0034317 A2). Наприклад, аналізуються послідовності варіабельної області важкого ланцюгу та варіабельної області легкого ланцюгу з вихідного антитіла та створюється "карта" людського Т-клітинного епітопу з кожної V-області, що показує розташування епітопів відносно визначальних комплементарних областей (CDR) та інших ключових залишків у послідовності. Індивідуальні Т-клітинні епітопи з карти Т-клітинних епітопів аналізуються для виявлення альтернативних амінокислотних замін з низьким ризиком зміни активності кінцевого антитіла. Розробляється ряд альтернативних послідовностей варіабельної області важкого та легкого ланцюгів, що містять комбінації амінокислотних замін, та ці послідовності згодом включаються у ряд зв'язуючих поліпептидів. Як правило, одержують від 12 до 24 варіантів антитіл та досліджують на зв'язування та/або функцію. Повні гени важкого та легкого ланцюгів, що містять модифіковані варіабельні та людські константні області, потім клонують у експресійні вектори, та отримані плазміди вводять у клітинні лінії для одержання цілого антитіла. Потім антитіла порівнюють у відповідних біохімічних та біологічних аналізах та визначають оптимальний варіант.

Специфічність зв'язування антигензв'язуючих поліпептидів згідно з даним винаходом може бути визначена за допомогою аналізів *in vitro*, таких як імунопреципітація, радіоімуноаналіз (PIA) або імуноферментний аналіз (ELISA).

У якості альтернативи методики, описані для одержання одноланцюгових одиниць (патент США № 4694778; Bird, Science 242:423-442 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 55:5879- 5883 (1988); та Ward et al., Nature 334:544-554 (1989)), можуть бути адаптовані для одержання одноланцюгових одиниць згідно з даним винаходом. Одноланцюгові одиниці утворюються шляхом зв'язування фрагментів важкого та легкого ланцюгів області Fv за допомогою амінокислотного містка, що приводить до утворення одноланцюгового злитого пептиду. Також можуть бути використані методики складання функціональних фрагментів Fv у *E.coli* (Skerra et al., Science 242: 1038-1041 (1988)).

Приклади методик, які можуть бути використані для одержання одноланцюгових Fv (scFv) та антитіл, включають описані у патентах США №№ 4946778 і 5258498; Huston et al., Methods in Enzymology 203:46-88 (1991); Shu et al., Proc. Natl. Sci. USA 90:1995-1999 (1993); та Skerra et al., Science 240:1038-1040 (1988). Для деяких застосувань, включаючи застосування антитіл *in vivo* у людей та аналізи на виявлення *in vitro*, може бути кращим використання химерних, гуманізованих або людських антитіл. Химерне антитіло являє собою молекулу, у якій різні частини антитіла походять із різних видів тварин, такі як антитіла, що мають варіабельну область, що походить з мишачого моноклонального антитіла, та константну область із людського імуноглобуліну. Способи одержання химерних антитіл відомі у даній галузі техніки. Див., наприклад, джерела Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., Biotechniques 4:214 (1986); Gillies et al., J. Immunol. Methods 125:191-202 (1989); патенти США №№ 5807715, 4816567, та 4816397, повністю включені у даний документ за допомогою посилання.

Гуманізовані антитіла являють собою молекули антитіл, отримані з антитіл, що походять від виду, що не є людиною, які зв'язують бажаний антиген, що мають одну або більше визначальних комплементарних областей (CDR) з виду, що не є людиною, та каркасних областей з молекули людського імуноглобуліну. Часто каркасні залишки у людських каркасних областях будуть замінені відповідним залишком з антитіла-донора CDR, щоб змінити, переважно поліпшити, зв'язування антигену. Ці заміни у каркасній області виявляють за способами, добре відомими у даній галузі техніки, наприклад, моделюванням взаємодій CDR та каркасних залишків для виявлення каркасних залишків, важливих для зв'язування антигену, та порівнянням послідовностей для виявлення незвичайних каркасних залишків у певних положеннях. (Див., наприклад, джерела Queen et al., патент США № 5585089; Riechmann et al., Nature 332:323 (1988), повністю включені у даний документ за допомогою посилання). Антитіла можуть бути гуманізовані з використанням різних методик, відомих у даній галузі техніки, включаючи, наприклад, щеплення CDR (EP 239400; публікація заявки PCT WO 91/09967; патенти США №№ 5225539, 5530101 і 5585089), венірування або зміну поверхні (EP 592106, EP 519596; Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska. et al., Proc. Natl. Sci. USA 91:969-973 (1994)) та перестановку ланцюгів (патент США № 5565332, повністю включений за допомогою посилання).

Повністю людські антитіла особливо бажані для терапії у людей. Людські антитіла можуть бути отримані за різними способами, відомими у даній галузі техніки, включаючи способи фагового дисплея з використанням бібліотек антитіл, отриманих з послідовностей людських імуноглобулінів. Див. також патенти США №№ 4444887 та 4716111; та публікації заявок PCT WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 та WO 91/10741; кожен з яких повністю включений у даний документ за допомогою посилання.

Людські антитіла також можуть бути отримані з використанням трансгенних мишей, які нездатні експресувати власні функціональні імуноглобуліни, але здатні експресувати гени людського імуноглобуліну. Наприклад, генні комплекси важкого та легкого ланцюгів людського імуноглобуліну можуть бути випадковим чином або шляхом гомологічної рекомбінації введені у ембріональні стовбурові клітини миші. У якості альтернативи, у ембріональні стовбурові клітини миші на додаток до генів людського важкого та легкого ланцюгу можуть бути введені людська варіабельна область, константна область та D-область. Гени важкого та легкого ланцюгу мишачого імуноглобуліну можуть бути зроблені нефункціональними окремо або одночасно із введенням локусів людського імуноглобуліну шляхом гомологічної рекомбінації. Зокрема, гомозиготна делеція області JH запобігає виробленню власних антитіл. Модифіковані ембріональні стовбурові клітини розмножують та вводять шляхом мікроін'єкції у бластоцисти для одержання химерних мишей. Потім химерних мишей схрещують для одержання гомозиготного потомства, що експресує людські антитіла. Трансгенних мишей імунізують зворотним антигеном звичайним чином, наприклад, усім або частиною бажаного цільового

поліпептиду. Моноклональні антитіла, спрямовані проти антигену, можуть бути отримані від імунізованих трансгенних мишей з використанням звичайної гібридомної технології. Трансгени людського імуноглобуліну, які несуть трансгенні миші, перебудовуються під час диференціювання В-клітин та згодом піддаються перемиканню класів та соматичним мутаціям. Таким чином, використовуючи таку методику, можна одержати терапевтично придатні антитіла IgG, IgA, IgM та IgE. Огляд цієї технології одержання людських антитіл наведений у Lonberg and Huszar *Int. Rev. Immunol.* 73:65-93 (1995). Докладне обговорення цієї технології одержання людських антитіл та людських моноклональних антитіл та інструкції для одержання таких антитіл наведені, наприклад, у публікаціях заявок РСТ WO 98/24893, WO 96/34096, WO 96/33735; патентах США №№ 5413923, 5625126, 5633425, 5569825, 5661016, 5545806, 5814318 та 5939598, повністю включених у даний документ за допомогою посилання. Крім того, такі компанії, як Abgenix, Inc. (Фримонт, Каліфорнія) та GenPharm (Сан-Хосе, Каліфорнія) можуть на замовлення надати людські антитіла, спрямовані проти обраного антигену, використовуючи технологію, схожу з описаною вище.

Повністю людські антитіла, що розпізнають обраний епітоп, також можуть бути отримані з використанням методики, яка називається "керований відбір". У цьому підході обране моноклональне антитіло, що не є людським, наприклад, мишаче антитіло, використовується як орієнтир для відбору повністю людського антитіла, що розпізнає той же епітоп. (Jespersen et al., *Bio/Technology* 72:899-903 (1988). Див. також патент США № 5565332, повністю включений за допомогою посилання).

У ще одному варіанті здійснення ДНК, що кодує бажані моноклональні антитіла, може бути легко виділена та секвенована з використанням звичайних процедур (наприклад, з використанням олігонуклеотидних зондів, здатних специфічно зв'язуватися з генами, що кодують важкі та легкі ланцюги мишачих антитіл). Виділені та субклоновані гібридомні клітини слугують кращим джерелом такої ДНК. Після виділення ДНК може бути поміщена у експресійні вектори, які потім трансфікують у прокаріотичні або еукаріотичні клітини-хазяї, такі як клітини *E. coli*, мавпячі клітини COS, клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO) або клітини мієломи, які у протилежному випадку не виробляють імуноглобуліни. Більш конкретно, виділена ДНК (яка може бути синтетичною, як описано у даному документі) може бути використана для клонування послідовностей константної та варіабельної областей для одержання антитіл, як описано у Newman et al., патент США № 5658570 з датою подачі заявки 25 січня 1995 р., включений у даний документ за допомогою посилання. По суті, це спричиняє виділення РНК із обраних клітин, перетворення у кДНК та ампліфікацію за допомогою ПЛР із використанням Ig-специфічних праймерів. Підходящі для цієї мети праймери також описані у патенті США № 5658570. Як більш докладно обговорюється нижче, трансформовані клітини, які експресують бажане антитіло, можуть бути вирощені у відносно великих кількостях для забезпечення поставок імуноглобуліну у клінічних та комерційних цілях.

Крім того, за допомогою рутинних методів рекомбінантної ДНК один або більше CDR антигензв'язуючих поліпептидів згідно з даним винаходом можуть бути вставлені у каркасні області, наприклад, у людські каркасні області, для гуманізації антитіла, що не є людським. Каркасні області можуть являти собою природні або консенсусні каркасні області, та переважно людські каркасні області (список людських каркасних областей див., наприклад, у Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 278:457-479 (1998)). Переважно поліпептид, утворений комбінацією каркасних областей та CDR, кодує антитіло, яке специфічно зв'язується з щонайменше одним епітопом бажаного поліпептиду, наприклад, LIGHT. Переважно у каркасних областях можуть бути зроблені одна або більше амінокислотних замінів та, переважно, амінокислотні заміни поліпшують зв'язування антитіла з його антигеном. Крім того, такі способи можуть бути використані для здійснення амінокислотних замінів або делецій одного або більше залишків цистеїну у варіабельній області, що беруть участь у внутрішньоланцюговому дисульфідному зв'язку, для одержання молекул антитіл, позбавлених одного або більше внутрішньоланцюгових дисульфідних зв'язків. Інші зміни поліпептиду входять у обсяг даного винаходу та знаходяться у межах знань фахівця у даній галузі техніки.

Крім того, можуть бути використані методики, розроблені для одержання "химерних антитіл" (Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*:851-855 (1984); Neuberger et al., *Nature* 372:604-608 (1984); Takeda et al., *Nature* 314:452-454 (1985)) шляхом сплайсингу генів з молекули мишачого антитіла, що має підходящу антигенну специфічність, разом з генами з молекули людського антитіла, що має підходящу біологічну активність. У контексті даного документа химерне антитіло являє собою молекулу, у якій різні частини походять із різних видів тварин, такі як антитіла, що мають варіабельну область, що походить з мишачого моноклонального антитіла, та константну область людського імуноглобуліну.

Ще один високоефективний засіб для одержання рекомбінантних антитіл описаний у Newman, Biotechnology 10: 1455-1460 (1992). А саме, за допомогою цієї методики одержують приматизовані антитіла, що містять мавпячі варіабельні домени та людські константні послідовності. Це джерело повністю включене у даний документ за допомогою посилання. Крім того, ця методика також описана у патентах США №№ 5658570, 5693780 та 5756096, що належать тому самому патентовласникові, кожен з яких включений у даний документ за допомогою посилання.

У якості альтернативи можуть бути вибрані та культивовані клітинні лінії, що виробляють антитіла, з використанням методик, добре відомих фахівцям у даній галузі техніки. Такі методики описані у різних лабораторних настановах та первинних публікаціях. У цьому зв'язку методики, що підходять для використання у даному винаході, як описано нижче, описані у джерелі Current Protocols in Immunology, Coligan et al., Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991), повністю включеному у даний документ за допомогою посилання, включаючи додатки.

Крім того, стандартні методики, відомі фахівцям у даній галузі техніки, можуть бути використані для введення мутацій у нуклеотидну послідовність, що кодує антитіло згідно з даним винаходом, включаючи, не обмежуючись перерахованим, сайт-спрямований мутагенез та ПЛР-опосередкований мутагенез, які приводять до виникнення амінокислотних замінів. Переважно, варіанти (включаючи похідні) кодують менше 50 амінокислотних замінів, менше 40 амінокислотних замінів, менше 30 амінокислотних замінів, менше 25 амінокислотних замінів, менше 20 амінокислотних замінів, менше 15 амінокислотних замінів, менше 10 амінокислотних замінів, менше 5 амінокислотних замінів, менше 4 амінокислотних замінів, менше 3 амінокислотних замінів або менше 2 амінокислотних замінів відносно референсної варіабельної області важкого ланцюгу, CDR-H1, CDR -H2, CDR-H3, варіабельної області легкого ланцюгу, CDR-L1, CDR-L2 або CDR-L3. У якості альтернативи, мутації можуть бути введені випадковим чином по всій або частині кодуєчої послідовності, наприклад, шляхом мутагенезу, що насичує, та отримані мутанти можуть бути піддані скринінгу на біологічну активність для виявлення мутантів, що зберегли активність.

Способи лікування та застосування

Як описано у даному документі, антитіла, варіанти або похідні відповідно до даного винаходу можуть бути використані у певних способах лікування та діагностики.

Даний винахід додатково відноситься до видів терапії на основі антитіл, що включають введення антитіл згідно з винаходом пацієнтові, такому як тварина, ссавець та людина, для лікування одного або більше розладів або станів, описаних у даному документі. Терапевтичні сполуки згідно з винаходом включають, не обмежуючись перерахованим, антитіла згідно з винаходом (включаючи їх варіанти та похідні, як описано у даному документі) та нуклеїнові кислоти або полінуклеотиди, що кодують антитіла згідно з винаходом (включаючи їх варіанти та похідні, як описано у даному документі).

Антитіла та фрагменти відповідно до даного винаходу у деяких варіантах здійснення можуть бути використані для виготовлення лікарського засобу для лікування запального або аутоімунного захворювання або розладу, або раку. Також вважають, що антитіла та фрагменти відповідно до даного винаходу ефективні для лікування механізмів, що лежать у основі болю, або самого болю.

Гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор (ГМ-КСФ) спочатку був відомий своєю здатністю генерувати колонії як гранулоцитів, так і макрофагів з попередників кісткового мозку. Також було показано, що він діє на зрілі мієлоїдні клітини як фактор виживання, активації та диференціювання. Нещодавні дослідження показують, що ГМ-КСФ також має велику кількість прозапальних функцій та відіграє ключову роль у розвитку аутоімунних та запальних захворювань.

ГМ-КСФ сприяє виживанню та активації макрофагів, нейтрофілів та еозинофілів, а також дозріванню дендритних клітин (DC). ГМ-КСФ може поляризувати макрофаги у M1-подібні запальні макрофаги, які виробляють різні запальні цитокіни, такі як TNF, IL-6, IL-12p70, IL-23 або IL-1 β , і, таким чином, стимулюють відповіді Th1-Th17. З іншого боку, також повідомляється, що асоціація ГМ-КСФ та імунної відповіді Th2 також спостерігається при алергійному запаленні дихальних шляхів.

Рецептор ГМ-КСФ складається з α -субодиниці, що зв'язує ГМ-КСФ із низькою афінністю (GMR α), та β -субодиниці, що передає сигнал, яка є загальною для рецепторів IL-3 та IL-5. Бінарний комплекс ГМ-КСФ та GMR α взаємодіє з вільною β -субодиницею та утворює високоафінний гексамерний комплекс. Додекамерні комплекси, утворені бічною агрегацією двох гексамерних комплексів, дозволяють Jak2, зв'язаному з β -субодиницею, димеризуватися та

трансфосфорилувати, у той час як гексамерні комплекси не дозволяють цього. Ця структура приводить до дозозалежних відповідей на активацію рецептору ГМ-КСФ. Низька концентрація ГМ-КСФ, така, як спостережувана у нормі, викликає фосфорилування Ser585 β с та активує сигнальний шлях 14-3-3/кінази PI-3, що приводить тільки до виживання клітин. Більш висока

концентрація ГМ-КСФ, така, як спостережувана при запальних станах, відключає фосфорилування Ser585 β с та опосередковане фосфорилування Tyr577 β с та активацію сигнального шляху Jak2/STAT5, сигнального шляху Ras/мітоген-активованої протеїнкінази та сигнального шляху кінази PI-3, що приводить до стимуляції клітинного виживання, проліферації та активації.

Широкий спектр клітин може виробляти ГМ-КСФ. Основними джерелами ГМ-КСФ є Т- та В-клітини, моноцити/макрофаги, ендотеліальні клітини та фібробласти. Нейтрофіли, еозинофіли, епітеліальні клітини, мезотеліальні клітини, клітини Панета, хондроцити та пухлинні клітини також можуть виробляти ГМ-КСФ. Вироблення ГМ-КСФ стимулюється різними факторами, включаючи TNF, IL-1, агоністи толл-подібних рецепторів та простагландин E2. Останнім часом була з'ясована патогенність ГМ-КСФ-виробляючих CD4 Т-клітин при аутоімунних та запальних захворюваннях, яка привертає все більшу увагу.

Останні дані показали, що ГМ-КСФ відіграє ключову роль у розвитку багатьох аутоімунних захворювань. Деpleція або дезактивація ГМ-КСФ пригнічує багато моделей аутоімунних захворювань, включаючи експериментальний аутоімунний енцефаломієліт (ЕАЕ), артрит, пов'язане з артритом інтерстиціальне захворювання легенів, нефрит або псоріаз. Також передбачається, що інгібування ГМ-КСФ може бути ефективним для лікування раку.

У деяких варіантах здійснення запального захворювання або стан, який необхідно лікувати розкритими антитілами, фрагментами та композиціями, включає одну або більше з хвороби Альцгеймера, хвороби Аддісона, атеросклерозу, анкілозуючого спондиліту, артриту, остеоартриту (ОА), ревматоїдного артриту (РА), псоріатичного артриту (ПА), анкілозуючого спондиліту, астми, атеросклерозу, хронічної обструктивної хвороби легень (ХОХЛ), хвороби Крона, коліту, дерматиту, дивертикуліту, фіброміалгії, гепатиту, синдрому подразненого кишечника (СПК), системного червоного вовчаку (СЧВ), нефриту, хвороби Паркінсона (ХП), васкуліту та виразкового коліту.

У деяких варіантах здійснення аутоімунне захворювання або стан, який необхідно лікувати розкритими антитілами, фрагментами та композиціями, включає одне або більше з осередкової алопеції, аутоімунної гемолітичної анемії, аутоімунного гепатиту, дерматоміозиту, діабету (1 типу), целиакії, аутоімунного ювенільного ідіопатичного артриту, гломерулонефриту, хвороби Грейвса, синдрому Гієна-Барре, ідіопатичної тромбоцитопенічної пурпури, міастенії гравіс, аутоімунного міокардиту, розсіяного склерозу, пемфігусу/пемфігоїду, перніціозної анемії, вузликового поліартеріїту, поліміозиту, первинного біліарного цирозу, псоріазу, ревматоїдного артриту, склеродермії/системного склерозу, синдрому Шегрена, системного червоного вовчаку, аутоімунного тиреоїдиту, тиреоїдиту Хашимото, аутоімунного увеїту, вітиліго та гранулематозу з поліангіїтом (Вегенера).

Ревматоїдний артрит (РА) являє собою тривалий аутоімунний розлад, що у першу чергу уражує суглоби. Звичайно приводить до теплих, набряклих та хворобливих суглобів. Біль та скутість часто погіршуються після відпочинку. Найчастіше уражуються зап'яски та кисті рук, при цьому ті самі суглоби звичайно уражуються на обох сторонах тіла. Захворювання також може уражувати інші частини тіла. Хоча причина ревматоїдного артриту незрозуміла, вважається, що він пов'язаний з комбінацією генетичних факторів та факторів впливу навколишнього середовища. Механізм, що лежить у основі, включає атаку суглобів імунною системою організму. Це приводить до запалення та потовщення суглобної капсули. Мета лікування полягає у зменшенні болю, зниженні запалення та поліпшенні рівня загальної життєдіяльності людини. Для полегшення симптомів часто використовуються знеболюючі засоби, стероїди та НПЗП (нестероїдні протизапальні препарати). Для того, щоб спробувати уповільнити прогресування захворювання, може бути використана група лікарських засобів, які називаються хворобо-модифікуючими антиревматичними препаратами (ХМАРП), таких як гідроксихлорохін та метотрексат.

Остеоартрит (ОА) являє собою тип захворювання суглобів, що виникає у результаті руйнування суглобового хряща та кістки, що знаходиться під ним. Найпоширенішими симптомами є біль та скутість суглобів. Спочатку симптоми можуть з'являтися тільки після фізичних вправ, але згодом можуть стати постійними. Інші симптоми можуть включати набряк суглобів, зменшення діапазону рухів, а у випадку ураження спини – слабкість або оніміння рук та ніг. Причини включають попередню травму суглоба, патологічний розвиток суглобу або кінцівки та спадкові фактори. Ризик вище у тих, хто має надлишкову вагу, різну довжину ніг та

роботу, що приводить до високого рівня навантаження на суглоби. Вважається, що остеоартрит викликаний механічним навантаженням на суглоб та слабо вираженими запальними процесами. Лікування включає фізичні вправи, зусилля щодо зниження навантаження на суглоби, групи підтримки та знеболюючі засоби.

5 Розсіяний склероз (РС) являє собою демієлінізуюче захворювання, при якому ушкоджуються ізолюючі оболонки нервових клітин головного та спинного мозку. Це ушкодження порушує здатність частин нервової системи до сполучення, що приводить до ряду ознак та симптомів, включаючи фізичні, психічні, а іноді і психіатричні проблеми. Конкретні симптоми можуть включати подвоєння у очах, сліпоту на одне око, м'язову слабкість, проблеми з чуттєвим
10 сприйняттям або проблеми з координацією. Хоча причина захворювання незрозуміла, механізмом, що лежать у основі, вважається або ураження імунної системи, або порушення функції клітин, що виробляють мієлін. На даний момент не існує способу вилікувати розсіяний склероз. Лікування спрямоване на поліпшення функції після атаки та запобігання нових атак.

Астма являє собою розповсюджене тривале запальне захворювання дихальних шляхів
15 легенів. Воно характеризується мінливими та повторюваними симптомами, оборотною обструкцією дихальних шляхів та бронхоспазмом. Симптоми включають епізоди хрипів, кашлю, відчуття стискання у грудній клітці та ускладнення дихання. Вважається, що астма викликана комбінацією генетичних факторів та факторів впливу навколишнього середовища. Фактори впливу навколишнього середовища включають вплив забруднень повітря та алергенів. Астму класифікують залежно від частоти симптомів, обсягу форсованого видиху за 1 секунду (ОФВ1)
20 та пікової швидкості видиху. Вона також може бути класифікована як атопічна або неатопічна, де атопія відноситься до схильності до розвитку реакції гіперчутливості 1 типу. Способу вилікувати астму не існує. Симптоми можна запобігти, уникаючи тригерів, таких як алергени та подразники, та шляхом використання інгаляційних кортикостероїдів. Бета-агоністи тривалої дії (LABA) або антилейкотриєнові агенти можуть бути використані на додаток до інгаляційних кортикостероїдів, якщо симптоми астми залишаються неконтрольованими. Лікування симптомів,
25 які швидко погіршуються, звичайно проводять за допомогою інгаляційного бета-2-агоністу короткої дії, такого як сальбутамол, та кортикостероїдів, які приймають перорально. У дуже важких випадках може знадобитися внутрішньовенне введення кортикостероїдів, сульфату магнію та госпіталізація.
30

Хронічна обструктивна хвороба легенів (ХОХЛ) являє собою тип обструктивної хвороби легенів, що характеризується обмеженням повітряного потоку протягом тривалого часу. ХОХЛ може включати два основні стани – емфізему та хронічний бронхіт. При емфіземі ушкоджуються стінки між великою кількістю альвеолярних мішечків. У результаті альвеолярні мішечки
35 втрачають свою форму та стають м'якими. Це ушкодження також може зруйнувати стінки альвеолярних мішечків, що приводить до зменшення їх кількості та збільшення розміру замість великої кількості маленьких альвеолярних мішечків. Якщо це відбувається, легенева здатність до газообміну зменшується. При хронічному бронхіті слизова оболонка дихальних шляхів залишається постійно подразненою та збудженою, що викликає її набряк. У дихальних шляхах
40 утворюється велика кількість густого слизу, що ускладнює дихання. Не існує відомого способу вилікувати ХОХЛ, однак симптоми піддаються лікуванню та прогресування захворювання може бути відстрочене.

Біль являє собою неприємне відчуття, часто викликане сильними або заподіюючими шкоду подразниками, такими як забій пальця ноги, опік пальця, нанесення спирту на поріз або забиття
45 ліктьового відростку. Біль являє собою складне, суб'єктивно сприймане явище, визначення болю було складним завданням. Біль також відносять до неприємного сенсорного та емоційного досвіду, пов'язаного з фактичним або можливим ушкодженням тканин. Біль іноді розглядають як симптом первинного захворювання, такого як запалення.

У деяких варіантах здійснення запропоновані способи лікування раку у пацієнта, якому це
50 необхідно. Спосіб у одному з варіантів здійснення включає введення зазначеному пацієнтові ефективної кількості антитіла відповідно до даного винаходу.

Необмежуючі приклади ракових захворювань включають рак сечового міхура, рак молочної залози, колоректальний рак, рак ендометрію, рак стравоходу, рак голови та шиї, рак нирки, лейкоз,
55 рак печінки, рак легені, лімфому, меланому, рак підшлункової залози, рак передміхурової залози та рак щитовидної залози.

Додаткові захворювання або стани, пов'язані з підвищеною виживаністю клітин, що підлягають лікуванню, попередженню, діагностиці та/або прогнозуванню за допомогою антитіл або їх варіантів або похідних згідно з винаходом, включають, не обмежуючись перерахованим, прогресування та/або метастази злоякісних утворень та асоційовані розлади, такі як лейкоз (у
60 тому числі гострі лейкози (наприклад, гострий лімфоцитарний лейкоз, гострий мієлоцитарний

лейкоз (у тому числі мієлобластний, промієлоцитарний, мієломоноцитарний, моноцитарний лейкоз та еритролейкоз)) та хронічні лейкози (наприклад, хронічний мієлоцитарний (гранулоцитарний) лейкоз та хронічний лімфоцитарний лейкоз), справжня поліцитемія, лімфоми (наприклад, хвороба Ходжкіна та неходжкінська лімфома), множинна мієлома, макроглобулінемія Вальденстрема, хвороба важких ланцюгів та солідні пухлини, у тому числі, не обмежуючись перерахованими, саркоми та карциноми, такі як фібросаркома, міксосаркома, ліпосаркома, хондросаркома, остеогенна саркома, хордома, ангіосаркома, ендотеліосаркома, лімфангіосаркома, лімфангіоендотеліосаркома, синовіома, мезотеліома, пухлина Юінга, лейоміосаркома, рабдоміосаркома, карцинома ободової кишки, рак підшлункової залози, рак молочної залози, рак яєчників, рак передміхурової залози, плоскоклітинна карцинома, базально-клітинна карцинома, аденокарцинома, карцинома потових залоз, карцинома сальних залоз, папілярна карцинома, папілярні аденокарциноми, цистаденокарцинома, медуллярна карцинома, бронхогенна карцинома, нирковоклітинний рак, гепатома, карцинома жовчних проток, хоріокарцинома, семінома, ембріональна карцинома, пухлина Вільмса, рак шейки матки, пухлина яєчка, карцинома легені, дрібноклітинна карцинома легені, карцинома сечового міхура, епітеліальна карцинома, гліома, астроцитиома, медулобластома, краніофарингіома, епендимома, пінеалома, гемангіобластома, акустична невринома, олігодендрогліома, менингіома, меланома, нейробластома та ретинобластома.

Конкретне дозування та режим лікування для будь-якого конкретного пацієнта будуть залежати від безлічі факторів, включаючи конкретні використовувані антитіла, їх варіант або похідну, вік, масу тіла, загальний стан здоров'я, стать та режим харчування пацієнта, а також час введення, швидкість виведення, комбінацію призначених лікарських засобів та важкість конкретного захворювання, що необхідно лікувати. Оцінка таких факторів медичними працівниками знаходиться у межах звичайної кваліфікації фахівця у даній галузі техніки. Кількість також буде залежати від конкретного пацієнта, якого необхідно лікувати, способу введення, типу рецептури, характеристик використовуваної сполуки, важкості захворювання та бажаного ефекту. Використовувана кількість може бути визначена за допомогою фармакологічних та фармакокінетичних принципів, добре відомих у даній галузі техніки.

Способи введення антитіл або їх варіантів включають, не обмежуючись перерахованим, внутрішньошкірний, внутрішньом'язовий, внутрішньоочеревинний, внутрішньовенний, підшкірний, інтраназальний, епідуральний та пероральний шляхи. Антигензв'язуючі поліпептиди або композиції можуть бути введені будь-яким підходящим шляхом, наприклад, шляхом інфузії або болюсної ін'єкції, шляхом абсорбції через епітеліальну вистилку або слизову оболонку (наприклад, слизову оболонку порожнини рота, слизову оболонку прямої кишки та кишечника і т.д.), та можуть бути введені разом з іншими біологічно активними агентами. Таким чином, фармацевтичні композиції, що містять антигензв'язуючі поліпептиди відповідно до даного винаходу, можуть бути введені перорально, ректально, парентерально, інтрацистернально, інтравагінально, внутрішньоочеревинно, місцево (наприклад, за допомогою порошоків, мазей, крапель або трансдермального пластиру), букально або у вигляді перорального або назального спрею.

У контексті даного документу термін "парентеральний" відноситься до способів введення, що включають внутрішньовенну, внутрішньом'язову, внутрішньоочеревинну, інтрастернальну, підшкірну та внутрішньосуглобну ін'єкцію та інфузію.

Введення може бути системним або місцевим. Крім того, може бути бажаним введення антитіл згідно з винаходом у центральну нервову систему будь-яким підходящим шляхом, включаючи внутрішньошлуночкову та інтратекальну ін'єкцію; внутрішньошлуночкова ін'єкція може бути спрощена за допомогою внутрішньошлуночкового катетера, наприклад, приєднаного до резервуара, такого як резервуар Оммая. Також може бути використане пульмональне введення, наприклад, за допомогою інгалятора або небулайзера та рецептури з розпорошуючим агентом.

Може бути бажане вводити антигензв'язуючі поліпептиди або композиції згідно з винаходом місцево у область, яка потребує лікування; це може бути досягнуте, наприклад, але не обмежуючись перерахованим, шляхом місцевої інфузії під час хірургічного втручання, місцевого нанесення, наприклад, у комбінації з перев'язкою рани після хірургічного втручання, шляхом ін'єкції, за допомогою катетера, за допомогою супозиторію або за допомогою імплантату, причому зазначений імплантат може бути виконаний з пористого, непористого або гелеподібного матеріалу, включаючи мембрани, такі як мембрани Sikalastic, або волокна. Краще при введенні білку, включаючи антитіло, відповідно до даного винаходу, необхідно стежити, щоб використовувалися матеріали, що не абсорбують білок.

У ще одному варіанті здійснення антигензв'язуючий поліпептид або композиція можуть бути доставлені у везикулі, зокрема, у ліпосомі (див. Langer, 1990, Science 249:1527-1533; Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (під ред.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, там же, стор. 317-327; див. у цілому те ж джерело).

У ще одному варіанті здійснення антигензв'язуючий поліпептид або композиція можуть бути доставлені у системі з контрольованим вивільненням. У одному з варіантів здійснення може бути використаний насос (див. Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). У ще одному варіанті здійснення даного винаходу можуть бути використані полімерні матеріали (див. Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (під ред.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (під ред.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, J., 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; див. також Levy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105). У ще одному варіанті здійснення система з контрольованим вивільненням може бути розміщена у безпосередній близькості від мішені для терапевтичного впливу, наприклад, мозку, при цьому потрібна тільки частина системної дози (див., наприклад, Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Інші системи з контрольованим вивільненням обговорюються у огляді за авт. Langer, 1990, Science 249:1527-1533.

У окремому варіанті здійснення, у якому композиція відповідно до даного винаходу містить нуклеїнову кислоту або полінуклеотид, що кодує білок, нуклеїнова кислота може бути введена *in vivo*, щоб стимулювати експресію кодуємого нею білку, шляхом включення її до складу підходящої молекули нуклеїнової кислоти експресійного вектору та його введення таким чином, що він проникає всередину клітини, наприклад, за допомогою ретровірусного вектору (див. патент США № 4980286), або за допомогою безпосередньої ін'єкції, або за допомогою бомбардування мікрочастинками (наприклад, генною гарматою; Biolistic, Dupont), або шляхом покриття ліпідами, або рецепторами клітинної поверхні, або трансфікуючими агентами, або за допомогою введення його у зв'язку з гомеобокс-подібним пептидом, який, як відомо, проникає у ядро (див., наприклад, Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868), і т.д. У якості альтернативи, нуклеїнова кислота може бути введена внутрішньоклітинно та включена у ДНК клітини-хазяїна для експресії шляхом гомологічної рекомбінації.

Кількість антитіл згідно з винаходом, яка буде ефективною для лікування, інгібування та попередження запального, імунного або злоякісного захворювання, розладу або стану, може бути визначена за стандартними клінічними методами. Крім того, необов'язково, у якості допоміжних засобів для встановлення оптимальних діапазонів доз можуть бути використані *in vitro* аналізи. Точна доза, яку слід використовувати у препараті, також буде залежати від способу введення та серйозності захворювання, розладу або стану, та її слід вибирати відповідно до думки практикуючого лікаря та специфікою кожного пацієнта. Ефективні дози можуть бути екстрапольовані із кривих доза-відповідь, отриманих із систем випробувань *in vitro* або на тваринних моделях.

У якості загальної пропозиції, доза антигензв'язуючих поліпептидів відповідно до даного винаходу, що вводиться пацієнтові, звичайно становить від 0,1 мг/кг до 100 мг/кг маси тіла пацієнта, від 0,1 мг/кг до 20 мг/кг маси тіла пацієнта або від 1 мг/кг до 10 мг/кг маси тіла пацієнта. Як правило, людські антитіла мають більш тривалий період напівжиття у організмі людини, ніж антитіла, що походять з інших видів, що пов'язане з імунною відповіддю на чужорідні поліпептиди. Таким чином, часто можливе використання більш низьких доз людських антитіл та меншої частоти введення. Крім того, дозування та частота введення антитіл згідно з винаходом може бути знижена за рахунок посилення поглинання та проникнення антитіл у тканині (наприклад, у мозок) за допомогою модифікацій, таких як, наприклад, ліпидування.

Способи лікування інфекційного або злоякісного захворювання, стану або розладу, що включають введення антитіла, його варіанту або похідної відповідно до даного винаходу, звичайно тестують *in vitro*, а потім *in vivo* на прийнятній тваринній моделі для визначення бажаної терапевтичної або профілактичної активності перед тим, як почати використання у людей. Підходящі тваринні моделі, включаючи трансгенних тварин, добре відомі фахівцям у даній галузі техніки. Наприклад, аналізи *in vitro* для демонстрації терапевтичної придатності антигензв'язуючого поліпептиду, описаного у даному документі, включають дію антигензв'язуючого поліпептиду на клітинну лінію або зразок тканини пацієнта. Дія антигензв'язуючого поліпептиду на клітинну лінію та/або зразок тканини може бути визначена з використанням методик, відомих фахівцям у даній галузі техніки, таких як аналізи, розкриті у

інших місцях даного документу. Відповідно до даного винаходу аналізи *in vitro*, які можуть бути використані для визначення того, чи показане введення конкретного антигензв'язуючого поліпептиду, включають аналізи культури клітин *in vitro*, у яких зразок тканини пацієнта вирощують у культурі та піддають впливу або іншим способом вводять сполуку, та спостерігають дію такої сполуки на зразок тканини.

Різні системи доставки відомі та можуть бути використані для введення антитіла згідно з винаходом або полінуклеотиду, що кодує антитіло згідно з винаходом, наприклад, включення у ліпосоми, мікрочастинки, мікрокапсули, рекомбінантні клітини, здатні експресувати сполуку, рецепторно-опосередкований ендоцитоз (див., наприклад, Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432), включення нуклеїнової кислоти до складу ретровірусного або іншого вектору і т.д.

У додатковому варіанті здійснення композиції відповідно до даного винаходу вводять у комбінації із протипухлинним агентом, протівірусним агентом, антибактеріальним або антибіотичним агентом або протигрибковими агентами. Будь-який із цих агентів, відомих у даній галузі техніки, може бути введений у композиціях відповідно до даного винаходу.

У ще одному варіанті здійснення композиції відповідно до винаходу вводять у комбінації з хіміотерапевтичним агентом. Хіміотерапевтичні агенти, які можуть бути введені у композиціях відповідно до винаходу, включають, не обмежуючись перерахованим, похідні антибіотиків (наприклад, доксорубіцин, блеоміцин, даунорубіцин та дактиномицин); антиестрогени (наприклад, тамоксифен); антиметаболіти (наприклад, фторурацил (5-FU), метотрексат, флоксуридин, інтерферон альфа-2b, глутамінова кислота, плікаміцин, меркаптопурин та 6-тіогuanін); цитотоксичні агенти (наприклад, кармустин (BCNU), ломустин (CCNU), цитозин-арабінозид, циклофосфамід, естрамустин, гідроксисечовина, прокарбазин, мітоміцин, бусульфан, цисплатин та вінкристину сульфат); гормони (наприклад, медроксипрогестерон, естрамустину фосфату натрієва сіль, етинілестрадіол, естрадіол, мегестролу ацетат, метилтестостерон, діетилстилбестролу дифосфат, хлортрианізен та тестолактон); похідні азотистого іприту (наприклад, мефален, хлорамбуцил, мехлоретамин (азотистий іприт) та тіотепа); стероїди та комбінації (наприклад, бетаметазону натрію фосфат); та інші (наприклад, дикарбазин, аспарагіназа, мітотан, вінкристину сульфат, вінбластину сульфат та етопозид).

Комбіновані композиції та способи лікування

Антитіла до ГМ-КСФ відповідно до даного винаходу можуть бути використані, у деяких варіантах здійснення, разом з іншим терапевтичним агентом.

У деяких варіантах здійснення другий терапевтичний агент являє собою протизапальний агент. Необмежуючі приклади включають аспірин, ібупрофен, напроксен, целекоксиб (целебрекс (Celebrex)), піроксикам (фельден (Feldene)), індометацин (індоцин (Indocin)), мелоксикам (Mobic Vivlodex), кетопрофен (орудис (Orudis)), кетопрофен уповільненого вивільнення, орувейл (Oruvail), актрон (Actron)), суліндак (клінорил (Clinoril)), дифлунізал (долобід (Dolobid)), набуметон (релафен (Relafen)), оксапрозин (дейпро (Daypro)), толметин (толметин натрію, толектин (Tolectin)), саліцил саліцилат (дисальцид (Disalcid)), етодолак (лодин (Lodine)), фенопрофен (налфон (Nalfon)), флурбіпрофен (ансайд (Ansaid)), кеторолак (торадол (Toradol)), меклофенамат та мефенамова кислота (понстел (Ponstel)).

У деяких варіантах здійснення другий терапевтичний агент підходить для лікування аутоімунного захворювання. Необмежуючі приклади включають глюкокортикоїд, антитіла до CD3, такі як муромонаб-CD3, інгібітори IL-2a, такі як базиліксимаб (симулект (Simulect)) та даклізумаб (зенапакс (Zenapax)), інгібітори кальциневрину, такі як такролімус та циклоспорин, сіролімус, еверолімус, інтерферони, опіоїдні препарати, TNF-зв'язуючі білки або антитіла та мікофенолат.

У деяких варіантах здійснення другий терапевтичний агент являє собою протираковий хіміотерапевтичний агент. За своїм механізмом дії хіміотерапевтичні агенти можуть бути класифіковані, наприклад, на наступні групи:

- антиметаболіти/протиракові агенти, такі як аналоги піримідину флоксуридин, капецитабін та цитарабін;

- аналоги пурину, антагоністи фолієвої кислоти та споріднені інгібітори;

- антипроліферативні/антимітотичні агенти, у тому числі продукти природного походження, такі як алкалоїд барвінку (вінбластин, вінкристин) та агенти, які діють на мікротрубочки, такі як таксан (паклітаксел, доцетаксел), вінбластин, нокодазол, епотилони, вінорелбін (навельбін (NAVELBINE®)) та епіподофілотоксини (етопозид, теніпозид);

- ДНК-ушкоджуючі агенти, такі як актиномицин, амсакрин, бусульфан, карбоплатин, хлорамбуцил, цисплатин, циклофосфамід (цитоксан (CYTOXAN®)), дактиномицин, даунорубіцин, доксорубіцин, епірубіцин, іфосфамід, мелфалан, мерхлоретамін, мітоміцин,

мітоксантрон, нітрозосечовина, прокаרבазин, таксол, таксотер, теніпозид, етопозид та триетилентіофосфорамід;

- антибіотики, такі як дактиноміцин, даунорубіцин, доксорубіцин, ідарубіцин, антрацикліни, мітоксантрон, блеоміцини, плікаміцин (мітраміцин) та мітоміцин;

5 - ферменти, такі як L-аспарагіназа, яка системно метаболізує L-аспарагін та залишає його клітини, які не здатні синтезувати свій власний аспарагін;

- антитромбоцитарні засоби;

- антипроліферативні/антимітотичні алкілюючі агенти, такі як азотисті іприти циклофосфамід та аналоги (мелфалан, хлорамбуцил, гексаметилмеламін та тіотепа), алкілнітрозосечовини (кармустин) та аналоги, стрептозоцин та триазени (дакарбазин);

10 - антипроліферативні/антимітотичні антиметаболіти, такі як аналоги фолієвої кислоти (метотрексат);

- комплексні сполуки платини (цисплатин, оксаліплатин та карбоплатин), прокаרבазин, гідроксисечовина, мітотан та аміноглютетимід;

15 - гормони, аналоги гормонів (естроген, тамоксифен, гозерелін, бікалутамід та нілутамід) та інгібітори ароматази (летрозол та анастрозол);

- антикоагулянти, такі як гепарин, синтетичні солі гепарину та інші інгібітори тромбіну;

- фібринолітичні агенти, такі як тканинний активатор плазміногену, стрептокіназа, урокіназа, аспірин, дипіридамомл, тиклопідин та клопідогрел;

20 - антиміграційні агенти;

- антисекреторні засоби (брефелъдин);

- імуносупресори такролімус, сіролімус, азатіоприн та мікофенолат;

- сполуки (TNF-470, геністеїн) та інгібітори факторів росту (інгібітори фактору росту ендотелію судин та інгібітори фактору росту фібробластів);

25 - блокатори ангіотензинових рецепторів, донори оксиду азоту;

- антисмислові олігонуклеотиди;

- антитіла, такі як трастузумаб та ритуксимаб;

- інгібітори клітинного циклу та індуктори диференціювання, такі як третиноїн;

30 - інгібітори, інгібітори топоізомерази (доксорубіцин, даунорубіцин, дактиноміцин, еніпозид, епірубіцин, етопозид, ідарубіцин, іринотекан, мітоксантрон, топотекан та іринотекан) та кортикостероїди (кортизон, дексаметазон, гідрокортизон, метилпреднізолон, преднізон та преднізолон);

- інгібітори кінази, що бере участь у передачі сигналів факторами росту;

- індуктори дисфункції;

35 - токсини, такі як холерний токсин, рицин, екзотоксин *Pseudomonas*, токсин аденілатциклази *Bordetella pertussis*, дифтерійний токсин та активатори каспази;

- та хроматин.

Композиції

Даний винахід також відноситься до фармацевтичних композицій. Такі композиції містять ефективну кількість антитіла та прийнятний носій. У деяких варіантах здійснення композиція додатково включає другий терапевтичний агент.

У окремому варіанті здійснення термін "фармацевтично прийнятний" означає схвалений федеральним або регіональним наглядовим органом або зазначений у Фармакопеї США або іншій загальновизнаній фармакопеї як підходящий для застосування у тварин та, більш конкретно, у людини. Крім того, "фармацевтично прийнятний носій" звичайно являє собою нетоксичний твердий, напівтвердий або рідкий наповнювач, розріджувач, інкапсулюючий матеріал або допоміжну композицію будь-якого типу.

Термін "носій" відноситься до розріджувача, ад'юванту, ексципієнту або наповнювача, з яким вводиться терапевтичний засіб. Такі фармацевтичні носії можуть являти собою стерильні рідини, такі як вода та масла, у тому числі нафтового, тваринного, рослинного або синтетичного походження, такі як арахісове масло, соєве масло, мінеральне масло, кунжутне масло та тому подібні. Вода є кращим носієм при внутрішньовенному введенні фармацевтичної композиції. Фізіологічні розчини та водні розчини декстрази та гліцерину також можуть бути використані у якості рідких носіїв, зокрема, для ін'єкційних розчинів. Підходящі фармацевтичні ексципієнти включають крохмаль, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, борошно, крейду, силікагель, стеарат натрію, моностеарат гліцерину, тальк, хлорид натрію, сухе знежирене молоко, гліцерин, пропіленгліколь, воду, етанол і таке інше. Композиція за необхідності може також містити незначні кількості змочувальних або емульгуючих агентів або буферних агентів, таких як ацетати, цитрати або фосфати. Також передбачені антибактеріальні агенти, такі як бензиловий спирт або метилпарабени; антиоксиданти, такі як аскорбінова кислота або

бісульфіт натрію; комплексоутворюючі агенти, такі як етилендіамінтетраоцтова кислота; та агенти для регулювання тоничності, такі як хлорид натрію або декстроза. Ці композиції можуть приймати форму розчинів, суспензій, емульсій, таблеток, пігулок, капсул, порошків, складів з уповільненим вивільненням та тому подібного. Композиція може бути отримана у вигляді супозиторія із традиційними сполучними агентами та носіями, такими як тригліцериди. Пероральний препарат може включати стандартні носії, такі як маніт, лактоза, крохмаль, стеарат магнію, сахарин натрію, целюлоза, карбонат магнію фармацевтичного ступеню чистоти і т.д. Приклади підходящих фармацевтичних носіїв описані у джерелі Remington's Pharmaceutical Sciences за авт. E. W. Martin, включеному у даний документ за допомогою посилання. Такі композиції будуть містити терапевтично ефективну кількість антигензв'язуючого поліпептиду, переважно у очищеній формі, разом з підходящою кількістю носія, щоб забезпечити форму для належного введення пацієнтові. Препарат повинен відповідати способу введення. Парентеральний препарат може бути введений у ампули, одноразові шприци або багатодозові флакони зі скла або пластику.

У одному варіанті здійснення рецептура фармацевтичної композиції розроблена відповідно до рутинних процедур у вигляді фармацевтичної композиції, адаптованої для внутрішньовенного введення людям. Як правило, композиції для внутрішньовенного введення являють собою розчини у стерильному ізотонічному водному буферному розчині. За необхідності композиція може також включати солюбілізуєчий агент та місцевий анестетик, такий як лігнокаїн, для полегшення болю у місці ін'єкції. Звичайно інгредієнти поставляються або окремо, або у вигляді суміші у складі стандартної лікарської форми, наприклад, у вигляді сухого ліофілізованого порошку або безводного концентрату у герметично закритому контейнері, такому як ампула або саше, із вказівкою кількості активного агента. Якщо композиція підлягає введенню шляхом інфузії, вона може бути поміщена, наприклад, у інфузійну пляшку, що містить стерильну воду або фізіологічний розчин фармацевтичного ступеня чистоти. Якщо композиція підлягає введенню шляхом ін'єкції, може бути забезпечена ампула зі стерильною водою для ін'єкцій або фізіологічним розчином, таким чином, що інгредієнти можуть бути змішані перед введенням.

Сполуки згідно з винаходом можуть бути отримані у вигляді нейтральних або сольових форм. Фармацевтично прийнятні солі включають солі, утворені з аніонами, такими як солі, отримані із соляною, фосфорною, оцтовою, щавлевою, винною кислотою і т.д., та солі, утворені з катіонами, такими як солі, отримані з натрієм, калієм, амонієм, кальцієм, гідроксидами заліза (III), ізопропіламіном, триетиламіном, 2-етиламіноетанолом, гістидином, прокаїном і т.д.

ПРИКЛАДИ

Приклад 1. Одержання мишачих антитіл

У цьому прикладі описаний процес одержання мишачих моноклональних антитіл до людського ГМ-КСФ із використанням гібридомної технології. Рекомбінантний людський білок ГМ-КСФ використовували у якості антигену. Для одержання мишачих моноклональних антитіл до людського ГМ-КСФ 6-8 тижневих мишей різних ліній, включаючи мишей BALB/c, C57/BL6 або SJL, спочатку імунізували 20 мкг рекомбінантного людського ГМ-КСФ. На 14, 28 та 42 день після першої імунізації імунізованих мишей повторно імунізували 5 мкг рекомбінантного білку. Для відбору мишей, що виробляють антитіла, які зв'язують білок ГМ-КСФ, сироватки від імунізованих мишей досліджували за допомогою ELISA. Коротко, планшети для мікротитрування покривали людським білком ГМ-КСФ у концентрації 1 мкг/мл у PBS (натрій-фосфатному буфері), 100 мкл/лунку при кімнатній температурі (кімн. темп.) протягом ночі, потім блокували 100 мкл/лунку 5 % BSA (бичачого сироваткового альбуміну). Розведену плазму імунізованих мишей додавали у кожен лунку та інкубували протягом 1-2 годин при кімнатній температурі. Планшети промивали PBS/Tween та потім інкубували з антитілом до мишачого IgG, кон'югованим з пероксидазою хрину (HRP), протягом 1 години при кімнатній температурі. Після промивання планшети проявляли субстратом ABTS (2,2'-азино-біс(3-етилбензотіазолін-6-сульфонова кислота) та аналізували за допомогою спектрофотометру для одержання значень оптичної густини при 405 нм. Мишей з достатніми титрами IgG до ГМ-КСФ стимулювали 25 мкг рекомбінантного людського білку ГМ-КСФ на 60 день після імунізації. Відібраних мишей використовували для одержання злитих білків.

Супернатанти гібридами досліджували на IgG до ГМ-КСФ за допомогою скринінгу ELISA. Первинні гібридомні клони, що дали позитивну відповідь у аналізі ELISA, відбирали для субклонування з використанням методу граничних розведень та додатково досліджували за допомогою підтверджувального аналізу зв'язування ELISA (фіг. 1) та аналізу проліферації TF-1 (фіг. 2). Перед стимуляцією ГМ-КСФ клітини TF-1 промивали мінімальним середовищем RPMI1640 та витримували у мінімальному середовищі протягом ночі. На 2 день ці клітини,

витримані у мінімальному середовищі, збирали та потім висівали їх з концентрацією 3×10^5 клітин/мл у кількості 50 мкл на лунку 96-лункового планшета для культивування клітин із плоским дном.

Людський рекомбінантний ГМ-КСФ (Genscript) у концентрації 0,2 нг/мл (4X) змішували у співвідношенні 1:1 з 20 % супернатантом культури гібридоми (4X), та 50 мкл суміші додавали до клітин TF-1 з одержанням кінцевої концентрації ГМ-КСФ 0,05 нг/мл, а супернатанту гібридоми – 5 %. Максимальну клітинну проліферацію (0 % інгібування) вимірювали шляхом інкубації клітин TF-1 при кінцевій концентрації ГМ-КСФ 0,05 нг/мл без додавання супернатанту гібридоми. 100 % інгібування проліферації TF-1 вимірювали шляхом виключення ГМ-КСФ із аналізу та витримування клітин тільки у повному середовищі RPMI1640. Потім клітини TF-1 інкубували протягом 72 годин при 37 °C. Життєздатність клітин вимірювали за допомогою люмінесцентного аналізу життєздатності клітин CellTiter-Glo® відповідно до інструкцій виробника.

У цілому три гібридомних моноклони 23F4, 32C4 та 50C5 показали значне інгібування проліферації TF-1, та 23F4 та 50C5 були відібрані для подальшого дослідження характеристик.

Приклад 2. Зв'язування мишачих антитіл з ГМ-КСФ людини або макака-резусу

У цьому прикладі досліджується залежність доза-відповідь зв'язування у ELISA мишачого моноклонального антитіла до ГМ-КСФ із рекомбінантним білком ГМ-КСФ людини або макака-резусу (1 мкг/мл у кількості 100 мкл).

Рекомбінантний білок ГМ-КСФ людини або макака-резусу (Genscript) наносили у концентрації 1 мкг/мл у PBS на планшети для мікротитрування на 2 год. при кімнатній температурі (кімн. темп.). Після нанесення антигену лунки блокували PBS/0,05 % Tween (PBST) з 1 % BSA протягом 1 год. при кімнатній температурі. Після промивання лунок PBST у лунку додавали різні концентрації антитіл до ГМ-КСФ та інкубували протягом 1 при кімнатній температурі. Для виявлення зв'язуючих антитіл додавали кон'юговані з HRP вторинні антитіла до мишачого Fc (Jackson Immuno Research) з наступним додаванням флуорогенних субстратів (Roche). У проміжках між усіма стадіями інкубації лунки планшета тричі промивали PBST. Флуоресценцію вимірювали у рідері для мікропланшетів TECAN Spectrafluor.

Як показано на фіг. 3, обидва антитіла 23F4 та 50C5 показали дозозалежне зв'язування з людським ГМ-КСФ із EC50, що склало 11,8 нг/мл та 14,6 нг/мл, відповідно, та ГМ-КСФ макака-резусу з EC50, що склали 10,2 нг/мл та 21,7 нг/мл, відповідно.

Приклад 3. Кінетика зв'язування мишачих антитіл з людським ГМ-КСФ

На фіг. 4 наведене графічне представлення кінетики зв'язування 23F4 та 50C5 з рекомбінантним людським ГМ-КСФ. Рекомбінантний людський ГМ-КСФ використовували у якості аналіту із серією послідовних концентрацій (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 нм). Аналіз кінетики зв'язування антитіла з антигеном проводили з використанням системи Biacore T200 з використанням підходу із захопленням мишачого антитіла. IgG до мишачого Fc іммобілізували на сенсорному чіпі CM5 відповідно до інструкцій виробника. Вводили досліджуване антитіло та захоплювали його іммобілізованим IgG до мишачого Fc. І потім окремо вводили кожну із серії послідовних концентрацій антигену та реєстрували профіль зв'язування для кожної концентрації аналізованого антигену, відповідно. Систему аналізу регенерували шляхом введення 10 мМ гліцину-HCl з pH 1,5 протягом 30 секунд. Робочий буфер являв собою HBS-EP + (10 мМ HEPES (4-(2-гідроксиетил)-1-піперазинетансульфонової кислоти), pH 7,4, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA та 0,05 % P20). Температура проведення аналізу становила 25 °C, а час асоціації та дисоціації становив 180 та 600 секунд, відповідно.

Дані Biacore були апроксимовані з використанням програмного забезпечення для аналізу даних Biacore T200 1.0 відповідно до моделі зв'язування 1:1 для розрахунків констант швидкості асоціації (k_a) та дисоціації (k_d), а також константи рівноваги (K_D). На додаток до фіг. 4 деякі зведені дані представлені у таблиці нижче.

Зразок	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)
23F4	8,723E+05	3,635E-05	4,168E-11
50C5	2,718E+06	1,204E-04	4,431E-11

Приклад 4. Блокування зв'язування ГМ-КСФ з альфа-субодиницею рецептору ГМ-КСФ мишачими антитілами

Щоб досліджувати ефективність антитіл у блокуванні зв'язування ГМ-КСФ із альфа-ланцюгом рецептору ГМ-КСФ, альфа-субодиницю рекомбінантного людського білку рецептору ГМ-КСФ (CD116) наносили у концентрації 2 мкг/мл у PBS на планшети для мікротитрування та залишали на ніч при 4 °C. Після нанесення антигену лунки блокували PBS/0,05 % Tween (PBST) з 1 % BSA протягом 1 год. при кімнатній температурі. Після промивання лунок PBST у лунку

додавали різні концентрації антитіл до ГМ-КСФ у присутності біотинільованого людського білку ГМ-КСФ (0,05 мкг/мл) та інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі.

Для виявлення зв'язування біотинільованого ГМ-КСФ із нанесеним рецептором додавали кон'югований з HRP стрептавідин з наступним додаванням флуорогенних субстратів (Roche). У проміжках між усіма стадіями інкубації лунки планшета тричі промивали PBST. Флуоресценцію вимірювали у рідері для мікропланшетів TECAN Spectrafluor. Як показано на фіг. 5, обидва антитіла продемонстрували дозозалежне інгібування зв'язування ГМ-КСФ із альфа-субодиницею рецептору ГМ-КСФ.

Приклад 5. Блокування ГМ-КСФ викликані мишачими антитілами передачею сигналів pSTAT5

Моноцити CD14+ виділяли з периферичної крові людини з використанням CD14-позитивних мікрогранул (Miltenyi Biotec). Очищені моноцити стимулювали людським ГМ-КСФ (0,2 нг/мл) протягом 30 хвилин при 37 °C у присутності різних концентрацій антитіла 23F4. Після інкубації клітини збирали та промивали буфером FACS (1x PBS + 2 % FBS) та пермеабілізували 2 % PFA (параформальдегідом) з наступною фіксацією клітин з використанням крижаного метанолу. Потім до клітин додавали кон'юговане з PE (фікоеритрином) антитіло до pSTAT5, інкубували протягом ще 30 хвилин при 4 °C та аналізували за допомогою проточної цитометрії. % інгібування розраховували як $[1 - (\text{середня інтенсивність флуоресценції досліджуваного зразку} / \text{середня інтенсивність флуоресценції контролю})] \times 100 \%$. Додавання антитіл у дозі 0,1 або 1 мкг/мл може значно знизити рівень викликані ГМ-КСФ активації pSTAT5 (фіг. 6).

Приклад 6. Інгібування мишачими антитілами ГМ-КСФ-залежної проліферації TF-1

Перед стимуляцією ГМ-КСФ клітини TF-1 промивали мінімальним середовищем RPMI1640 та витримували у мінімальному середовищі протягом ночі. На 2 день ці клітини, витримані у мінімальному середовищі, збирали та потім висівали їх з концентрацією 3×10^5 клітин/мл у кількості 50 мкл на лунку 96-лункового планшета для культивування клітин із плоским дном. Людський рекомбінантний ГМ-КСФ (Genscript) у концентрації 0,2 нг/мл (4X) змішували у співвідношенні 1:1 з мишачими антитілами до ГМ-КСФ (0,01 нг/мл – 1000 нг/мл, розведеними у повному середовищі), та 50 мкл суміші додавали до клітин TF-1. Максимальну клітинну проліферацію (0 % інгібування) вимірювали шляхом інкубації клітин TF-1 при кінцевій концентрації ГМ-КСФ 0,05 нг/мл без додавання антитіла. 100 % інгібування проліферації TF-1 вимірювали шляхом виключення ГМ-КСФ із аналізу та витримування клітин тільки у повному середовищі RPMI1640. Потім клітини TF-1 інкубували протягом 72 годин при 37 °C. Життєздатність клітин вимірювали за допомогою люмінесцентного аналізу життєздатності клітин CellTiter-Glo® відповідно до інструкцій виробника. Значення IC₅₀ для інгібування проліферації TF-1 як для 23F4, так і для 50C5 складало приблизно 10,9 нг/мл (фіг. 7).

Приклад 7. Гуманізація мишачих антитіл

Гени варіабельної області мишачих антитіл використовували для створення гуманізованого моноклонального антитіла. На першій стадії цього процесу амінокислотні послідовності VH та VK антитіл порівнювали з доступною базою даних послідовностей генів людського Ig, щоб знайти у цілому найбільш добре співпадаючі послідовності генів людського Ig зародкової лінії.

Потім конструювали гуманізовані послідовності варіабельного домену, де CDR1, 2 та 3 важкого та легкого ланцюгів антитіла були прищеплені на каркасні послідовності генів людського Ig. Потім була створена тривимірна модель, щоб визначити, чи існують які-небудь положення каркасної області, у яких заміна амінокислоти миші на амінокислоту людини (зворотні мутації) може впливати на зв'язування та/або конформацію CDR. Відповідні послідовності та зворотні мутації представлені у таблицях нижче.

Послідовності CDR VH 23F4

CDR1	SHYLH (SEQ ID NO: 1)
CDR2	WIFPGDDKTKYNEKFKG (SEQ ID NO: 2)
CDR3	GTKYLNWNFDV (SEQ ID NO: 3)

Послідовності CDR VL 23F4

CDR1	KANQNVGTTLA (SEQ ID NO: 4)
CDR2	SASYRYS (SEQ ID NO: 5)
CDR3	HQYTTYPLT (SEQ ID NO: 6)

Конструювання гуманізованих антитіл для 23F4

Конструювання VH I: VH1-f/JH6	
Конструкція	Мутація
23F4 VH	Химерне
23F4 VH.1	Привиті CDR, Q1E, T98R
23F4 VH.1a	Основана на 23F4 VH.1, A72S
23F4 VH.1b	Основана на 23F4VH.1, A72S, V68A
23F4 VH.1c	Основана на 23F4VH.1, A72S, V68A, I70L, M48I
23F4 VH.1d	Основана на 23F4VH.1, A72S, V68A, I70L, M48I, G26D, F29L
Конструювання VH II: VH1-f/JH6	
23F4 VH.2	Привиті CDR, Q1E
23F4 VH.2a	Основана на 23F4 VH.2, R72S
23F4 VH.2b	Основана на 23F4 VH.2, R72S, M70L
23F4 VH.2c	Основана на 23F4 VH.2, R72S, M70L, M48I, V68A
23F4 VH.2d	Основана на 23F4 VH.2, R72S, M70L, M48I, V68A, G26D, F29L
Конструювання VK: L8/Jk4	
Конструкція	Мутація
23F4Vk	Химерне
23F4 Vk.1	Привиті CDR
23F4 Vk.1a	Основана на 23F4 Vk.1, L46A
23F4 Vk.1b	Основана на 23F4 Vk.1, L46A, S60D, E70D
23F4 Vk.1c	Основана на 23F4 Vk.1, L46A, S60D, E70D, A43S, Y87F

5 Амінокислотні та нуклеотидні послідовності деяких гуманізованих антитіл 23F4 перераховані у таблиці нижче.

Послідовності гуманізованих антитіл (залишки CDR підкреслені, а зворотні мутації поміщені у прямокутники)

23F4 VH	<u>QVQLQQSGPELVKPGTSMKISCKTSDYTLTSHYLHWVKQRPQGQGLEWIGW</u> <u>IFPGDDKTKYNEKFKGKATLTSDKTSNTAYMQLSSLTSEESAVYFCARGT</u> KYLNNWFDVWGTGTTVTVSS	SEQ ID NO: 7
23F4 VH.1	<u>EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTSHYLHWVQQAPGKGLEWMGW</u> <u>IFPGDDKTKYNEKFKGRVTITADTSTDATYMESSLRSEDATAVYYCAR</u> <u>RG</u> <u>T</u> KYLNNWFDVWGGGTTVTVSS	SEQ ID NO: 8
23F4 VH.1a	<u>EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTSHYLHWVQQAPGKGLEWMGW</u> <u>IFPGDDKTKYNEKFKGRVTIT</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>M</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>T</u> KYLNNWFDVWGGGTTVTVSS	SEQ ID NO: 9
23F4 VH.1b	<u>EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTSHYLHWVQQAPGKGLEWMGW</u> <u>IFPGDDKTKYNEKFKGR</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>M</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>T</u> KYLNNWFDVWGGGTTVTVSS	SEQ ID NO: 10
23F4 VH.1c	<u>EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTSHYLHWVQQAPGKGLEW</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>W</u> <u>IFPGDDKTKYNEKFKGR</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>M</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>T</u> KYLNNWFDVWGGGTTVTVSS	SEQ ID NO: 11
23F4 VH.1d	<u>EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKV</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>H</u> <u>Y</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>W</u> <u>V</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>W</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>W</u> <u>IFPGDDKTKYNEKFKGR</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>M</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>T</u> KYLNNWFDVWGGGTTVTVSS	SEQ ID NO: 12
23F4 VH.2	<u>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSHYLHWVRQAPGQGLEWMGW</u> <u>IFPGDDKTKYNEKFKGRVTMTTRDTSISTAYMELSRRLRSDDATAVYYCAR</u> <u>RG</u> <u>T</u> KYLNNWFDVWGGGTTVTVSS	SEQ ID NO: 13
23F4 VH.2a	<u>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSHYLHWVRQAPGQGLEWMGW</u> <u>IFPGDDKTKYNEKFKGRVTMT</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>M</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>T</u> KYLNNWFDVWGGGTTVTVSS	SEQ ID NO: 14
23F4 VH.2b	<u>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSHYLHWVRQAPGQGLEWMGW</u> <u>IFPGDDKTKYNEKFKGRVT</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>M</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>T</u> KYLNNWFDVWGGGTTVTVSS	SEQ ID NO: 15

23F4 VH.2c	<u>E</u> VQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSHYLHWVRQAPGQGLEWIGW IFPGDDKTKYNEKFKGRATITSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARIGT KYLNNWFDVWGQGTITVTVSS	SEQ ID NO: 16
23F4 VH.2d	<u>E</u> VQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASDYLITSHYLHWVRQAPGQGLEWIGW IFPGDDKTKYNEKFKGRATITSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARIGT KYLNNWFDVWGQGTITVTVSS	SEQ ID NO: 17
23F4Vk	DIVLTQPKFLSTSVGDRVSVTCKANQNVGTTLAWYQQKPGQSPKALIYS ASYRYSVGPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCHQYTTYPLTFGG GTKLEIK	SEQ ID NO: 18
23F4 Vk.1	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCKANQNVGTTLAWYQQKPGKAPKLLIYS ASYRYSVGPDRFTGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCHQYTTYPLTFGG GTKVEIK	SEQ ID NO: 19
23F4 Vk.1a	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCKANQNVGTTLAWYQQKPGKAPKALIYS ASYRYSVGPDRFTGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCHQYTTYPLTFGG GTKVEIK	SEQ ID NO: 20
23F4 Vk.1b	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCKANQNVGTTLAWYQQKPGKAPKALIYS ASYRYSVGPDRFTGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCHQYTTYPLTFGG GTKVEIK	SEQ ID NO: 21
23F4 Vk.1c	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCKANQNVGTTLAWYQQKPGKSPKALIYS ASYRYSVGPDRFTGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYFCHQYTTYPLTFGG GTKVEIK	SEQ ID NO: 22

Комбінація VH/VK для гуманізованого антитіла 23F4

VH	Vk	23F4 Vk.1	23F4 Vk.1a	23F4 Vk.1b	23F4 Vk.1c	23F4 Vk
23F4 VH.1		Hu23F4-1	Hu23F4-2	Hu23F4-3	Hu23F4-4	
23F4 VH.1a		Hu23F4-5	Hu23F4-6	Hu23F4-7	Hu23F4-8	
23F4 VH.1b		Hu23F4-9	Hu23F4-10	Hu23F4-11	Hu23F4-12	
23F4 VH.1c		Hu23F4-13	Hu23F4-14	Hu23F4-15	Hu23F4-16	
23F4 VH.1d		Hu23F4-17	Hu23F4-18	Hu23F4-19		
23F4 VH.2		Hu23F4-20	Hu23F4-21	Hu23F4-22	Hu23F4-23	
23F4 VH.2a		Hu23F4-24	Hu23F4-25	Hu23F4-26	Hu23F4-27	
23F4 VH.2b		Hu23F4-28	Hu23F4-29	Hu23F4-30	Hu23F4-31	
23F4 VH.2c		Hu23F4-32	Hu23F4-33	Hu23F4-34	Hu23F4-35	
23F4 VH.2d		Hu23F4-36	Hu23F4-37	Hu23F4-38		
23F4 VH						Химерне 23F4

5 Послідовності CDR VH 50C5

CDR1	PYSIH (SEQ ID NO: 23)
CDR2	YINPSTGYIEYNQHFKE (SEQ ID NO: 24)
CDR3	GGDYEGYFDY (SEQ ID NO: 25)

Послідовності CDR VL 50C5

CDR1	RLNENIYSFLA (SEQ ID NO: 26)
CDR2	NAETLAE (SEQ ID NO: 27)
CDR3	QQHYGTPYT (SEQ ID NO: 28)

10

Конструювання гуманізованих антитіл для 50C5

Конструювання VH I: VH1-69/JH6	
Конструкція	Мутація
50C5 VH	Химерне
50C5 VH.1	Привиті CDR, Q1E
50C5 VH.1a	Основа на 50C5 VH.1, S84R
50C5 VH.1b	Основа на 50C5 VH.1, S84R, G27Y, T28I

50C5 VH.1c	Основа на 50C5 VH.1, S84R, G27Y, T28I, M48I
50C5 VH.1d	Основа на 50C5 VH.1, S84R, G27Y, T28I, M48I, V68T, I70L
50C5 VH.1e	Основа на 50C5 VH.1, S84R, G27Y, T28I, M48I, V68T, I70L, S30T
Конструювання VK: O12/Jk4	
Конструкція	Мутація
50C5Vk	Химерне
50C5 Vk.1	Привиті CDR
50C5 Vk.1a	Основа на 50C5 Vk.1, I48V
50C5 Vk.1b	Основа на 50C5 Vk.1, I48V, G57D
50C5 Vk.1c	Основа на 50C5 Vk.1, I48V, G57D, D70Q
50C5 Vk.1d	Основа на 50C5 Vk.1, I48V, G57D, D70Q, A43S

Послідовності гуманізованих антитіл (залишки CDR підкреслені, а зворотні мутації поміщені у прямокутники)

50C5 VH	<u>QVQLQQSAAELVRPGASVKMSCKASGYIFT</u> <u>PYSIHWIKQRPQGQGLEWIGY</u> <u>INPSTGYIEYNQHF</u> <u>KDR</u> <u>TTLTADKSSSTAYMQLRSLTSEDSAVYYCARGG</u> <u>DYEGYFDYWGGQTTLTVSS</u>	SEQ ID NO: 29
50C5 VH.1	<u>EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV</u> <u>SCKASGGTFSPYSIHWVRQAPGQGLEWMGY</u> <u>INPSTGYIEYNQHF</u> <u>KDR</u> <u>VTITADKSTSTAYMELSSLRSED</u> <u>AVYYCARGG</u> <u>DYEGYFDYWGGQTTVTVSS</u>	SEQ ID NO: 30
50C5 VH.1a	<u>EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV</u> <u>SCKASGGTFSPYSIHWVRQAPGQGLEWMGY</u> <u>INPSTGYIEYNQHF</u> <u>KDR</u> <u>VTITADKSTSTAYMEL</u> <u>R</u> <u>SLRSED</u> <u>AVYYCARGG</u> <u>DYEGYFDYWGGQTTVTVSS</u>	SEQ ID NO: 31
50C5 VH.1b	<u>EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV</u> <u>SCKASGYIF</u> <u>SPYSIHWVRQAPGQGLEWMGY</u> <u>INPSTGYIEYNQHF</u> <u>KDR</u> <u>VTITADKSTSTAYMEL</u> <u>R</u> <u>SLRSED</u> <u>AVYYCARGG</u> <u>DYEGYFDYWGGQTTVTVSS</u>	SEQ ID NO: 32
50C5 VH.1c	<u>EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV</u> <u>SCKASGYIF</u> <u>SPYSIHWVRQAPGQGLEW</u> <u>IGY</u> <u>INPSTGYIEYNQHF</u> <u>KDR</u> <u>VTITADKSTSTAYMEL</u> <u>R</u> <u>SLRSED</u> <u>AVYYCARGG</u> <u>DYEGYFDYWGGQTTVTVSS</u>	SEQ ID NO: 33
50C5 VH.1d	<u>EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV</u> <u>SCKASGYIF</u> <u>SPYSIHWVRQAPGQGLEW</u> <u>IGY</u> <u>INPSTGYIEYNQHF</u> <u>KDR</u> <u>TIT</u> <u>TADKSTSTAYMEL</u> <u>R</u> <u>SLRSED</u> <u>AVYYCARGG</u> <u>DYEGYFDYWGGQTTVTVSS</u>	SEQ ID NO: 34
50C5 VH.1e	<u>EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV</u> <u>SCKASGYIFT</u> <u>PYSIHWVRQAPGQGLEW</u> <u>IGY</u> <u>INPSTGYIEYNQHF</u> <u>KDR</u> <u>TIT</u> <u>TADKSTSTAYMEL</u> <u>R</u> <u>SLRSED</u> <u>AVYYCARGG</u> <u>DYEGYFDYWGGQTTVTVSS</u>	SEQ ID NO: 35
50C5 Vk	<u>DIQMTQSPDLSASVGETVTITC</u> <u>RLNENIYSFLAWYQQRQKGKSPQLLVYNA</u> <u>ETLAEDVPSRFSGSGSGTQFSLKISSLTDDFGTYC</u> <u>QQHYGTPYTFGGGT</u> <u>NLEIE</u>	SEQ ID NO: 36
50C5 Vk.1	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC</u> <u>RLNENIYSFLAWYQQKPGKAPKLLIYNA</u> <u>ETLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC</u> <u>QQHYGTPYTFGGGT</u> <u>KVEIK</u>	SEQ ID NO: 37
50C5 Vk.1a	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC</u> <u>RLNENIYSFLAWYQQKPGKAPKLL</u> <u>YNA</u> <u>ETLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC</u> <u>QQHYGTPYTFGGGT</u> <u>KVEIK</u>	SEQ ID NO: 38
50C5 Vk.1b	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC</u> <u>RLNENIYSFLAWYQQKPGKAPKLL</u> <u>YNA</u> <u>ETLAED</u> <u>VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC</u> <u>QQHYGTPYTFGGGT</u> <u>KVEIK</u>	SEQ ID NO: 39
50C5 Vk.1c	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC</u> <u>RLNENIYSFLAWYQQKPGKAPKLL</u> <u>YNA</u> <u>ETLAED</u> <u>VPSRFSGSGSGT</u> <u>Q</u> <u>FTLTISLQPEDFATYYC</u> <u>QQHYGTPYTFGGGT</u> <u>KVEIK</u>	SEQ ID NO: 40
50C5 Vk.1d	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC</u> <u>RLNENIYSFLAWYQQKPGK</u> <u>S</u> <u>PKLL</u> <u>YNA</u> <u>ETLAED</u> <u>VPSRFSGSGSGT</u> <u>Q</u> <u>FTLTISLQPEDFATYYC</u> <u>QQHYGTPYTFGGGT</u> <u>KVEIK</u>	SEQ ID NO: 41

VH	Vk	50C5 Vk.1	50C5 Vk.1a	50C5 Vk.1b	50C5 Vk.1c	50C5 Vk.1d	50C5 Vk
50C5 VH.1							
50C5 VH.1a		Hu50C5-1	Hu50C5-2	Hu50C5-3	Hu50C5-4	Hu50C5-5	
50C5 VH.1b		Hu50C5-6	Hu50C5-7	Hu50C5-8	Hu50C5-9	Hu50C5-10	
50C5 VH.1c		Hu50C5-11	Hu50C5-12	Hu50C5-13	Hu50C5-14	Hu50C5-15	
50C5 VH.1d		Hu50C5-16	Hu50C5-17	Hu50C5-18	Hu50C5-19	Hu50C5-20	
50C5 VH.1e		Hu50C5-21	Hu50C5-22	Hu50C5-23	Hu50C5-24		
50C5 VH							Химерне 50C5

Приклад 8. Зв'язування гуманізованих антитіл з людським ГМ-КСФ

Гуманізовані варіанти досліджували на зв'язування з рекомбінантним людським ГМ-КСФ, як описано раніше. Рекомбінантний людський білок ГМ-КСФ (Genscript) наносили у концентрації 1 мкг/мл у PBS на планшети для мікротитрування на 2 год. при кімнатній температурі (кімн. темп.). Після нанесення антигену лунки блокували PBS/0,05 % Tween (PBST) з 1 % BSA протягом 1 год. при кімнатній температурі. Після промивання лунок PBST у лунку додавали різні концентрації гуманізованих антитіл до ГМ-КСФ та інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі.

Для виявлення зв'язуючих антитіл додавали кон'юговані з HRP вторинні антитіла до мишачого Fc (Jackson Immuno Research) з наступним додаванням флуорогенних субстратів (Roche). У проміжках між усіма стадіями інкубації лунки планшета тричі промивали PBST. Флуоресценцію вимірювали у рідері для мікропланшетів TECAN Spectrafluor. Як показано на фіг. 8, усі гуманізовані варіанти продемонстрували схожу ефективність зв'язування з людським ГМ-КСФ у порівнянні з химерним антитілом.

Приклад 9. Кінетика зв'язування гуманізованих антитіл

Кінетику зв'язування гуманізованих антитіл вимірювали за допомогою Біасоре, як описано раніше. Рекомбінантний людський ГМ-КСФ використовували як аналіт із серією послідовних концентрацій (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 нм). Аналіз кінетики зв'язування антитіла з антигеном проводили з використанням системи Біасоре T200 з використанням підходу із захопленням людського антитіла. IgG до людського Fc іммобілізували на сенсорному чипі CM5 відповідно до інструкцій виробника. Вводили досліджуване антитіло та захоплювали його іммобілізованим IgG до людського Fc. І потім окремо вводили кожну із серій послідовних концентрацій антигену та реєстрували профіль зв'язування для кожної концентрації аналізованого антигену, відповідно.

Систему аналізу регенерували шляхом введення 10 мМ гліцину-HCl з pH 1,5 протягом 30 секунд. Робочий буфер являв собою HBS-EP + (10 мМ HEPES, pH 7,4, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA та 0,05 % P20). Температура проведення аналізу становила 25 °C, а час асоціації та дисоціації становив 180 та 600 секунд, відповідно. Дані Біасоре були апроксимовані з використанням програмного забезпечення для аналізу даних Біасоре T200 1.0 відповідно до моделі зв'язування 1:1 для розрахунків констант швидкості асоціації (k_a) та дисоціації (k_d), а також константи рівноваги (K_D). Як показано у таблицях нижче, з 23F4 найбільшу афінність зв'язування у порівнянні з химерним антитілом продемонстрували Hu23F4-13, Hu23F4-27 та Hu23F4-36; з 50C5 найбільшу афінність зв'язування у порівнянні з химерним антитілом продемонстрували Hu50C5-8, Hu50C5-17, Hu50C5-18, Hu50C5-19, Hu50C5-21 та Hu50C5-23.

Антиген	Антитіло	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)
ГМ-КСФ	3523-Hu23F4-5	1,188E+6	1,239E-4	1,043E-10
	3523-Hu23F4 -6	8,76SE+S	1,353E-4	1,544E-10
	3523-Hu23F4-13	1,279E+6	1,195E-4	9,349E-11
	3523-Hu23F4-20	8,007E+5	1,137E-4	1,420E-10
	3523-Hu23 F4-23	8,994E+5	1,164E-4	1,295E-10
	3523-Hu23 F4-25	6,354E+5	1,091E-4	1,718E-10
	3523-Hu23F4-27	9,232E+5	9,461E-5	1,025E-10
	3523-Hu23F4-29	6,673E+S	1,013E-4	1,518E-10
	3523-Hu23F4-36	1,271E+6	1,026E-4	8,070E-11
	Химерне 3523-Hu23F4	1,229E+6	3,873E-5	3,150E-11

Антиген	Антитіло	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (М)
ГМ-КСФ	35230Hu50C5-6	4,418E+6	1,375E-4	3,112E-11
	35230Hu50C5-8	4,911E+6	1,386E-4	2,822E-11
	35230Hu50C5-11	4,368E+6	1,363E-4	3,121E-11
	35230Hu50C5-17	4,466E+6	1,112E-4	2,491E-11
	35230Hu50C5-19	4,724E+6	1,089E-4	2,306E-11
	35230Hu50C5-19	4,622E+6	1,061E-4	2,295E-11
	35230Hu50C5-21	4,592E+6	1,082E-4	2,356E-11
	35230Hu50C5-23	4,535E+6	1,251E-4	2,760E-11
	Химерне 35230Hu50C5	4,433E+6	1,419E-4	3,202E-11

Приклад 10. Інгібування гуманізованими антитілами проліферації TF-1

- Перед стимуляцією ГМ-КСФ клітини TF-1 промивали мінімальним середовищем RPMI1640 та витримували у мінімальному середовищі протягом ночі. На 2 день ці клітини, витримані у мінімальному середовищі, збирали та потім висівали їх з концентрацією 3×10^5 клітин/мл у кількості 50 мкл на лунку 96-лункового планшету для культивування клітин із плоским дном. Людський рекомбінантний ГМ-КСФ (Genscript) у концентрації 0,2 нг/мл (4X) змішували у співвідношенні 1:1 з гуманізованими антитілами до ГМ-КСФ (0,01 нг/мл – 1000 нг/мл, розведеними у повному середовищі), та 50 мкл суміші додавали до клітин TF-1. Максимальну клітинну проліферацію (0 % інгібування) вимірювали шляхом інкубації клітин TF-1 при кінцевій концентрації ГМ-КСФ 0,05 нг/мл без додавання антитіла. 100 % інгібування проліферації TF-1 вимірювали шляхом виключення ГМ-КСФ із аналізу та витримування клітин тільки у повному середовищі RPMI1640. Потім клітини TF-1 інкубували протягом 72 годин при 37 °C.
- Життєздатність клітин вимірювали за допомогою люмінесцентного аналізу життєздатності клітин CellTiter-Glo® відповідно до інструкцій виробника. Серед гуманізованих антитіл з досліджених 23F4 найбільше інгібування продемонстрували Hu23F4-13, Hu23F4-27 та Hu23F4-36 з IC₅₀, що склали 4,95 нг/мл, 3,95 нг/мл та 3,30 нг/мл, відповідно (фіг. 9). Серед гуманізованих антитіл з досліджених 50C5 найбільше інгібування продемонструвало Hu50C5-23 з IC₅₀, що склала 14,31 нг/мл (фіг. 9).

Назва антитіла	IC ₅₀ для проліферації TF-1
Химерне Hu23F4	8,55 нг/мл
Hu23F4-5	15,58 нг/мл
Hu23F4-6	7,87 нг/мл
Hu23F4-13	4,95 нг/мл
Hu23F4-20	8,77 нг/мл
Hu23F4-23	9,08 нг/мл
Hu23F4-25	12,22 нг/мл
Hu23F4-27	3,95 нг/мл
Hu23F4-29	27,44 нг/мл
Hu23F4-36	3,30 нг/мл

Назва антитіла	IC ₅₀ для проліферації TF-1
Химерне Hu50C5	86,47 нг/мл
Hu50C5-6	23,93 нг/мл
Hu50C5-8	45,90 нг/мл
Hu50C5-11	111,1 нг/мл
Hu50C5-17	22,06 нг/мл
Hu50C5-18	41,27 нг/мл
Hu50C5-19	16,99 нг/мл
Hu50C5-21	21,64 нг/мл
Hu50C5-23	14,31 нг/мл

Приклад 11. Блокування гуманізованими антитілами передачі сигналів pSTAT5

- Моноцити CD14+ виділяли з периферичної крові людини з використанням CD14-позитивних мікрогранул (Miltenyi Biotec). Очищені моноцити стимулювали людським ГМ-КСФ (0,2 нг/мл) протягом 30 хвилин при 37 °C у присутності різних концентрацій гуманізованих антитіл. Після інкубації клітини збирали та промивали буфером FACS (1x PBS + 2 % FBS) та пермеабілізували

2 % PFA з наступною фіксацією клітин з використанням крижаного метанолу. Потім до клітин додавали кон'юговане з PE антитіло до pSTAT5, інкубували протягом ще 30 хвилин при 4 °C та аналізували за допомогою проточної цитометрії. % інгібування розраховували як $[1 - (\text{середня інтенсивність флуоресценції досліджуваного зразку} / \text{середня інтенсивність флуоресценції контролю})] \times 100 \%$. Додавання Hu23F4-13, Hu23F4-27, Hu23F4-36, Hu50C5-17 та Hu50C5-23 у дозі 0,1 або 1 мкг/мл може значно знизити рівень викликаної ГМ-КСФ активації pSTAT5 (фіг. 10).

Приклад 12. Зв'язування гуманізованих антитіл з ГМ-КСФ макака-резусу

Рекомбінантний білок ГМ-КСФ макака-резусу (Genscript) наносили у концентрації 1 мкг/мл у PBS на планшети для мікротитрування на 2 год. при кімнатній температурі (кімн. темп.). Після нанесення антигену лунки блокували PBS/0,05 % Tween (PBST) з 1 % BSA протягом 1 год. при кімнатній температурі. Після промивання лунок PBST у лунку додавали різні концентрації гуманізованих антитіл до ГМ-КСФ та інкубували протягом 1 при кімнатній температурі. Для виявлення зв'язуючих антитіл додавали кон'юговані з HRP вторинні антитіла до мишачого Fc (Jackson Immuno Research) з наступним додаванням флуорогенних субстратів (Roche). У проміжках між усіма стадіями інкубації лунки планшета тричі промивали PBST. Флуоресценцію вимірювали у рідері для мікропланшетів TECAN Spectrafluor. Як показано на фіг. 11, Hu23F4-13, Hu23F4-27 та Hu23F4-36 продемонстрували дозозалежне зв'язування із ГМ-КСФ макака-резусу з EC₅₀, що склали 7,44 нг/мл, 6,25 нг/мл та 7,75 нг/мл, відповідно; Hu50C5-17 та Hu50C5-23 продемонстрували дозозалежне зв'язування із ГМ-КСФ макака-резусу з EC₅₀, що склали 18,86 нг/мл та 21,63 нг/мл, відповідно.

Назва антитіла	EC ₅₀ для зв'язування ГМ-КСФ макака-резусу
Hu23F4-13	7,44 нг/мл
Hu23F4-27	6,25 нг/мл
Hu23F4-36	7,75 нг/мл
Hu50C5-17	18,86 нг/мл
Hu50C5-23	21,63 нг/мл

Приклад 13. Фармакокінетика Hu23F4-27 у яванського макака

За результатами проведених аналізів біологічної активності in vitro Hu23F4-27 було обрано для визначення фармакокінетичних властивостей у інтактного яванського макака. Антитіло Hu23F4-27 вводили за допомогою болюсної внутрішньовенної ін'єкції інтактному яванському макаку у різних дозах: 0,4 мг/кг, 2 мг/кг та 10 мг/кг, відповідно. Зразки плазми збирали у обрані моменти часу через 28 днів після введення дози та визначали концентрацію відповідного білку за допомогою ELISA. Потім розраховували фармакокінетичні параметри за допомогою некомпартментного підходу, реалізованого у програмі WinNonlin (Certara, Каліфорнія), показані на фіг. 12.

Група (n=2)	T _{1/2} (год.)	C _{max} (мкг/мл)	AUC _{0-t} (діб*мкг/мл)	AUC _{inf} (діб*мкг/мл)	Кліренс (мл/год./кг)
10 мг/кг	121,4±11,4	432,2±31,7	1254,5±38,3	1276,1±48,6	0,327±0,012
2 мг/кг	220,7±94,8	74,1±8,3	280,3±46,3	311,4±76,6	0,276±0,068
0,4 мг/кг	178,2±4,8	11,1±4,6	49,4±1,9	52,9±1,7	0,315±0,010

Обсяг даного винаходу не повинен бути обмежений окремими описаними варіантами здійснення, які відіграють роль окремих ілюстрацій конкретних аспектів винаходу, та будь-які композиції або способи, які є функціонально еквівалентними, знаходяться у межах обсягу даного винаходу. Фахівцям у даній галузі техніки буде очевидно, що способи та композиції відповідно до даного винаходу можуть бути піддані різним модифікаціям та варіаціям без відхилення від суті або обсягу винаходу. Таким чином, мається на увазі, що даний винахід охоплює його модифікації та варіації за умови, що вони входять у обсяг прикладеної формули винаходу та її еквівалентів.

Усі публікації та патентні заявки, згадані у даному описі, включені у даний документ за допомогою посилання тією самою мірою, як якби кожна окрема публікація або патентна заявка була конкретним та індивідуальним чином включена за допомогою посилання.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> I-MAB

<120> АНТИТІЛА ДО ГМ-КСФ ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ
 <130> 54LW-258793-WO
 <150> CN201610831525.9
 5 <151> 2016-09-19
 <150> CN201610832677.0
 <151> 2016-09-19
 <160> 46
 <170> PatentIn версія 3.5
 10 <210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 15 <223> Синтетична
 <400> 1
 Ser His Tyr Leu His
 1 5
 20 <210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 25 <223> Синтетична
 <400> 2
 Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Lys Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 30 Gly
 <210> 3
 <211> 11
 35 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетична

<400> 3

Gly Thr Lys Tyr Leu Asn Trp Asn Phe Asp Val

1 5 10

5 <210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

10 <223> Синтетична

<400> 4

Lys Ala Asn Gln Asn Val Gly Thr Thr Leu Ala

1 5 10

15 <210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

20 <223> Синтетична

<400> 5

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser

1 5

25 <210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

30 <223> Синтетична

<400> 6

His Gln Tyr Thr Thr Tyr Pro Leu Thr

1 5

35 <210> 7

<211> 120

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична

<400> 7

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

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Asp Tyr Thr Leu Thr Ser His
20 25 30

10 Tyr Leu His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

15 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Thr Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

20 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Glu Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Lys Tyr Leu Asn Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Thr
100 105 110

25 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8

<211> 120

30 <212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична

<400> 8

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His

UA 126565 C2

20 25 30
 Tyr Leu His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 5
 Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Lys Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 10 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 15 Ala Arg Gly Thr Lys Tyr Leu Asn Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 20
 <210> 9
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 25 <220>
 <223> Синтетична
 <400> 9
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 30
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His
 20 25 30
 Tyr Leu His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 35 40 45
 Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Lys Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ser Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Lys Tyr Leu Asn Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110

10 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 10
 15 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетична

20 <400> 10
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His
 25 20 25 30

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

30 Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Lys Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Lys Tyr Leu Asn Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

5 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11

<211> 120

<212> PRT

10 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична

<400> 11

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His
20 25 30

20 Tyr Leu His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

25

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Lys Tyr Leu Asn Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

35 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 12

<211> 120
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 5 <223> Синтетична
 <400> 12
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 10 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Asp Tyr Thr Leu Thr Ser His
 20 25 30
 Tyr Leu His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 15 Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Lys Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 20 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 25 Ala Arg Gly Thr Lys Tyr Leu Asn Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 30
 <210> 13
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 35 <220>
 <223> Синтетична
 <400> 13
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

UA 126565 C2

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His

20 25 30

5

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Lys Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

10 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

15 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Thr Lys Tyr Leu Asn Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Gln

100 105 110

20

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 14

25 <211> 120

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична

30 <400> 14

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His

35 20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

5 Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

10 Ala Arg Gly Thr Lys Tyr Leu Asn Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
15 115 120

<210> 15
<211> 120
<212> PRT
20 <213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 15

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
25 1 5 10 15

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

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

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

35 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

UA 126565 C2

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

Ala Arg Gly Thr Lys Tyr Leu Asn Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Gln
5 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

10 <210> 16
<211> 120
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>

15 <223> Синтетична
<400> 16

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

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

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

25 Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Lys Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
30 65 70 75 80

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

35 Ala Arg Gly Thr Lys Tyr Leu Asn Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 17

<211> 120

5 <212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична

<400> 17

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

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

15 Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Lys Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
20 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Thr Lys Tyr Leu Asn Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

30 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 18

35 <211> 107

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична

<400> 18

Asp Ile Val Leu Thr Gln Pro Gln Lys Phe Leu Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

5

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Asn Gln Asn Val Gly Thr Thr
20 25 30

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

10

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

15

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

20

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

<210> 19

25

<211> 107

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична

30

<400> 19

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Asn Gln Asn Val Gly Thr Thr
20 25 30

35

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

10 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 20

15 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетична

20 <400> 20

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Asn Gln Asn Val Gly Thr Thr
 25 20 25 30

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

30 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 21

5 <211> 107

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична

10 <400> 21

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

15 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Asn Gln Asn Val Gly Thr Thr
20 25 30

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

20 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

25

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

30 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 22

<211> 107

<212> PRT

35 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична

<400> 22

	Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Phe	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
	1				5					10					15	
5	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Asn	Gln	Asn	Val	Gly	Thr	Thr
				20					25					30		
	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Pro	Lys	Ala	Leu	Ile
				35				40						45		
10	Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly
		50					55					60				
	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
	65					70					75				80	
15	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	His	Gln	Tyr	Thr	Thr	Tyr	Pro	Leu
					85					90					95	
	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys					
20				100					105							
	<210>	23														
	<211>	5														
	<212>	PRT														
25	<213>	Штучна	послідовність													
	<220>															
	<223>	Синтетична														
	<400>	23														
	Pro	Tyr	Ser	Ile	His											
30	1				5											
	<210>	24														
	<211>	17														
	<212>	PRT														
35	<213>	Штучна	послідовність													
	<220>															
	<223>	Синтетична														
	<400>	24														

Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Ile Glu Tyr Asn Gln His Phe Lys
 1 5 10 15

Asp

5

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична

<400> 25

Gly Gly Asp Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr

15 1 5 10

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

20 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична

<400> 26

Arg Leu Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Phe Leu Ala

25 1 5 10

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

30 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична

<400> 27

Asn Ala Glu Thr Leu Ala Glu

35 1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетична
 5 <400> 28
 Gln Gln His Tyr Gly Thr Pro Tyr Thr
 1 5

 <210> 29
 10 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетична
 15 <400> 29
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Ala Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Pro Tyr
 20 20 25 30

 Ser Ile His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

 25 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Ile Glu Tyr Asn Gln His Phe
 50 55 60

 Lys Asp Arg Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 30
 Met Gln Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ala Arg Gly Gly Asp Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 35 100 105 110

 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 30
 <211> 119
 <212> PRT
 5 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетична
 <400> 30
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 10 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Pro Tyr
 20 25 30
 15 Ser Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Ile Glu Tyr Asn Gln His Phe
 50 55 60
 20 Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 25 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Asp Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 30 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 31
 <211> 119
 35 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетична

<400> 31

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

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

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

10

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Ile Glu Tyr Asn Gln His Phe
50 55 60

15 Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

20 Ala Arg Gly Gly Asp Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

25

<210> 32

<211> 119

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

30

<220>

<223> Синтетична

<400> 32

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

35

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ser Pro Tyr
20 25 30

UA 126565 C2

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Ile Glu Tyr Asn Gln His Phe
5 50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Asp Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

15 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 33

20 <211> 119
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична

25 <400> 33

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ser Pro Tyr
30 20 25 30

Ser Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

35 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Ile Glu Tyr Asn Gln His Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

UA 126565 C2

	65		70		75		80									
	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85				90					95		
5	Ala	Arg	Gly	Gly	Asp	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
					100				105					110		
	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
10					115											
	<210>		34													
	<211>		119													
	<212>		PRT													
15	<213>		Штучна послідовність													
	<220>															
	<223>		Синтетична													
	<400>		34													
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
20	1				5					10					15	
	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ile	Phe	Ser	Pro	Tyr
					20				25					30		
25	Ser	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
			35					40					45			
	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Thr	Gly	Tyr	Ile	Glu	Tyr	Asn	Gln	His	Phe
		50					55					60				
30	Lys	Asp	Arg	Thr	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
	65					70				75					80	
	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
35					85				90					95		
	Ala	Arg	Gly	Gly	Asp	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
					100				105					110		

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

5 <210> 35

<211> 119

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

10 <223> Синтетична

<400> 35

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1

5

10

15

15 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Pro Tyr

20

25

30

Ser Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

20

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Ile Glu Tyr Asn Gln His Phe

50

55

60

Lys Asp Arg Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

25

65

70

75

80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

30 Ala Arg Gly Gly Asp Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100

105

110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

35

<210> 36

<211> 107

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична

<400> 36

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Leu Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Phe
20 25 30

10

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

15 Tyr Asn Ala Glu Thr Leu Ala Glu Asp Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu Gln Thr
65 70 75 80

20 Asp Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Gly Thr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn Leu Glu Ile Glu
100 105

25

<210> 37

<211> 107

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

30

<220>

<223> Синтетична

<400> 37

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

35

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Leu Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Phe
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asn Ala Glu Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 5 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 10 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Gly Thr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 15
 <210> 38
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 20 <220>
 <223> Синтетична
 <400> 38
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 25
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Leu Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Phe
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val
 30 35 40 45
 Tyr Asn Ala Glu Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 35 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Gly Thr Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

5

<210> 39

<211> 107

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

10

<220>

<223> Синтетична

<400> 39

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Leu Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Phe

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val

20

35

40

45

Tyr Asn Ala Glu Thr Leu Ala Glu Asp Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

25

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Gly Thr Pro Tyr

85

90

95

30

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 40

35

<211> 107

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична

<400> 40

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

5

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Leu Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Phe
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val
35 40 45

10

Tyr Asn Ala Glu Thr Leu Ala Glu Asp Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

15

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

20

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 41

25

<211> 107

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична

30

<400> 41

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Leu Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Phe
20 25 30

35

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Asn Ala Glu Thr Leu Ala Glu Asp Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

5 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

10

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 42

15

<211> 5

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична

20

<400> 42

Asp Tyr Thr Leu Thr
1 5

<210> 43

25

<211> 5

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична

30

<400> 43

Gly Tyr Thr Phe Thr
1 5

<210> 44

35

<211> 5

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична

<400> 44

Gly Tyr Ile Phe Thr

1 5

5

<210> 45

<211> 5

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

10

<220>

<223> Синтетична

<400> 45

Gly Tyr Ile Phe Ser

1 5

15

<210> 46

<211> 5

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

20

<220>

<223> Синтетична

<400> 46

Gly Gly Thr Phe Ser

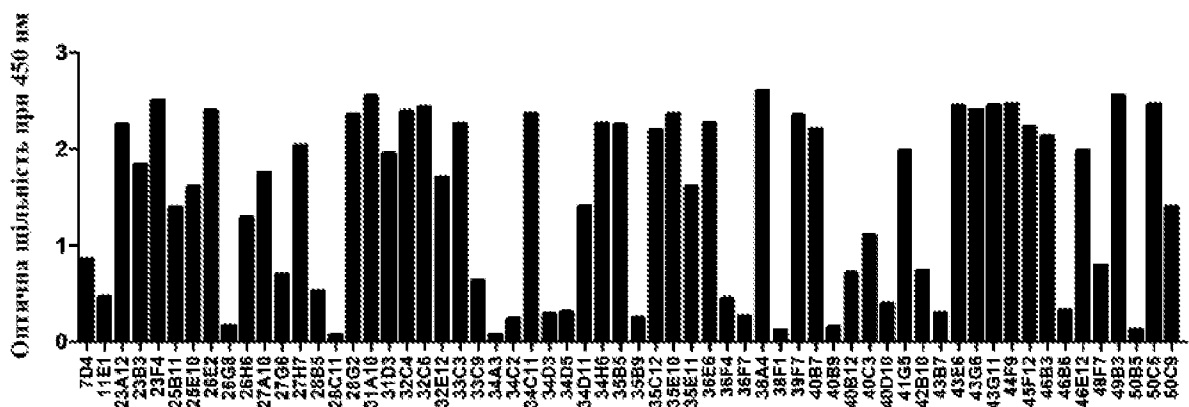
1 5

25

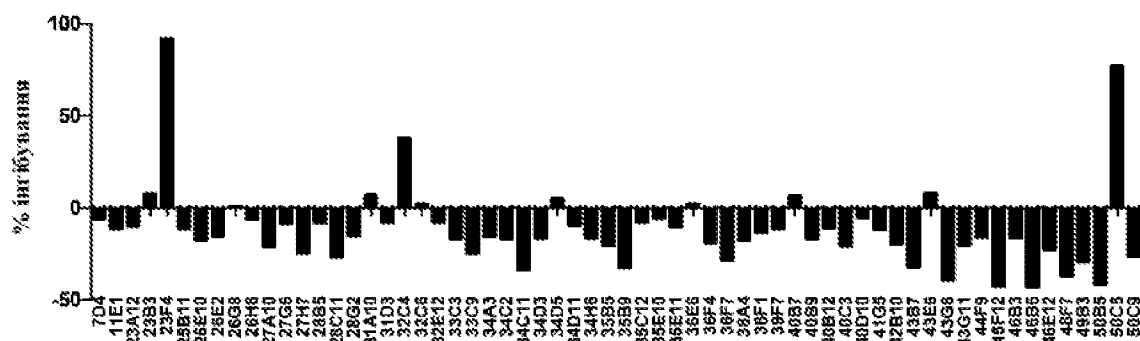
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Виділене антитіло або його фрагмент, причому зазначене антитіло або його фрагмент має специфічність до людського білка ГМ-КСФ та містить варіабельну область важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 14, та варіабельну область легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 22.
2. Антитіло або його фрагмент за п. 1, що додатково містить константну область важкого ланцюга, константну область легкого ланцюга, область Fc або їх комбінацію.
3. Антитіло або його фрагмент за п. 2, де константна область легкого ланцюга являє собою константну область каппа-ланцюга або лямбда-ланцюга.
4. Антитіло або його фрагмент за п. 1, де зазначене антитіло або його фрагмент має ізотип IgG, IgM, IgA, IgE або IgD.
5. Антитіло або його фрагмент за п. 4, де ізотип являє собою IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4.
6. Антитіло або його фрагмент за будь-яким з пп. 1-5, де зазначене антитіло або його фрагмент являє собою химерне антитіло, гуманізоване антитіло або повністю людське антитіло.
7. Антитіло або його фрагмент за п. 6, де зазначене антитіло або його фрагмент являє собою гуманізоване антитіло.
8. Антитіло або його фрагмент за п. 1, де зазначене антитіло або його фрагмент являє собою біспецифічне антитіло або одноланцюговий варіабельний фрагмент.

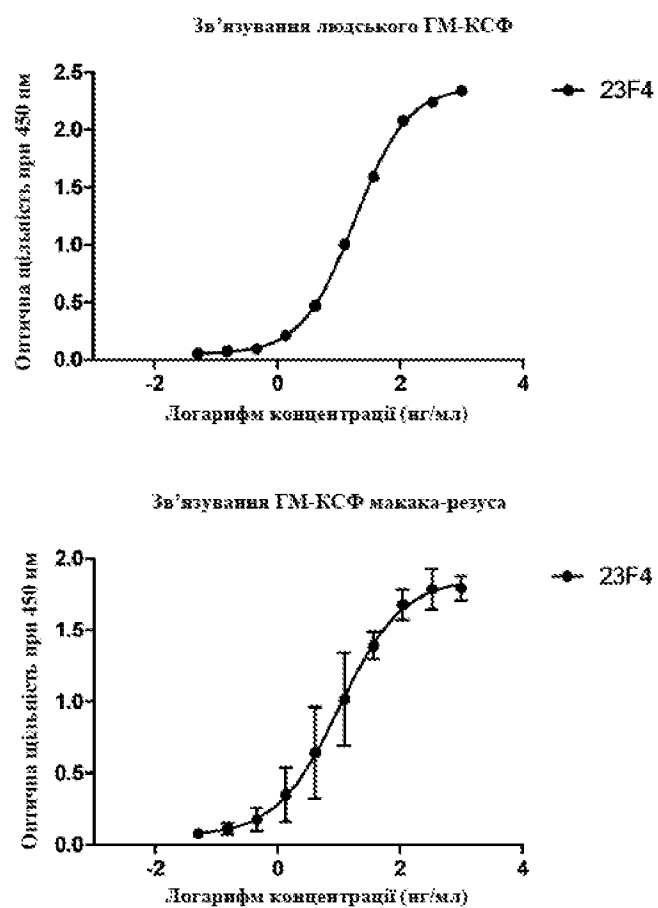
9. Композиція для лікування порушень, опосередкованих ГМ-КСФ, яка містить антитіло або його фрагмент за будь-яким з пп. 1-8 та фармацевтично прийнятний носій.
10. Виділена клітина, яка містить один або більше полінуклеотидів, які кодують антитіло або його фрагмент за будь-яким з пп. 1-8.
- 5 11. Спосіб лікування запального або аутоімунного захворювання або стану у пацієнта, якому це необхідно, який включає введення зазначеному пацієнту антитіла або його фрагмента за будь-яким з пп. 1-8.
12. Спосіб за п. 11, який **відрізняється** тим, що запальне захворювання або стан вибрано з групи, яка складається з хвороби Альцгеймера, хвороби Аддісона, атеросклерозу, анкілозуючого спондиліту, артриту, остеоартриту (ОА), ревматоїдного артриту (РА), псоріатичного артриту (ПА), анкілозуючого спондиліту, астми, атеросклерозу, хронічної обструктивної хвороби легень (ХОХЛ), хвороби Крона, коліту, дерматиту, дивертикуліту, фіброміалгії, гепатиту, синдрому подразненого кишечника (СПК), системного червоного вовчака (СЧВ), нефриту, хвороби Паркінсона (ХП), васкуліту та виразкового коліту.
- 10 13. Спосіб за п. 11, який **відрізняється** тим, що аутоімунне захворювання або стан вибрано з групи, яка складається з осередкової алопеції, аутоімунної гемолітичної анемії, аутоімунного гепатиту, дерматоміозиту, діабету (1 типу), целиакії, аутоімунного ювенільного ідіопатичного артриту, гломерулонефриту, хвороби Грейвса, синдрому Гійєна-Барре, ідіопатичної тромбоцитопенічної пурпури, міастенії гравіс, аутоімунного міокардиту, розсіяного склерозу, пемфігусу/пемфігоїду, перніціозної анемії, вузликового поліартеріїту, поліміозиту, первинного біліарного цирозу, псоріазу, ревматоїдного артриту, склеродермії/системного склерозу, синдрому Шегрена, системного червоного вовчака, аутоімунного тиреоїдиту, тиреоїдиту Хашимото, аутоімунного увеїту, вітиліго та гранулематозу з поліангіїтом (Вегенера).
- 15 14. Спосіб лікування раку у пацієнта, якому це необхідно, який включає введення зазначеному пацієнту антитіла або його фрагмента за будь-яким з пп. 1-8.
- 20 15. Спосіб за п. 14, який **відрізняється** тим, що рак вибраний з групи, яка складається з раку сечового міхура, раку молочної залози, колоректального раку, раку ендометрія, раку стравоходу, раку голови та шиї, раку нирки, лейкозу, раку печінки, раку легень, лімфоми, меланоми, раку підшлункової залози, раку передміхурової залози та раку щитовидної залози.
- 25 16. Спосіб зменшення або полегшення болю у пацієнта, якому це необхідно, який включає введення зазначеному пацієнту антитіла або його фрагмента за будь-яким з пп. 1-8.
- 30 17. Спосіб виявлення експресії ГМ-КСФ у зразку, який включає приведення зразка у контакт з антитілом або його фрагментом за будь-яким з пп. 1-8 в умовах, які забезпечують зв'язування антитіла або його фрагмента з ГМ-КСФ та виявлення зв'язування, що свідчить про експресію ГМ-КСФ у зразку.
- 35



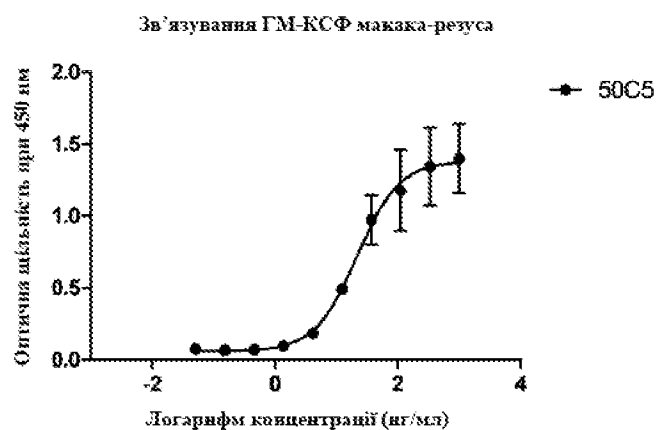
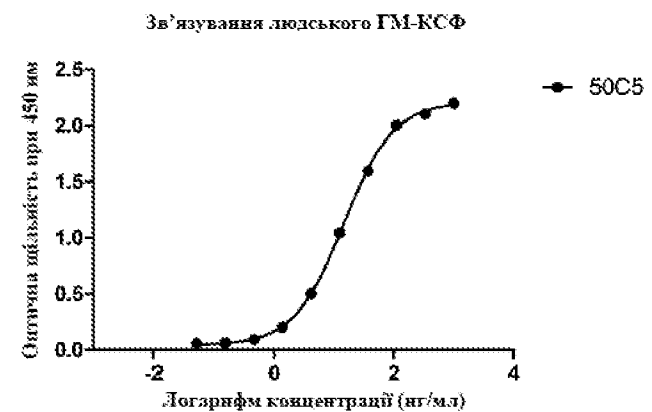
Фіг.1



Фіг.2



Фіг.3



Фіг.3
(продовження)

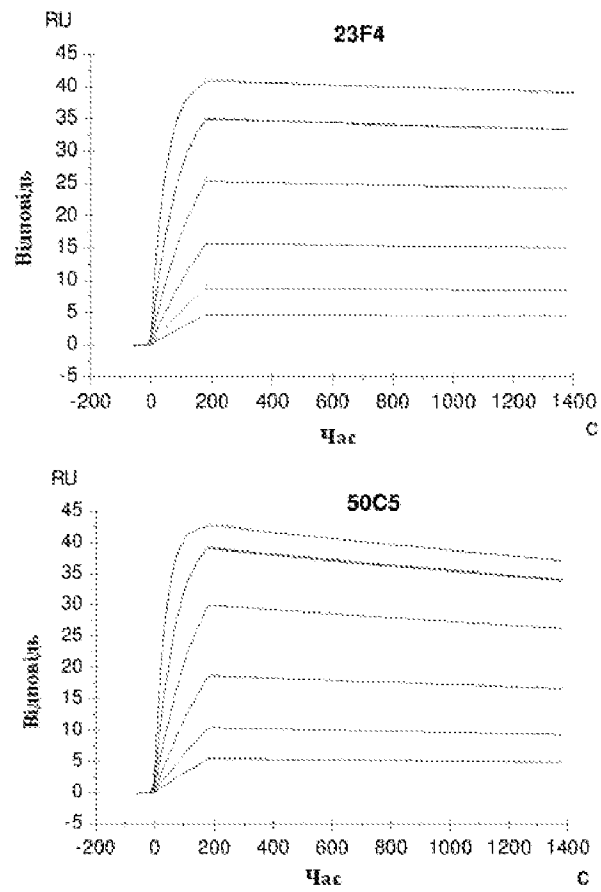


Fig.4

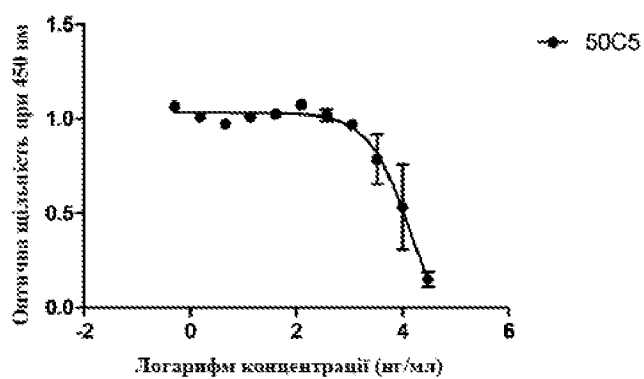
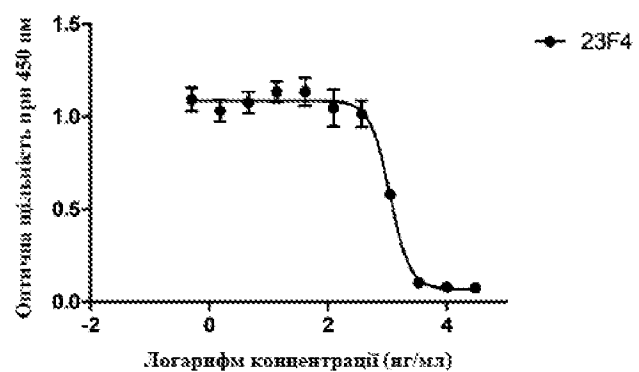


Fig.5

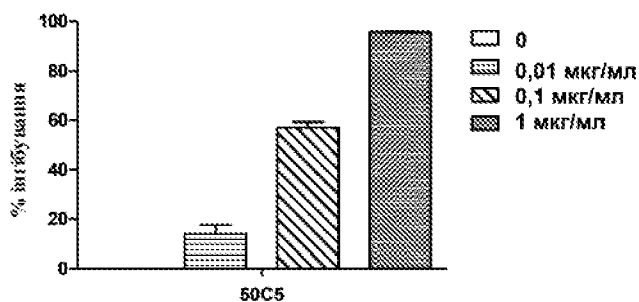
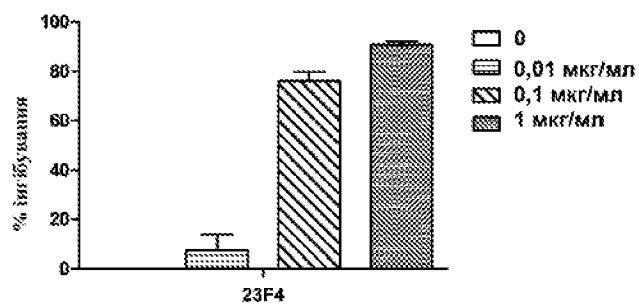
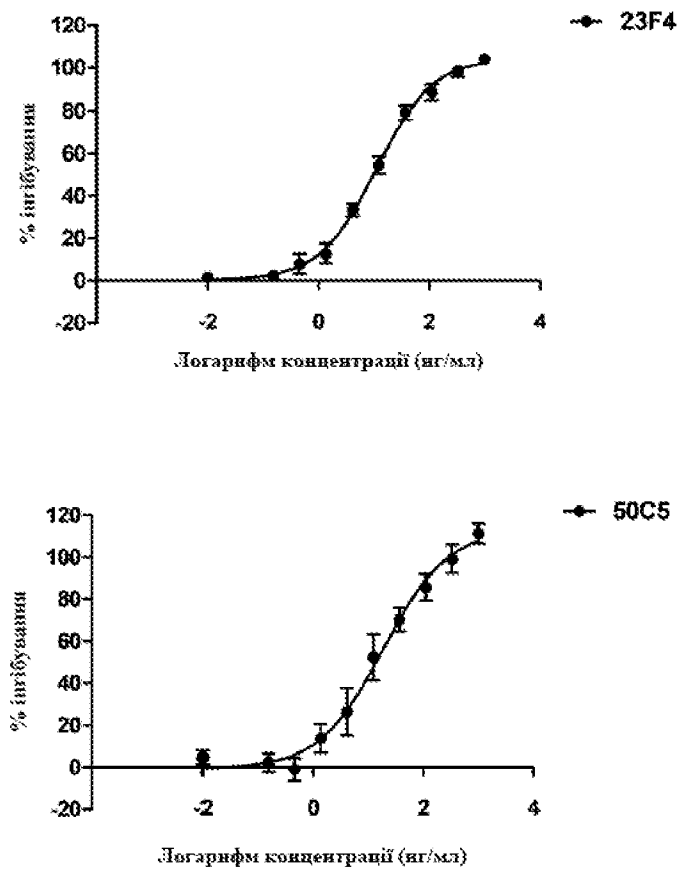


Fig.6



Фіг.7

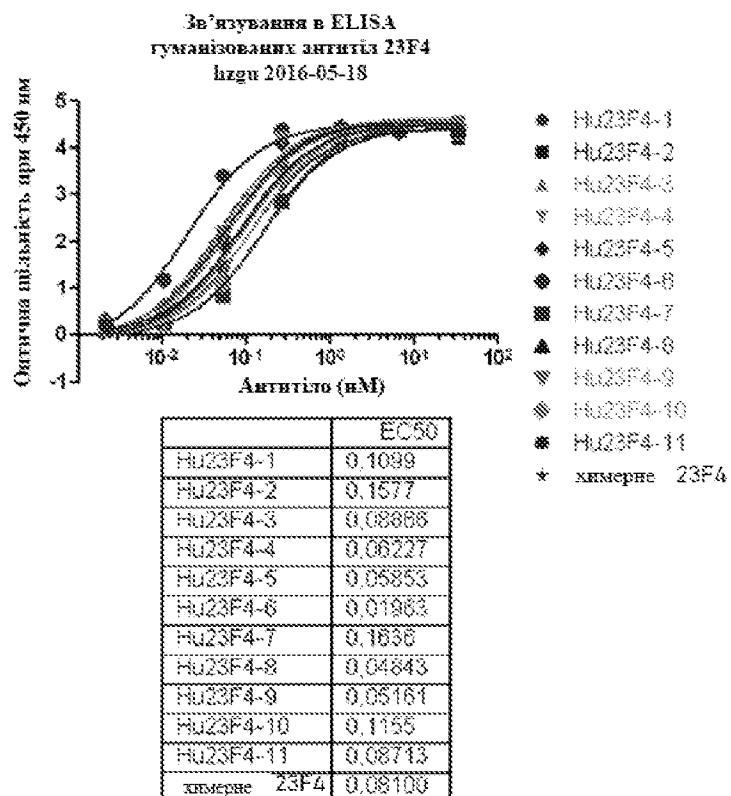
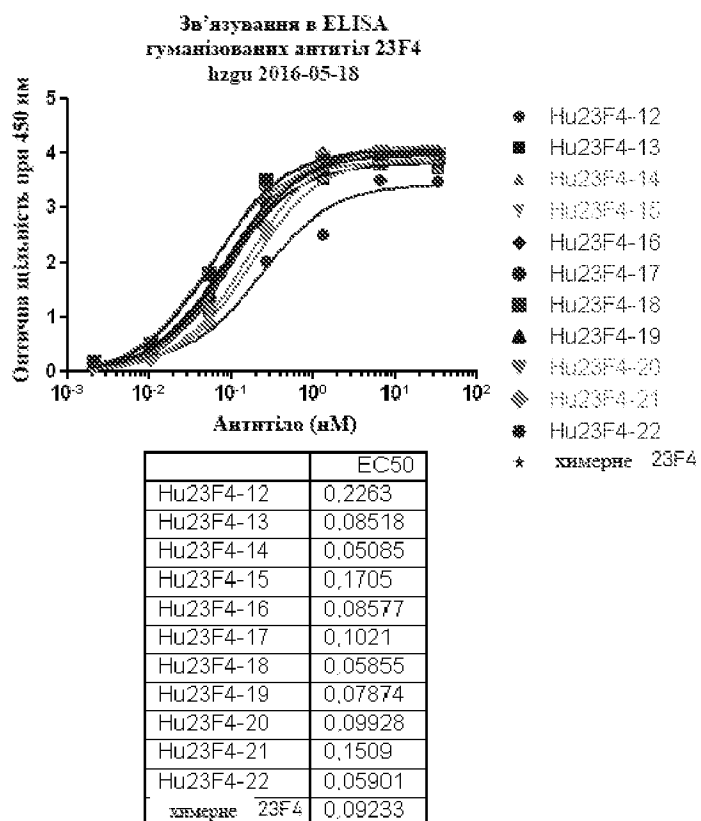
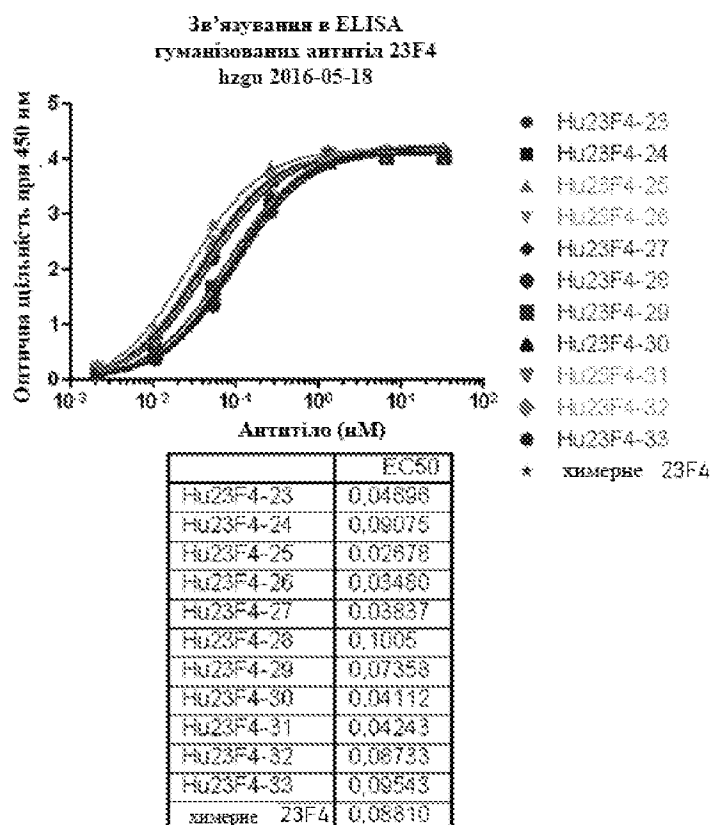


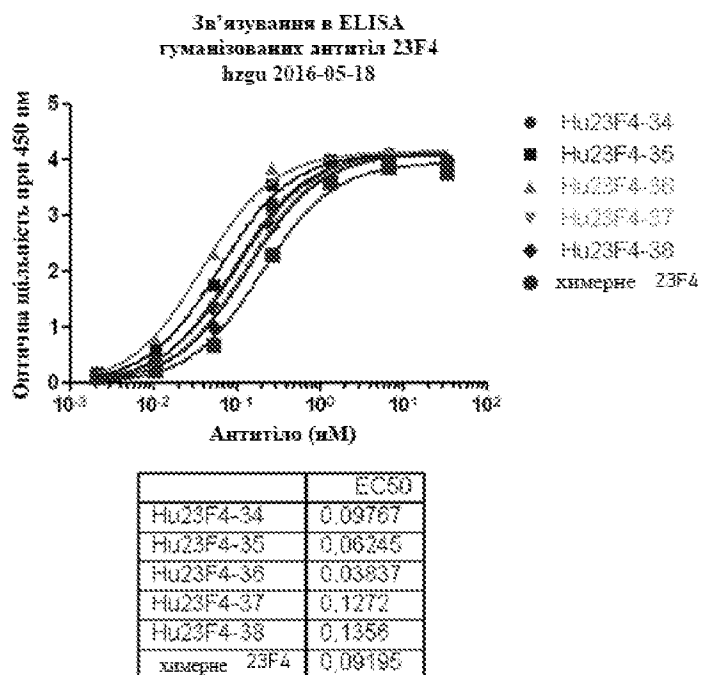
Fig.8



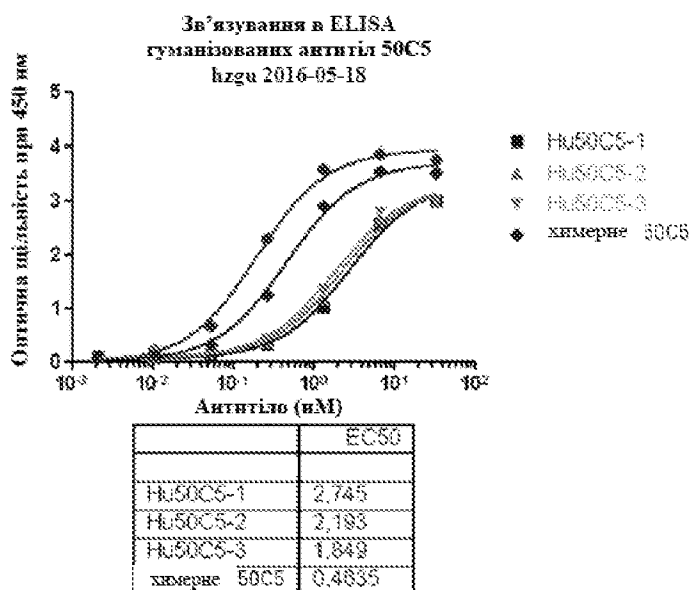
Фіг.8
(продовження)



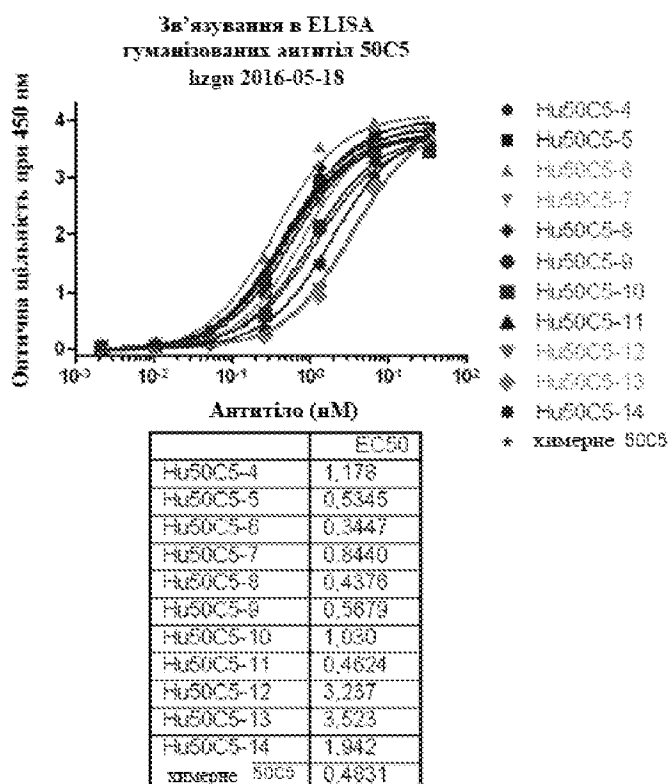
Фіг.8
(продовження)



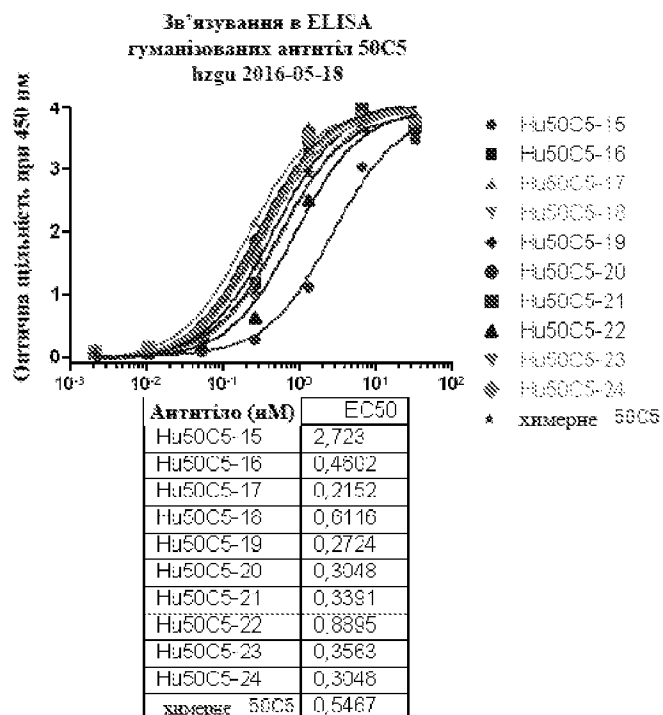
Фіг.8
(продовження)



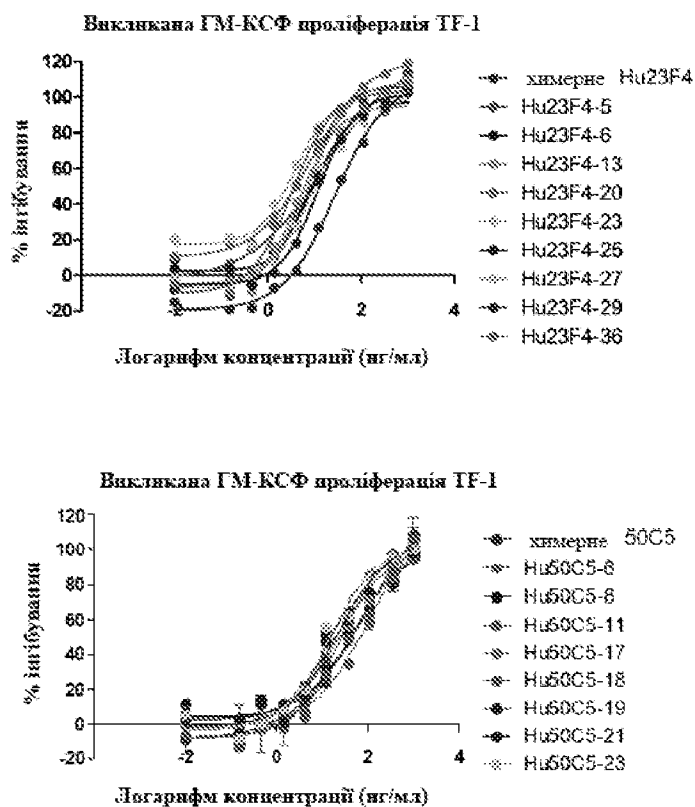
Фіг.8
(продовження)



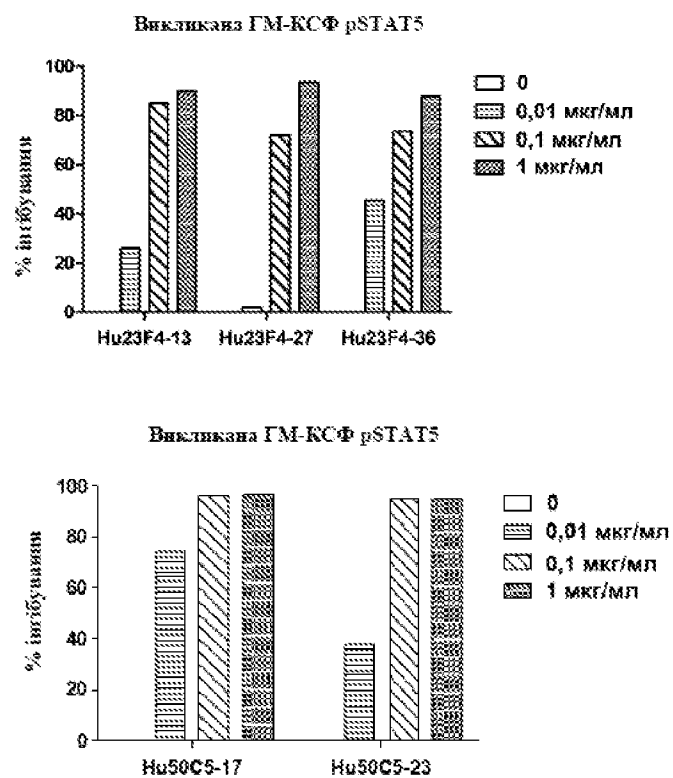
Фіг.8
(продовження)



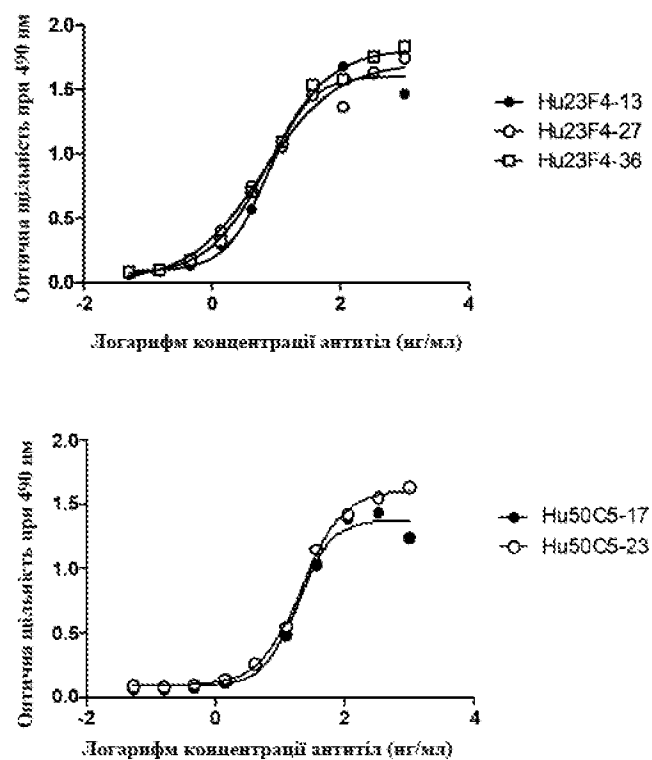
Фіг.8
(продовження)



Фіг.9



Фіг.10



Фіг.11

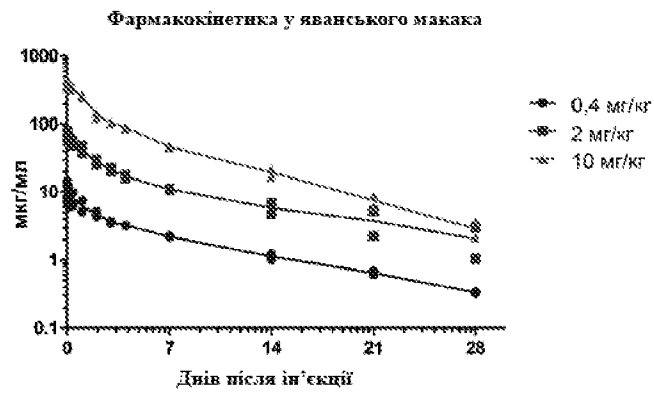


Fig.12