



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 16/22 (2020.08); A61K 39/39533 (2020.08); A61P 11/00 (2020.08); A61P 35/00 (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2018146158, 07.06.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
07.06.2017Дата регистрации:
22.04.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
08.06.2016 GB 1610044.8

(43) Дата публикации заявки: 09.07.2020 Бюл. № 19

(45) Опубликовано: 22.04.2021 Бюл. № 12

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 09.01.2019(86) Заявка РСТ:
EP 2017/063796 (07.06.2017)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2017/211873 (14.12.2017)Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

БОН, Хелен (GB),
КОМПСОН, Джоанн Элизабет (GB),
ДИКСОН, Кейт Луиз (GB),
ДОЙЛ, Карл Брендан (GB),
ЭЛЛИС, Марк (GB),
ГОВЕЙА САНШУ, Мария Маргарита (GB),
ДЖАПП, Реймонд Энтони (GB),
КЕВОРКЯН, Лара (GB),
ЛАЙТВУД, Дэниел Джон (GB),
МАРШАЛЛ, Диана (GB),
ПЭЙН, Эндрю Чарльз (GB),
РАСТРИК, Джозеф Майкл Дэвид (GB),
ШУЛЬЦЕ, Моника-Сара (GB),
ТЕРНЕР, Элисон (GB),
ТАЙСОН, Керри Луиз (GB)

(73) Патентообладатель(и):

ЮСБ БИОФАРМА СРЛ (BE)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO2006086469 A2, 17.08.2006. LISA
M. RICE et al., Fresolimumab treatment decreases
biomarkers and improves clinical symptoms in
systemic sclerosis patients, J Clin Invest., 2015,
Vol.125, N.7, pp.2795-2807. ROSEMARY J.
AKHURST et al., Targeting the TGFβ signalling
pathway in disease, Nat Rev Drug Discov, 2012,
Vol.11, N.10, pp.790-811. RU2386638 (см. прод.)

(54) Антагонистические антитела, которые связываются с человеческими TGFβ1, TGFβ2 и TGFβ3, и их
применение при лечении фиброза легких

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии, в частности к антагонистическому антителу или его связывающему фрагменту, специфично связывающемуся с человеческим TGF-beta 1, человеческим TGF-beta 2 и человеческим TGF-beta 3, к способу его получения, а также к выделенной последовательности ДНК, кодирующей его легкую и тяжелую цепь, и содержащей его композиции. Также раскрыты вектор, клетка-

хозяин, содержащие вышеуказанную последовательность ДНК. Изобретение также относится к применению вышеуказанного антитела или его фрагмента при изготовлении лекарственного средства для лечения или профилактики патологического расстройства, которое опосредовано TGF-beta 1, 2 или 3 или которое связано с повышенным уровнем TGF-beta 1, 2 или 3, а также в изготовлении

лекарственного средства для лечения или профилактики легочного расстройства, которое опосредовано TGF-бета 1, 2 или 3 или которое связано с повышенным уровнем TGF-beta 1, 2 или 3. Изобретение позволяет эффективно осуществлять лечение пациента, страдающего

или подверженного риску патологического расстройства, опосредованного TGF-beta 1, 2 или 3 или связанного с повышенным уровнем TGF-beta 1, 2 или 3. 13 н. и 15 з.п. ф-лы, 13 табл., 12 пр., 18 ил.

(56) (продолжение):
C2, 20.04.2010.

R U 2 7 4 6 9 2 6 C 2

R U 2 7 4 6 9 2 6 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07K 16/22 (2006.01)*A61K 39/395* (2006.01)*A61P 11/00* (2006.01)*A61P 35/00* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C07K 16/22 (2020.08); A61K 39/39533 (2020.08); A61P 11/00 (2020.08); A61P 35/00 (2020.08)(21)(22) Application: **2018146158, 07.06.2017**(24) Effective date for property rights:
07.06.2017Registration date:
22.04.2021

Priority:

(30) Convention priority:
08.06.2016 GB 1610044.8(43) Application published: **09.07.2020 Bull. № 19**(45) Date of publication: **22.04.2021 Bull. № 12**(85) Commencement of national phase: **09.01.2019**(86) PCT application:
EP 2017/063796 (07.06.2017)(87) PCT publication:
WO 2017/211873 (14.12.2017)Mail address:
**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**BON, Khelen (GB),
KOMPSON, Dzhoann Elizabet (GB),
DIKSON, Kejt Luiz (GB),
DOJL, Karl Brendan (GB),
ELLIS, Mark (GB),
GOVEJA SANSU, Mariya Margarida (GB),
DZHAPP, Rejmond Entoni (GB),
KEVORKYAN, Lara (GB),
LAJTVUD, Deniel Dzhon (GB),
MARSHALL, Diana (GB),
PEJN, Endryu Charlz (GB),
RASTRIK, Dzhozef Majkl Devid (GB),
SHULTSE, Monika-Sara (GB),
TERNER, Elison (GB),
TAJSON, Kerri Luiz (GB)**

(73) Proprietor(s):

YUSB BIOFARMA SRL (BE)**(54) ANTAGONISTIC ANTIBODIES THAT BIND TO HUMAN TGFβ1, TGFβ2 AND TGFβ3, AND THEIR USE IN TREATMENT OF LUNG FIBROSIS**

(57) Abstract:

FIELD: biochemistry.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biochemistry and namely to an antagonist antibody or its binding fragment that specifically binds to human TGF-beta 1, human TGF-beta 2 and human TGF-beta 3, to a method for its production as well as to an isolated DNA sequence encoding its light and heavy chain; and compositions containing it. Also disclosed are a vector, host cell containing the above DNA sequence. The invention also relates to the use of the above antibody or a fragment thereof in the manufacture of a medicament for the treatment or prevention of a

pathological disorder mediated by TGF-beta 1, 2 or 3 or which is associated with an increased level of TGF-beta 1, 2 or 3 as well as in the manufacture a medicament for the treatment or prevention of a pulmonary disorder which is mediated by TGF-beta 1, 2 or 3, or which is associated with an increased level of TGF-beta 1, 2 or 3.

EFFECT: invention makes it possible to effectively treat a patient suffering from or at risk of a pathological disorder mediated by TGF-beta 1, 2 or 3, or associated with an increased level of TGF-beta 1, 2 or 3.

28 cl, 13 tbl, 12 ex, 18 dwg

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

У людей присутствует три изоформы TGF-beta: TGF-beta 1, TGF-beta 2 и TGF-beta 3. Изоформы гомологичны и имеют идентичность последовательности ~70%. Все они синтезируются и секретируются в виде латентного комплекса, в котором TGF-beta образует комплекс с двумя другими полипептидами, латентным TGF-beta-связывающим белком (LTBP) и латентно-ассоциированным пептидом (LAP) (белок, полученный из N-концевой области продукта гена TGF-beta). Сывороточные протеиназы, такие как плазмин, катализируют высвобождение активного зрелого TGF-beta из комплекса.

В своих активных формах изоформы TGF-beta существуют в виде гомодимерного белка ~25 кДа. Все 3 изоформы передают сигнал через одинаковые трансмембранные рецепторы, TbetaRI и TbetaRII. Сначала TGF-beta связывается с TbetaRII, который затем образует гетеротетрамерный комплекс с TbetaRI, что приводит к фосфорилированию TbetaRI и активации последующих сигнальных путей (см. Derynck & Miyazono (eds), 2008, The TGF-beta Family, Cold Spring Harbor Press). Несмотря на сигнализацию через один и тот же рецепторный комплекс, у трех изоформ были отмечены различные неперекрывающиеся функции, которые можно проиллюстрировать на примере мышей, содержащих генетические делеции индивидуальных изоформ, каждая из которых имеет отличный фенотип (Shull et al., 1992, Nature 359: 693-699, Sanford et al., 1997, Development 124: 2659-2670; Proetzel et al., 1995, Nature Genet., 11: 409-414).

TGF-beta представляет собой плеотропную молекулу, участвующую в ряде биологических процессов. TGF-beta ингибирует пролиферацию многих типов клеток, включая эпителиальные, эндотелиальные, гематopoэтические и иммунные клетки. Эффекторные функции иммунных клеток также реактивны в отношении TGF-beta, и TGF-beta подавляет дифференцировку клеток Th1 и Th2, стимулируя клетки Treg, поэтому TGF-beta обладает преимущественно иммуносупрессивной функцией (Li et al., 2006, Ann Rev Immunol., 24: 99-146, Rubtsov & Rudensky, 2007, Nat Rev Immunol., 7: 443-453). Экспрессия TGF-beta подвержена сильной регуляции и участвует в поддержании тканевого гомеостаза. Однако хроническая сверхэкспрессия TGF-beta связана с управлением прогрессии заболевания в таких болезненных состояниях, как злокачественное новообразование и фиброз.

Благодаря роли человеческого TGF-beta во множестве человеческих расстройств были разработаны терапевтические стратегии для ингибирования или противодействия активности TGF-beta. В частности, искали антитела, которые связываются и нейтрализуют TGF-beta, в качестве средства для ингибирования активности TGF-beta. В данной области известны антитела против TGF-beta. Системно введенное антитело против TGF-beta1 (CAT-192) оценивали в фазе I/II клинических испытаний у пациентов с системным склерозом без каких-либо доказательств эффективности с дозами до 10 мг/кг (Denton et al., 2007, Arthritis Rheum, 56: 323-333). Гуманизированное антитело (TbetaM1), оптимизированное для активности против TGF-beta1, оценивали в Фазе I клинических испытаний у пациентов с метастатическим злокачественным новообразованием, но при этом не было отмечено никакого противоопухолевого эффекта (Cohn et al., 2014, Int J Oncol., 45: 2221-2231). Человеческое антитело против TGF-beta2 (CAT-152) оценивали для профилактики рубцевания после трабекулэктомии, но различия между плацебо не отмечались (CAT-152 0102 Trabeculectomy Study Group, 2007, Ophthalmology, 114: 1822-1830). Для лечения некоторых видов злокачественного новообразования и фиброзного заболевания было исследовано системное введенное полноразмерного IgG, специфичного к TGF-beta1, 2 и 3 (Fresolimumab, GC1008). Однако сообщалось о побочных эффектах, включающих поражения кожи, которые, по-

видимому, связаны с системной доставкой антитела (Lacouture et al., 2015, *Cancer Immunol Immunother.*, 64: 437-446).

Фиброз является aberrантным ответом на заживление ран, при котором в органе или ткани образуется избыточная фиброзная соединительная ткань. На стадии ремоделирования при нормальном заживлении ран синтез нового коллагена превышает скорость его деградации, что приводит к образованию рубцов. Конечным процессом нормального заживления ран является рассасывание рубца, которое происходит за счет сочетания уменьшения синтеза коллагена и повышенной деградации коллагена, процесса, контролируемого матриксными металлопротеиназами (ММП) и тканевыми ингибиторами металлопротеиназ (TIMPS), которые продуцируются гранулоцитами, макрофагами, эпидермальными клетками и миофибробластами. Таким образом, заживление ран включает в себя сдвиг метаболического равновесия от стимулирования депонирования с последующим разрушением. Любое нарушение этого равновесия может привести к чрезмерному депонированию матриксных компонентов, что приводит к отверждению и рубцеванию тканей и к разрушению нормальной тканевой архитектуры, и к нарушению тканевой функции; это нарушение называют фиброзом.

Аномальные эпителиально-мезенхимальные взаимодействия, измененные фенотипы фибробластов, увеличенная пролиферация фибробластов и чрезмерное депонирование коллагена и внеклеточного матрикса представляют собой все ключевые процессы, которые способствуют фиброзу. Ключевым типом клеток в этом процессе являются миофибробласты. Активация миофибробластов приводит к повышенной секреции ими коллагена I, III и IV типов, фибронектина, ламинина и протеогликанов. Другие типы клеток, которые, как считается, играют важную роль в фиброзе, включают эпителиальные клетки и макрофаги. TGF-beta считается основным регулятором фиброза и способствует фиброзу посредством действий на нескольких типах клеток, включающих макрофаги и фибробласты (Leask & Abraham, 2004, *FASEB J.*, 18: 816-827). Ключевые профиброзные активности включают стимулирование миграции фибробластов и трансформацию фибробластов в миофибробласты, стимулирование чрезмерного депонирования ECM. TGF-beta также участвует в миграции макрофагов и стимулирует продуцирование макрофагами мезенхимальных факторов роста, таких как PDGF, а также ингибирует деградацию ECM за счет повышенной экспрессии ингибиторов протеаз, таких как TIMP3.

Фиброзные заболевания являются основной причиной заболеваемости и смертности и могут влиять на многие системы тканей и органов. В эту группу заболеваний включены интерстициальные заболевания легких. Идиопатический легочный фиброз (IPF) является наиболее распространенной формой интерстициальных заболеваний легких и относится к одной из семи отдельных групп идиопатических интерстициальных пневмоний (ИП). Интерстиций представляет собой микроскопическое пространство между базальными мембранами альвеолярного эпителия и капиллярного эндотелия и образует часть альвеолярно-капиллярного барьера. ИП характеризуются расширением интерстициального компартмента воспалительными клетками, с ассоциированным фиброзом, особенно отмеченным для IPF.

У пациентов с IPF проявляется прогрессирующая напряженная одышка и кашель с прогрессирующим легочным паренхимным фиброзом, что приводит к легочной рестрикции и гипоксемии. Диагноз IPF устанавливается с использованием комбинации клинических, рентгенологических и патологических критериев и связан с характерной патологической картиной, называемой обычной интерстициальной пневмонией (UIP).

IPF можно диагностировать в любом возрасте, но наиболее распространен у лиц

старше 50 лет, а распространенность среди мужчин выше, чем у женщин. При IPF уровень смертности выше, чем при многих неопластических заболеваниях, при этом коэффициент выживаемости в течение 3 лет составляет 50%, а выживаемость в течение 5 лет составляет всего 20%. Причина IPF неизвестна, но предполагается, что существует несколько эпизодов активации эпителиальных клеток от еще неидентифицированных экзогенных и эндогенных стимулов, которые, если их не подвергать лечению, приводят к прогрессирующим повреждениям легких и в конечном счете к фиброзу. Нарушение альвеолярного эпителия вызывает миграцию, пролиферацию и активацию мезенхимальных клеток, что приводит к образованию фибробластных/миофибробластных очагов с чрезмерным накоплением ECM.

Экспрессия TGF-beta увеличивается в фиброзных легких пациентов с IPF (Broekelmann et al., 1991, PNAS, 88: 6642-6646, Khalil et al., 1991, Am J Respir Cell Mol Biol, 5: 155-162) и наряду с хорошо известной ролью TGF-beta в управлении фиброзных механизмов, ингибирование TGF-beta следует рассматривать как эффективный механизм лечения пациентов с IPF.

Для пациентов с IPF не существует эффективной терапии. Противовоспалительные агенты, включающие кортикостероиды, циклофосфамид и азотиоприн, оказались мало полезными для пациентов и имели связанные побочные эффекты. Недавно были одобрены два низкомолекулярных лекарственных средства, пирфенидон и нинтеданиб для лечения IPF. Было показано, что оба лекарственных средства замедляют прогрессирование заболевания, но не излечивают заболевание, и у многих пациентов продолжается ухудшение. Кроме того, очевидны побочные явления, связанные с лечением, такие как желудочно-кишечные расстройства, сыпь и светочувствительность (Cottin and Maher, 2015, Eur Respir Rev, 24: 58-64, Mazzei et al., 2015, Ther Adv Respir Dis.) На сегодняшний момент для фиброзных проявлений нет никаких направленных терапий и нет терапий антителами.

Кроме того, TGF-beta также ассоциирован с легочной гипертензией, такой как легочная артериальная гипертензия (РАН). Повышенная экспрессия TGF-beta у пациентов с легочной гипертензией была продемонстрирована иммуногистохимией (Botney et al., 1994, Am J Pathol, 144: 286-295), а также была отмечена в гомогенатах крови и легких пациентов с легочной гипертензией (Selimovic et al., 2009, Eur Respir J, 34: 662-668, Gore et al., PLOS One (2014) 9 (6): e100310). Также было показано, что киназный ингибитор TbetaRI ингибирует модель легочной гипертензии, индуцированную монокроталином (Zaiman et al., 2008, Am J Respir Crit Care Med, 177: 896-905). Легочная гипертензия является хорошо изученным осложнением IPF, и эти данные подтверждают гипотезу о том, что пациенты IPF, симптомы которых обусловлены как интерстициальным фиброзом, так и легочной гипертензией, могут относиться к подгруппе пациентов, для которых терапия против TGF-beta может быть потенциально еще более эффективной.

Следовательно, существует потребность в подходящих и/или улучшенных антителах, способных связывать и ингибировать все три изоформы TGF-beta, подходящих для терапевтических применений. Такие антитела также могут быть более эффективными для лечения легочных симптомов и/или иметь меньше побочных эффектов при их доставке путем ингаляции.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к новым TGF-beta-специфичным антителам и их связывающим фрагментам, в частности к антагонистическим антителам и фрагментам.

В одном аспекте предложено антагонистическое антитело, которое связывается с человеческим TGF-beta 1, человеческим TGF-beta 2 и человеческим TGF-beta 3,

содержащее тяжелую цепь, где переменный домен тяжелой цепи содержит по меньшей мере одну из CDR, имеющую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4 для CDR-H1, CDR, имеющую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5 для CDR-H2, и CDR, имеющую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9 для CDR-H3.

В одном аспекте предложено антагонистическое антитело, которое связывается с человеческим TGF-beta 1, человеческим TGF-beta 2 и человеческим TGF-beta 3, содержащее легкую цепь, где переменный домен легкой цепи содержит по меньшей мере одну из CDR, имеющую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1 для CDR-L1, CDR, имеющую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2 для CDR-L2, и CDR, имеющую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3 для CDR-L3.

Раскрытие также распространяется на полинуклеотид, такой как ДНК, кодирующий антитело или фрагмент, как описано в настоящем документе.

Также предложена клетка-хозяин, содержащая указанный полинуклеотид.

В настоящем описании предложены способы экспрессии антитела или его связывающего фрагмента.

Настоящее раскрытие также относится к фармацевтическим композициям, содержащим указанные антитела или их связывающие фрагменты.

В одном варианте осуществления предложен способ лечения, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела, фрагмента или композиции, как описано в настоящем документе.

Настоящее раскрытие также распространяется на антитело, связывающий фрагмент или композицию в соответствии с настоящим изобретением для применения при лечении, конкретно, при лечении злокачественного новообразования и/или фиброзного заболевания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фигурах 1 A-I представлены определенные аминокислотные и полинуклеотидные последовательности антитела по изобретению.

На Фигуре 1A представлены последовательности CDR из антитела 4856 (SEQ ID NO: 1-9).

На Фигуре 1B представлены кроличьи последовательности для антитела 4856 (SEQ ID NO: 10-25).

На Фигуре 1C представлены муринизированные последовательности для антитела 4856 (SEQ ID NO: 26-33), а также мышинные акцепторные последовательности (SEQ ID NO: 34-37).

На Фигуре 1D представлена легкая цепь (SEQ ID NO: 45-51) и последовательности переменных областей (SEQ ID NO: 38-44) для антитела 4856 gL3.

На Фигуре 1E представлена тяжелая цепь Fab (SEQ ID NO: 59-65) и последовательности переменных областей (SEQ ID NO: 52-58) для антитела 4856 gH13.

На Фигуре 1F представлена тяжелая цепь Fab (SEQ ID NO: 73-79) и последовательности переменных областей (SEQ ID NO: 66-72) для антитела 4856 gH20.

На Фигуре 1G представлена тяжелая цепь Fab (SEQ ID NO: 87-93) и последовательности переменных областей (SEQ ID NO: 80-86) для антитела 4856 gH23.

На Фигуре 1H представлены тяжелые цепи Fab (SEQ ID NO: 101-107) и последовательности переменных областей (SEQ ID NO: 94-100) для антитела 4856 gH29.

На Фигуре 1I представлены человеческие акцепторные каркасные последовательности (SEQ ID NO: 108-111).

На Фигуре 2 представлены выравнивания аминокислотных последовательностей различных легкой цепи (Фигура 2А) и тяжелой цепи (Фигура 2В) антитела 4856 и акцепторных последовательностей.

На Фигуре 3А представлена аминокислотная последовательность человеческого латентно-ассоциированного пептида и TGF-beta 1.

На Фигуре 3В представлена аминокислотная последовательность зрелого человеческого TGF-beta 1.

На Фигуре 3С представлена аминокислотная последовательность человеческого латентно-ассоциированного пептида и TGF-beta 2.

На Фигуре 3D представлена аминокислотная последовательность зрелого человеческого TGF-beta 2.

На Фигуре 3Е представлена аминокислотная последовательность человеческого латентно-ассоциированного пептида и TGF-beta 3.

На Фигуре 3F представлена аминокислотная последовательность зрелого человеческого TGF-beta 3.

На Фигурах 4А, В и С показан эффект кроличьего антитела 4856 Fab в анализе репортерного гена HEK-Blue-TGF-beta для (А) TGF-beta1, (В) TGF-beta2 и (С) TGF-beta3.

На Фигуре 5 показан эффект кроличьего Fab 4856 в анализе репортерного гена в совместной культуре VxPC3-HEK-Blue с эндогенным TGF-beta.

На Фигуре 6 показаны изображения депонирования ECM клетками HRMC в ответ на 10 нМ адриамицин и в присутствии возрастающих концентраций 4856 Fab-трансплантатов gL3gH13, gL3gH20, gL3gH23 и gL3gH29 или контрольного Fab.

На Фигурах 7А, В и С показано влияние 4856 Fab-трансплантатов gL3gH13, gL3gH20, gL3gH23 и gL3gH29 на депонирование (А) фибронектина, (В) коллагена I и III и (С) коллагена IV из HRMC, обработанных адриамицином.

На Фигуре 8 показаны изображения депонирования ECM с помощью совместных культур SAEpC и фибробластов IPF в присутствии возрастающих концентраций 4856 Fab-трансплантата gL3gH13 и контрольного Fab.

На Фигурах 9А, В и С показано влияние 4856 Fab-трансплантата gL3gH13 и контрольного Fab на депонирование (А) фибронектина, (В) коллагена I и III и (С) коллагена IV из совместных культур SAEpC и фибробластов IPF.

На Фигурах 10А, В и С показано влияние 4856 Fab-трансплантата gL3gH13 на ингибирование депонирования фибронектина из монокультуры человеческих почечных проксимальных трубчатых эпителиальных клеток, индуцированное (А) TGF-beta 1, (В) TGF-beta 2 и (С) TGF-beta 3.

На Фигуре 10D показано влияние 4856 Fab-трансплантата gL3gH13 на ингибирование депонирования фибронектина из совместной культуры человеческих почечных проксимальных трубчатых эпителиальных клеток и фибробластов почек человека.

На Фигуре 11А и В показано влияние 4856 Fab-трансплантата gL3gH13 на ингибирование депонирования TGF-beta 1-индуцированного (А) коллагена I и III, (В) коллагена V из монокультуры человеческих почечных проксимальных трубчатых эпителиальных клеток.

Фигура 12 Сравнение эффекта интраназального введения указанных 4856 Fab на экспрессию PAI-1 у мышей на 7-й день после введения блеомицина.

Фигура 13 Сравнение дозы интраназально введенного 4856 Fab gL3gH13 в отношении экспрессии PAI-1 у мышей на 7-й день после введения блеомицина.

Фигуры 14А-В Эффект интраназально введенного 4856 Fab gL3gH13 с 1 по 28 день на А) индуцированное блеомицином депонирование коллагена (окрашивание PSR) и

(В) содержание гидроксипролина в легком.

Фигура 15А-В. Эффект интраназально введенного 4856 Fab gL3gH13 с 13 по 28 день на А) индуцированное блеомицином депонирование коллагена (окрашивание PSR) и В) содержание гидроксипролина в легком.

5 Фигуры 16А-В. Эффект интраназально введенного 4856 Fab gL3gH13, А) с 1 по 28 день или В) с 13 по 28 день на индуцированную блеомицином дифференцировку миофибробластов в легких.

Фигуры 17А-В. Эффект интраназально введенного 4856 Fab gL3gH13 А) с 1 по 28 день или В) с 13 по 28 день на индуцированную блеомицином экспрессию pSmad2/3 в
10 клетках, экспрессирующих коллаген типа 1.

На Фигуре 18А показана последовательность зрелого человеческого TGF-beta 1 (SEQ ID NO: 114) с остатками, участвующими во взаимодействии с 4856 Fab gL3gH13 (подчеркнуто), и остатками, критичными для взаимодействия с TbetaRI и TbetaRII (полужирный шрифт) с использованием кристаллографических данных с разрешением
15 4Å.

На Фигуре 18В показана последовательность зрелого человеческого TGF-beta 1 (SEQ ID NO: 114) с остатками, участвующими во взаимодействии с 4856 Fab gL3gH13 (подчеркнуто), и остатками, критичными для взаимодействия с TbetaRI и TbetaRII (жирный шрифт) с использованием кристаллографических данных с разрешением 5Å.

20 На Фигуре 18С показана последовательность зрелого человеческого TGF-beta 2 (SEQ ID NO: 116).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Антитела по настоящему изобретению связываются с TGF-beta 1, TGF-beta 2 и TGF-beta 3. В одном варианте осуществления антитела по настоящему изобретению связывают
25 все три изоформы зрелого TGF-beta, зрелого TGF-beta 1 (SEQ ID NO: 114), зрелого TGF-beta 2 (SEQ ID NO: 115) и зрелого TGF-beta 3 (SEQ ID NO: 118). В одном варианте осуществления антитела по настоящему изобретению связываются с гомодимером каждой из трех изоформ зрелого TGF-beta, гомодимером зрелого TGF-beta 1 (SEQ ID NO: 114), гомодимером зрелого TGF-beta 2 (SEQ ID NO: 115) и гомодимером зрелого
30 TGF-beta 3 (SEQ ID NO: 118). В одном варианте осуществления антитела по настоящему изобретению не связываются с латентными формами TGF-beta 1, TGF-beta 2 и TGF-beta 3, содержащими латентно-ассоциированный пептид (LAP), как показано в SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: ID NO: 115 и SEQ ID NO: 117.

В одном варианте осуществления антитела, описанные в настоящем документе,
35 являются антагонистическими. Используемый в настоящем описании термин «антагонистическое антитело» описывает антитело, которое способно ингибировать и/или нейтрализовать биологическую сигнальную активность TGF-beta 1, TGF-beta 2 и TGF-beta 3, например, путем блокирования связывания или, по существу, путем уменьшения связывания TGF-beta 1, TGF-beta 2 и TGF-beta 3 с TbetaRI и/или TbetaRII и,
40 таким образом, путем ингибирования образования и активации рецепторного комплекса TGF-beta.

Анализы, подходящие для определения способности антитела ингибировать и/или нейтрализовать биологическую сигнальную активность TGF-beta 1, TGF-beta 2 и TGF-beta 3, представлены в примерах настоящего описания, например, анализ репортерного
45 гена HEK-Blue TGF-beta с использованием рекомбинантного TGF-beta 1, 2 и/или 3, описанный в Примере 1 и Примере 2, или анализ репортерного гена в совместной культуре VxPC3 и HEK-Blue TGF-beta, обусловленный продуцированием TGF-beta клетками VxPC3, описанный в Примере 3.

В одном варианте осуществления молекулы антител по настоящему изобретению обладают ингибирующей активностью в анализе репортерного гена HEK-Blue TGF-beta с рекомбинантным TGF-beta 1, TGF-beta 2 или TGF-beta 3, где антитело ингибирует активность человеческого TGF-beta 1 с IC50 0,5 нМ или лучше, ингибирует активность человеческого TGF-beta2 с IC50 0,05 нМ или лучше и ингибирует активность человеческого TGF-beta 3 с IC50 2 нМ или лучше. В одном варианте осуществления антитело ингибирует TGF-beta в анализе репортерного гена HER-Blue TGF-beta с эндогенным TGF-beta с IC50 10 нМ или лучше.

Молекулы антител по настоящему изобретению соответственно имеют высокую аффинность связывания. Аффинность может быть измерена с использованием любого подходящего способа, известного в данной области, включая такие методы, как поверхностный плазмонный резонанс, например BIAcore, как описано в примерах в настоящем документе, с использованием выделенных природных или рекомбинантных TGF-beta 1, TGF-beta 2 и TGF-beta 3 или подходящего слитого белка/полипептида. В одном варианте осуществления молекулы антитела по настоящему изобретению имеют следующий порядок аффинности связывания, с наиболее высоким значением для человеческого TGF-beta 1, за которым следует человеческий TGF-beta 2, и с наименьшей аффинностью связывания для человеческого TGF-beta 3. В одном варианте осуществления молекулы антитела по настоящему изобретению имеют аффинность связывания для человеческого TGF-beta 1, которая составляет в 10-30 раз выше, например в 15-25 раз выше, чем аффинность связывания для человеческого TGF-beta 3. В одном варианте осуществления молекулы антител по настоящему изобретению имеют аффинность связывания для человеческого TGF-beta 2, которая в 2-20 раз выше, например в 5-15 раз выше, чем аффинность связывания для человеческого TGF-beta 3.

Соответственно молекулы антител по настоящему изобретению имеют аффинность связывания для выделенных TGF-beta 1, TGF-beta 2 и TGF-beta 3 примерно 2000 пМ или менее чем 2000 пМ. В одном варианте осуществления молекула антитела по настоящему изобретению имеет аффинность связывания для человеческого TGF-beta 1 500 пМ или менее, например 200 пМ или менее, или 100 пМ или менее. В одном варианте осуществления молекула антитела по настоящему изобретению имеет аффинность связывания для человеческого TGF-beta 2 500 пМ или менее, например 300 пМ или менее, 200 пМ или менее. В одном варианте осуществления молекула антитела по настоящему изобретению имеет аффинность связывания для человеческого TGF-beta 3 3000 пМ или менее, например 2500 пМ или менее, 2000 пМ или менее.

В одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению имеет аффинность связывания для человеческого TGF-beta 1 100 мкМ или менее, аффинностью связывания для человеческого TGF-beta 2 200 пМ или менее и аффинность связывания для человеческого TGF-beta 3 2000 пМ или лучше.

Чем ниже числовое значение аффинности, тем выше аффинность антитела или фрагмента для изоформы TGF-beta.

Авторами настоящего изобретения предложены новые антитела против TGF-beta, включая гуманизированные антитела. Антитела были получены в результате иммунизации кроликов зрелым TGF-beta 1 и зрелым TGF-beta 2.

Остатки в вариабельных доменах антитела обычно нумеруются в соответствии с системой, разработанной Kabat et al., 1987. Эта система изложена в Kabat et al., 1987, in Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (далее «Kabat et al. (выше)»). Эта система нумерации используется в настоящей спецификации, если не указано иное.

Обозначения остатков по Kabat не всегда прямо соответствуют линейной нумерации аминокислотных остатков. Фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньше или дополнительные аминокислоты, чем в строгой нумерации Kabat, соответствуя укорочению или вставке в структурный компонент, будь то

5 каркасная область или область определения комплементарности (CDR) основной структуры варибельного домена. Правильная нумерация остатков по Kabat может быть определена для данного антитела путем выравнивания остатков гомологии в последовательности антитела в соответствии со «стандартной» нумерацией по Kabat.

CDR варибельного домена тяжелой цепи расположены в остатках 31-35 (CDR-H1),

10 остатках 50-65 (CDR-H2) и остатках 95-102 (CDR-H3) в соответствии с системой нумерации Kabat. Однако, согласно Chothia (Chothia, C. and Lesk, AM, J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987)), петля, эквивалентная CDR-H1, простирается от остатка 26 до остатка 32. Таким образом, если не указано иное, «CDR-H1», используемый в настоящем описании, предназначен для обозначения остатков 26-35, как описано комбинацией

15 системы нумерации Kabat и определения топологической петли Chothia.

CDR варибельного домена легкой цепи расположены в остатках 24-34 (CDR-L1), остатках 50-56 (CDR-L2) и остатках 89-97 (CDR-L3) в соответствии с системой нумерации Kabat.

Антитела для использования в настоящем раскрытии могут быть получены с

20 использованием любого подходящего способа, известного в данной области. Полипептид/белок TGF-beta, включая слитые белки, клетки, экспрессирующие (рекомбинантно или естественно) полипептид, могут быть использованы для получения антител, которые специфически распознают TGF-beta. Полипептид может быть «зрелым» полипептидом TGF-beta 1, TGF-beta 2 и TGF-beta 3, как показано в SEQ ID NO: 113, 115

25 и 117, или может быть его биологически активным фрагментом или его производным. Полипептиды, используемые для иммунизации хозяина, могут быть получены способами, хорошо известными в данной области, из генетически сконструированных клеток-хозяев, содержащих экспрессирующие системы, или они могут быть выделены из природных биологических источников. В настоящей заявке термин «полипептиды»

30 включает пептиды, полипептиды и белки. Они используются взаимозаменяемо, если не указано иное. Полипептид TGF-beta в некоторых случаях может быть частью более крупного белка, такого как слитый белок, например, слитый с аффинным маркером, лидерной последовательностью или другой последовательностью.

Антитела, сгенерированные против полипептида TGF-beta, могут быть получены в

35 случае, где необходима иммунизация животного, путем введения полипептидов животному, предпочтительно животному, отличному от человека, с использованием хорошо известных и обычных протоколов, см., например, Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (ed.), Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986). Могут быть иммунизированы многие теплокровные животные, такие как кролики,

40 мыши, крысы, овцы, коровы, верблюды или свиньи. Однако наиболее приемлемыми являются мыши, кролики, свиньи и крысы.

Моноклональные антитела могут быть получены любым способом, известным в данной области, таким как метод гибридом (Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256: 495-497), метод триом, метод гибридом В-клеток человека (Kozbor et al., 1983, Immunology Today, 4:72) и метод EBV-гибридом (Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp77-96, Alan R Liss, Inc.).

Антитела также могут быть получены с использованием метода антитела из одиночного лимфоцита путем клонирования и экспрессии кДНК варибельной области

иммуноглобулина, полученной из одиночных лимфоцитов, отобранных для получения конкретных антител, например, способами, описанными Babcook, J. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7843-7848; WO92/02551; WO04/051268 и в международной патентной заявке WO 04/106377.

5 Скрининг на антитела может быть проведен с использованием анализов для измерения связывания с человеческим TGF-beta и/или анализов для измерения способности блокировать связывание лиганда с рецептором. Примеры подходящих анализов описаны в примерах, приведенных в настоящем документе.

Используемый в настоящем описании термин «специфичный» относится к антителу, которое распознает только антиген, к которому он специфичен, или антитело, которое имеет значительно более высокую аффинность связывания с антигеном, к которому оно специфично, по сравнению со связыванием с антигенами, к которым оно не специфично, например, по меньшей мере в 5, 6, 7, 8, 9, 10 раз более высокую аффинность связывания.

15 Аминокислотные последовательности и полинуклеотидные последовательности некоторых антител в соответствии с настоящим изобретением представлены на Фигурах 1 и 2.

В одном аспекте изобретения антитело представляет собой антагонистическое антитело, которое связывается с человеческим TGF-beta 1, человеческим TGF-beta 2 и 20 человеческим TGF-beta 3, содержащее тяжелую цепь, где вариабельный домен тяжелой цепи содержит по меньшей мере одну из CDR, имеющую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4 для CDR-H1, CDR, имеющую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5 для CDR-H2 и CDR, имеющую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9 для CDR- 25 H3. Предпочтительно, вариабельный домен тяжелой цепи содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4 для CDR-H1, последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5 для CDR-H2, и последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9 для CDR-H3.

Во втором аспекте изобретения антитело представляет собой антагонистическое 30 антитело, которое связывается с человеческим TGF-beta 1, человеческим TGF-beta 2 и человеческим TGF-beta 3, содержащее легкую цепь, где вариабельный домен легкой цепи содержит по меньшей мере одну CDR, имеющую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1 для CDR-L1, CDR, имеющую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2 для CDR-L2, и CDR, имеющую последовательность, приведенную в SEQ ID 35 NO: 3 для CDR- L3. Предпочтительно, вариабельный домен легкой цепи содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1 для CDR-L1, последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2 для CDR-L2, и последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3 для CDR-L3,

Молекулы антител по настоящему изобретению соответственно содержат 40 комплементарную легкую цепь или комплементарную тяжелую цепь, соответственно.

В одном варианте осуществления антитело по изобретению представляет собой антагонистическое антитело, которое связывается с человеческим TGF-beta 1, человеческим TGF-beta 2 и человеческим TGF-beta 3, содержащее тяжелую цепь, как определено выше, и дополнительно содержит легкую цепь, где вариабельный домен 45 легкой цепи содержит по меньшей мере одну из CDR, имеющую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1 для CDR-L1, CDR, имеющую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2 для CDR-L2, и CDR, имеющую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3 для CDR-L3. Вариабельный домен легкой цепи

предпочтительно включает последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1 для CDR-L1, последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2 для CDR-L2, и последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3 для CDR-L3.

В одном варианте осуществления антитело по изобретению представляет собой антагонистическое антитело, которое связывается с человеческим TGF-beta 1, человеческим TGF-beta 2 и человеческим TGF-beta 3, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, где вариабельный домен тяжелой цепи содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4 для CDR-H1, последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5 для CDR-H2, и последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9 для CDR-H3; и где вариабельный домен легкой цепи содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1 для CDR-L1, последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2 для CDR-L2, и последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3 для CDR-L3.

Понятно, что одна или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций могут быть сделаны в CDR, предоставленных настоящим изобретением, без значительного изменения способности антитела связываться с TGF-beta 1, TGF-beta 2 и TGF-beta 3 и нейтрализовать активность TGF-beta 1, TGF-beta 2 и TGF-beta 3. Эффект любых аминокислотных замен, вставок и/или делеций может быть легко протестирован специалистом в данной области, например, с использованием описанных в настоящем документе способов, особенно тех, которые приведены в примерах, для определения связывания TGF-beta 1, TGF-beta 2 и TGF-beta 3 и ингибирования взаимодействия TGF-beta 1, TGF-beta 2 и TGF-beta 3 и рецептора. В одном варианте осуществления по меньшей мере одна аминокислота заменена консервативной заменой в одной или более CDR, выбранных из группы, независимо состоящей из:

- любой из CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3;
- любой из комбинаций CDR-H1 и H2, CDR-H1 и H3, CDR-H1 и L1, CDR-H1 и L2, CDR-H1 и L3, CDR-H2 и H3, CDR-H2 и L1, CDR-H2 и L2, CDR-H2 и L3, CDR-H3 и L1, CDR-H3 и L2, CDR-H3 и L3, CDR-L1 и L2, CDR-L1 и L3, CDR-L2 и L3;
- CDR-H1, H2 и H3, CDR-H1, H2 и L1, CDR-H1, H2 и L2, CDR-H1, H2 и L3, CDR-H2, H3 и L1, CDR-H2, H3 и L2, CDR-H2, H3 и L3, CDR-H3, L1 и L2, CDR-H3, L1 и L3, CDR-L1, L2, L3;
- любой из комбинаций CDR-H1, H2, H3 и L1, CDR-H1, H2, H3 и L2, CDR-H1, H2, H3 и L3, CDR-H2, H3, L1 и L2, CDR-H2, H3, L2 и L3, CDR-H3, L1, L2 и L3, CDR-L1, L2, L3 и H1, CDR-L1, L2, L3 и H2, CDR-L1, L2, L3 и H3, CDR-L2, L3, H1 и H2,
- CDR-H1, H2, H3, L1 и L2, CDR-H1, H2, H3, L1 и L3, CDR-H1, H2, H3, L2 и L3, CDR-L1, L2, L3, H1 и H2, CDR-L1, L2, L3, H1 и H3, CDR-L1, L2, L3, H2 и H3; и
- комбинации CDR-H1, H2, H3, L1, L2 и L3.

Соответственно, настоящее изобретение относится к антагонистическому антителу, которое связывается с человеческим TGF-beta 1, человеческим TGF-beta 2 и человеческим TGF-beta 3, содержащему одну или более CDR, выбранных из CDRH-1 (SEQ ID NO: 4), CDRH-2 (SEQ ID NO: 5), CDRH-3 (SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9), CDRL-1 (SEQ ID NO: 1), CDRL-2 (SEQ ID NO: 2) и CDRL-3 (SEQ ID NO: 3), в которых одна или более аминокислот в одной или более CDR были заменены другой аминокислотой, например сходной аминокислотой, как определено в настоящем описании ниже.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антагонистическому антителу, которое связывается с человеческим TGF-beta 1, человеческим TGF-beta 2 и человеческим TGF-beta 3, содержащему CDRH-1 (SEQ ID NO:

4), CDRH-2 (SEQ ID NO: 5), CDRH-3 (SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9), CDRL-1 (SEQ ID NO: 1), CDRL-2 (SEQ ID NO: 2) и CDRL-3 (SEQ ID NO: 3), например, где одна или более аминокислот в одной или более CDR были заменены другой аминокислотой, такой как сходная аминокислота, как определено в настоящем описании ниже.

В одном варианте осуществления домен тяжелой цепи, описанный в настоящем документе, включает в себя последовательность с 1, 2, 3 или 4 консервативными аминокислотными заменами, например, в каркасе.

В одном варианте осуществления каркас вариабельной области тяжелой цепи содержит 1, 2, 3 или 4 аминокислоты, которые были вставлены, удалены, заменены, или их комбинацию. В одном варианте осуществления заменяющая аминокислота представляет собой соответствующую аминокислоту из донорного антитела.

В одном варианте осуществления раскрытая в настоящем описании вариабельная область легкой цепи включает в себя последовательность с 1, 2, 3 или 4 консервативными аминокислотными заменами, например, в каркасе.

В одном варианте осуществления каркас вариабельной области легкой цепи содержит 1, 2, 3 или 4 аминокислоты, которые были вставлены, удалены, заменены, или их комбинацию. В одном варианте осуществления заменяющая аминокислота представляет собой соответствующую аминокислоту, образующую донорное антитело.

В одном аспекте настоящего изобретения предложено антитело против TGF-beta или его связывающий фрагмент, где вариабельный домен тяжелой цепи содержит три CDR, а последовательность CDR-H1 имеет по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 4, последовательность CDR-H2 имеет по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90% или 95% идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 5, и последовательность CDR-H3 имеет по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9. Предпочтительно антитело против TGF-beta или его связывающий фрагмент дополнительно содержит легкую цепь, где вариабельный домен легкой цепи содержит три CDR, а последовательность CDR-L1 имеет по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 1, последовательность CDR-L2 имеет по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 2, и последовательность CDR-L3 имеет по меньшей мере 60% идентичности или сходства с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 3.

В одном варианте осуществления вариабельная область имеет по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности или сходства с раскрытой в настоящем описании вариабельной областью.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антагонистическому антителу, которое связывается с человеческим TGF-beta 1, человеческим TGF-beta 2 и человеческим TGF-beta 3, которое контактирует с последовательностью, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотам 24-35 SEQ ID NO: 114 и необязательно по меньшей мере одной из аминокислот 90-95 SEQ ID NO: 114. В следующем варианте осуществления антитело контактирует с последовательностью, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 114. В одном варианте осуществления антитело дополнительно

контактирует по меньшей мере с одной из аминокислот 60, 97 и 101 SEQ ID NO: 114. Еще в одном варианте осуществления антитело также контактирует с аминокислотами вне аминокислот, представленных в настоящем описании. Под терминами «контактирует» или «контактирование» подразумевается, что взаимодействие может
 5 быть обнаружено с использованием стандартных методов рентгеноструктурной кристаллографии при подходящем разрешении, таком как 5 Å или 4 Å.

В другом варианте осуществления предложено антитело против TGF-beta, которое конкурирует связыванием антитела или фрагмента по изобретению за связывание с TbetaRI и/или TbetaRII.

10 В одном варианте осуществления предложено антитело против TGF-beta, которое перекрестно блокирует связывание антитела, содержащего 6 CDR, приведенных в последовательности SEQ ID NO: 1 для CDR-L1, SEQ ID NO: 2 для CDR-L2, SEQ ID NO: 3 для CDR-L3, SEQ ID NO: 4 для CDR-H1, SEQ ID NO: 5 для CDR-H2 и SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9 для CDR-H3, в частности, где
 15 перекрестное блокирование является аллостерическим.

В одном варианте осуществления предложено антитело против TGF-beta, которое перекрестно блокирует связывание антитела, содержащего 6 CDR, приведенных в последовательности SEQ ID NO: 1 для CDR-L1, SEQ ID NO: 2 для CDR-L2, SEQ ID NO: 3 для CDR-L3, SEQ ID NO: 4 для CDR-H1, SEQ ID NO: 5 для CDR-H2 и SEQ ID NO: 6 или
 20 SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9 для CDR-H3, в частности, где антитело перекрестно блокирует связывание путем связывания того же эпитопа, что и антитело, которое оно блокирует.

В одном варианте осуществления антитело или связывающий фрагмент взяты из мыши, крысы, кролика, верблюда или других видов млекопитающих. Например,
 25 антитело или связывающий фрагмент могут быть кроличьими. Примеры переменных областей для таких антител представлены в SEQ ID NO: 10-17.

В одном варианте осуществления антитело или связывающие фрагменты являются химерными. Как правило, химерные антитела или связывающие фрагменты содержат элементы из двух или более видов, сохраняя при этом определенные характеристики
 30 этого вида. Например, химерное антитело или связывающий фрагмент может иметь переменную область от одного вида, такого как мышь, крыса, кролик или другие виды млекопитающих, и всю или часть константной области от другого вида, такого как человек.

В одном варианте осуществления антитело или связывающие фрагменты согласно
 35 изобретению гуманизированы.

Используемый в настоящем описании термин «гуманизированное антитело» относится к антителу или к молекуле антитела, где тяжелая и/или легкая цепь содержит одну или более CDR (включая, если целесообразно, одну или более модифицированных CDR) из донорного антитела (например, мышинового моноклонального антитела),
 40 трансплантированных в каркас переменной области тяжелой и/или легкой цепи акцепторного антитела (например, человеческого антитела) (см., например, US 5585089, WO 91/09967). Обзор см. Vaughan et al., Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998. В одном варианте осуществления скорее происходит перенос всей CDR, а не только одного или более остатков, определяющих специфичность, из любой из CDR, описанных выше, в
 45 каркас человеческих антител (см., например, Kashmiri et al., 2005, Methods, 36: 25-34). В одном варианте осуществления только остатки, определяющие специфичность, из одной или более CDR, описанных выше, переносятся в каркас человеческих антител. В другом варианте осуществления только остатки, определяющие специфичность, из каждой из

CDR, описанных выше, переносятся в каркас человеческих антител. Когда трансплантируют CDR или остатки, определяющие специфичность, то может использоваться любая подходящая каркасная последовательность акцепторной

вариабельной области с учетом класса/типа донорного антитела, из которого получены

5 CDR, включая каркасные области мыши, примата и человека.

Соответственно, гуманизированное антитело в соответствии с настоящим изобретением содержит вариабельный домен, содержащий человеческие акцепторные каркасные области, а также одну или более CDR, конкретно представленных в настоящем описании. Таким образом, в одном варианте осуществления предложено

10 гуманизированное антитело, которое связывается с человеческими TGF-beta 1, TGF-beta 2 и TGF-beta 3, где вариабельный домен содержит человеческие акцепторные каркасные области и донорные CDR, не относящиеся к человеку.

Примерами человеческих каркасов, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, являются KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY и POM (Kabat et al., выше).

15 Например, KOL и NEWM могут использоваться для тяжелой цепи, REI может использоваться для легкой цепи, а EU, LAY и POM могут использоваться как для тяжелой цепи, так и для легкой цепи. Альтернативно, могут использоваться последовательности человеческой зародышевой линии; они доступны по адресу: www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase или по адресу www.imgt.org, каждый из которых в последний раз был доступен

20 07 января 2016 года.

В гуманизированном антителе по настоящему изобретению акцепторные тяжелые и легкие цепи необязательно должны быть получены из одного и того же антитела и могут, если целесообразно, содержать композитные цепи, имеющие каркасные области, полученные из разных цепей.

25 В одном варианте осуществления человеческий каркас включает в себя 1, 2, 3 или 4 аминокислотных замены, вставки или делеции, например 1, 2, 3 или 4 консервативные замены или замены донорных остатков.

В одном варианте осуществления последовательность, используемая в качестве человеческого каркаса, на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более имеет сходство или идентична последовательности, описанной в настоящем документе.

30

Подходящая каркасная область для тяжелой цепи гуманизированного антитела по настоящему изобретению получена из последовательности IGHV3-21 подгруппы VH3 человека вместе с JH5 (SEQ ID NO: 111).

Подходящая каркасная область для легкой цепи гуманизированного антитела по настоящему изобретению получена из последовательности IGKV1-5 подгруппы VK1 человека вместе с JK4 (SEQ ID NO: 109).

35

Соответственно, в одном примере предложено гуманизированное антитело, содержащее последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4 для CDR-H1, последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5 для CDR-H2, и последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9 для CDR-H3, где каркасная область тяжелой цепи получена из последовательности IGHV3-21 подгруппы VH3 человека вместе с JH5 (SEQ ID NO: 111).

40

В одном примере вариабельный домен тяжелой цепи антитела содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 80 или

45 SEQ ID NO: 94.

Подходящая каркасная область для легкой цепи гуманизированного антитела по настоящему изобретению получена из последовательности IGKV1-5 подгруппы VK1 человеческой зародышевой линии вместе с JK4 (SEQ ID NO: 109).

Соответственно, в одном примере предложено гуманизированное антитело, содержащее последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1 для CDR-L1, последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2 для CDR-L2, и последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3 для CDR-L3, где каркасная область легкой цепи получена из последовательности IGKV1-5 подгруппы VK1 человека вместе с JK4 (SEQ ID NO: 109).

В одном примере переменный домен легкой цепи антитела содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38.

В гуманизированном антителе по настоящему изобретению каркасные области не обязательно должны иметь точно такую же последовательность, как в случае акцепторного антитела. Например, необычные остатки могут быть изменены на более часто встречающиеся остатки для этого класса или типа акцепторной цепи.

Альтернативно, выбранные остатки в акцепторных каркасных областях могут быть изменены так, чтобы они соответствовали остатку, имеющемуся в том же положении в донорском антителе (см. Reichmann et al., 1998, Nature, 332: 323-324). Такие изменения должны быть сведены к минимуму, необходимому для восстановления аффинности донорского антитела. Протокол для отбора остатков в акцепторных каркасных областях, который может потребоваться изменить, изложен в WO 91/08967.

Донорный остаток, используемый в настоящем описании, относится к остатку из антитела, отличного от человеческого (например, мышиногo или кроличьего антитела), которое предоставило CDR.

В одном варианте осуществления предложено гуманизированное антитело, где переменный домен тяжелой цепи не содержит каких-либо донорных остатков.

Аналогичным образом, в одном варианте осуществления предложено антитело или связывающий фрагмент, который «муринизирован». Такое антитело или связывающий фрагмент может иметь кроличий донор и мышинный акцептор. Примеры таких антител приведены в SEQ ID NO: 26-33. Примеры мышинных акцепторных последовательностей приведены в SEQ ID NO: 34-37.

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антагонистическому антителу, которое связывается с человеческим TGF-beta 1, человеческим TGF-beta 2 и человеческим TGF-beta 3, имеющим тяжелую цепь, содержащую последовательность переменной области тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 80 или SEQ ID NO: 94, и легкую цепь, содержащую последовательность переменной области легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 38.

В одном варианте осуществления раскрытие представляет собой последовательность антитела, которая на 80% имеет сходство или идентична описанной в настоящем документе последовательности, например на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более в части или по всей соответствующей последовательности.

В одном варианте осуществления соответствующая последовательность представляет собой SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 80 или SEQ ID NO: 94. В одном варианте осуществления соответствующая последовательность представляет собой SEQ ID NO: 38.

Используемый в настоящем описании термин «идентичность» указывает, что в любом конкретном положении в выровненных последовательностях аминокислотный остаток идентичен между последовательностями. Используемый в настоящем описании термин «сходство» указывает, что в любом конкретном положении в выровненных последовательностях аминокислотный остаток имеет сходный тип между

последовательностями. Например, лейцин может быть заменен изолейцином или валином. Другие аминокислоты, которые часто могут быть заменены друг другом, включают, но не ограничиваются ими, следующие:

- фенилаланин, тирозин и триптофан (аминокислоты, имеющие ароматические боковые цепи);
- лизин, аргинин и гистидин (аминокислоты, имеющие основные боковые цепи);
- аспартат и глутамат (аминокислоты, имеющие кислотные боковые цепи);
- аспарагин и глутамин (аминокислоты, имеющие амидные боковые цепи); и
- цистеин и метионин (аминокислоты, имеющие серосодержащие боковые цепи).

Степени идентичности и сходства можно легко вычислить (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987, Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991, программный пакет BLAST™ от NCBI (Altschul, S.F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410; Gish, W. & States, D.J. 1993, Nature Genet. 3:266-272. Madden, T.L. et al., 1996, Meth. Enzymol. 266: 131-141; Altschul, S.F. et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402; Zhang, J. & Madden, T.L. 1997, Genome Res. 7: 649-656).

Молекулы антител по настоящему изобретению могут содержать полную молекулу антитела, имеющую полноразмерные тяжелые и легкие цепи или их связывающий фрагмент, и могут представлять собой, но не ограничены ими, Fab, модифицированный Fab, Fab', модифицированный Fab', F(ab')₂, Fv, однодоменные антитела (например, VH или VL или VHH), scFv, би-, три- или тетравалентные антитела, Bis-scFv, диатела, триатела, тетратела и эпитоп-связывающие фрагменты любого из вышеуказанных (см. например Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136; Adair and Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217). Способы создания и изготовления этих фрагментов антител хорошо известны в данной области (см., например, Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216: 165-181). Другие фрагменты антител для использования в настоящем изобретении включают фрагменты Fab и Fab', описанные в международных патентных заявках WO 05/003169, WO05/003170 и WO05/003171. Поливалентные антитела могут содержать множественные специфичности, например, могут быть биспецифичными или моноспецифичными (см., например, WO92/22853, WO05/113605, WO2009/040562 и WO2010/035012).

Связывающий фрагмент антитела, используемый в настоящем описании, относится к фрагменту, способному связываться с антигеном с аффинностью, так что фрагмент характеризуется как специфичный для антигена.

В одном варианте осуществления антитело в соответствии с настоящим изобретением предложено в виде слитого белка TGF-beta-связывающего антитела, который содержит иммуноглобулиновый компонент, например фрагмент Fab или Fab', и одно или два однодоменных антитела (dAb), которые прямо или косвенно связаны с ним, например, как описано в WO2009/040562, WO2010/035012, WO2011/030107, WO2011/061492 и WO2011/086091, которые включены в настоящее описание в качестве ссылки.

В одном варианте осуществления слитый белок содержит два доменных антитела, например, в виде пары вариативной области тяжелой цепи (VH) и вариативной области легкой цепи (VL), необязательно связанных дисульфидной связью.

В одном варианте осуществления Fab- или Fab'-элемент слитого белка имеет такую же или сходную специфичность для однодоменного антитела или антител. В одном

варианте осуществления Fab или Fab' имеют различную специфичность к однодоменному антителу или антителам, то есть слитый белок является поливалентным. В одном варианте осуществления поливалентный слитый белок в соответствии с настоящим изобретением содержит сайт связывания альбумина, например пара VH/VL в нем

5 обеспечивает сайт связывания альбумина.

Домены константной области молекулы антитела по настоящему изобретению, если они имеются, могут быть выбраны с учетом предлагаемой функции молекулы антитела и, в частности, эффекторных функций, которые могут потребоваться. Например, домены константной области могут быть доменами IgA, IgD, IgE, IgG или IgM человека. В

10 частности, могут быть использованы домены константной области человеческого IgG, особенно изотипов IgG1 и IgG3, когда молекула антитела предназначена для терапевтических целей, и необходимы эффекторные функции антитела. Альтернативно, изотипы IgG2 и IgG4 могут быть использованы, когда молекула антитела предназначена для терапевтических целей, а эффекторные функции антител не требуются, например,

15 просто для блокирования активности TGF-beta.

Понятно, что также могут быть использованы варианты последовательности этих доменов константной области. Например, могут использоваться молекулы IgG4, в которых серин в положении 241 был заменен на пролин, как описано в Angal et al., 1993, Molecular Immunology, 1993, 30: 105-108. Соответственно, в варианте осуществления,

20 где антитело представляет собой антитело IgG4, оно может включать мутацию S241P.

Специалисту в данной области должно быть понятно, что антитела могут подвергаться разнообразным посттрансляционным модификациям. Тип и степень этих модификаций часто зависят от линии клеток-хозяев, используемых для экспрессии антитела, а также условий культивирования. Такие модификации могут включать

25 изменения в гликозилировании, окислении метионина, образовании дикетопиперазина, изомеризации аспартата и дезаминировании аспарагина. Частой модификацией является потеря карбоксиконцевого основного остатка (такого как лизин или аргинин) из-за действия карбоксипептидаз (как описано в Harris, R.J. Journal of Chromatography 705: 129-134, 1995). Однако С-концевой лизин отсутствует как на тяжелой, так и на легкой цепи

30 варианта осуществления изобретения для Ab4856.

В одном примере одна или более CDR, представленных в настоящем описании, могут быть модифицированы для удаления нежелательных остатков или сайтов, таких как остатки цистеина или сайты изомеризации аспарагиновой кислоты (D) или сайты

35 дезамидирования аспарагина (N).

Например, один или более остатков цистеина в любой из CDR могут быть заменены другой аминокислотой, такой как серин.

В одном примере сайт дезамидирования аспарагина может быть удален из одной или более CDR путем мутации аспарагинового остатка (N) и/или соседнего остатка на любую другую подходящую аминокислоту. В одном примере сайт дезамидирования

40 аспарагина, такой как NG или NS, может быть мутирован, например, до NA или NT.

В одном примере сайт изомеризации аспарагиновой кислоты можно удалить из одной или более CDR путем мутации остатка аспарагиновой кислоты (D) и/или соседнего остатка до любой другой подходящей аминокислоты. В одном примере сайт изомеризации аспарагиновой кислоты, такой как DG или DS, может быть мутирован,

45 например, до EG, DA или DT.

В одном примере сайт N-гликозилирования, такой как NLS, может быть удален путем мутации аспарагинового остатка (N) до любой другой подходящей аминокислоты, например, до SLS или QLS. В одном примере сайт N-гликозилирования, такой как NLS,

может быть удален путем мутации остатка серина (S) до любого другого остатка, за исключением треонина (T).

В одном варианте осуществления тяжелая цепь антитела содержит домен CH1, домен CH2 и домен CH3, а легкая цепь антитела содержит домен CL, либо каппа, либо лямбда.

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

В одном варианте осуществления антитело, предложенное настоящим изобретением, представляет собой антагонистическое антитело, имеющее специфичность к человеческому TGF-beta, в котором константная область тяжелой цепи содержит модифицированную шарнирную область. Соответственно, настоящее изобретение 10 относится к антителу, в котором тяжелая цепь содержит или состоит из последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 87 или SEQ ID NO: 101.

Настоящее изобретение также относится к антителу, в котором легкая цепь содержит 15 или состоит из последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 45.

Антитело, предложенное настоящим изобретением, имеет тяжелую цепь, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 87 или SEQ ID NO: 101, и легкую цепь, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 45.

20 Также предложено антитело против TGF-beta или его связывающий фрагмент, в котором тяжелая и легкая цепи по меньшей мере на 80% (предпочтительно 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) идентичны или имеют сходство с тяжелой цепью, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 87 или SEQ ID NO: 101, и легкой цепью, содержащей последовательность, 25 приведенную в SEQ ID NO: 45. В одном варианте осуществления легкая цепь содержит или состоит из последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 45, и тяжелая цепь содержит или состоит из последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 87 или SEQ ID NO: 101. В другом варианте осуществления легкая цепь содержит или состоит из последовательности SEQ ID NO: 45, и тяжелая цепь 30 содержит или состоит из последовательности SEQ ID NO: 59.

Кроме того, настоящее изобретение относится к специфической области или эпитопу человеческого TGF-beta 1, 2 или 3, который связывается антителом, предложенным настоящим изобретением, в частности, антителом 4856, содержащим последовательность тяжелой цепи gH13 (SEQ ID NO: 59) и/или последовательность легкой цепи gL3 (SEQ ID 35 NO: 45).

Эта специфическая область или эпитоп полипептида человеческого TGF-beta 1, 2 или 3 может быть идентифицирована с помощью любого подходящего метода картирования эпитопов, известного в данной области, в сочетании с любым из антител, предложенных настоящим изобретением. Примеры таких способов включают скрининговые пептиды 40 различной длины, полученные из TGF-beta, для связывания с антителом по настоящему изобретению с наименьшим фрагментом, который может специфично связываться с антителом, содержащим последовательность эпитопа, распознаваемого антителом (например, пептидом в области примерно от 5 до 20, предпочтительно примерно 7 аминокислот в длину). Пептиды TGF-beta могут быть получены синтетически или путем 45 протеолитического гидролиза полипептида TGF-beta. Пептиды, которые связываются с антителом, можно идентифицировать, например, масс-спектрометрическим анализом. В другом примере ЯМР-спектроскопия или рентгеновская кристаллография могут быть использованы для идентификации эпитопа, связанного с антителом по настоящему

изобретению. После идентификации эпитопный фрагмент, который связывается с антителом по настоящему изобретению, может быть использован, если потребуется, в качестве иммуногена для получения дополнительных антител, которые связываются с одним и тем же эпитопом.

5 Антитела, которые перекрестно блокируют связывание антитела в соответствии с настоящим изобретением, в частности, антитело, содержащее последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO: 59) и последовательность легкой цепи (SEQ ID NO: 45), могут быть одинаково полезны в антагонизме TGF-beta 1, 2 и 3. Соответственно, настоящее изобретение также относится к антагонистическому антителу, имеющему специфичность
10 для человеческого TGF-beta 1, 2 и 3, которое перекрестно блокирует связывание любого из описанных выше антител с человеческим TGF-beta 1, 2 и/или 3 и/или перекрестно блокируется от связывания TGF-beta 1, 2 и/или 3 с любым из этих антител. В одном варианте осуществления такое антитело связывается с тем же эпитопом, что и антитело, описанное выше. В другом варианте осуществления перекрестно блокирующее
15 нейтрализующее антитело связывается с эпитопом, который граничит и/или перекрывается с эпитопом, связанным с антителом, описанным выше. В другом варианте осуществления перекрестно блокирующее нейтрализующее антитело данного аспекта изобретения не связывается с тем же эпитопом, что и антитело по настоящему изобретению, или эпитопом, который граничит и/или перекрывается с указанным
20 эпитопом.

Перекрестно блокирующие антитела могут быть идентифицированы с использованием любого подходящего метода в данной области, например, с использованием конкурентных анализов ИФА или BIAcore, где связывание перекрестно блокирующего антитела с человеческим TGF-beta 1, 2 и/или 3 предотвращает связывание антитела по
25 настоящему изобретению или наоборот.

В одном варианте осуществления предложено антагонистическое антитело, имеющее специфичность для человеческого TGF-beta 1, 2 и 3, которое перекрестно блокирует связывание антитела, чья тяжелая цепь содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 59, и легкая цепь которой содержит последовательность, приведенную в
30 SEQ ID NO: 45, для человеческого TGF-beta 1, 2 и 3. В одном варианте осуществления перекрестно блокирующие антитела, предложенные настоящим изобретением, ингибируют связывание антитела, содержащего последовательность тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 59, и последовательность легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 45 более чем на 80%, например, более чем на 85%, например более чем на 90%,
35 в частности более чем на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более.

Альтернативно или дополнительно антагонистические антитела в соответствии с этим аспектом изобретения могут быть перекрестно заблокированы от связывания с человеческим TGF-beta 1, 2 и 3 с помощью антитела, содержащего последовательность тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 59, и последовательность легкой цепи,
40 приведенную в SEQ ID NO: 45. Также предложена антагонистическая молекула антитела, обладающая специфичностью для человеческого TGF-beta 1, 2 и 3, которая перекрестно блокируется от связывания человеческого TGF-beta 1, 2 и 3 с помощью антитела, содержащего последовательность тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 59, и последовательность легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 45. В одном варианте
45 осуществления антагонистические антитела, предусмотренные этим аспектом изобретения, ингибируются от связывания с человеческим TGF-beta 1, 2 и 3 с помощью антитела, содержащего последовательность тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 59, и последовательность легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 45, более чем на 80%,

например, более чем на 85%, например более чем на 90%, в частности более 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более.

В одном варианте осуществления перекрестно блокирующие антитела, предложенные настоящим изобретением, являются полностью человеческими. В одном варианте осуществления перекрестно блокирующие антитела, предложенные настоящим изобретением, являются гуманизированными. В одном варианте осуществления антитела по настоящему изобретению пригодны для ингаляционной доставки, например, путем распыления. В одном примере физические свойства антител по настоящему изобретению, например, аффинность и активность связывания, существенно не изменяются при распылении. В одном примере антитела по настоящему изобретению являются высокостабильными. Одной из мер стабильности антител является температура плавления (Тпл). Температура плавления может быть определена любым подходящим способом, известным в данной области, например, с использованием Thermofluor (Ericsson et al., Analytical Biochemistry 357 (2006) 289-298) или DSC (дифференциальная сканирующая калориметрия). Предпочтительно антитела, предложенные настоящим изобретением, имеют высокую температуру плавления (Тпл), как правило, по меньшей мере 75°C. В одном примере антитело по настоящему изобретению имеет Тпл по меньшей мере 75°C. В одном примере антитело по настоящему изобретению имеет Тпл по меньшей мере 77°C. В одном примере антитело по настоящему изобретению имеет Тпл по меньшей мере 79°C.

Биологические молекулы, такие как антитела или фрагменты, содержат кислотные и/или основные функциональные группы, тем самым придавая молекуле чистый положительный или отрицательный заряд. Количество общего «наблюдаемого» заряда будет зависеть от абсолютной аминокислотной последовательности сущности, локальной среды заряженных групп в трехмерной структуре и условий окружающей среды молекулы. Изоэлектрическая точка (pI) представляет собой pH, при котором конкретная молекула или поверхность, доступная растворителю, не несет никакого суммарного электрического заряда. В одном примере антитело и фрагменты TGF-beta по изобретению могут быть сконструированы так, чтобы иметь соответствующую изоэлектрическую точку. Это может привести к образованию антител и/или фрагментов с более прочными свойствами, в частности, с подходящими профилями растворимости и/или стабильности, и/или с улучшенными характеристиками очистки.

Таким образом, в одном аспекте изобретение относится к гуманизированному антителу TGF-beta, сконструированному с тем, чтобы иметь изоэлектрическую точку, отличную от изоэлектрической точки первоначально идентифицированного антитела. Антитело может, например, быть сконструировано путем замены аминокислотного остатка, такой как замена кислотного аминокислотного остатка одним или более основным аминокислотным остатком. Альтернативно, могут быть введены основные аминокислотные остатки или удалены кислотные аминокислотные остатки. Альтернативно, если молекула имеет неприемлемо высокую величину pI, кислотные остатки могут быть введены для снижения pI, если требуется. Важно, чтобы при манипулировании pI необходимо было соблюдать осторожность, чтобы сохранить целевую активность антитела или фрагмента. Таким образом, в одном варианте осуществления сконструированное антитело или фрагмент имеет такую же или по существу такую же активность, что и «немодифицированное» антитело или фрагмент.

Для прогнозирования изоэлектрической точки антитела или фрагмента можно использовать такие программы, как **ExPASy www.expasy.ch/tools/pi_tool.html (доступ к 21 декабря 2015 года).

В одном варианте осуществления перекрестно блокирующее антитело имеет изоэлектрическую точку по меньшей мере 7, например, по меньшей мере 8, как например, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8 или 8,9 или по меньшей мере 9, такие как 9, 9,1, 9,2, 9,3 или 9,4.

Понятно, что аффинность антител, предложенных настоящим изобретением, может быть изменена с использованием любого подходящего способа, известного в данной области. Следовательно, настоящее изобретение также относится к вариантам молекул антител по настоящему изобретению, которые имеют улучшенную аффинность к TGF-beta. Такие варианты могут быть получены с помощью ряда протоколов созревания аффинности, включая мутацию CDR (Yang et al., 1995, J. Mol. Biol., 254: 392-403), перетасовка цепи (Marks et al., 1992, Bio/Technology, 10: 779-783), использование штаммов-мутаторов *E. coli* (Low et al., 1996, J. Mol. Biol., 250: 359-368), перетасовка ДНК (Patten et al., 1997, Curr. Opin. Biotechnol., 8: 724-733), фаговый дисплей (Thompson et al., J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) и «sexual PCR» (Crameri et al., 1998, Nature, 391: 288-291). Vaughan et al. (выше) обсуждают эти методы созревания аффинности.

Если целесообразно, антитело для применения в настоящем изобретении может быть конъюгировано с одной или более эффекторными молекулами. Понятно, что эффекторная молекула может содержать одну эффекторную молекулу или две или более таких молекул, которые связаны так, чтобы образовывать единый фрагмент, который может быть присоединен к антителам по настоящему изобретению. Когда целесообразно получить фрагмент антитела, связанный с эффекторной молекулой, он может быть получен стандартными методами химической или рекомбинантной ДНК, в которых фрагмент антитела связан либо непосредственно, либо через связующий агент с эффекторной молекулой. Методы конъюгирования таких эффекторных молекул с антителами хорошо известны в данной области (см. Hellstrom et al., Controlled Drug Delivery, 2nd Ed., Robinson et al., Eds., 1987, pp. 623-53, Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev., 62: 119-58 и Dubowchik et al., 1999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123). Конкретные химические процедуры включают, например, те, которые описаны в WO 93/06231, WO 92/2 22583, WO 89/00195, WO 89/01476 и WO 03/31581. Альтернативно, когда эффекторная молекула представляет собой белок или полипептид, связь может быть достигнута с использованием процедур рекомбинантной ДНК, например, как описано в WO86/01533 и EP0392745.

Используемый в настоящем описании термин эффекторная молекула включает, например, противоопухолевые агенты, лекарственные средства, токсины, биологически активные белки, например ферменты, другие антитела или фрагменты антител, синтетические или природные полимеры, нуклеиновые кислоты и их фрагменты, например ДНК, РНК и их фрагменты, радионуклиды, в частности, радиоактивный йодид, радиоизотопы, хелатированные металлы, наночастицы и репортерные группы, такие как флуоресцентные соединения или соединения, которые могут быть обнаружены с помощью ЯМР или ЭПР спектроскопии.

Примеры эффекторных молекул могут включать цитотоксины или цитотоксические агенты, включая любой агент, который вреден для клеток (например, убивает их). Примеры включают комбрестатины, доластатины, эпотилоны, стауроспорин, майтансиноиды, спонгистатины, ризоксин, галихондрины, роридины, гемиастерлины, таксол, цитохалазин В, грамицидин D, этидий бромид, эметин, митомицин, этопосид, тенопосид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромицин, а также их аналоги или гомологи.

Эффекторные молекулы также включают, но не ограничиваются ими, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацилдекарбазин), алкилирующие агенты (например, мехлорэтамин, тиоэпа хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, дибромманнит, стрептозотоцин, митомицин С и цис-дихлордиамин платины (II) (DDP цисплатин), антрациклины (например, даунорубицин (ранее дауномицин) и доксорубицин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее актиномицин), блеомицин, митрамицин, антрамицин (АМС), калихеамицины или дуокармицины) и антимитотические агенты (например, винкристин и винбластин).

Другие эффекторные молекулы могут включать хелатированные радионуклиды, такие как ^{111}In и ^{90}Y , Lu^{177} , Висмут ^{213} , Калифорний ^{252} , Иридий ^{192} и

Вольфрам ^{188} /Рений ^{188} ; или лекарственные средства, такие как, но не ограничиваясь ими, алкилфосфохолины, ингибиторы топоизомеразы I, таксоиды и сурамин.

Другие эффекторные молекулы включают белки, пептиды и ферменты. Интересующие ферменты включают, но не ограничиваются ими, протеолитические ферменты, гидролазы, лиазы, изомеразы, трансферазы. Интересующие белки, полипептиды и пептиды включают, но не ограничиваются ими, иммуноглобулины, токсины, такие как абрин, ризин А, экзотоксин синегнойной палочки или дифтерийный токсин, белок, такой как инсулин, фактор некроза опухоли, α -интерферон, бета-интерферон, фактор роста нервов, фактор роста тромбоцитов или активатор тканевого плазминогена, тромботический агент или антиангиогенный агент, например ангиостатин или эндостатин, или модификатор биологического ответа, такой как лимфокин, интерлейкин-1 (IL-1), интерлейкин-2 (IL-2), фактор роста нервов (NGF) или другой фактор роста и иммуноглобулины.

Другие эффекторные молекулы могут включать детектируемые вещества, полезные, например, при диагностике. Примеры детектируемых веществ включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы, биолюминесцентные материалы, радиоактивные нуклиды, позитрон-излучающие металлы (для использования в позитронно-эмиссионной томографии) и нерадиоактивные парамагнитные ионы металлов. См., в основном, патент США №4741900 для ионов металлов, которые могут быть конъюгированы с антителами для использования в качестве диагностики. Подходящие ферменты включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; подходящие простетические группы включают стрептавидин, авидин и биотин; подходящие флуоресцентные материалы включают умбелиферон, флуоресцеин, изотиоцианат флуоресцеина, родамин, дихлортриазиниламина флуоресцеин, дансилхлорид и фикоэритрин; подходящие люминесцентные материалы включают люминол; подходящие биолюминесцентные материалы включают люциферазу, люциферин и аэкворин; и подходящие радиоактивные нуклиды включают ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In и ^{99}Tc .

В другом примере эффекторная молекула может увеличивать период полужизни антитела *in vivo* и/или уменьшать иммуногенность антитела, и/или усиливать доставку антитела через эпителиальный барьер к иммунной системе. Примеры подходящих эффекторных молекул этого типа включают полимеры, альбумин, альбуминсвязывающие белки или альбуминсвязывающие соединения, такие как описанные в WO 05/17984.

В одном варианте осуществления предпочтительным является период полужизни, обеспечиваемый эффекторной молекулой, которая не зависит от TGF-beta.

Если эффекторная молекула является полимером, она может, вообще говоря, быть синтетическим или природным полимером, например, необязательно замещенным полиалкиленовым, полиалкениленовым или полиоксиалкиленовым полимером с прямой или разветвленной цепью или разветвленным или неразветвленным полисахаридом, например гомо- или гетерополисахаридом.

Конкретные необязательные заместители, которые могут присутствовать на вышеуказанных синтетических полимерах, включают одну или более гидроксильных, метильных или метоксигрупп.

Конкретные примеры синтетических полимеров включают необязательно замещенный прямой или с разветвленной цепью поли(этиленгликоль), (поли(пропиленгликоль), поли(виниловый спирт) или его производные, особенно необязательно замещенный поли(этиленгликоль), такой как метоксиполи(этиленгликоль) или его производные.

Конкретные природные полимеры включают лактозу, амилозу, декстран, гликоген или их производные.

В одном варианте осуществления полимер представляет собой альбумин или его фрагмент, такой как человеческий сывороточный альбумин или его фрагмент.

Подразумевается, что «производные», используемые в настоящем описании, включают реакционноспособные производные, например, тиоселективные реакционноспособные группы, такие как малеимиды и тому подобное.

Реакционноспособная группа может быть связана непосредственно или через линкерный сегмент с полимером. Понятно, что остаток такой группы в некоторых случаях будет частью продукта в качестве связующей группы между фрагментом антитела и полимером.

Размер полимера можно варьировать по желанию, но обычно он будет находиться в среднем диапазоне молекулярных масс от 500 до 50000 Да, например, от 5000 до 40000 Да, например от 20000 до 40000 Да. Размер полимера, в частности, может быть выбран на основе предполагаемого использования продукта, например способности локализоваться в определенных тканях, таких как опухоли, или продлевать период полужизни (обзор см. В Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 531-545). Так, например, когда продукт предназначен для того, чтобы из кровотока проникнуть в ткань, например, для использования при лечении опухоли, может быть выгодным использовать полимер с малой молекулярной массой, например, с молекулярной массой около 5000 Да. Для применений, где продукт остается в кровотоке, может быть выгодным использовать полимер с более высокой молекулярной массой, например имеющий молекулярную массу в диапазоне от 20000 Да до 40000 Да.

Подходящие полимеры включают полиалкиленовый полимер, такой как поли(этиленгликоль) или, особенно, метоксиполи(этиленгликоль) или его производное, и особенно с молекулярной массой в диапазоне примерно от 15000 Да примерно до 40000 Да.

В одном примере антитела для использования в настоящем изобретении присоединены к поли(этиленгликолю) (ПЭГ). В одном конкретном примере антитело представляет собой фрагмент антитела, и молекулы ПЭГ могут быть присоединены через любую доступную аминокислотную функциональную группу боковой цепи или концевой аминокислоты, расположенную во фрагменте антитела, например, через любую свободную амино-, имино-, тиольную, гидроксильную или карбоксильную группу. Такие аминокислоты могут встречаться естественным образом во фрагменте антитела или могут быть сконструированы во фрагменте с использованием способов

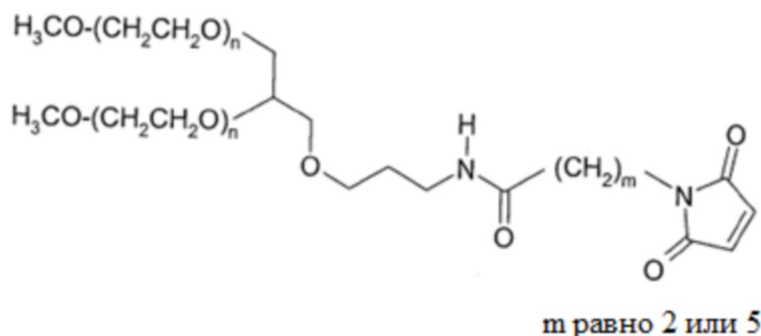
рекомбинантной ДНК (см., например, US 5219996, US 5667425, WO 98/2971, WO2008/038024). В одном примере молекула антитела по настоящему изобретению представляет собой модифицированный Fab-фрагмент, в котором модификация представляет собой добавление к С-концу его тяжелой цепи одной или более аминокислот, чтобы обеспечить присоединение эффекторной молекулы. Соответственно, дополнительные аминокислоты образуют модифицированную область шарнира, содержащую один или более цистеиновых остатков, к которым может быть присоединена эффекторная молекула. Несколько сайтов могут использоваться для присоединения двух или более молекул ПЭГ.

Подходящие молекулы ПЭГ ковалентно связаны через тиольную группу по меньшей мере одного остатка цистеина, расположенного во фрагменте антитела. Каждая молекула полимера, присоединенная к фрагменту модифицированного антитела, может быть ковалентно связана с атомом серы остатка цистеина, расположенного во фрагменте. Ковалентная связь обычно будет представлять собой дисульфидную связь или, в частности, серо-углеродную связь. Если тиольная группа используется в качестве точки присоединения соответственно активированных эффекторных молекул, например, могут быть использованы тиольные селективные производные, такие как малеимиды и производные цистеина. Активированный полимер можно использовать в качестве исходного материала для получения фрагментов антител, модифицированных полимером, как описано выше. Активированным полимером может быть любой полимер, содержащий реакционноспособную тиольную группу, такую как α -галогенкарбоновая кислота или сложный эфир, например иодацетамид, имид, например, малеимид, винилсульфон или дисульфид. Такие исходные вещества могут быть получены коммерчески (например, из Nektar, ранее Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA) или могут быть получены из коммерчески доступных исходных материалов с использованием обычных химических процедур. Конкретные молекулы ПЭГ включают 20K метокси-ПЭГ-амин (получаемый от Nektar, ранее Shearwater, Rapp Polymere и SunBio) и M-PEG-SPA (можно получить от Nektar, ранее Shearwater).

В одном варианте осуществления антитело представляет собой модифицированный Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент или diFab, который является ПЭГилированным, т.е. имеет ПЭГ (поли(этиленгликоль)), ковалентно присоединенный к нему, например, согласно способу, описанному в EP 0948544 или EP1090037 [см. также «Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications», 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, New York, «Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications», 1997, J. Milton Harris and S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC and «Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences», 1998, M. Aslam and A. Dent, Grove Publishers, New York; Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54:531-545]. В одном примере ПЭГ прикрепляется к цистеину в шарнирной области. В одном примере модифицированный ПЭГ Fab-фрагмент содержит малеимидную группу, ковалентно связанную с одной тиольной группой в модифицированной шарнирной области. Лизиновый остаток может быть ковалентно связан с малеимидной группой, и к каждой из аминокислот по остатку лизина может быть присоединен полимер метоксиполи(этиленгликоля), имеющий молекулярную массу приблизительно 20000 Да. Таким образом, общая молекулярная масса ПЭГ, присоединенного к Fab-фрагменту, может составлять приблизительно 40000 Да.

Конкретные молекулы ПЭГ включают 2-[3-(N-малеимидо)пропионамидо]этиламин N,N'-бис(метоксиполи(этиленгликоля) MW 20000) модифицированного лизина, также известный как PEG2MAL40K (полученный от Nektar, ранее Shearwater).

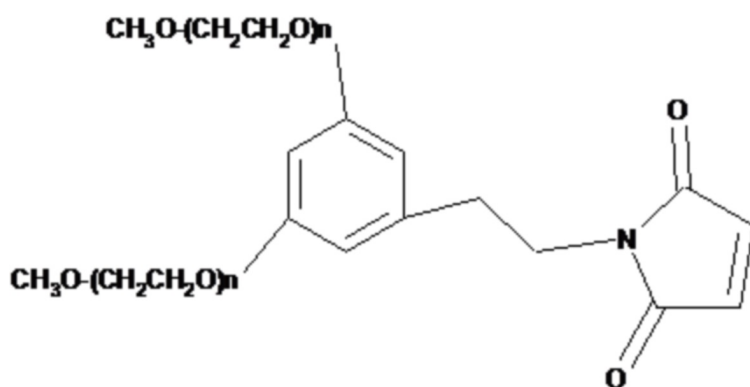
Альтернативные источники ПЭГ-линкеров включают NOF, которые поставляют GL2-400MA3 (где m в структуре ниже равно 5) и GL2-400MA (где m равно 2), а n составляет приблизительно 450:



То есть каждый ПЭГ составляет примерно 20000 Да.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления ПЭГ представляет собой 2,3-бис(метилполиоксиэтилен-окси)-1-{[3-(6-малеими́до-1-оксогексил)амино]пропилокси}гексан (содержащий 2 рукава разветвленный ПЭГ, $-(CH_2)_3NHCO(CH_2)_5-MAL$, M_w 40000, известен как SUNBRIGHT GL2-400MA3.

Дополнительные альтернативные ПЭГ-эффektorные молекулы относятся к следующему типу:



В одном варианте осуществления предложено антитело, такое как полноразмерное антитело, которое является ПЭГилированным (например, с ПЭГ, описанным в настоящем документе), присоединенным через аминокислотный остаток цистеина по аминокислоте 226 или около нее в цепи, например по аминокислоте 226 тяжелой цепи (при последовательной нумерации). В одном варианте осуществления ПЭГ присоединен к Cys226 SEQ ID NO: 101.

В одном варианте осуществления в настоящем раскрытии предложена молекула Fab-ПЭГ, содержащая один или более полимеров ПЭГ, например 1 или 2 полимера, таких как полимер или полимеры 40 кДа.

Молекулы Fab-ПЭГ в соответствии с настоящим изобретением могут быть особенно выгодными тем, что они имеют период полужизни, не зависящий от Fc-фрагмента.

В одном варианте осуществления предложен scFv, конъюгированный с полимером, таким как молекула ПЭГ, молекула крахмала или молекула альбумина.

В одном варианте осуществления антитело или фрагмент конъюгируют с молекулой крахмала, например, для увеличения периода полужизни. Методы конъюгирования начинают с белка, как описано в US 8017739, включенном в настоящее описание путем

ссылки.

Репортерная молекула, используемая в настоящем описании, представляет собой молекулу, которая может быть детектирована, например, флуоресцентный краситель, радиоактивная метка или другая детектируемая сущность.

5 Настоящее изобретение также относится к выделенной последовательности ДНК, кодирующей тяжелую и/или легкую цепь (цепи) молекулы антитела по настоящему изобретению. Соответственно, последовательность ДНК кодирует тяжелую или легкую цепь молекулы антитела по настоящему изобретению. ДНК-последовательность по
10 настоящему изобретению может содержать синтетическую ДНК, например, полученную путем химической обработки, кДНК, геномную ДНК или любую их комбинацию.

Последовательности ДНК, которые кодируют молекулу антитела по настоящему изобретению, могут быть получены способами, хорошо известными специалистам в данной области. Например, последовательности ДНК, кодирующие часть или все
15 тяжелые и легкие цепи антитела, могут быть синтезированы по желанию из определенных последовательностей ДНК или на основе соответствующих аминокислотных последовательностей.

ДНК, кодирующая акцепторные каркасные последовательности, широко доступна специалистам в данной области и может быть легко синтезирована на основе их известных аминокислотных последовательностей.

20 Стандартные методы молекулярной биологии могут быть использованы для получения последовательностей ДНК, кодирующих молекулу антитела по настоящему изобретению. Целевые последовательности ДНК могут быть синтезированы полностью или частично с использованием методов синтеза олигонуклеотидов. При необходимости можно использовать методы сайт-направленного мутагенеза и полимеразной цепной
25 реакции (ПЦР).

Примеры подходящих последовательностей ДНК представлены на Фигуре 1.

Настоящее изобретение также относится к клонирующему или экспрессирующему вектору, содержащему одну или более последовательностей ДНК по настоящему изобретению. Соответственно, предложен клонирующий или экспрессирующий вектор,
30 содержащий одну или более последовательностей ДНК, кодирующих антитело по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления вектор содержит последовательности ДНК легкой цепи, приведенные в SEQ ID NO: 46 или SEQ ID NO: 47, и/или последовательность ДНК тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO:
35 102 или SEQ ID NO: 103. Соответственно, клонирующий или экспрессирующий вектор содержит две последовательности ДНК, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепь молекулы антитела по настоящему изобретению, предпочтительно SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 61, соответственно, и подходящие сигнальные последовательности. В одном примере вектор содержит межгенную последовательность между тяжелой и легкой
40 цепями (см. WO03/048208).

Специалистам в данной области хорошо известны общие методы, с помощью которых могут быть сконструированы векторы, способы трансфекции и методы культивирования. В этом отношении есть ссылка на «Current Protocols in Molecular Biology», 1999, FM Ausubel (ed), Wiley Interscience, New York и Maniatis Manual produced by Cold Spring Harbor
45 Publishing.

Также предложена клетка-хозяин, содержащая один или более клонирующих или экспрессирующих векторов, содержащих одну или более последовательностей ДНК, кодирующих антитело по настоящему изобретению. Любая подходящая система клетки-

хозяева/вектор может быть использована для экспрессии последовательностей ДНК, кодирующих молекулу антитела по настоящему изобретению. Также могут использоваться бактериальные экспрессирующие системы клеток-хозяев, например, *E. coli* и другие микробные системы, или эукариотические, например клетки

5 млекопитающих. Подходящие клетки-хозяева млекопитающих включают клетки НЕК, СНО, миеломные или гибридомные клетки.

Настоящее изобретение также относится к способу получения молекулы антитела в соответствии с настоящим изобретением, включающему культивирование клетки-хозяина, содержащей вектор по настоящему изобретению, в условиях, подходящих для

10 экспрессии белка из ДНК, кодирующей молекулу антитела по настоящему изобретению, и выделение молекулы антитела.

Молекула антитела может содержать только полипептид тяжелой или легкой цепи, и в этом случае для трансфекции клеток-хозяев необходимо использовать только кодирующую последовательность полипептида тяжелой цепи или легкой цепи. Для

15 получения продуктов, содержащих как тяжелые, так и легкие цепи, клеточная линия может трансфицироваться двумя векторами: первым вектором, кодирующим полипептид легкой цепи, и вторым вектором, кодирующим полипептид тяжелой цепи.

Альтернативно, может быть использован один вектор, включающий в себя последовательности, кодирующие полипептиды легкой цепи и тяжелой цепи.

20 Антитела и фрагменты в соответствии с настоящим изобретением экспрессируются клетками-хозяевами на хорошем уровне. Таким образом, свойства антител и/или связывающих фрагментов пригодны для экспрессии в промышленном масштабе.

Таким образом, существует способ культивирования клетки-хозяина и экспрессии антитела или его фрагмента, выделения последнего и необязательно его очистки с

25 получением выделенного антитела или фрагмента. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает стадию конъюгации эффекторной молекулы с выделенным антителом или фрагментом, например, конъюгацию с ПЭГ-полимером, в частности, как описано в настоящем документе.

В одном варианте осуществления предложен способ очистки антитела (в частности, антитела или фрагмента согласно изобретению), включающий проведение

30 анионообменной хроматографии в несвязывающем режиме, так что примеси сохраняются на колонке, а антитело элюируется.

В одном варианте осуществления при очистке используется аффинный захват на колонке TGF-beta.

35 В одном варианте осуществления при очистке используют сибакроновый синий или ему подобный для очистки слитого альбумина или конъюгатных молекул.

Подходящие ионообменные смолы для использования в этом процессе включают смолу Q.FF (поставляемую компанией GE-Healthcare). Стадию можно, например, проводить при pH примерно 8.

40 Способ может дополнительно содержать начальную стадию захвата с использованием катионообменной хроматографии, например, при pH от 4 до 5, например 4,5.

Катионообменная хроматография может, например, использовать смолу, такую как смола CaptoS или SP сефароза FF (поставляемая компанией GE-Healthcare). Затем антитело или фрагмент можно элюировать из смолы с использованием раствора ионной

45 соли, такого как хлорид натрия, например, в концентрации 200 mM.

Таким образом, стадия или стадии хроматографии могут включать одну или более стадий промывки, если это необходимо.

Процесс очистки может также содержать одну или более стадий фильтрации, таких

как стадия диафильтрации.

Таким образом, в одном варианте осуществления предложено очищенное антитело против TGF-beta или фрагмент, например гуманизированное антитело или фрагмент, в частности, антитело или фрагмент в соответствии с изобретением, по существу очищенный, в частности, свободный или по существу свободный от эндотоксина и/или белка клетки-хозяина или ДНК.

Очищенная форма, используемая выше, предназначена для обозначения чистоты по меньшей мере на 90% масс./масс., такой как 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% масс./масс. или более.

Подразумевается, что по существу свободен от эндотоксина, как правило, обозначает содержание эндотоксина 1 ЕЭ на мг продукта-антитела или менее, например 0,5 или 0,1 ЕЭ на мг продукта.

Подразумевается, что по существу, свободный от белка клетки-хозяина или ДНК, как правило, обозначает содержание белка клетки-хозяина и/или ДНК, составляющее 400 мкг на 1 мг продукта-антитела или менее, как например, 100 мкг на 1 мг или менее, в частности, 20 мкг на 1 мг, если это необходимо.

Настоящее изобретение также относится к антагонистическому антителу, которое связывается с человеческим TGF-beta 1, человеческим TGF-beta 2 и человеческим TGF-beta 3 (или к фармацевтическим композициям, содержащим его) в соответствии с раскрытием для применения в качестве лекарственного средства. Настоящее изобретение также относится к антагонистическому антителу, которое связывается с человеческим TGF-beta 1, человеческим TGF-beta 2 и человеческим TGF-beta 3 (или к фармацевтическим композициям, содержащим его) в соответствии с раскрытием для применения при лечении или профилактике патологического расстройства, которое опосредуется TGF-beta 1, 2 и/или 3 или которое связано с повышенным уровнем TGF-beta 1, 2 и/или 3.

Настоящее изобретение также относится к применению антагонистического антитела, которое связывается с человеческим TGF-beta 1, человеческим TGF-beta 2 и человеческим TGF-beta 3 согласно раскрытию изобретения при изготовлении лекарственного средства для лечения или профилактики патологического расстройства, которое опосредуется TGF-beta 1, 2 и/или 3 или которое связано с повышенным уровнем TGF-beta 1, 2 и/или 3.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения пациента, страдающего или подверженного риску патологического расстройства, опосредованного TGF-beta 1, 2 или 3 или связанного с повышенным уровнем TGF-beta 1, 2 или 3, причем способ включает введение пациенту эффективного количества антитела согласно раскрытию изобретения. В настоящей заявке патологическое расстройство, которое опосредуется TGF-beta 1, 2 и/или 3 или которое связано с повышенным уровнем TGF-beta 1, 2 и/или 3, может быть любым подходящим расстройством. В одном варианте патологическое расстройство выбирают из группы, состоящей из: фиброза легких, такого как идиопатический фиброз легких, легочной гипертензии, такой как легочная артериальная гипертензия.

Антитело в соответствии с раскрытием изобретения может быть использовано для лечения заболеваний легких, включающих легочную артериальную гипертензию.

Антитело в соответствии с раскрытием изобретения может быть использовано для лечения пациентов, страдающих идиопатическим легочным фиброзом и легочной артериальной гипертензией.

Настоящее изобретение также относится к антагонистическому антителу Fab или Fab'-фрагменту, которое связывается с человеческим TGF-beta 1, человеческим TGF-beta

2 и человеческим TGF-beta 3, для применения путем ингаляционного введения в лечении или профилактике патологического расстройства, которое опосредовано TGF-бета 1, 2 или 3 или которое связано с повышенным уровнем TGF-beta 1, 2 или 3.

Настоящее изобретение также относится к антагонистическому антителу Fab или Fab'-фрагменту, которое связывается с человеческим TGF-beta 1, человеческим TGF-beta 2 и человеческим TGF-beta 3, в изготовлении лекарственного средства для лечения или профилактики патологического расстройства, которое опосредовано TGF-бета 1, 2 или 3 или которое связано с повышенным уровнем TGF-beta 1, 2 или 3, путем ингаляционного введения.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения пациента, страдающего или подверженного риску патологического расстройства, опосредованного TGF-beta 1, 2 или 3 или связанного с повышенным уровнем TGF-beta 1, 2 или 3, причем способ включает введение пациенту путем ингаляции эффективного количества антагонистического антитела Fab или Fab'-фрагмента, которое связывается с человеческим TGF-beta 1, человеческим TGF-beta 2 и человеческим TGF-beta 3.

Патологическим расстройством, подходящим для лечения путем ингаляционного введения, может быть любое легочное заболевание, которое опосредуется TGF-beta 1, 2 и/или 3 или которое связано с повышенным уровнем TGF-beta 1, 2 и/или 3, например заболевание, выбранное из группы, состоящей из: фиброза легких, такого как идиопатический фиброз легких (IPF), например легкий, умеренный и/или тяжелый IPF, а также кистозный фиброз и легочная гипертензия, такая как легочная артериальная гипертензия (РАН). В другом варианте осуществления антитело может быть использовано для лечения легкого IPF, такого как легкий IPF, связанный с легочной гипертензией, в частности, РАН или диспропорциональной легочной гипертензии. В одном варианте осуществления антитело может использоваться для лечения пациента, страдающего IPF и легочной гипертензией, такими как IPF и РАН. В другом варианте осуществления антитело можно использовать для лечения системного склероза. В следующем варианте осуществления антитело может быть использовано для лечения системного склероза, связанного по меньшей мере с одним из следующих: фиброз легких (SSc-ILD); легочная гипертензия, например, легочная гипертензия, связанная с заболеванием соединительной ткани; или и с тем и с другим: IPF и легочной гипертензией.

Использование ингаляционного антитела, которое связывается с человеческим TGF-beta 1, человеческим TGF-beta 2 и человеческим TGF-beta 3, может снизить риск побочных эффектов при местном введении в легкие по сравнению с системным введением антитела.

Антитела и фрагменты согласно раскрытию настоящего изобретения могут быть использованы в лечении или профилактике.

Молекула антитела по настоящему изобретению также может быть использована при диагностике, например, при диагностике *in vivo* и визуализации состояний заболевания, в которое вовлечен TGF-beta.

Поскольку антитела по настоящему изобретению полезны при лечении и/или профилактике патологического состояния, настоящее изобретение также относится к фармацевтической или диагностической композиции, содержащей молекулу антитела по настоящему изобретению в сочетании с одним или более фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, разбавителями или носителями.

Соответственно, предусмотрено применение антитела по изобретению для изготовления лекарственного средства. Композиция обычно будет поставляться в виде части стерильной фармацевтической композиции, которая обычно включает фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению

может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый адъювант.

Настоящее изобретение также относится к способу получения фармацевтической или диагностической композиции, включающему добавление и смешивание молекулы антитела по настоящему изобретению вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, разбавителями или носителями.

Молекула антитела может быть единственным активным ингредиентом в фармацевтической или диагностической композиции. Альтернативно, антитело можно вводить в комбинации, например, одновременно, последовательно или отдельно с другим одним или более терапевтически активными ингредиентами. Соответственно, молекула антитела в фармацевтической или диагностической композиции может быть дополнена другими активными ингредиентами, включая ингредиенты в виде других антител, например, антитела против семейства рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR, HER-2), антитела против рецепторов фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), антитела против рецептора фактора роста тромбоцитов (PDGFR), или отличные от антител ингредиенты, такие как иматиниб, дазатиниб, ниолтиниб, базутиниб, gefitinib, эрлотиниб, темсиrolimus, вандетаниб, вемурафениб, кризотиниб, вориностат, ромидеписин, бортезомиб, сорафениб, сунитиниб, пазопаниб, регорафениб, кабозантиниб, перфенидон, нинтеданиб, стероиды или другие лекарственные молекулы, в частности, чей период полужизни не зависит от связывания TGF-beta. В конкретном варианте осуществления антитело вводят с помощью нинтеданиб, например, для лечения IPF.

Активный ингредиент, используемый в настоящем описании, относится к ингредиенту с фармакологическим эффектом, таким как терапевтический эффект, в соответствующей дозе.

Фармацевтические композиции соответственно включают терапевтически эффективное количество антитела по изобретению. Используемый в настоящем описании термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству терапевтического агента, необходимого для лечения, улучшения или предотвращения целевого заболевания или состояния, или для проявления детектируемого терапевтического, фармакологического или профилактического эффекта. Для любого антитела терапевтически эффективное количество может быть оценено первоначально либо в анализах клеточной культуры, либо на животных моделях, как правило, на грызунах, кроликах, собаках, свиньях или приматах. Животная модель может также использоваться для определения соответствующего диапазона концентраций и пути введения. Такая информация затем может быть использована для определения полезных доз и путей введения человеку.

Точное терапевтически эффективное количество для пациента будет зависеть от тяжести заболевания, общего состояния здоровья пациента, возраста, веса и пола пациента, диеты, времени и частоты введения, комбинации лекарственных средств, чувствительности реакции и толерантности/ответа на терапию. Это все может быть определено путем рутинного экспериментирования и находится в пределах оценки врача. Как правило, терапевтически эффективное количество будет составлять от 0,01 мг/кг до 500 мг/кг, например от 0,1 мг/кг до 200 мг/кг, например 100 мг/кг. В частности, терапевтически эффективное количество будет составлять от 0,001 до 100 мг/кг.

Фармацевтические композиции могут быть удобно представлены в виде единых лекарственных форм, содержащих заранее определенное количество активного агента по изобретению на дозу.

Терапевтические дозы антител в соответствии с раскрытием настоящего изобретения

не демонстрируют явных или ограниченных токсикологических эффектов *in vivo*.

Композиции могут вводиться пациенту индивидуально или в комбинации (например, одновременно, последовательно или отдельно) с другими агентами, лекарственными средствами или гормонами.

5 Антитела, которые будут использоваться для лечения различных воспалительных заболеваний, могут использоваться отдельно или в комбинации с различными другими противовоспалительными агентами.

Антитела, которые будут использоваться для лечения различных фиброзных заболеваний, могут использоваться отдельно или в комбинации с другими
10 противofiброзными агентами. Примерами таких агентов являются пирфенидон и/или нинтеданиб.

Доза, при которой вводится молекула антитела по настоящему изобретению, зависит от характера состояния, подлежащего лечению, тяжести присутствующего состояния и от того, используется ли молекула антитела профилактически или для лечения
15 существующего состояния.

Частота дозы будет зависеть от периода полужизни молекулы антитела и продолжительности ее действия. Если молекула антитела имеет короткий период полужизни (например, от 2 до 10 часов), то может потребоваться дать одну или более доз в день. Альтернативно, если молекула антитела имеет длительный период полужизни
20 (например, от 2 до 15 дней) и/или длительный профиль фармакодинамики (PD), может потребоваться только однократное введение дозы один раз в день, один раз в неделю или даже один раз в 1 или 2 месяца.

Период полужизни, используемый в настоящем описании, предназначен для обозначения продолжительности присутствия молекулы в кровотоке, например, в
25 сыворотке/плазме.

Используемая в настоящем описании фармакодинамика относится к профилю и, в частности, к продолжительности биологического действия молекулы в соответствии с настоящим изобретением.

Фармацевтически приемлемый носитель не должен сам индуцировать образование
30 антител, вредных для индивидуума, получающего композицию, и не должен быть токсичным. Подходящими носителями могут быть крупные, медленно метаболизируемые макромолекулы, такие как белки, полипептиды, липосомы, полисахариды, полимолочные кислоты, полиглицоловые кислоты, полимерные аминокислоты, сополимеры аминокислот и неактивные вирусные частицы.

35 Можно использовать фармацевтически приемлемые соли, например соли минеральных кислот, такие как гидрохлориды, гидробромиды, фосфаты и сульфаты или соли органических кислот, такие как ацетаты, пропионаты, малонаты и бензоаты.

Фармацевтически приемлемые носители в терапевтических композициях могут дополнительно содержать жидкости, такие как воду, физиологический раствор, глицерин
40 и этанол. Кроме того, в таких композициях могут присутствовать вспомогательные вещества, такие как смачивающие или эмульгирующие агенты или буферные вещества с рН. Такие носители позволяют составлять фармацевтические композиции в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, взвесей и суспензий для приема пациентом внутрь.

45 Подходящие формы для введения включают формы, подходящие для парентерального введения, например, путем инъекции или инфузии, например, путем болюсной инъекции или непрерывной инфузии. Если продукт предназначен для инъекций или инфузий, он может принимать форму суспензии, раствора или эмульсии в

маслянистом или водном носителе и может содержать составные агенты, такие как суспендирующие, консервирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Альтернативно, молекула антитела может быть представлена в сухой форме для восстановления перед использованием с помощью соответствующей стерильной жидкости.

После приготовления композиции по изобретению можно вводить непосредственно пациенту. Объектами, подлежащими лечению, могут быть животные. Однако в одном или более вариантах осуществления композиции адаптированы для введения людям.

Подходящим образом в композициях в соответствии с настоящим изобретением pH конечного состава отличается от значения изоэлектрической точки антитела или фрагмента, например, если pH композиции составляет 7, тогда может быть уместным pI от 8 до 9 или выше. Безотносительно к теории считается, что это может в конечном итоге обеспечить получение конечного состава с улучшенной стабильностью, например, антитело или фрагмент остаются в растворе.

В одном примере фармацевтическая композиция при pH в диапазоне 4-7 содержит 1-200 мг/мл антитела в соответствии с настоящим изобретением, 1-100 mM буфера, 0,001-1% поверхностно-активного вещества, а) 10-500 mM стабилизатора, б) 10-500 mM стабилизатора и 5-500 mM агента тоничности или с) 5-500 mM агента тоничности.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут вводиться любым количеством путей, включая, но не ограничиваясь ими, пероральный, внутривенный, внутримышечный, внутриартериальный, интрамедуллярный, интратекальный, внутрижелудочковый, трансдермальный, чрескожный (например, см. WO98/20734), подкожный, внутрибрюшинный, интраназальный, энтеральный, местный, сублингвальный, интравагинальный или ректальный. Гипоспреи могут также использоваться для введения фармацевтических композиций по изобретению. Как правило, терапевтические композиции могут быть приготовлены в виде инъекций либо в виде жидких растворов, либо суспензий. Также могут быть получены твердые формы, пригодные для растворения или суспензии в жидких носителях перед инъекцией. Предпочтительно молекулы антител по настоящему изобретению вводят подкожно, путем ингаляции или местно. Например, антитело можно вводить интраназально или перорально, например, путем ингаляции.

Прямую доставку композиций обычно осуществляют путем инъекции, подкожно, внутримышечно, внутривенно или интратекально или доставляют в интерстициальное пространство ткани. Композиции также можно вводить в пораженный участок.

Дозированное лечение может представлять собой схему с однократным введением или схему с многократным введением.

Понятно, что активный ингредиент в композиции будет представлять собой молекулу антитела. Таким образом, оно будет подвержено деградации в желудочно-кишечном тракте. Таким образом, если композицию следует вводить по пути с использованием желудочно-кишечного тракта, композиция должна содержать агенты, которые защищают антитело от деградации, но которые высвобождают антитело после его абсорбции из желудочно-кишечного тракта.

Подробное обсуждение фармацевтически приемлемых носителей доступно в Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, NJ 1991).

В одном варианте осуществления композиция предложена в виде композиции для местного введения, включая ингаляцию.

Подходящие ингаляционные препараты включают ингаляционные порошки, дозирующие аэрозоли, содержащие газы-пропелленты или ингаляционные растворы,

свободные от газов-пропеллентов (таких как распыляемые растворы или суспензии). Ингаляционные порошки согласно раскрытию изобретения, содержащие активное вещество, могут состоять исключительно из вышеуказанных активных веществ или смесей вышеуказанных активных веществ с физиологически приемлемым

5 вспомогательным веществом.

Эти ингаляционные порошки могут включать моносахариды (например, глюкозу или арабинозу), дисахариды (например, лактозу, сахарозу, мальтозу), олиго- и полисахариды (например, декстраны), полиспирты (например, сорбит, маннит, ксилит), соли (например, хлорид натрия, карбонат кальция) или их смеси друг с другом.

10 Целесообразно использовать моно- или дисахариды, использование лактозы или глюкозы предпочтительно, но не исключительно в форме их гидратов.

Частицы для осаждения в легких требуют размера частиц менее 10 микрон, например 1-9 мкм, например, от 0,1 до 5 мкм, в частности от 1 до 5 мкм. Размер частиц активного ингредиента (такого как антитело или фрагмент) имеет первостепенное значение,

15 поскольку считается, что он коррелирует с осаждением в областях легкого, пригодных для лечения антителом или связывающим фрагментом по изобретению. Например, частицы размером 10 мкм или менее, например от 0,1 до 5 мкм, в частности от 1 до 5 мкм, с большей вероятностью будут осаждаться в альвеолярных структурах легкого.

Газы-пропелленты, которые могут быть использованы для приготовления

20 ингаляционных аэрозолей, известны в данной области техники. Подходящие газы-пропелленты выбирают из углеводородов, таких как н-пропан, н-бутан или изобутан и галогенуглеводородов, таких как хлорированные и/или фторированные производные метана, этана, пропана, бутана, циклопропана или циклобутана. Вышеуказанные газы-пропелленты могут использоваться сами по себе или в их смесях.

25 Особенно подходящими газами-пропеллентами являются галогенированные производные алканов, выбранные из TG 11, TG 12, TG 134a и TG227. Из вышеупомянутых галогенированных углеводородов особенно пригодны TG134a (1,1,1,2-тетрафторэтан) и TG227 (1,1,1,2,3,3,3-гептафторпропан) и их смеси.

Ингаляционные аэрозоли, содержащие газ-пропеллент, могут также содержать

30 другие ингредиенты, такие как сорастворители, стабилизаторы, поверхностно-активные вещества (ПАВ), антиоксиданты, смазывающие вещества и средства для регуляции pH. Все эти ингредиенты известны в данной области.

Ингаляционные аэрозоли, содержащие газ-пропеллент, согласно изобретению могут содержать до 5 мас. % активного вещества. Аэрозоли согласно изобретению содержат,

35 например, 0,002-5 мас. %, 0,01-3 мас. %, 0,015-2 мас. %, 0,1-2 мас. %, 0,5-2 мас. % или 0,5-1 мас. % активного ингредиента.

Альтернативно, местное введение в легкие также может быть осуществлено путем введения жидкого раствора или суспензионного состава, например, с использованием устройства, такого как небулайзер, например, небулайзер, подключенный к компрессору.

40 В одном варианте осуществления композиция предложена в виде дискретных ампул, содержащих единичную дозу для доставки путем распыления.

В одном варианте осуществления антитело поставляется в лиофилизированной форме, для восстановления или, альтернативно, в виде суспензионной композиции.

Антитело по изобретению может быть доставлено диспергированным в растворителе, например, в виде раствора или суспензии. Его можно суспендировать в соответствующем физиологическом растворе, например физиологическом растворе или другом фармакологически приемлемом растворителе или в буферном растворе. Буферные растворы, известные в данной области, могут содержать 0,05мг -0,15 мг динатрия

эдетата, 8 мг - 9 мг NaCl, 0,15 мг - 0,25 мг полисорбата, 0,25 мг - 0,30 мг безводной лимонной кислоты и 0,45 мг - 0,55 мг цитрата натрия на 1 мл воды для достижения рН примерно 4-5. В суспензии, например, можно использовать лиофилизированное антитело.

Терапевтические суспензии или растворы могут также содержать одно или более вспомогательных веществ. Вспомогательные вещества хорошо известны в данной области и включают в себя буферы (например, цитратный буфер, фосфатный буфер, ацетатный буфер и бикарбонатный буфер), аминокислоты, мочевины, спирты, аскорбиновую кислоту, фосфолипиды, белки (например, сывороточный альбумин), ЭДТА, хлорид натрия, липосомы, маннит, сорбит и глицерин. Растворы или суспензии могут быть инкапсулированы в липосомы или биоразлагаемые микросферы. Состав обычно предоставляется по существу в стерильной форме с использованием стерильных процессов производства.

Это может включать в себя производство и стерилизацию путем фильтрации буферного растворителя/ раствора, используемого для композиции, асептической суспензии антитела в стерильном буферном растворе растворителя, и путем выдачи препарата в стерильные сосуды способами, известными специалистам в данной области.

Распыляемый состав в соответствии с раскрытием настоящего изобретения может быть предоставлен, например, в виде однократных лекарственных форм (например, герметичные пластиковые контейнеры или флаконы), упакованные в конверты из фольги. Каждый флакон содержит единичную дозу в объеме, например, 2 мл буфера растворителя/раствора.

Раскрытые в настоящем описании антитела считаются подходящими для доставки посредством распыления.

Также предполагается, что антитело по настоящему изобретению можно вводить с использованием генной терапии. Для этого ДНК-последовательности, кодирующие тяжелую и легкую цепи молекулы антитела под контролем соответствующих компонентов ДНК, вводят пациенту таким образом, что цепи антитела экспрессируются из последовательностей ДНК и собираются *in situ*.

В одном варианте осуществления настоящее раскрытие включает использование антител или их фрагментов в качестве реагента диагностики, например, конъюгированного с репортерной молекулой. Таким образом, предложено антитело или фрагмент согласно раскрытию, которое является меченым. В одном аспекте предложена колонка, содержащая антитело или фрагмент согласно раскрытию.

Таким образом, предложено антитело или фрагмент антитела против TGF-beta для применения в качестве реагента для таких целей, как:

1) очистка белка TGF-beta (или его связывающего фрагмента), который конъюгируют с матрицей и используют в качестве аффинной колонки или (в виде модифицированной формы антитела против TGF-beta) в качестве осаждающего агента (например, в виде формы, модифицированной доменом, распознаваемым другой молекулой, которая может быть модифицирована), который необязательно осаждается анти-Fc-реагентом);

2) детектирование и/или количественное определение TGF-beta на клетках или в клетках, живых или фиксированных (клетки *in vitro* или в тканях или срезах клеток). Использование для этого может включать количественную оценку TGF-beta в качестве биомаркера для отслеживания эффекта обработки антителом против TGF-beta. Для этих целей кандидат может использоваться в модифицированной форме (например, путем добавления другого фрагмента в качестве генетического гибридного белка или химического конъюгата, как например, путем добавления репортерной молекулы, например флуоресцентной метки, используемой для детектирования);

3) очистка или сортировка TGF-beta-несущих клеток, меченных связыванием с кандидатом, модифицированным способами, проиллюстрированными в (1) и (2).

«Содержащий» в контексте настоящей спецификации предназначено для обозначения «включающий».

5 Если технически целесообразно, варианты осуществления изобретения могут быть объединены.

Варианты осуществления описаны в настоящем документе как содержащие определенные признаки/элементы. Раскрытие изобретения также распространяется на отдельные варианты осуществления, состоящие или в основном состоящие из указанных признаков/элементов.

Технические ссылки, такие как патенты и заявки, включены в настоящее описание путем ссылки.

Любые варианты осуществления, конкретно и явно изложенные в настоящем описании, могут составлять основу отказа от ответственности либо отдельно, либо в сочетании с одним или более дополнительными вариантами осуществления.

Настоящее изобретение далее описано исключительно в качестве иллюстрации в следующих примерах.

ПРИМЕРЫ

В следующих примерах использование терминов TGF-beta 1, TGF-beta 2 и TGF-beta 3 относится к зрелым последовательностям TGF-beta 1, TGF-beta 2 и TGF-beta 3, как показано на Фигурах 3b, 3d и 3f, соответственно.

Пример 1. Иммунизация и первичный и вторичный скрининг супернатантов клеточной культуры В-клеток

4-х самцов кроликов Half-Lop (> 2 кг) иммунизировали подкожно человеческим белком TGF-beta1 (Фигура 3b) 250 мкг, смешанным с человеческим белком TGF-beta2 250 мкг (Фигура 3d), с получением общей дозы 500 мкг на кролика, эмульгированной в равном объеме полного адьюванта Фрейнда (CFA) путем энергичного смешивания шприцем. Кроликам вводили бустерные инъекции с интервалом 21 день с использованием неполного адьюванта Фрейнда (IFA) с забором крови из уха через 14 дней после иммунизации. Вводили 3 дозы смеси изоформ 1/2 перед конечной дозой только человеческого белка TGF-beta2 (500 мкг). Завершение введения происходило через 14 дней после конечного бустерного введения суспензий одиночных клеток селезенки, костного мозга и моноклеаров периферической крови, полученных и замороженных в 10% DMSO/ FCS при -80°C.

Полученные иммунные ответы определяли с помощью ИФА. На 96-луночные планшеты Nunc-Immuno™ 1 Maxisorp™ наносили покрытие либо в виде человеческого белка TGF-beta1 (Peprotech, # 100-21C) при 2 мкг/мкл в PBS, человеческого белка TGF-beta2 (R & D systems, 302-B2-010/CF) или человеческого белка TGF-beta-3 (R & D-системы, 243-B3-010/CF) при 0,5 мкг/мл в PBS и инкубировали в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали после каждого слоя (автоматизированно, 4×200 мл промывок PBS+0,05% Tween). Лунки блокировали 1% (мас./об.) казеином (VWR Chemicals, 440203H) в PBS путем инкубации при комнатной температуре (RT) в течение 1 часа. Сыворотки, log-разведения от 1/100 в 1% казеине добавляли и инкубировали в течение 1½ часов при комнатной температуре. В каждую лунку добавляли 100 мкл конъюгата козьего антикроличьего Fc-специфического антитела IgG и пероксидазы хрена (Jackson, 111-036-046) при разведении 1/3000 в 1% (мас./об.) казеине в PBS и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Добавляли субстрат, 100 мкл ТМБ (3,3',5,5' Тетраметилбензидин, растворимый) и реакцию останавливали 50 мкл 2,5% раствора

фторида натрия в dH₂O. Оптические плотности (OD) определяли при 610 нм с использованием ИФА-ридера.

Культуры В-клеток получали с использованием метода, аналогичного описанному Zubler et al. (1985). Вкратце, В-клетки, полученные из мононуклеаров периферической крови (PBMC) из иммунизированных кроликов, культивировали с плотностью приблизительно 5000 клеток на лунку в 96-луночных планшетах для культивирования в 96-луночном планшете со средой RPMI 1640 с концентрацией 200 мкл/л (Gibco BRL), дополненной 10% FCS (Sigma Aldrich), 2% HEPES (Sigma Aldrich), 2% L-глутамином (Gibco BRL), 1% раствором пенициллина/стрептомицина (Gibco BRL), 0,1% бета-меркаптоэтанолом (Gibco BRL) 0,2% Нормоцином (Invivogen), 1% супернатант активированных человеческих мононуклеаров периферической крови (PBMC) и гамма-облученные мутантные клетки EL4 мышины тимомы (5×10^4 /лунку) в течение семи дней при температуре 37°C с в атмосфере 5% CO₂.

Первичный скрининг на связывание TGF-beta:

Присутствие антител, специфичных к белку TGF-beta, в супернатантах культуры В-клеток определяли с использованием гомогенного анализа на основе флуоресценции с использованием гранул Superavidin™ (Bangs Laboratories), покрытых биотинилированным TGF-beta1 (Peprotech). Белок TGF-beta1 биотинилировали с использованием набора для биотинилирования Lightning-Link® (Innova Biosciences) в соответствии с инструкциями производителя.

10 мкл супернатанта культуры В-клеток переносили из 96-луночных культуральных планшетоов со штрихкодом в 384-луночные аналитические планшеты со штрихкодом с черной стенкой, содержащие TGF-β1, иммобилизованный на гранулах (10 мкл/лунку), с использованием автоматизированного жидкостного манипулятора Bravo (Agilent). Связывание детектировали с помощью козьего антикроличьего IgG Fcγ-специфического конъюгата FITC (Jackson ImmunoResearch). Планшеты считывали в системе детектирования TTV Labtech mirrorball®.

После первичного скрининга супернатанты, положительные по связыванию TGF-beta, объединяли на 96-луночных планшетах со штрихкодом с использованием робота-захвата Beckman и В-клеток в планшетах для культивирования клеток, замороженных при -800°C.

Вторичный скрининг на связывание с TGF-beta 1, 2 и 3:

Для определения способности антител связываться с различными изоформами TGF-beta, супернатант В-клеток в этих основных планшетах подвергали скринингу в ИФА-анализе с 3 различными изоформами TGF-beta. Анализ ИФА включал нанесение покрытий в виде различных изоформ TGF-beta 1, 2, 3 (Peprotech) на 384-луночные планшеты Maxisorp™ (ThermoScientific/Nunc) с концентрацией 2 мкг/мл в PBS. Планшеты блокировали 1% BSA в PBS и затем инкубировали с 10 мкл/лунку супернатанта культуры В-клеток. Вторичное HRP-конъюгированное козье антитело против кроличьего fc IgG (Jackson ImmunoResearch) добавляли к планшетах с последующей визуализацией связывания с субстратом ТМВ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином из EMD Millipore, 10 мкл/лунку). Оптическую плотность измеряли при 630 нм с использованием микропланшетного ридера BioTek Synergy 2.

Результаты первичного скрининга и вторичного скрининга

79 мышей, крыс и кроликов иммунизировали только человеческим TGF-beta1 (SEQ ID NO: 114; фиг. 3b) и скринировали на связывание TGF-beta 1 с различными уровнями положительных для TGF-beta 1 агентов связывания. Из этих 79 различных

иммунизированных крыс, мышей и кроликов идентифицировали 2656 агентов связывания для антител против человеческого TGF-beta 1. Однако только 831 из этих лунок продемонстрировали связывание со всеми тремя изоформами на вторичном скрининге.

Как описано выше, 4 кролика иммунизировали как человеческим TGF-beta 1, так и человеческим TGF-beta 2. Всю сыворотку этих 4 кроликов анализировали на первичном скрининге и продемонстрировали 1367 положительных лунок для связывания TGF-beta 1 и затем подвергали вторичному скринингу на связывание со всеми тремя изоформами TGF-beta 1, 2 и 3, что привело к идентификации 1026 лунок со связыванием со всеми тремя изоформами TGF-beta.

После первичного и вторичного скрининга В-клетки, демонстрирующие связывание со всеми тремя изоформами, затем анализировали на блокирующую активность.

Анализ репортерного гена в клетках HEK-Blue TGF-beta с использованием рекомбинантного TGF-beta 1

Анализ репортерного гена был разработан с использованием клеток HEK-Blue TGF-beta (клеточная линия HEK-Blue TGF-beta, Invivogen). Клеточная линия HEK-Blue TGF-beta реагирует на присутствие TGF-beta путем экспрессии SEAP, который детектируется с помощью реагента колориметрического детектирования. Антитела, способные нейтрализовать TGF-beta, приведут к уменьшению сигнала, генерируемого в репортерной клеточной линии. Оценивали способность тестирующих агентов нейтрализовать TGF-beta 1.

Антитела титровали 3-кратно или добавляли в одной концентрации и инкубировали с изоформами человеческого TGF-beta 1, 2 или 3 (50 пг/мл TGF-beta-изоформы) в аналитической среде (DMEM, 4,5 г/л глюкозы, 10% об./об.) фетальной бычьей сыворотки, 50 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина, 100 мкг/мл Normoci, 2 мМ L-глутамин) в течение 30 минут до добавления 50000 клеток HEK-Blue TGF-beta и инкубировали в течение 16 часов при 37°C. SEAP, продуцируемый клетками в ответ на активацию TGF-beta, детектировали добавлением реагента Quanti Blue (Invivogen) в течение 1 часа при 37°C и путем детектирования с помощью поглощения при 630 нм. Максимальный сигнал генерировали лунки, содержащие HEK-Blue TGF-beta-клетки и TGF-beta, и минимальный сигнал генерировали с использованием избытка TGF-beta-нейтрализующего антитела.

Супернатант культуры В-клеток, содержащий BSN.4856, анализировали в однократном анализе репортерного гена TGF-beta1 (мастер-планшет 3142, из лунки D012). Антитело проявляло 80% ингибирования TGF-beta1. Процент ингибирования из анализов концентрационных кривых рассчитывали на основе максимального и минимального сигналов в аналитическом планшете.

Пример 2. Клонирование генов варибельной области из В-клеток и экспрессия и характеристика активности рекомбинантного Fab в анализах *in vitro*

Данные связывания ИФА и анализов блокирования репортерных генов в Примере 1 позволили выбрать лунки для извлечения варибельной области. Чтобы извлечь гены варибельной области антитела из интересующих лунок, необходимо провести стадию деконволюции, чтобы обеспечить идентификацию антигенспецифических В-клеток в данной лунке, поскольку присутствует гетерогенная популяция В-клеток. Это было достигнуто с использованием метода флуоресценции фокусов (Clargo et al., MAb, Vol. 6, Iss. 1, 2014). Вкратце, иммуноглобулин-секретирующие В-клетки из положительных лунок смешивали со стрептавидиновыми гранулами (New England Biolabs) с покрытием биотинилированным TGF-beta1 и 1:1200 конечного разведения козьего антикроличьего Fcγ-специфичного FITC конъюгата (Jackson ImmunoResearch). После статической

инкубации при 37°C в течение 1 часа, антиген-специфические В-клетки могут быть идентифицированы по наличию флуоресцентного ореола, окружающего эти В-клетки. Эти индивидуальные В-клетки, идентифицированные с помощью микроскопа Olympus, затем собирали микроманипулятором Eppendorf и осаждали в пробирку для ПЦР.

Гены варибельной области антитела выделяли из одиночных клеток с помощью обратной транскрипции (ОТ)-ПЦР с использованием праймеров на варибельную область тяжелой и легкой цепей. Проводили два раунда ПЦР с вложенной ПЦР для введения сайтов рестрикции на концах 3' и 5', что позволило клонировать варибельную область в экспрессирующий вектор млекопитающего, содержащий кроличий Fab без шарнира (VH) или кроличью цепь каппа (VL). Конструкции тяжелых и легких цепей ко-трансфецировали в клетки Expi-293 с использованием ExpiFectamine™ 293 (Invitrogen) и рекомбинантного антитела, экспрессируемого в 48-луночной планшете с глубокими лунками в объеме 1 мл или в конической колбе на 30 мл. После 7-дневной экспрессии неочищенные транзиторные супернатанты собирали и тестировали снова на связывание с помощью ИФА и на блокирование в анализе репортерного гена, как описано в Примере 1. Связывание со всеми тремя изоформами было подтверждено с использованием рекомбинантного кроличьего Fab 4856 в ИФА. Последовательности представлены на Фигуре 1В.

Экспрессированную кроличью молекулу 4856 Fab очищали с помощью аффинного захвата с использованием мелкомасштабной системы очистки на основе вакуума. Вкратце, супернатант из 30 мл клеточной культуры стерильно фильтровали на 0,22 мкм фильтре перед добавлением 1 мл гранул GammaBind Plus™ (GE Healthcare). Смесь супернатанта/гранул затем переворачивали в течение часа, прежде чем надосадочную жидкость удаляли, применяя вакуум. Гранулы промывали PBS перед элюированием 0,1 М глицином с pH 2,7. Элюированные фракции нейтрализовали и буфер заменяли на PBS перед тем, как стерильно фильтровать через 0,22 мкм. Конечный анализ состоял из определения концентрации с помощью A280; очистки с помощью SEC-UPLC (колонка BEH200, Waters); и определения эндотоксина с помощью системы с картриджем PTS-Endosafe™ (Charles River).

Пример 3. Характеристика активности рекомбинантного кроличьего Fab в анализах *in vitro*

Анализ репортерного гена в клетках HEK-SEAP-SBE с использованием рекомбинантных TGF-beta 1, 2 и 3:

Затем очищенный кроличий Fab тестировали (n=2) в анализе TGF-beta с использованием репортерного гена, как описано в Примере 1, в 10-точечном дозовом ответа против TGF-beta 1, 2 и 3. Изоформы TGF-beta 1, 2 и 3 добавляли в концентрации 50 пг/мл и оценивали способность антитела нейтрализовать TGF-beta 1, 2 и 3.

Данные приводили в соответствие с использованием 4-параметрической логистической модели (Фигура 4а, 4b и 4с). IC50 рассчитывали на основе точки перегиба кривой (Таблица 1).

Идентификатор	Среднее геометрическое значение IC50 (нМ)		
	TGF-beta1	TGF-beta2	TGF-beta3
BSN.4856.rbFab. (n=2, из 5 отдельных образцов)	1,77 (0,04 нМ)	0,3 (0,01 нМ)	24,51 (0,54 нМ)

ТАБЛИЦА 1. Значения IC50 для очищенного кроличьего Fab 4856 в анализе репортерного гена в клетках HEK-Blue TGF-beta (Invivogen).

Очищенный кроличий Fab 4856 ингибировал TGF-beta1, TGF-beta2 и TGF-beta3-управляемый анализ репортерного гена в клетках HEK-Blue TGF-beta с IC50 0,04, 0,01

и 0,54 нМ, соответственно.

Анализ репортерного гена в совместной культуре ВхРС3 и НЕК-Blue TGF-beta с эндогенным TGF-beta:

Была разработана система совместного культивирования, состоящая из клеток Вх-
 5 РС3 (АТСС) и клеточной линии НЕК-Blue TGF-beta (Invivogen). Клетки ВХРС-3 конститутивно продуцируют и активируют TGF-beta. Клеточная линия НЕК-Blue TGF-beta реагирует на присутствие активного TGF-beta экспрессией SEAP, которая детектируется с помощью реагента колориметрического детектирования. Антитела, способные нейтрализовать TGF-beta, приведут к уменьшению сигнала, генерируемого
 10 в репортерной клеточной линии.

Клетки НЕК-Blue TGF-beta высевали в количестве 100000 клеток на лунку в DMEM с 10% FCS и инкубировали в течение 90 минут при 37°C. Тестируемые агенты титровали 3-кратно в бессывороточной DMEM, содержащей 0,2% (мас./об.) BSA и добавляли к
 15 клеткам НЕК-Blue TGF-beta. Клетки ВхРС3 добавляли в бессывороточную DMEM, содержащую 0,2% (мас./об.) BSA, в количестве 50000 клеток на лунку и инкубировали в течение 18 часов при 37°C. Максимальный сигнал генерировался из лунок, содержащих как клетки ВХ-РС3, так и НЕК-Blue TGF-beta, и минимальный сигнал генерировался с использованием избытка TGF-beta-нейтрализующего антитела. SEAP определяли путем добавления реагента QuantiBlue в течение 1 часа при 37°C и измерения поглощения при
 20 630 нм.

Очищенный кроличий Fab 4856 анализировали в анализе репортерного гена при совместном культивировании ВхРС3-НЕК-Blue TGF-beta (n=3). Процент ингибирования из анализов концентрационных кривых рассчитывали на основе максимального и минимального сигналов в анализе, и данные приводили в соответствие с использованием
 25 4-х параметрической логистической модели (Фигура 5). IC50 рассчитывали на основе точки перегиба кривой (Таблица 2).

ТАБЛИЦА 2. Результаты эффективности кроличьего Fab 4856 в анализе репортерного гена в совместной культуре клеток ВхРС3-НЕК-Blue TGF-beta. Пять различных образцов кроличьего Fab 4856 тестировали в трех независимых экспериментах.

30

Идентификатор	n	Среднее геометрическое значение IC50 (нМ) диапазон
BSN.4856.rbFab	3	3,7; 0,8-16

BSN.4856.rbFab ингибирует анализ репортерного гена в совместной культуре ВхРС3-
 35 НЕК-Blue TGF-beta с IC50 3,7 нМ.

Аффинность кроличьего Fab 4856

Аффинность кроличьего Fab 4856 к изоформам TGF-β 1, 2 и 3 определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса с использованием Biacore™ T200 (GE Healthcare).

Изоформы TGF-β 1, 2 и 3 (Peprotech) иммобилизовали на чипе CM5 Series S посредством химической аминоконденсации на Flowcell 2, 3 и 4 (соответственно) до
 40 уровня приблизительно 150RU. Буфер HBS-EP (10 мМ HEPES pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ EDTA, 0,05% поверхностно-активного вещества P20, GE Healthcare) использовали в качестве рабочего буфера. Кроличий Fab 4856 титровали по всем трем изоформам при различных концентрациях (200-1200 нМ) при скорости потока 30 мкл/мин. Поверхность регенерировали с помощью инъекции 2×10 мкл 10 мМ HCl при скорости потока 10 мкл/
 45 мин.

Кривые связывания с вычитанием фона анализировали с использованием программного обеспечения для оценки Biacore™ T200 (версия 1.0) в соответствии со стандартными процедурами. Кинетические параметры для кроличьего Fab 4856

определяли с использованием алгоритма «подбора с гетерогенным лигандным» с $RI=0$. Кинетические параметры приведены в Таблице 3.

Считается, что иммобилизация каждой изоформы TGF β на сенсорном чипе Biacore™ с помощью лизиновых остатков мешает связыванию антитела с одним связывающим доменом и приводит к вторичному слабому взаимодействию (KD1). Данные были приведены в соответствии с гетерогенной моделью для учета двух независимых событий связывания. Считается, что более высокоаффинный компонент (KD2) представляет незакрытое взаимодействие и, следовательно, наиболее представительное измерение аффинности тестируемого антитела.

Таблица 3. Аффинность кроличьего Fab 4856 определяли с использованием анализа аффинности Biacore, $n=5$ для каждой группы.

	Ka1 (1/Mc)	Kd1 (1/c)	KD1 (M)	ka2 (1/Mc)	kd2 (1/c)	KD2 (M)
TGFb1	5,05E+04	3,18E-04	6,30E-09	4,55E+05	5,08E-05	1,12E-10
TGFb2	3,87E+04	6,55E-05	1,69E-09	6,32E+05	3,83E-04	6,06E-10
TGFb3	6,33E+04	7,82E-04	1,24E-08	8,73E+05	1,44E-03	1,65E-09

Пример 4. Генерация химерных и гуманизированных трансплантатов антитела 4856
Антитело Fab 4856 было выбрано для дальнейшей оптимизации на основе его превосходной ингибирующей активности как в анализе репортерного гена HEK-Blue™-SBE, так и в анализе репортерного гена при совместном культивировании VxPC3-HEK-Blue™-SBE в сочетании с его способностью связываться со всеми тремя изоформами TGF-beta с высокой аффинностью.

Химерное антитело 4856

Вариабельные области антитела 4856 клонировали в отдельные экспрессирующие векторы тяжелых и легких цепей и экспрессировали в виде фрагмента человеческого Fab (без шарнира).

Ген VH (SEQ ID NO: 17) клонировали в вектор pMhFab-HIS6, который содержит ДНК, кодирующую человеческую константную область CH1 гамма-1 (аллотип G1m17) с усеченным шарниром и С-концевым маркером из шести гистидиновых остатков. Ген VL (каппа) (SEQ ID NO: 13) клонировали в вектор pMhCK, который содержит ДНК, кодирующую человеческую константную область каппа (аллотип K1m3).

Антитела экспрессировали с помощью транзитной котрансфекции векторов тяжелой и легкой цепей в клетки Expi293F™.

Гуманизированное антитело 4856

Антитело 4856 гуманизировали путем трансплантации CDR из V-области кроличьего антитела на каркасы V-области человеческого зародышевого антитела.

Чтобы восстановить активность антитела, в гуманизированной последовательности также сохраняли ряд каркасных остатков из V-области кролика. Эти остатки выбирали с использованием протокола, описанного Adair et al. (1991) (Humanised antibodies. WO91/09967). Выравнивание последовательностей V-области кроличьего антитела (донора) с последовательностями V-области человеческой зародышевой линии (акцептора) показано на Фигурах 2a и 2b вместе с разработанными гуманизированными последовательностями.

CDR, трансплантированные от донорной на акцепторную последовательность, были такими, как определено Kabat et al. (см. выше), за исключением CDRH1, где используется комбинированное определение Chothia/Kabat (см. Adair et al., выше).

Гены, кодирующие ряд вариабельных последовательностей V-области тяжелой и легкой цепей, были разработаны и сконструированы методом автоматического синтеза ДНК2.0. Другие варианты V-областей тяжелой и легкой цепей были созданы путем

модификации генов VH и VK посредством олигонуклеотид-направленного мутагенеза, включая, в некоторых случаях, мутации в CDR для модификации потенциальных сайтов изомеризации аспарагиновой кислоты.

Эти гены клонировали в ряд векторов, чтобы обеспечить экспрессию

5 гуманизированного антитела 4856 Fab в клетках *E.coli* и млекопитающих. Цепи вариантов и их комбинации оценивали по их активности относительно исходного антитела, их биофизическим свойствам и пригодности для последующей обработки, что привело к выбору трансплантата легкой цепи gL3 и трансплантата тяжелой цепи gH13.

10 Человеческая V-область IGKV1-5 плюс JK4 J-область (Фигура 1I, также доступная от IMGT®, www.imgt.org, последний доступ к которому был получен до 5 января 2016 г.) были выбраны в качестве акцептора для CDR легкой цепи 4856. Остатки каркаса легкой цепи в трансплантате gL3 все взяты из гена человеческой зародышевой линии, за исключением остатков 1, 2, 3 и 71 (нумерация Kabat), где сохранялись донорные

15 остатки аланин (A1), тирозин (Y2), аспарагиновая кислота (D3) и тирозин (Y71), соответственно. Сохранение остатков A1, Y2, D3 и Y71 было необходимо для полной эффективности гуманизированного антитела.

Человеческая V-область IGHV3-21 плюс JH5 J-область (Фигура 1I, также доступны от IMGT®, www.imgt.org, последний доступ к 05 января 2016 г.) были выбраны в качестве

20 акцептора для CDR тяжелой цепи антитела 4856. Как и у многих кроличьих антител, ген VH антитела 4856 короче, чем выбранный человеческий акцептор. При выравнивании с человеческой акцепторной последовательностью каркас 1 области VH антитела 4856 не имеет N-концевого остатка, который сохраняется в гуманизированном антителе (Фигура 2b). Каркас 3 VH-области кроличьего 4856 также не содержит двух остатков

25 (75 и 76) в петле между цепями D и E бета-листа: в трансплантате gH13 пропуск заполняется соответствующими остатками (лизин 75, K75, аспарагин 76, N76) из выбранной человеческой акцепторной последовательности (Фигура 2b). Остатки каркаса тяжелой цепи в трансплантатах gH13, gH23 и gH29 все взяты из гена человеческой зародышевой линии, за исключением остатков 48, 49, 73 и 78 (нумерация Kabat), где

30 сохраняются донорные остатки изолейцин (I48), глицин (G49), серин (S73) и валин (V78), соответственно. Сохранение остатков E1, V2, Q3, I48, G49, S73 и V78 было необходимо для полной эффективности гуманизированного антитела.

В трансплантате gH20 каркасные остатки все взяты из гена зародышевой линии человека, за исключением остатков 48, 69, 71, 73 и 78 (нумерация Kabat), где сохранены

35 донорные остатки изолейцин (I48), метионин (M69), лизин (K71), серин (S73) и валин (V78), соответственно.

Остаток 98 в CDRH3 трансплантатов gH13, gH20, gH23 и gH29 подвергали мутации из остатка глицина (G98) до остатка аланина (A98), таким образом удаляя

40 потенциальный сайт изомеризации аспарагиновой кислоты из последовательностей gH13, gH20, gH23 и gH29.

Потенциальный сайт дезаминирования аспарагина в остатках N100e и G100f (Фигура 2b) удаляли из трансплантата gH23 путем мутации G100f до A100f и удаляли из трансплантата gH29 путем мутации N100e до D100e.

Экспрессия гуманизированного 4856 Fab

45 Исходные фрагменты Fab 4856 были сконструированы и протестированы в виде экспрессирующих векторов млекопитающих. Для достижения наивысшего выхода использование кодонов трансплантатов было изменено в соответствии с периплазматической экспрессией *E.coli*. Трансплантаты выравнивали с предыдущими

гуманизированными Fab, которые исторически давали стабильно высокий выход, и соответствующие кодоны изменяли соответственно с каркасными последовательностями.

Для экспрессии гуманизированного Fab 4856 в *E.coli* гуманизированный ген V-области тяжелой цепи (SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 82 или SEQ ID NO: 96) и ген V-области легкой цепи (SEQ ID NO: 40) клонировали в экспрессирующий вектор UCB pTTOD, который содержит ДНК, кодирующую константную область С-каппа (K1m3 аллотип) и человеческую CH1-область гамма-1 (аллотип G1m17). Гены fkpA и dsbC *E.coli* также вводили в экспрессирующую плазмиду, поскольку было обнаружено, что совместная экспрессия этих шапероновых белков улучшает выход гуманизированного Fab в штамме MXE016 *E.coli* во время ферментации с периодической подачей, используя IPTG для индукции экспрессии Fab. Легкие и тяжелые цепи Fab 4856 и полипептиды FkpA и DsbC экспрессировались из одного мультицистрона под контролем индуцируемого IPTG промотора tac.

Экспрессию Fab тестировали в продуцирующем штамме *E.coli* MXE016 с использованием 5 мл метода автоматической индукции. Комбинация шаперонов FkpA и DsbC значительно увеличила выход Fab.

Для экспрессии гуманизированного Fab 4856 в клетках млекопитающих ген V-области гуманизированной легкой цепи соединяли с последовательностью ДНК, кодирующей человеческую константную область С-каппа (аллотип K1m3), для создания непрерывного гена легкой цепи (SEQ ID NO: 41). Ген V-области гуманизированной тяжелой цепи соединяли с последовательностью ДНК, кодирующей человеческую CH1-область гамма-1 (аллотип G1m17), для создания непрерывного гена тяжелой цепи (SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 83 или SEQ ID NO: 97). Гены тяжелой и легкой цепей клонировали в экспрессирующий вектор млекопитающих pMXE692 Cellca vector DGV 4856 gL3 gH13 VL VH.

Определение аффинности выделенного из *E.coli* Fab 4856 gL3gH13 с помощью Biacore Антитело 4856 gL3gH13, продуцируемое в *E.coli* в соответствии с описанным выше способом, тестировали на аффинность к изоформам TGF- β 1, 2 и 3, которую определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса с использованием Biacore T200 (GE Healthcare). Изоформы человеческого TGF- β 1, 2 и 3 (Peprotech) иммобилизовали на чипе CM5 Series S с помощью химической реакции аминоконденсации на Flowcell 2, 3 и 4 (соответственно) до уровня приблизительно 20RU. Буфер HBS-EP (10 mM HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% Surfactant P20, GE Healthcare) использовали в качестве рабочего буфера. Антитело 4856 gL3gH13Fab титровали по всем трем изоформам при различных концентрациях (200-1,56 нМ) при скорости потока 30 мкл/мин. Поверхность регенерировали с помощью инъекции 2×10 мкл 10 mM HCl при скорости потока 10 мкл/мин.

Кривые связывания с вычитанием фона анализировали с использованием программного обеспечения T200 для оценки (версия 1.0, GE Healthcare) в соответствии со стандартными процедурами. Кинетические параметры определяли с использованием алгоритма гетерогенной подгонки с $RI=0$), как описано в Примере 3, и значения приведены в Таблице 4. Как и раньше, с кроличьей версией Fab в Таблице 3, KD2 Таблицы 4, как полагают, представляет собой значение незакрытого связывания для антитела 4856 gL3gH13Fab.

Таблица 4: Аффинность для гуманизированного Fab 4856, определенная с использованием анализа аффинности Biacore, n=4 для каждой группы.

TGF β изоформа	ka1 (1/Mc)	kd1 (1/c)	KD1 (M)	ka2 (1/Mc)	kd2 (1/c)	KD2 (M)
TGF β 1	7,49E+04	7,09E-04	9,48E-09	7,04E+05	5,56E-05	8,08E-11

TGFb2	5,77E+04	2,11E-04	3,67E-09	9,04E+05	1,70E-04	1,96E-10
TGFb3	9,32E+04	1,46E-03	1,57E-08	2,00E+06	3,39E-03	1,72E-09

Аналитическую гель-фильтрацию проводили для определения того, связывается ли трансплантат антитела 4856 gL3gH13 с полноразмерной последовательностью TGF-beta 1, включая латентно-ассоциированный пептид. Данные продемонстрировали, что антитело 4856 gL3gH13 не связывается с полноразмерным TGF-beta 1, включая латентно-ассоциированный пептид (данные не показаны).

Пример 5. *in vitro* ингибирующая активность гуманизированных трансплантатов

Ингибирующая активность в анализе репортерного гена HER-Blue TGF-beta с использованием рекомбинантных TGF-beta 1, 2 и 3:

Ингибирующую активность 4856 гуманизированных трансплантатов gL3gH13, gL3gH20, gL3gH23 и gL3gH29 анализировали в анализе репортерного гена HEK-Blue TGF-beta с использованием рекомбинантных TGF-beta 1, 2 и 3, как описано в Примере 1, в 10-точечном ответе дозы против TGF-beta 1, 2 и 3. Изоформы TGF-beta-1, 2 и 3 добавляли в концентрации 50 пг/мл и оценивали способность антитела нейтрализовать TGF-beta 1, 2 и 3. Данные приводили в соответствие с использованием 4-х параметрической логистической модели. IC50 рассчитывали на основании точки перегиба кривой (Таблица 5). Из Таблицы 5 видно, что гуманизированные трансплантаты, особенно gL3gH13 и gL3gH20, эффективны для нейтрализации активности TGF-beta 1, 2 и 3.

Таблица 5: Ингибирование экзогенных изоформ TGF-beta 1, 2 и 3.

TGF-beta1	N	среднее геометрическое значение (нМ)	95% CI (диапазон, где N=<4)
4856gL3gH29	9	0,255	0,173-0,376
4856gL3gH23	8	0,41	0,313-0,538
4856gL3gH13	11	0,074	0,053-0,104
4856gL3gH20	12	0,038	0,024-0,062
TGF-beta 2	N	среднее геометрическое значение (нМ)	95% CI (диапазон, где N=<4)
4856gL3gH29	3	0,016	0,013-0,018 (диапазон)
4856gL3gH23	3	0,017	0,015-0,022 (диапазон)
4856gL3gH13	3	0,01	0,007-0,019 (диапазон)
4856gL3gH20	5	0,011	0,010-0,027
TGF-beta 3	N	среднее геометрическое значение (нМ)	95% CI (диапазон, где N=<4)
4856gL3gH29	3	1,954	1,6-2,46 (диапазон)
4856gL3gH23	4	1,987	1,21-1,88 (диапазон)
4856gL3gH13	4	0,475	0,248-0,909
4856gL3gH20	5	0,302	0,141-0,647

Ингибирующая активность в анализе репортерного гена при совместном культивировании ВхРС3 и HEK-Blue TGF-beta с эндогенным TGF-beta:

Ингибирующую активность гуманизированных трансплантатов gL3gH13, gL3gH20, gL3gH23 и gL3gH29 4856 анализировали с помощью анализа репортерного гена при совместном культивировании ВхРС3 и HEK-Blue TGF-beta, как описано в Примере 3. Процент ингибирования от анализов концентрационных кривых рассчитывали на основе максимального и минимального сигналов в анализе, и данные приводили в соответствие с использованием 4-х параметрической логистической модели. IC50 рассчитывали на основе точки перегиба кривой, и результаты показаны в Таблице 6. Из Таблицы 6 можно заметить, что гуманизированные трансплантаты, особенно gL3gH13, gL3gH20 и gL3gH29, эффективны для нейтрализации TGF-beta, экспрессируемого

и активированного клетками в этом анализе.

Таблица 6: Ингибирование TGF-beta, экспрессируемого клетками VxPC3, в анализе с совместным культивированием с клетками HEK-Blue TGF-beta.

Эндогенный анализ	N	Среднее геометрическое значение (нМ)	95% CI (диапазон, где N=<4)
4856gL3gH23	4	9,104	3,89-21,31
4856gL3gH29	4	3,773	0,71-20,05
4856gL3gH13	4	3,949	2,52-6,19
4856gL3gH20	3	4,626	3,01-6,41 (диапазон)

Пример 6. Ингибирующая активность гуманизированных трансплантатов 4856 в индуцированной адриамицином *in vitro* модели фиброза почки

Адриамицин-индуцированная нефропатия является хорошо охарактеризованной моделью приобретенного фиброза почек у грызунов с патологическими особенностями, сходными с гломерулосклерозом человека и тубулоинтерстициальным фиброзом.

Мезангиальные клетки являются одним из основных типов клеток, участвующих в фиброзном фенотипе в ответ на адриамицин. Была создана человеческая *in vitro* модель для фиброзного ответа на обработку адриамицином, и проводили оценку способности TGF-beta-нейтрализующих трансплантатов gL3gH13, gL3gH20, gL3gH23 и gL3gH29 антитела 4856 Fab модулировать депонирование компонентов внеклеточного матрикса (ECM) в этой системе.

Первичные человеческие почечные мезангиальные клетки (HRMC, Innoprot) высевали в количестве $1,6 \times 10^4$ клеток/см² в присутствии 10 нМ адриамицина и тестируемых трансплантатов 4856 Fab gL3gH13, gL3gH20, gL3gH23 и gL3gH29 и контрольного Fab (3-кратные последовательные разведения в диапазоне от 0,2 до 6000 нМ). Клетки инкубировали в течение 6 дней при 37°C, 5% CO₂, затем лизировали в 0,25 М NH₄OH/25 мМ Tris (30 мин при 37°C) и депонированный ECM фиксировали в ледяном метаноле (30 мин при -20°C). Депонирование отдельных компонентов ECM детектировали путем визуализации с высоким содержанием после иммуноокрашивания для фибронектина (AlexaFluor488-конъюгированный Ebioscience 53-9869-82), Коллагенов I и III (поликлональные кроличьи антитела Millipore AB745 и AB747) и Коллагена типа IV (конъюгированного с Efluor660) Ebioscience 50-9871-80). Получали изображения и интенсивность флуоресценции детектировали с помощью Cellomics Arrayscan. Максимальный сигнал получали из лунок, содержащих обработанные адриамицином клетки, в отсутствие Fab, и минимальный сигнал получали в лунках, где клетки не подвергались воздействию адриамицина.

Процент ингибирования из анализов концентрационных кривых рассчитывали на основе максимальной и минимальной интенсивности флуоресценции в анализе, и данные приводили в соответствие с использованием 4-параметрической логистической модели. Изображения и показанные графики представляют собой три повторных эксперимента.

На Фигуре 6 показаны типичные изображения депонирования ECM в HRMC в ответ на 10 нМ адриамицин и в присутствии указанных концентраций TGF-beta-нейтрализующих 4856 Fab-трансплантатов gL3gH13, gL3gH20, gL3gH23 и gL3gH29 или контрольного Fab.

На Фигуре 7 показаны типичные концентрационные кривые для 4856 Fab-трансплантатов gL3gH13, gL3gH20, gL3gH23 и gL3gH29 в *in vitro*-анализе с адриамицином.

Четыре протестированных TGF-beta-нейтрализующих Fab-трансплантата ингибировали индуцированное адриамицином депонирование ECM в HRMC (Таблица 7).

Таблица 7: Ингибирование депонирования ЕСМ с помощью 4856 Fab-трансплантатов gL3gH13, gL3gH20, gL3gH23 и gL3gH29 в индуцированной адриамицином модели фиброза почек (среднее геометрическое значение из 3 повторных экспериментов).

5	4856 Fab трансплантат	Фибронектин		Коллаген I&III		Коллаген IV	
		Среднее геометрическое значение IC50 (нМ)	диапазон n=3	Среднее геометрическое значение IC50 (нМ)	диапазон n=3	Среднее геометрическое значение IC50 (нМ)	диапазон n=3
	gL3gH29	105,96	49,3-190,1	90,10	40,2-178,1	22,93	6,0-50,7
	gL3gH23	227,29	40,6-1387,7	198,35	110,4-540,2	44,86	24,8-99,8
10	gL3gH13	57,30	32,9-118,6	57,94	31,0-87,7	10,39	9,2-11,8
	gL3gH20	104,84	52,1-329,4	33,86	16,8-60,2	16,65	8,3-51,0

Следует отметить, что верхняя и нижняя асимптоты некоторых кривых фиксировались с минимальными или максимальными значениями.

Пример 7. Ингибирующая активность гуманизированного трансплантата 4856 в *in vitro* модели интерстициального фиброза легкого человека

Эпителиальное повреждение и активация фибробластов являются важными событиями, приводящими к депонированию ЕСМ во время фиброзного процесса. Чтобы создать *in vitro* модель интерстициального фиброза легкого, был разработан анализ с использованием первичных человеческих эпителиальных клеток легкого (SAEpC, ATCC) и фибробластов легкого (ATCC), выделенных от пациента IPF. Совместная культура этих двух типов клеток в среде эпителиальных клеток индуцирует значительное депонирование ЕСМ даже в отсутствие дополнительного стимула, что позволяет изучать антифиброзные агенты.

$1,8 \times 10^4$ первичных человеческих эпителиальных клеток малых дыхательных путей (SAEpC) и равное количество фибробластов легких IPF высевали на см^2 (всего $3,6 \times 10^4$ клеток/ см^2) и совместно культивировали в течение 7 дней при 37°C , 5% CO_2 . 4856 Fab-трансплантат gL3gH13 и контрольный Fab подвергали 3-кратному титрованию в диапазоне от 0,03 до 1000 нМ. Через 7 дней совместного культивирования жизнеспособность клеток оценивали с помощью Presto Blue, затем клетки лизировали в 0,25 М NH_4OH /25 мМ Tris (30 мин при 37°C) и депонированный ЕСМ фиксировали в ледяном метаноле (30 мин при -20°C). Депонирование отдельных компонентов ЕСМ детектировали путем визуализации с высоким содержанием после иммуноокрашивания для фибронектина и коллагена типа I, III, IV и V. Были получены изображения и интенсивность флуоресценции, детектированные с помощью Cellomics Arrayscan. Максимальный сигнал генерировался в необработанной совместной культуре, а минимальный сигнал генерировался при использовании избытка Fab.

Процент ингибирования после анализов концентрационных кривых рассчитывали на основе максимального и минимального сигналов в анализе, и данные приводили в соответствие с использованием 4-параметрической логистической модели. IC50 рассчитывали на основе точки перегиба кривой. Изображения и показанные графики представляют собой три повторных эксперимента.

На Фигуре 8 показаны изображения депонирования ЕСМ с помощью SAEpC и совместных культур IPF фибробластов в присутствии указанных концентраций 4856 Fab-трансплантата gL3gH13 и контрольного Fab.

На Фигуре 9 показаны концентрационные кривые 4856 Fab-трансплантата gL3gH13 и контрольного Fab в анализе совместной культуры клеток легких человека.

В Таблице 7 показаны результаты эффективности для ингибирования депонирования

ЕСМ с помощью 4856 Fab-трансплантата gL3gH13 в анализе совместного культивирования клеток легких (среднее геометрическое из 3 повторных экспериментов)

ЕСМ белок	Среднее геометрическое значение IC50 (нМ) (диапазон) n=3
	4856 gL3gH13
Фибронектин	2,42 (1,6-3,9)
Коллаген I & III	2,66 (2,3-3,2)
Коллаген IV	2,91 (2,1-5,5)
Коллаген V	2,70 (1,8-4,5)

Депонирование ЕСМ в совместных культурах SAEPc и фибробластов IPF ингибировалось с помощью 4856 Fab-трансплантата gL3gH13.

Пример 8. Ингибирующая активность гуманизированного трансплантата 4856 в *in vitro* модели фиброза почки человека

Способность 4856 Fab gL3gH13 ингибировать депонирование фибронектина и коллагена в первичных клетках почки человека оценивали с использованием тестов накопления внеклеточного матрикса (ЕСМ) на монокультуре человеческих почечных проксимальных трубчатых эпителиальных клетках (RPTEC), стимулированных TGF-beta 1, 2 или 3, и на совместной культуре почечных проксимальных трубчатых эпителиальных клеток (RPTEC) с человеческими почечными фибробластами (HRF) (без стимуляции).

Человеческие почечные проксимальные трубчатые эпителиальные клетки (RPTEC, Innoprot) и человеческие почечные фибробласты (HRF, InnoProt) высевали в количестве 2000 клеток на лунку (соотношение 1:1 в совместной культуре) на 384-луночный черный планшет с прозрачным дном (Corning) в присутствии 0,1-100 мкг/мл (0,2-2000 нМ) антитела против TGF-beta (gL3gH13 Fab) или контрольного Fab и 10 нг/мл TGF-beta1 (Peprotech), TGF-beta2 (R & D) или TGF-beta3 (R & D) для монокультуры RPTEC или без экзогенного TGF-beta (без стимуляции) для совместной культуры RPTEC и HRF в конечном объеме 50 мкл в Базальной среде для почечных эпителиальных клеток+0,5% Fcs и добавки (ATCC).

Через 7 дней инкубации при 37°C 5% CO₂ клетки промывали в PBS и лизировали 20 мкл 0,25 М NH₄OH/25 mM Tris в течение 15 мин при 37°C. Матрицу промывали 3 раза в PBS, фиксировали в 40 мкл 100% метанола в течение 30 мин при -20°C и промывали 3 раза в PBS перед окрашиванием с использованием антител против фибронектина (eBiosciences), коллагена I (Millipore), коллагена III (Millipore), коллагена IV (eBiosciences) и антитела против коллагена V (Abcam). Планшеты сканировали на ридере Cellomics Arrayscan HC, используя 3-канальный протокол в рамках биоприложения профилирования «Cellomics CellHealth» и 10-кратный объектив (новая камера X1) с 2x2-битнированием (1104x1104 пикселей/поле).

Хотя были получены данные считывания для коллагена IV, результаты были исключены из-за неприемлемых окон анализа и изменчивости.

Результаты представлены в Таблице 9 и на Фигурах 10a, b, c и d и на Фигурах 11a и b, которые демонстрируют, что gL3gH13 Fab способен ингибировать индуцированное TGF-beta1, 2 и 3 накопление фибронектина и коллагена I, III и V в системе монокультуры RPTEC и в системе совместной культуры RPTEC и HRF с эндогенно продуцируемым TGF-beta.

Таблица 9: IC50 и среднее геометрическое IC50 (нМ) (N=3) для gL3gH13:

Маркер	Антитело	Монокультура+TGFB1	Монокультура+TGFB2	Монокультура+TGFB3	Совместная культура
--------	----------	--------------------	--------------------	--------------------	---------------------

		N=1	N=2	N=3	Ср. геом	N=1	N=2	N=3	Ср. геом	N=1	N=2	N=3	Ср. геом	N=1	N=2	Ср. геом
Фибро-нектин	gL3gH13	12,6	57,4	9,8	19,2	0,16	0,76	0,22	0,30	51,5	140,0	76,8	82,1	32,6	27,1	29,7
Коллаген I & III	gL3gH13	5,1	13,8	19,8	11,2	<2	0,60	0,13	0,30	64,3	123,8	67,2	81,2	22,4	48,0	32,8
Коллаген V	gL3gH13	13,1	92,1	69,4	43,7	0,52	10,5	5,29	3,1	140,8	336,3	146,6	190,8	38,9	81,6	56,3

Пример 9. *in vivo* модель фиброза легкого мыши

i) 7-дневное стимулирование

Острая вызванная блеомицином модель повреждения легких включает местное введение гликопептидного блеомицина непосредственно в легкие мышей. Это индуцирует воспалительный ответ, связанный с увеличением ингибитора активации плазминогена-1 (PAI-1), и, в конечном итоге, приводит к легочному фиброзу. PAI-1 транскрипционно регулируется TGF-beta и может выступать в роли мощного фиброгенного медиатора, индуцирующего рекрутирование воспалительных клеток и депонирование внеклеточного матрикса (ECM) (Ghosh and Vaughan, 2012, J Cell Physiol, 227: 493-507),

Любой эффект на тестируемые антител Fab против TGF-beta для ограничения фиброгенеза, такой как ингибирование PAI-1, свидетельствует о том, что пан-специфическое TGF-beta блокирующее Fab, доставляемое непосредственно в легкие, является жизнеспособным терапевтическим средством против легочного фиброза у людей.

4856 Fab-трансплантаты (гуманизированные) вводили местно непосредственно в легкие мышей через интраназальный путь (i.n). Мышам C57/BL6 вводили 4856gL3gH13 или 4856gL3gH29 (по 200 мкг/мышь) за 1 час до стимулирования блеомицином (о.р 0,05Ед/мышь) и через 6 часов после. Мыши впоследствии получали 4856gL3gH13 или 4856gL3gH29 ((i.n) 200 мкг/мышь) каждые 12 часов, пока не прекратили прием на 7-й день. Сразу же после прекращения приема собирали бронхоальвеолярную лаважную жидкость (BAL) и определяли общие концентрации PAI-1 с помощью ИФА.

Статистический анализ проводили с помощью одностороннего ANOVA против контрольной группы, обработанной блеомицином.

Результаты этого введения двух 4856Fab (4856gL3gH13 и 4856gL3gH29) показаны на Фигуре 12. На Фигуре 12 показано, что у мышей, стимулированных блеомицином, значительно повышался уровень PAI-1 в BAL по сравнению с контрольными мышами, стимулированными солевым раствором, и что гуманизированные Fab, 4856gL3gH13 и 4856gL3gH29 способны ингибировать индуцированный блеомицином PAI-1 на 49% и 64%, соответственно, при доставке непосредственно в легкие.

Во втором исследовании мышам C57/BL6 вводили гуманизированные 4856gL3gH13 (по 20, 60, 200 мкг/мышь) за 1 час до стимулирования блеомицином (о.р 0,05Ед/мышь) и через 6 часов. Мыши впоследствии получали 4856gL3gH13 каждые 12 часов, пока прием не прекращали на 7-й день. Сразу же после прекращения приема BAL собирали, и общие концентрации PAI-1 определяли с помощью ИФА. Статистический анализ проводили односторонним ANOVA против контрольной группы, обработанной блеомицином. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0005$, **** $p \leq 0,00005$.

Чтобы продемонстрировать превосходную эффективность 4856gL3gH13 в этой системе, на Фигуре 13 показано влияние 4856gL3gH13 на блеомицин-индуцированный PAI-1 в разных дозах. Как было показано ранее, блеомицин вызывает увеличение уровня BAL PAI-1, который может быть значительно ингибирован до 76% с использованием 200 мкг/мышь 4856gL3gH13 и до 45% с использованием 60 мкг/мышь 4856gL3gH13.

Это демонстрирует, что доставленный местно (i.n) 4856gL3gH13 значительно ингибирует острый блеомицин-индуцированный PAI-1? и что можно местно ингибировать TGF-beta в легком, потенциально избегая нежелательных системных событий.

5 ii) 28-дневное стимулирование

Более длительные эффекты стимулирования блеомицином вызывали легочный фиброз, поэтому аналогичное исследование проводили на мышах в течение 28 дней с муринизированным 4856gL3gH13 (далее 4856), которое дозировали профилактически с 1-го дня, а также с 13-го дня стимулирования блеомицином. Это более позднее введение 10 4856 позволяет фиброзу как можно сильнее развиваться в легком до начала обработки.

Влияние 4856 на блеомицин-индуцированный легочный фиброз оценивали путем ослабления депонирования ECM и дифференцировки миофибробластов в легких. Депонирование ECM определяли гистологически в ткани, погруженной в парафин, путем окрашивания на коллаген с использованием Picro Sirius Red (PSR). Это 15 подтверждается более количественным анализом уровня гидроксипролина в расщепленной легочной ткани. Гидроксипролин является основным компонентом коллагена и может использоваться для оценки количества коллагена в тканях. Кроме того, количество миофибробластов; это преобладающий тип клеток, которые, как считается, ответственны за депонирование коллагена в легком, определяли с 20 использованием иммуногистохимического (ИНС) окрашивания для α -Гладкомышечного актина (α -SMA). Более того, ингибирование фосфорилированного гомолога белка «Mothers against decapentaplegic» 2 и 3 (p-Smad2/3) также определяли с помощью ИНС, чтобы продемонстрировать специфическое ингибирование с помощью 4856 сигнального пути TGF. Все статистические данные определяли с использованием непарного t-теста 25 против назначенной контрольной группы, стимулированной блеомицином. *P=0,05; **p=0,01; ***p=0,001; ****p=0,0001.

а) 4856 улучшает вызванное блеомицином депонирование коллагена в легких

Обработка 4856 с 1 по 28 день. Мышей (самцы c57BL/6, n=8/группа) обрабатывали физиологическим раствором (i.t, 50 мкл) или блеомицином (i.t, 50 мкл, 0,5 мг/мл) в 30 течение 28 дней. Кроме того, мышей обрабатывали либо носителем (i.n, 25 мкл), либо 4856 (i.n, 25 мкл, 400 мкг/мышь) два раза с 1 по 28 день.

Обработка 4856 с 13 по 28 день. Мышей (самцы c57BL/6, n=8/группа) обрабатывали физиологическим раствором (i.t, 50 мкл) или блеомицином (i.t, 50 мкл, 0,5 мг/мл) в течение 12 или 28 дней. Кроме того, мышей обрабатывали либо носителем (в, 25 мкл), 35 либо 4856 (в, 25 мкл, 400 мкг/мышь) два раза в день с 13 по 28 день.

Анализ. Всю левую долю фиксировали в 4% формалине в течение 6 ч и погружали в парафин. 5 мкм срезы разрезали и окрашивали PSR. Изображения визуализировали с использованием микроскопа Nikon Eclipse 80i (Nikon, Badhoevedorp, Netherlands), а фиброзную область, как минимум, из четырех полей на мышь, анализировали с 40 использованием ImageJ (V. 1.42q, National Institutes of Health, USA). Количество белка коллагена в трех нижних долях правого легкого (азигулярная доля, сердечная доля и диафрагмальная доля) определяли с помощью анализа гидроксипролина. После гидролиза в 6 М HCl в течение трех часов при 120°C. pH образцов доводили до 6 с помощью 6 М NaOH. Затем к каждому образцу добавляли 0,06 М хлорамина Т и 45 инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем добавляли 3,15 М хлорной кислоты и 20% п-диметиламинобензальдегида, и образцы инкубировали в течение дополнительных 20 мин при 60°C. Поглощение определяли при 557 нм с помощью спектрофотометра для микропланшетов Spectra MAX 190.

Результаты. Интратрахеальная (i.t) инстилляционная блеомицина с использованием микрораспылителя (50 мкл, 0,5 мг/мл) индуцировала выраженный легочный фиброз по сравнению с контрольными мышами, которых обрабатывали инстилляцией физиологического раствора (0,9% NaCl, растворитель блеомицина). Это продемонстрировано усилением окрашивания PSR и повышенным содержанием гидроксипролина в легких (Фигуры 14 и 15). Кроме того, эти фиброзные изменения были более выраженными через 28 дней, чем через 12 дней (Фигура 15), что указывает на то, что тяжесть фиброза прогрессировала с течением времени.

Обработка с использованием 4856 с 1 по 28 день (25 μ L i.n; 400 мкг/мышь, два раза в день) приводила к значительному снижению как PSR (Фигура 14A), так и содержания гидроксипролина в легких (Фигура 14B). Это предполагает, что 4856 может предотвратить блеомицин-индуцированный легочный фиброз. Кроме того, введение 4856 мышам, стимулированным блеомицином с 13 по 28 день, значительно ограничивало прогрессирующее увеличение PSR (Фигура 15A) и гидроксипролина (Фигура 15B), наблюдаемое на 28-й день, по сравнению с мышами, обработанными носителем. Это предполагает, что 4856 способен ограничивать прогрессирование заболевания, при его введении того, как фиброз уже проявляется.

б) 4856 улучшает дифференцировку блеомицин-индуцированных миофибробластов в легких

Мышей (самцы c57BL/6; n=8/группа) обрабатывали физиологическим раствором (i.t 50 мкл) или блеомицином (i.t, 50 мкл, 0,5 мг/мл) в течение 12 или 28 дней. Кроме того, мышам обрабатывали либо носителем (i.n 25 мкл) или 4856 (i.n 25 мкл; 400 мкг/мышь) два раза в день с дня 1 по 28 или с дня 13 по 28 день. Миофибробласты характеризуются экспрессией α -гладкомышечного актина (α -SMA). Фибробласты, положительные для α -SMA, были обнаружены путем инкубации с моноклональными антителами против α SMA (клон 1A4, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Экспрессию визуализировали вторичными антителами, мечеными пероксидазой хрена, и 3,3'-диаминобензидин тетрагидрохлоридом (DAB) (Sigma-Aldrich). Моноклональные мышечные IgG-антитела (Calbiochem, San Diego, CA, USA) использовали для изотипических контролей. Для каждой мыши оценивали четыре разных поля.

Введение блеомицина также приводило к увеличению дифференцировки миофибробластов в легких, характеризующейся экспрессией α -SMA ИНС (Фигура 16). На Фигуре 16A показано, что дифференцировка миофибробластов, индуцированная блеомицином в легком, ингибировалась при введении 4856 с 1 по 28 день. Кроме того, хотя не наблюдалось значительного увеличения экспрессии α -SMA между 12 и 28 днями обработки блеомицином, введение 4856 с 13 по 28 день также вызывало значительное ослабление дифференцировки миофибробластов. Кроме того, она снижалась до нижнего уровня экспрессии α -SMA, наблюдаемой после обработки блеомицином в течение 12 дней, предполагая возможное изменение фиброзных процессов в этот момент времени (Фигура 16B).

с) 4856 ингибирует индуцированную блеомицином сигнализацию TGF- β в легких.

Мышей (самцы c57BL/6; n=8/группа) обрабатывали физиологическим раствором (i.t 50 мкл) или блеомицином (i.t, 50 мкл, 0,5 мг/мл) в течение 12 или 28 дней. Кроме того, мышам обрабатывали либо носителем (i.n 25 мкл) или 4856 (i.n 25 мкл; 400 мкг/мышь) два раза в день с 1 по 28 день или с 13 по 28 день. Срезы легких окрашивали козьими антителами против pSmad2/3 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) и антителами против коллагена I типа (Abcam, Cambridge, UK). В качестве вторичных антител использовались HRP-конъюгированные антитела или Alexa Fluor (Life Technologies,

Дармштадт, Германия). Посторонние антитела соответствующего изотипа служили в качестве контроля. Ядра окрашивали с использованием DAPI (Santa Cruz Biotechnology). Окрашивание визуализировалось с помощью микроскопа Nikon Eclipse 80i (Nikon, Badhoevedorp, Netherlands). Экспрессию pSmad2/3 в клетках, положительных по коллагену 1-го типа, оценивали в трех разных полях на мышь.

Блеомицин-индуцированный фиброз легких ассоциировался с увеличением экспрессии pSmad2/3 в клетках, положительных по коллагену 1-го типа, как на 12-й день, так и в большей степени на 28-й день по сравнению с контрольной группой, обработанной физиологическим раствором (Фигура 17В). Обработка с помощью 4856 с 1 по 28 день (Фигура 17А) и с 13 по 28 день (Фигура 17В) значительно ингибировала экспрессию pSmad2/3 ниже, чем у контрольных мышей, получавших физиологический раствор, предполагая, что TGF β -зависимое Smad2/3 фосфорилирование полностью блокировалось с помощью 4856. Кроме того, 4856, которое вводили с 13 по 13 день, может отменить индуцированное блеомицином увеличение экспрессии pSmad2/3, наблюдаемое после 12 дней стимуляции блеомицином вместе с носителем, что коррелирует с эффектом, наблюдаемым при дифференцировке миофибробластов.

d) Вывод

4856 оказывало мощные антифиброзные эффекты в мышинной модели индуцированного блеомицином фиброза легкого и улучшал гистологические изменения в депонировании коллагена (PSR окрашивание), накопления коллагена (анализ гидроксипролина), влияло на дифференцировку миофибробластов (α -SMA экспрессия), а также на активацию канонической сигнализации TGF- β (экспрессия pSmad2/3). Кроме того, 4856 доказал свою эффективность при введении либо профилактически с 1 по 28 день, либо в качестве воздействия с 13 по 28 день после того, как фиброзные изменения уже были очевидны. Это подтверждает гипотезу о возможности местного ингибирования TGF β в легких, потенциально избегая нежелательных системных событий.

Пример 10. Биофизический анализ гуманизированных трансплантатов 4856 Fab

Гуманизированные трансплантаты антитела 4856: gL3gH13, gL3gH20, gL3gH23, gL3gH29 подвергали серии биохимических и биофизических анализов для скрининга и отбора наиболее надежной молекулы для разработки и стабильности введения. Анализы включали сравнение таких характеристик, как Тпл (температура плавления в середине процесса разворачивания белка); экспериментальная рI и стабильность агрегации в интерфейсе воздух-жидкость (имитация напряжения сдвига при изготовлении и стабильность распыления); и склонность к дезамидированию.

Измерение термостабильности (Тпл)

Проводили анализ теплового сдвига на основе флуоресценции (также называемый анализом «thermofluor») с получением Тпл (температура в середине процесса разворачивания белка) для оценки термостабильности очищенных молекул. Реакционная смесь содержала 5 мкл 30-кратного SYPRO® Orange (Invitrogen), разбавленного PBS из исходного раствора 5000X и 45 мкл образца при 0,12 мг/мл (в PBS pH 7,4). 10 мкл смеси распределяли по четыре повтора в 384-луночный прозрачный ПЦР-планшет, и реакцию осуществляли на системе 7900HT Fast Real-Time (Applied Biosystems) для ПЦР в реальном времени. Устройство нагрева системы ПЦР было установлено на уровне от 20 до 99°C при скорости нарастания 1,1°C мин⁻¹. Устройство с зарядовой связью контролировало изменения флуоресценции в лунках. Увеличение интенсивности наносили на график, точку перегиба наклона (слоев) использовали для генерации Тпл.

Тпл (температура в середине процесса разворачивания белка) определяли с помощью анализа «thermofluor». В этом методе SYPRO оранжевый (флуоресцентный краситель)

используется для контроля процесса разворачивания путем связывания с гидрофобными областями, которые становятся экспонированными во время теплового расширения. Более высокое значение $T_{пл}$ приравнивается к большей молекулярной стабильности и устойчивости к развитию напряжения распыления.

5 Один домен разворачивания, как и ожидалось, наблюдали для всех молекул, что эквивалентно домену разворачивания Fab. Результаты суммированы в Таблице 10.

Можно было ранжировать молекулы на основе их температуры плавления: gL3gH13, как было показано, имеет самую высокую температуру плавления, замена N109G на D109G в HC CDR3 (gL3gH29) привела к снижению температуры плавления на 2°C, и
10 оба, gL3gH23 и gL3gH20 продемонстрировали дальнейшее снижение температуры плавления на 2°C. gL3gH13 имел самую высокую температуру плавления 79°C, что делает его отличным кандидатом для использования при местной доставке в легкие с помощью распыления, где Fab должен сохранять достаточную биологическую активность после распыления.

15 Таблица 10: Анализ $T_{пл}$: «Thermofluor» анализ: gL3gH13 > gL3gH29 > gL3gH20 = gL3gH23

Антитело 4856 Fab трансплантат	$T_{пл}$, °C
gL3gH13	79
gL3gH20	75,3
gL3gH23	75,7
20 gL3gH29	77

Экспериментальная pI и анализ вариантов заряда

Очищенные образцы анализировали с использованием системы cIEF ICE3 с цельной капиллярной системой визуализации (ProteinSimple). Образцы готовили путем
25 смешивания следующего: 30 мкл образца (из 1 мг/мл материала в воде класса ВЭЖХ), 35 мкл 1% раствора метилцеллюлозы (Protein Simple), 4 мкл pH3-10 амфолитов (Pharmalyte), 0,5 мкл 4,65 и 0,5 мкл 9,77 синтетических pI-маркеров (ProteinSimple), 12,5 мкл 8М раствора мочевины (Sigma-Aldrich). Для получения конечного объема до 100 мкл использовали воду класса ВЭЖХ. Смесь быстро встряхивали, чтобы обеспечить
30 полное перемешивание и центрифугирование при 10000 об/мин в течение 3 минут для удаления пузырьков воздуха перед анализом. Образцы фокусировали в течение 1 мин при 1,5 кВ, затем 5 мин при 3 кВ, а изображения капилляра A280 были получены с использованием программного обеспечения ProteinSimple. Полученные
35 электрофорограммы сначала анализировали с использованием программного обеспечения iCE3 и оценивали значения pI (линейная зависимость между pI-маркерами). Затем калибровочные электрофорограммы интегрировали с использованием программного обеспечения Empower (Waters).

pI всех ведущих кандидатов была высокой (см. Таблицу 11), так что маловероятно, что молекулы будут иметь приблизительно нулевой общий молекулярный заряд (при
40 увеличении риска агрегации) при ожидаемом pH состава. Было установлено, что экспериментальная pI была одинаковой для всех молекул, и поэтому нельзя было их различить.

Таблица 11: Экспериментальная pI

	Экспериментальная pI
45 gL3gH13	9,34
gL3gH20	9,25
gL3gH23	9,34
gL3gH29	9,1

Склонность к агрегации на границе воздух-жидкость

Очищенные образцы (3×250 мкл аликвоты) в PBS, pH 7,4 при 1 мг/мл встряхивали при 1400 об/мин при 25°C в 1,5 мл пробирках eppendorf с использованием Eppendorf Mixmate. Образцы анализировали на образование мутности в различные моменты времени после встряхивания, получая поглощение при 595 нм с использованием спектрофотометра (Varian). Данные наносили на график в зависимости от времени.

Все ведущие кандидаты подвергали стрессу путем встряхивания для получения информации об агрегационной стабильности на границе воздух-жидкость. Это служило для имитации усилий сдвига во время производства, а также потенциальной стабильности при распылении. Агрегационную стабильность контролировали измерением мутности при 595 нм до 144 часов. Скорость агрегации была медленной (низкие значения поглощения), и между трансплантатами не наблюдалось различий.

Анализ состояния дезамидирования Asn (N) 109 (CDR3 тяжелой цепи)

В CDR3 тяжелой цепи для gL3gH13, gL3gH20 (как N109G) и для gL3gH23 (N109A) присутствует мотив дезамидирования. Химическая нестабильность на этом сайте может привести к гетерогенности продукта и иммуногенности. Трансплантат gL3gH29 имеет D109G в этом сайте (дезамидированный продукт) для тестирования пригодности в качестве кандидата при одновременной минимизации риска дезамидирования.

Базовое процентное дезамидирование на N109 в CDR3 тяжелой цепи для gL3gH13, gL3gH20 и gL3gH23 сразу после очистки определяли путем (i) трипсинового расщепления/пептидного картирования/масс-спектрометрии и (ii) капиллярного визуализированного изoeлектрического фокусирования (ICE3). Скорость/склонность сайта N109 к созданию дезамидата (потеря аммиака, образование кислотных компонентов) определяли, подвергая три молекулы воздействию ускоренных стрессовых условий, которые, как известно, способствуют дезамидированию (pH 8, 37°C).

(i) Масс-спектрометрия

Аликвоты (50 мкг) восстанавливали с помощью DTT, алкилировали иодацетамидом, затем расщепляли трипсином (1:20 об/об) в течение ночи при комнатной температуре. Гидролиз (~ 2 мкг) анализировали путем инъекции на колонку C18 (1×150 мм BEH-300), уравновешенную 0,2% муравьиной кислотой/водой. Полученные пептиды элюировали со скоростью 20 мкл/мин в градиенте ацетонитрила в масс-спектрометр Thermo Fusion, работающий в режиме +ve-ion. Комплектование в зависимости от данных (DDA) состояло из полного сканирования orbitrap (разрешение 120000) с последующей фрагментацией HCD и измерением с использованием ионной ловушки наиболее интенсивных предшественников. Данные MS анализировали с использованием Thermo Pepfinder для соответствия полученным спектрам с ожидаемой последовательностью антитела.

Процент базального уровня дезамидирования (потери аммиака) в сайте N109G (CDR3 тяжелой цепи) в gL3gH13 и gL3gH20 был сходным (~4%), тогда как при N109A для gL3gH23 не было отмечено дезамидирования.

После ускоренного стресса (pH 8 в течение 2 недель при 4°C и 37°C) не было изменений уровня дезамидирования для любого трансплантата Fab (Таблица 12).

В целом, замена N109G на N109A приводила к тому, что gL3gH23 имел потенциально более низкий риск дезамидирования. Однако, поскольку базальный уровень был низким для всех, и не было повышенной склонности после ускоренного стресса, все молекулы имели уровень дезамидирования, который был бы подходящим для терапевтического кандидата.

Таблица 12: Процент дезаминирования до и после ускоренного стресса (pH 8).

	gL3gH13	gL3gH20	gL3gH23	gL3gH29
--	---------	---------	---------	---------

Сайт (CDR3 тяжелой цепи)	N109G	N109G	N109A	D109G
T0 (базальный уровень)	4,7%	4,1%	не детектировали	не детектировали
2 недели/ 4°C	4,4%	4%	не детектировали	не детектировали
2 недели/37°C	3,4%	2,4%	не детектировали	не детектировали

(ii) Визуализированное капиллярное изoeлектрическое фокусирование (ICE3)

ICE3 осуществляли, как описано выше для измерения pI, и результаты не выявили существенных различий между трансплантатами gL3gH13, gL3gH20, gL3gH23 и gL3gH29 в % заряженных компонентов до и после ускоренного стресса (pH 8).

Пример 11. Исследование распыления гуманизированного 4856 Fab-трансплантата gL3gH13

Агрегационную стабильность к сдвиговым усилиям, возникающим при распылении трансплантата Fab 4856 gL3gH13 (далее 4886), определяли с использованием исследуемого небулайзера PARI eFlow® (PARI Pharma GmbH, Grafeling, Германия). *E.coli* экспрессировали Fab 4856 при ~100 мг/мл в буфере с pH 6, разбавленном до номинальных концентраций 20 мг/мл, 50 мг/мл и 80 мг/мл, и в буфере с pH 7,4, разбавленном до номинальных концентраций 20 мг/мл и 50 мг/мл.

Предварительно отфильтрованные/стерильные образцы 4856 (~1 мл) при различных концентрациях и буферах распыляли с помощью небулайзера eFlow®.

(i) Влияние распыления на концентрацию

Разведенные образцы (<1 AU при 280 нм) измеряли с использованием спектрофотометра Varian Cary 50-Bio UV/Vis. Концентрацию рассчитывали с использованием коэффициента поглощения 1,72 AU (280 нм, 1 мг/мл и длины пути 1 см).

Никакой разницы в концентрации (мг/мл) не наблюдали между образцами до и после распыления.

(ii) Эксклюзионная ВЭЖХ (SEC HPLC)

Этот анализ контролировал образование растворимых агрегатов и фрагментированного материала.

Образцы разбавляли до 1 мг/мл (объем инъекции 25 мкл) или 5 мг/мл (объем инъекции 20 мкл). Анализ осуществляли с использованием колонки TSK G3000SW (7,7 мм I.Dx30 см), соединенный с системой Agilent 1100, элюировали изократически с использованием 0,2 М фосфата натрия, pH 7 при 1,0 мл/мин в течение 17 минут, 30°C. Пики контролировали при 280 нм.

Не было обнаружено различий в процентах образцов с высокой молекулярной массой (HMW), присутствующих в материале до и после распыления. Следовательно, распыление не приводило к образованию растворимого агрегата. Не было никаких доказательств присутствия материала с низкой молекулярной массой, следовательно, не было обнаружено фрагментации вследствие распыления.

(iii) Динамическое рассеяние света (DLS)

Этот анализ контролировал генерацию высокомолекулярных соединений (нерастворимый материал в виде частиц, который был бы отфильтрован колонкой SEC HPLC). Fab 4856 в буфере, содержащем гистидин и хлорид натрия, при pH 6 тестировали с помощью динамического рассеяния света с использованием прибора Malvern Nano ZS.

Не было обнаружено различий в интенсивности основного пика (%) от профиля распределения размера интенсивности (SDP) для 4856 до 50 мг/мл в образцах до и после распыления. Что касается процента полидисперсности (% PD), распределение интенсивности сильно сдвинуто к материалу с более крупной молекулярной массой

(рассеяние пропорционально квадрату молекулярной массы), и когда оно преобразуется в объемное распределение, описывающее относительную долю нескольких присутствующих видов, то наблюдаются минимальные незначительные изменения до 50 мг/мл.

5 (iv) SDS PAGE (невосстанавливающие и восстанавливающие условия)

Этот анализ контролировал генерацию агрегации/фрагментации в буфере, включающем гистидин и NaCl, при pH 6.

Для восстанавливающих условий 10 мкл образца при 1 мг/мл смешивали с 10 мкл буфера для образцов Tris/Глицин SDS (2x, Invitrogen) и 2 мкл 100 мМ N-этилmaleимида; 10 нагревали при 100°C в течение 2 минут.

Для восстанавливающих условий 10 мкл образца при 1 мг/мл смешивали с 10 мкл буфера для образцов Tris/Глицин SDS (2x, Invitrogen) и 2 мкл DTT (10x Invitrogen); нагревали при 100°C в течение 3 минут.

После центрифугирования 10 мкл (4,5 мкг) каждого образца загружали в гель Novex 15 Tris/Glycine (4-20%) (Invitrogen) и подвергали электрофорезу при 125 мВ (постоянное напряжение) в течение 100 минут. Полосы визуализировали Кумасси синим.

Не наблюдалось различий между образцами до и после распыления до 20 мг/мл.

(vi) Функциональный *in vitro* анализ.

Этот анализ осуществляли в гистидине, pH 6, NaCl, при 20, 50 и 80 мг/мл.

20 Анализ репортерного гена в клетках HER-Blue TGF-beta с использованием рекомбинантного TGF-beta 1 проводили, как описано в Примере 3.

Никаких существенных различий в IC50 не наблюдалось между образцами до и после распыления при любой концентрации.

(v) Аэрозольная характеристика распыляемого антитела при моделировании дыхания

25 Этот анализ контролировал размер капель, а также дозу и время распыления Fab 4856 при концентрации 50 мг/мл (pH 6) с использованием небулайзера PARI eFlow®. Вкратце, небулайзер подключали к синусному насосу, а аэрозольные капли, содержащие распыляемый материал, собирали на дыхательном фильтре. Использовали профиль дыхания взрослого с объемом дыхания 500 мл при 15 вдохах в минуту и отношением 30 ингаляция:выдох 50:50. После завершения, фильтр для сбора промывали для экстракции распыленного материала, который анализировали с помощью ВЭЖХ (Таблица 13).

Таблица 13. Данные экспериментов по симуляции дыхания с использованием двух разных головок небулайзера.

35	Масс-медианный диаметр (MMD)		2,9 мкм		3,7 мкм	
			Среднее значение	SD (n=6)	Среднее значение	SD (n=6)
	Время распыления	мин	14,1* После обратного потока: 5,75	5	3,62	0,34
	DD	мг	71,5	5,5	66,4	3,5
	DD	%	68	5,1	63,5	3,4
40	Остаток	мг	14,7	3,2	22,9	2,1
	Остаток	%	14	3,1	21,9	2
	RD<5мкм	мг	66,6	5	52,1	4,3
	RD<5мкм	%	63,4	4,6	49,8	4,2
	RD<3,3мкм	мг	45,2	4,9	25,7	3,1
45	RD<3,3мкм	%	43,1	4,7	24,6	2,9
	DDR	мг/мин	2,2	1,2	20,8	3,3
	DDR	%/мин	2,1	1,1	19,9	3,2

Доставленную дозу (DD) определяли с помощью экспериментов по симуляции дыхания. DD [%] составила 68% (2,9 мкм MMD) и 64% (3,7 мкм MMD), что считается

типичным хорошим результатом, так как значения DD редко превышают 70%. Остаток составил 14% (2,9 мкм MMD) и 21,9% (3,7 мкм MMD), что также находится в типичном диапазоне. Вдыхаемые дозы <5 мкм (RD <5 мкм) составили 63% (2,9 мкм MMD) против 50% (3,7 мкм MMD). Размер частиц влияет на доставку в разные области дыхательного

пути, а RD <5 мкм соответствует альвеолярной доставке.

Эти данные подтверждают пригодность 4856 Fab для доставки путем распыления.

Пример 12 - Структура, определенная с помощью рентгеновской кристаллографии

Антитело 4856 кристаллизовали с TGF-beta1 для определения аминокислотных остатков, с которыми оно контактирует.

i) Подготовка образца

2 мл зрелого TGF-beta 1 при 2,25 мг/мл в 5 mM HCl доводили до pH 7 путем добавления 30 мкл 2 M Tris pH8. После инкубации при комнатной температуре в течение 1 часа осадок удаляли центрифугированием, оставляя 2 мл при 2,1 мг/мл. К этому добавляли 0,46 мл Fab4856gL3gH13 при 32 мг/мл (14,7 мг) с приблизительным молярным соотношением 1:1,1 TGF-beta1:Fab. Оставляли при комнатной температуре в течение 1 часа, затем загружали на колонку S200 16/160, предварительно уравновешенную 50 mM NaCl, 25 mM Tris, 5% глицерином, pH 7,5. Пиковые фракции комплекса объединяли и концентрировали до 10 мг/мл для кристаллографии.

ii) Кристаллизация

Тип эксперимента кристаллизации	Сидячая капля, диффузия пара		
Условие кристаллизации	0,1M Фосфат цитрат натрия pH4,2, 40% PEG300		
Концентрация белка	10мг/мл	Объем капли/отношение	0,4мкл белка+0,4мкл резервуар
Время роста кристалла	8-21 день		
Криопротекция	Кристаллы собирали из капли и быстро замораживали в жидком азоте (-180°C) в течение 10 секунд		

Скрининг проводили с использованием различных условий, которые были доступны от Qiagen (приблизительно 2000 условий). Инкубацию и визуализацию проводили с помощью Formulatrix RockImager 1000 (для полного инкубационного периода 21 день).

iii) Сбор данных и уточнение структуры

Источник рентгеновского излучения	Синхротрон Diamond		
Тип Эксперимента	осцилляция	Длина волны	0,92819Å
Обрабатывающие программы	Mosflm		
Предел разрешения	40-2,48	Пространственная группа	P6 ₅ 22
одиночная ячейка	a = 114,0 Å	B = 114,0 Å	c = 289,5 Å
параметры	α = 90	B = 90	γ = 120 °
комплектность	99,9 (100,0)	Мультиплетность	18,3 (19,0)
I/σ(I)	20,1 (3,7)	R _{merge}	11,2% (83,2%)
Количество отражений	741045 (109123)	Количество уникальных отражений	40392 (5758)
Комментарии			

Метод определения структуры	Молекулярная замена	Используемая программа(ы)	Phaser
Структурная матрица	Внутренний человеческий Fab, 3KFD		
Уточняющая программа	Refmac	Предел разрешения	40-2,48
R фактор	22,18%	Свободный R фактор	25,14%
Количество атомов, отличных от водорода	4175		
RMSD длина связи	0,0205 Å	RMSD угол связи	2,057°
число и процент остатков в предпочитаемой области по карте Рамачандрана	515 (94,5%)	Полные маргинальные остатки по карте Рамачандрана	2 (0,37%)

Остатки TGF-beta 1, взаимодействующие с 4856gL3gH13 Fab, приведены на Фигурах 18А и 18В. 4856gL3gH13 Fab связывается в области, которая накладывается на область рецепторного связывания, предполагая, что будет конкуренция рецепторной блокады с помощью 4856gL3gH13 Fab, причем антитело против TGF-beta 1 эффективно благодаря превосходной аффинности. Был также протестирован вариант 4856gL3H13, содержащий замену аспарагина треонином в легкой цепи (положение 5 SEQ ID NO: 45) и было обнаружено, что он не вызывает изменений в структуре.

Аналогично, одноцепочечный формат антитела 4856 (scFv 4856, SEQ ID NO: 108) кристаллизовали с TGF-beta 2 (SEQ ID NO: 116) для определения аминокислотных остатков, с которыми контактирует антитело. Остатки TGF-beta 2, взаимодействующие с scFv 4856, приведены на Фигуре 18С, показывающие связывание в той же области, что показано для связывания Fab с TGF-beta 1.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

```

15 <110>   UCB Biopharma sprl
    <120>   Антитела
    <130>   PF0037-WO
    <150>   GB1610044.8
    <151>   2016-06-08
20 <160>   118
    <170>   PatentIn version 3.5
    <210>   1
    <211>   11
    <212>   Белок
25 <213>   Искусственная последовательность
    <220>
    <223>   CDRL1
    <400>   1
        Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Ser Gly Leu Ala
30 1             5             10
    <210>   2
    <211>   7
    <212>   Белок
    <213>   Искусственная последовательность
35 <220>
    <223>   CDRL2
    <400>   2
        Ala Ala Ser Asp Leu Ala Ser
40 1             5
    <210>   3
    <211>   12
    <212>   Белок
    <213>   Искусственная последовательность
    <220>
45 <223>   CDRL3
    <400>   3
        Gln Gln Thr Trp Thr Asp Gly Gly Ile Asp Asn Pro
        1             5             10

```

<210> 4
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 5 <220>
 <223> CDRH1
 <400> 4
 Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Asp Met Ser
 1 5 10
 10 <210> 5
 <211> 17
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 15 <223> CDRH2
 <400> 5
 Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 1 5 10 15
 Gly
 20 <210> 6
 <211> 15
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 25 <223> CDRH3
 <400> 6
 Gly Arg Asp Gly Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asn Gly Tyr Ser Leu
 1 5 10 15
 <210> 7
 30 <211> 15
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> CDRH3 var1
 35 <400> 7
 Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asn Gly Tyr Ser Leu
 1 5 10 15
 <210> 8
 <211> 15
 40 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> CDRH3 var 2
 <400> 8
 45 Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asn Ala Tyr Ser Leu
 1 5 10 15
 <210> 9
 <211> 15

<212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> CDRH3 var3
 5 <400> 9
 Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asp Gly Tyr Ser Leu
 1 5 10 15
 <210> 10
 <211> 110
 10 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> VL кроличьего 4856
 <400> 10
 15 Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Ala Val Gly
 1 5 10 15
 Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Ser Gly
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu Ile
 20 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Cys
 65 70 75 80
 25 Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Trp Thr Asp Gly Gly
 85 90 95
 Ile Asp Asn Pro Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105 110
 <210> 11
 30 <211> 330
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> VL кроличьего 4856
 35 <400> 11
 gcctatgata tgacccagac tccagcctct gtggaggtag ctgtgggagg cacagtcacc 60
 atcaagtgcc aggccagtga gagcatttac agtggtttgg cctgggtatca gcagacacca 120
 gggcagcgtc ccaagctcct gatctatgct gcatccgac tggcatctgg ggtcccatcg 180
 cgattcaaaag gcagtggatc tgggacagag tacactctca ccatcagcgg cgtggagtgt 240
 40 gccgatgctg ccacttacta ctgtcaacag acttggactg atggtggtat tgataatcct 300
 ttccggcggag ggaccgaggt ggtggtcaaa 330
 <210> 12
 <211> 132
 <212> Белок
 45 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> VL-область кроличьего 4856 с сигнальной последовательностью
 <400> 12

Met Asn Met Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15
Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser
20 25 30
5 Val Glu Val Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
35 40 45
Glu Ser Ile Tyr Ser Gly Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln
50 55 60
Arg Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val
10 65 70 75 80
Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr
85 90 95
Ile Ser Gly Val Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110
15 Thr Trp Thr Asp Gly Gly Ile Asp Asn Pro Phe Gly Gly Gly Thr Glu
115 120 125
Val Val Val Lys
130
<210> 13
20 <211> 396
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> VL кроличьего 4856 с сигнальной последовательностью
25 <400> 13
atgaacatga gggccccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
agatgtgcct atgatatgac ccagactcca gcctctgtgg aggtagctgt gggaggcaca 120
gtcaccatca agtgccaggc cagtgagagc atttacagtg gtttggcctg gtatcagcag 180
acaccagggc agcgtcccaa gctcctgatc tatgctgcat ccgatctggc atctggggtc 240
30 ccatcgcgat tcaaaggcag tggatctggg acagagtaca ctctcaccat cagcggcgtg 300
gagtgtgccg atgctgccac ttactactgt caacagactt ggactgatgg tggattgat 360
aatcctttcg gcggaggggac cgaggtgggtg gtcaaaa 396
<210> 14
<211> 121
35 <212> Белок
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> VH кроличьего 4856
<400> 14
40 Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15
Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Asp
20 25 30
Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
45 35 40 45
Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Met Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile

RU 2746926 C2

	65		70		75		80									
	Thr	Ser	Pro	Thr	Thr	Glu	Asp	Met	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Gly
				85					90						95	
	Arg	Asp	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Ser	Arg	Asn	Gly	Tyr	Ser	Leu	Trp	Gly
5			100					105						110		
	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
			115					120								
	<210>	15														
	<211>	363														
10	<212>	ДНК														
	<213>	Искусственная последовательность														
	<220>															
	<223>	VH кроличьего 4856														
	<400>	15														
15	cagtcgctgg	aggagtcctgg	gggtcgcctg	gtcacgcctg	ggacacccct	gacactcacc										60
	tgcacagcct	ctggattctc	cctcagcagc	tacgacatga	gctgggtccg	ccaggctcca										120
	gggaaggggc	tggaatggat	cggaatcatt	tatggtggta	gtggtagcac	atggtacgcg										180
	agctgggcga	aaggccgatt	caccatgtcc	aaaacgtcga	ccacggtgga	tctgaaaatc										240
	accagtcgga	cgaccgagga	catggccacc	tatttctgtg	ccagaggacg	ggatggtggt										300
20	gctggtggtt	ctcgtaatgg	ctattccttg	tggggccaag	gcaccctggt	caccgtctcg										360
	agt															363
	<210>	16														
	<211>	140														
	<212>	Белок														
25	<213>	Искусственная последовательность														
	<220>															
	<223>	VH кроличьего 4856 с сигнальной последовательностью														
	<400>	16														
	Met	Glu	Thr	Gly	Leu	Arg	Trp	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Val	Leu	Lys	Gly
30	1			5					10					15		
	Val	Gln	Cys	Gln	Ser	Leu	Glu	Glu	Ser	Gly	Gly	Arg	Leu	Val	Thr	Pro
			20					25					30			
	Gly	Thr	Pro	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser
			35				40					45				
35	Ser	Tyr	Asp	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
		50				55					60					
	Trp	Ile	Gly	Ile	Ile	Tyr	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser	Thr	Trp	Tyr	Ala	Ser
	65			70				75						80		
	Trp	Ala	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Met	Ser	Lys	Thr	Ser	Thr	Thr	Val	Asp
40			85				90						95			
	Leu	Lys	Ile	Thr	Ser	Pro	Thr	Thr	Glu	Asp	Met	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys
			100				105					110				
	Ala	Arg	Gly	Arg	Asp	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Ser	Arg	Asn	Gly	Tyr	Ser
			115				120					125				
45	Leu	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
		130				135					140					
	<210>	17														
	<211>	420														

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VN кроличьего 4856 с сигнальной последовательностью

5 <400> 17

atggagactg	ggctgcgctg	gcttctcctg	gtcgtgtgtc	tcaaagggtg	ccagtgtcag	60
tcgctggagg	agtccggggg	tcgcctggtc	acgcctggga	cacccctgac	actcacctgc	120
acagcctctg	gattctccct	cagcagctac	gacatgagct	gggtccgcca	ggctccaggg	180
aaggggctgg	aatggatcgg	aatcatattat	ggtggtagtg	gtagcacatg	gtacgcgagc	240
tgggcgaaag	gccgattcac	catgtccaaa	acgtcgacca	cggtggatct	gaaaatcacc	300
agtccgacga	ccgaggacat	ggccacctat	ttctgtgcca	gaggacggga	tgggtgggtct	360
ggtggttctc	gtaatggcta	ttccttgtgg	ggccaaggca	ccctgggtcac	cgtctcgagt	420

<210> 18

<211> 214

15 <212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> легкая цепь кроличьего 4856

<400> 18

20	Ala	Tyr	Asp	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Ala	Ser	Val	Glu	Val	Ala	Val	Gly
	1				5				10					15		
	Gly	Thr	Val	Thr	Ile	Lys	Cys	Gln	Ala	Ser	Glu	Ser	Ile	Tyr	Ser	Gly
			20					25					30			
	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Thr	Pro	Gly	Gln	Arg	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
25			35					40					45			
	Tyr	Ala	Ala	Ser	Asp	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Lys	Gly
		50				55					60					
	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Val	Glu	Cys
	65				70				75					80		
30	Ala	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Thr	Trp	Thr	Asp	Gly	Gly
					85				90					95		
	Ile	Asp	Asn	Pro	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Glu	Val	Val	Val	Lys	Arg	Thr
			100					105					110			
	Pro	Val	Ala	Pro	Thr	Val	Leu	Ile	Phe	Pro	Pro	Ala	Ala	Asp	Gln	Val
35			115					120					125			
	Ala	Thr	Gly	Thr	Val	Thr	Ile	Val	Cys	Val	Ala	Asn	Lys	Tyr	Phe	Pro
		130				135					140					
	Asp	Val	Thr	Val	Thr	Trp	Glu	Val	Asp	Gly	Thr	Thr	Gln	Thr	Thr	Gly
	145				150				155					160		
40	Ile	Glu	Asn	Ser	Lys	Thr	Pro	Gln	Asn	Ser	Ala	Asp	Cys	Thr	Tyr	Asn
					165				170					175		
	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Ser	Thr	Gln	Tyr	Asn	Ser	His	Lys
				180				185					190			
	Glu	Tyr	Thr	Cys	Lys	Val	Thr	Gln	Gly	Thr	Thr	Ser	Val	Val	Gln	Ser
45			195					200					205			
	Phe	Asn	Arg	Gly	Asp	Cys										
		210														
	<210>	19														

<211> 642
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 5 <223> легкая цепь кроличьего 4856
 <400> 19
 gcctatgata tgacccagac tccagcctct gtggaggtag ctgtgggagg cacagtcacc 60
 atcaagtgcc aggccagtga gagcatttac agtggtttgg cctgggtatca gcagacacca 120
 gggcagcgtc ccaagctcct gatctatgct gcatccgatc tggcatctgg ggtcccatcg 180
 10 cgattcaaaag gcagtggatc tgggacagag tacactctca ccatcagcgg cgtggagtggt 240
 gccgatgctg ccacttacta ctgtcaacag acttggactg atgggtggtat tgataatcct 300
 ttccggcggag ggaccgaggt ggtgggtcaaaa cgtacgccag ttgcacctac tgtcctcatc 360
 tccccaccag ctgctgatca ggtggcaact ggaacagtca ccatcgtgtg tgtggcgaat 420
 aaatactttc ccgatgtcac cgtcacctgg gaggtggatg gcaccacca aacaactggc 480
 15 atcgagaaca gtaaaacacc gcagaattct gcagattgta cctacaacct cagcagcact 540
 ctgacactga ccagcacaca gtacaacagc cacaaagagt acacctgcaa ggtgaccagg 600
 ggcacgacct cagtcgtcca gagcttcaat aggggtgact gt 642
 <210> 20
 <211> 236
 20 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> легкая цепь кроличьего 4856 с сигнальной последовательностью
 <400> 20
 25 Met Asn Met Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser
 20 25 30
 Val Glu Val Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
 30 35 40 45
 Glu Ser Ile Tyr Ser Gly Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln
 50 55 60
 Arg Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val
 65 70 75 80
 35 Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr
 85 90 95
 Ile Ser Gly Val Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110
 Thr Trp Thr Asp Gly Gly Ile Asp Asn Pro Phe Gly Gly Gly Thr Glu
 40 115 120 125
 Val Val Val Lys Arg Thr Pro Val Ala Pro Thr Val Leu Ile Phe Pro
 130 135 140
 Pro Ala Ala Asp Gln Val Ala Thr Gly Thr Val Thr Ile Val Cys Val
 145 150 155 160
 45 Ala Asn Lys Tyr Phe Pro Asp Val Thr Val Thr Trp Glu Val Asp Gly
 165 170 175
 Thr Thr Gln Thr Thr Gly Ile Glu Asn Ser Lys Thr Pro Gln Asn Ser
 180 185 190

Ala Asp Cys Thr Tyr Asn Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Ser Thr
195 200 205
Gln Tyr Asn Ser His Lys Glu Tyr Thr Cys Lys Val Thr Gln Gly Thr
210 215 220
5 Thr Ser Val Val Gln Ser Phe Asn Arg Gly Asp Cys
225 230 235
<210> 21
<211> 708
<212> ДНК
10 <213> Искусственная последовательность
<220>
<223> легкая цепь кроличьего 4856 с подчеркнутой сигнальной последовательностью
<400> 21
atgaacatga gggccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
15 agatgtgcct atgatatgac ccagactcca gcctctgtgg aggtagctgt gggaggcaca 120
gtcaccatca agtgccaggc cagtgaagagc atttacagtg gtttggcctg gtatcagcag 180
acaccagggc agcgtcccaa gctcctgata tatgctgcat ccgactctggc atctggggtc 240
ccatcgcgat tcaaaggcag tggatctggg acagagtaca ctctcaccat cagcggcgtg 300
gagtgtgccg atgctgccac ttactactgt caacagactt ggactgatgg tggattatgat 360
20 aatcctttcg gcgaggggac cgagggtggtg gtcaaacgta cgccagttgc acctactgtc 420
ctcatcttcc caccagctgc tgatcagggtg gcaactggaa cagtcaccat cgtgtgtgtg 480
gcgaataaat actttcccga tgtcaccgtc acctgggagg tggatggcac caccctaaaca 540
actggcatcg agaacagtaa aacaccgcag aattctgcag attgtaccta caacctcagc 600
agcactctga cactgaccag cacacagtac aacagccaca aagagtacac ctgcaagggtg 660
25 acccagggca cgacctcagt cgtccagagc ttcaataggg gtgactgt 708
<210> 22
<211> 216
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность
30 <220>
<223> Тяжелая цепь кроличьего 4856 Fab
<400> 22
Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15
35 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Asp
20 25 30
Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
35 40 45
40 Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Met Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile
65 70 75 80
Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly
85 90 95
45 Arg Asp Gly Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asn Gly Tyr Ser Leu Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Pro Lys Ala Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Cys Gly Asp Thr Pro Ser Ser Thr Val
130 135 140
Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Leu Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160
5 Thr Trp Asn Ser Gly Thr Leu Thr Asn Gly Val Arg Thr Phe Pro Ser
165 170 175
Val Arg Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Ser Val
180 185 190
Thr Ser Ser Ser Gln Pro Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Thr
10 195 200 205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val
210 215
<210> 23
<211> 648
15 <212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Тяжелая цепь кроличьего 4856 Fab
<400> 23
20 cagtcgctgg aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacaccct gacactcacc 60
tgcacagcct ctggattctc cctcagcagc tacgacatga gctgggtccg ccagggtcca 120
gggaaggggc tggaatggat cggaatcatt tatggtggtg gtggtagcac atggtacgcg 180
agctgggcga aaggccgatt caccatgtcc aaaacgtcga ccacggtgga tctgaaaatc 240
accagtccga cgaccgagga catggccacc tatttctgtg ccagaggacg ggatgggtgt 300
25 gctggtggtt ctcgtaatgg ctattccttg tggggccaag gcaccctggt caccgtctcg 360
agtgggcaac ctaaggctcc atcagtcttc ccactggccc cctgctgcgg ggacacaccc 420
agctccacgg tgaccctggg ctgcctgggtc aaaggctacc tcccggagcc agtgaccgtg 480
acctggaact cgggcaccct caccaatggg gtacgcacct tcccgtccgt ccggcagtcc 540
tcaggcctct actcgtgag cagcgtggtg agcgtgacct caagcagcca gcccgtcacc 600
30 tgcaacgtgg cccacccagc caccaacacc aaagtggaca agaccgtt 648
<210> 24
<211> 235
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность
35 <220>
<223> Тяжелая цепь кроличьего 4856 Fab с подчеркнутой сигнальной последовательностью.
<400> 24
Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15
40 Val Gln Cys Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro
20 25 30
Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser
35 40 45
Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
45 50 55 60
Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser
65 70 75 80
Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp

					85					90					95	
	Leu	Lys	Ile	Thr	Ser	Pro	Thr	Thr	Glu	Asp	Met	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys
					100					105					110	
	Ala	Arg	Gly	Arg	Asp	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Ser	Arg	Asn	Gly	Tyr	Ser
5					115					120					125	
	Leu	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gln	Pro	Lys
					130					135					140	
	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Cys	Gly	Asp	Thr	Pro	Ser
	145					150					155					160
10	Ser	Thr	Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Leu	Pro	Glu	Pro
					165					170					175	
	Val	Thr	Val	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Thr	Leu	Thr	Asn	Gly	Val	Arg	Thr
					180					185					190	
	Phe	Pro	Ser	Val	Arg	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val
15					195					200					205	
	Val	Ser	Val	Thr	Ser	Ser	Ser	Gln	Pro	Val	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His
					210					215					220	
	Pro	Ala	Thr	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val					
	225					230					235					
20	<210>	25														
	<211>	705														
	<212>	ДНК														
	<213>	Искусственная последовательность														
	<220>															
25	<223>	Тяжелая цепь кроличьего 4856 Fab с сигнальной последовательностью														
	<400>	25														
	atggagactg	ggctgcgctg	gcttctcctg	gtcgtgtgtc	tcaaagggtgt	ccagtgtcag										60
	tcgctggagg	agtccggggg	tcgcctgggtc	acgcctggga	caccctgac	actcacctgc										120
	acagcctctg	gattctccct	cagcagctac	gacatgagct	gggtccgcca	ggctccaggg										180
30	aaggggctgg	aatggatcgg	aatcatttat	ggtggtagtg	gtagcacatg	gtacgcgagc										240
	tgggcgaaag	gccgattcac	catgtccaaa	acgtcgacca	cggtggatct	gaaaatcacc										300
	agtccgacga	ccgaggacat	ggccacctat	ttctgtgccca	gaggacggga	tggtgggtgt										360
	ggtgggttctc	gtaatggcta	ttccttgtgg	ggccaaggca	ccctggtcac	cgtctcgagt										420
	gggcaacctta	aggctccatc	agtcttccca	ctggccccct	gctgcgggga	cacaccacgc										480
35	tccacggtga	ccctgggctg	cctgggtcaaaa	ggctacctcc	cggagccagt	gaccgtgacc										540
	tggaactcgg	gcaccctcac	caatggggta	cgcaccttcc	cgtccgtccg	gcagtcctca										600
	ggcctctact	cgctgagcag	cgtggtgagc	gtgacctcaa	gcagccagcc	cgtcacctgc										660
	aacgtggccc	accagccac	caacacaaaa	gtggacaaga	ccgtt											705
	<210>	26														
40	<211>	110														
	<212>	Белок														
	<213>	Искусственная последовательность														
	<220>															
	<223>	V-область мурилизированного 4856 mL1.1														
45	<400>	26														
	Ala	Tyr	Asp	Met	Asn	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly
	1				5					10					15	
	Asp	Thr	Ile	Thr	Ile	Thr	Cys	Gln	Ala	Ser	Glu	Ser	Ile	Tyr	Ser	Gly

20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
 5 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Trp Thr Asp Gly Gly
 85 90 95
 10 Ile Asp Asn Pro Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 27
 <211> 330
 <212> ДНК
 15 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> V-область муринизированного 4856 mL1.1
 <400> 27
 gcctacgaca tgaaccagtc gccatcaagc ctgagcgcct cccttggcga caccatcacc 60
 20 attacttgcc aagcctccga aagcatctac tccggactcg cctggatatca gcagaaaccg 120
 gggaacattc ccaagctcct gatctacgcc gcttccgact tggcatcggg agtgccgtca 180
 cggttcaagg ggtccggatc gggaaccgag tacaccctga ctatctcctc cctgcaacc 240
 gaggatattg cgacctacta ctgtcagcag acttggacgg atggtggaat cgacaaccct 300
 ttcggtggcg gcaccaagct ggaaatcaag 330
 25 <210> 28
 <211> 130
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 30 <223> V-область муринизированного 4856 mL1.1 с сигнальной последовательностью
 <400> 28
 Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15
 Asp Ala Arg Cys Ala Tyr Asp Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 35 20 25 30
 Ala Ser Leu Gly Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser
 35 40 45
 Ile Tyr Ser Gly Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro
 50 55 60
 40 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80
 Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Trp
 45 100 105 110
 Thr Asp Gly Gly Ile Asp Asn Pro Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 115 120 125
 Ile Lys

130

<210> 29

<211> 390

<212> ДНК

5 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> V-область муринизированного 4856 mL1.1 с сигнальной последовательностью

<400> 29

atgtctgtcc ccacccaagt cctcggactc ctgctactct ggcttacaga tgccagatgc 60

10 gcctacgaca tgaaccagtc gccatcaagc ctgagcgcct cccttggcga caccatcacc 120

attacttgcc aagcctccga aagcatctac tccggactcg cctggatatca gcagaaaccg 180

gggaacattc ccaagctcct gatctacgcc gcttccgact tggcatcggg agtgccgtca 240

cggttcaagg ggtccggatc gggaaccgag tacaccctga ctatctcctc cctgcaaccc 300

gaggatattg cgacctaacta ctgtcagcag acttggacgg atggtggaat cgacaaccct 360

15 ttcggtggcg gcaccaagct ggaaatcaag 390

<210> 30

<211> 124

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

20 <220>

<223> V-область муринизированного 4856 mH2.1

<400> 30

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

1 5 10 15

25 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr

20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Ala

30 50 55 60

Lys Gly Lys Phe Ile Met Ser Lys Asp Ser Ala Lys Asn Thr Val Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys

85 90 95

35 Ala Arg Gly Arg Asp Gly Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asn Gly Tyr Ser

100 105 110

Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 31

40 <211> 372

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> V-область муринизированного 4856 mH2.1

45 <400> 31

gagggtcaagc tgctggaatc ggggggaggt ctggtgcagc cgggcggatc tctgaagctg 60

tcatgcaccg catccgggtt tagcctttcg tcctacgaca tgtcctgggt gcgccaggcc 120

cccggaaagg gattggaatg gatcggcatt atctacgggg gctccgggtc cacttggtac 180

gcgagctggg ccaaggggaa gttcatcatg tcgaaggact ccgctaagaa caccgtgtac 240
ctccaaatga gcaaagtccg gagcgaggat atggccacct atttctgcg cgggggaagg 300
gacggaggag ccggcggttc cagaaacggc tactcactgt ggggacaggg caccctcgtg 360
actgtctcga gt 372

5 <210> 32
<211> 143
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность
<220>

10 <223> V-область муринизированного 4856 mH2.1 с сигнальной последовательностью
<400> 32
Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
15 20 25 30
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45
Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60
20 Glu Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala
65 70 75 80
Ser Trp Ala Lys Gly Lys Phe Ile Met Ser Lys Asp Ser Ala Lys Asn
85 90 95
Thr Val Tyr Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp Met Ala Thr
25 100 105 110
Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Arg Asp Gly Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asn
115 120 125
Gly Tyr Ser Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

30 <210> 33
<211> 429
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>

35 <223> V-область муринизированного 4856 mH2.1 с сигнальной последовательностью
<400> 33
atggaatgga gctgggtctt tctcttcttc ctgtcagtaa ctacaggagt ccattctgag 60
gtcaagctgc tggaatcggg gggaggtctg gtgcagccgg gcggtatctt gaagctgtca 120
tgcaccgcat ccgggttttag cctttcgtcc tacgacatgt cctgggtgcg ccaggcccc 180
40 ggaaagggat tggaatggat cggcattatc tacgggggct ccggttccac ttggtacgag 240
agctggggcca aggggaagtt catcatgtcg aaggactccg ctaagaacac cgtgtacctc 300
caaatgagca aagtccggag cgaggatatg gccacattt tctgcgcccc gggaaggagc 360
ggaggagccg gcggttccag aaacggctac tactgtggg gacagggcac cctcgtgact 420
gtctcagat 429

45 <210> 34
<211> 107
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Мышиный IGKV15-103 JK1 акцепторный каркас

<400> 34

5 Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp
20 25 30
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
10 Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
15 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 35

<211> 321

20 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Мышиный IGKV15-103 JK1 акцепторный каркас

<400> 35

25 gacatccaga tgaaccagtc tccatccagt ctgtctgcat cccttggaga cacaattacc 60
atcacttgcc atgccagtca gaacattaat gtttggttaa gctggtacca gcagaaacca 120
ggaaatattc ctaaactatt gatctataag gcttccaact tgcacacagg cgtcccatca 180
aggtttagtg gcagtggatc tggaacagggt ttcacattaa ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagacattg ccacttacta ctgtcaacag ggtcaaagtt atccttggac gttcgggtga 300
30 ggcaccaagc tggaatatca a 321

<210> 36

<211> 113

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

35 <220>

<223> Мышиный IGHV4-S1 JH3 акцепторный каркас

<400> 36

Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
40 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
20 25 30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu
45 50 55 60
Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

				85					90					95				
	Ala	Arg	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser		
				100					105					110				
	Ala																	
5	<210>	37																
	<211>	339																
	<212>	ДНК																
	<213>	Искусственная последовательность																
	<220>																	
10	<223>	Мышиный IGHV4-S1 JH3 акцепторный каркас																
	<400>	37																
																		60
																		120
																		180
15																		240
																		300
																		339
	<210>	38																
	<211>	110																
20	<212>	Белок																
	<213>	Искусственная последовательность																
	<220>																	
	<223>	4856 gL3 V-область																
	<400>	38																
25	Ala	Tyr	Asp	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly		
	1				5					10				15				
	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Gln	Ala	Ser	Glu	Ser	Ile	Tyr	Ser	Gly		
				20					25					30				
	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile		
30				35					40					45				
	Tyr	Ala	Ala	Ser	Asp	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly		
		50					55					60						
	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro		
		65				70					75					80		
35	Asp	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Thr	Trp	Thr	Asp	Gly	Gly		
					85					90					95			
	Ile	Asp	Asn	Pro	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys				
				100						105					110			
	<210>	39																
40	<211>	330																
	<212>	ДНК																
	<213>	Искусственная последовательность																
	<220>																	
	<223>	4856 gL3 V-область (экспрессия в млекопитающих)																
45	<400>	39																
																		60
																		120
																		180

cggttctccg gctccggaag cggcactgag tacaccctga ccatttcctc gcttcaaccg 240
 gatgacttcg cgacctacta ctgtcagcag acttggacgg acgggggcat cgacaaccg 300
 tttggtggag gcaccaaaagt cgagattaag 330
 <210> 40
 5 <211> 330
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> 4856 gL3 V-область (экспрессия в E. coli)
 10 <400> 40
 gcgtatgata tgaccagag tccaagcacc ctctccgcca gcgtaggcga tcgtgtgact 60
 attacctgtc aggccagtga aagcatctat agcggcctgg cgtggatatca gcaaaaaccg 120
 ggcaaagccc cgaagctgct catctatgcg gcgtccgatc tggcgagcgg tgtgccaagc 180
 cgtttcagtg gcagcggcag cggcaccgaa tataccctca caatttcgtc tctccagccg 240
 15 gatgatttcg ccacttacta ttgtcagcaa acctggaccg atggcggcag tgataaccg 300
 ttcggtggcg gcactaaagt agaaatcaaa 330
 <210> 41
 <211> 128
 <212> Белок
 20 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> 4856 gL3 V-область с сигнальной последовательностью
 <400> 41
 Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 25 1 5 10 15
 Tyr Ser Ala Tyr Asp Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser
 20 25 30
 Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr
 35 40 45
 30 Ser Gly Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 50 55 60
 Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 65 70 75 80
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 35 85 90 95
 Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Trp Thr Asp
 100 105 110
 Gly Gly Ile Asp Asn Pro Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125
 40 <210> 42
 <211> 384
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 45 <223> 4856 gL3 V-область с сигнальной последовательностью
 <400> 42
 atgaagtggg tcaccttcat ctccctgctg tttctgttct cctccgccta ctccgcctac 60
 gacatgaccc agtccccctc aaccctctcc gcttccgtgg gagatcgcgt gaccatcact 120

tgccaagcct ccgaatcgat ctactcgggt ctggcctggt atcagcagaa gccaggggaag 180
gcacctaaagc tgttgatcta cgcggcctca gacctggcca gcggagtgcc cagccgggttc 240
tccggctccg gaagcggcac tgagtacacc ctgaccattt cctcgcttca accggatgac 300
ttcgcgacct actactgtca gcagacttgg acggacgggg gcatcgacaa cccgtttggg 360
5 ggaggcacca aagtcgagat taag 384
<210> 43
<211> 131
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность
10 <220>
<223> 4856 gL3 V-область с сигнальной последовательностью (экспрессия в E. coli)
<400> 43
Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15
15 Thr Val Ala Gln Ala Ala Tyr Asp Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu
20 25 30
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu
35 40 45
Ser Ile Tyr Ser Gly Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
20 50 55 60
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile
85 90 95
25 Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr
100 105 110
Trp Thr Asp Gly Gly Ile Asp Asn Pro Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
115 120 125
Glu Ile Lys
30 130
<210> 44
<211> 393
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
35 <220>
<223> 4856 gL3 V-область с сигнальной последовательностью (экспрессия в E. coli)
<400> 44
atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggctg gtttcgctac cgtagcgcaa 60
gctgcgtatg atatgaccca gagtccaagc accctctccg ccagcgtagg cgatcgtgtg 120
40 actattacct gtcaggccag tgaaagcatc tatagcggcc tggcgtggta tcagcaaaaa 180
ccgggcaaaag ccccgaagct gctcatctat gcggcgtccg atctggcgag cgggtgtgcca 240
agccgtttca gtggcagcgg cagcggcacc gaatataccc tcacaatttc gtctctccag 300
ccggatgatt tcgccactta ctattgtcag caaacctgga ccgatggcgg cattgataac 360
ccgttcggtg gcggcactaa agtagaaatc aaa 393
45 <210> 45
<211> 217
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> 4856 gL3 легкая цепь

<400> 45

5 Ala Tyr Asp Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Ser Gly
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 10 Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Trp Thr Asp Gly Gly
 15 85 90 95
 Ile Asp Asn Pro Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110
 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 115 120 125
 20 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 130 135 140
 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 145 150 155 160
 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 25 165 170 175
 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 180 185 190
 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 195 200 205
 30 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 46

<211> 651

<212> ДНК

35 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> 4856 gL3 легкая цепь (экспрессия в млекопитающих)

<400> 46

40 gcctacgaca tgacccagtc cccctcaacc ctctccgctt ccgtgggaga tcgcgtgacc 60
 atcacttgcc aagcctccga atcgatctac tcgggtctgg cctggtatca gcagaagcca 120
 gggaaggcac ctaagctggt gatctacgcg gcctcagacc tggccagcgg agtgcccagc 180
 cggttctccg gctccggaag cggcactgag tacaccctga ccatttcctc gcttcaaccg 240
 gatgacttcg cgacctacta ctgtcagcag acttggaacg acggggggcat cgacaacccg 300
 tttgggtggag gcaccaaagt cgagattaag cgtacggtag cggcccatc tgtcttcac 360
 45 ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctgttggtgtg cctgctgaat 420
 aacttctatc ccagagagggc caaagtacag tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt 480
 aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc 540
 accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc 600

catcaggggcc tgagctcgcc cgtcacaaag agcttcaaca ggggagagtg t 651

<210> 47

<211> 651

<212> ДНК

5 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> 4856 gL3 легкая цепь (экспрессия в E.coli)

<400> 47

gcgtatgata tgacccagag tccaagcacc ctctccgccg gcgtaggcga tcgtgtgact 60

10 attacctgtc aggccagtga aagcatctat agcggcctgg cgtgggtatca gcaaaaaccg 120

ggcaaagccc cgaagctgct catctatgcg gcgtccgacg tggcgagcgg tgtgccaagc 180

cgtttcagtg gcagcggcag cggcaccgaa tataccctca caatttcgtc tctccagccg 240

gatgatattcg ccacttacta ttgtcagcaa acctggaccg atggcgggcat tgataacccg 300

ttcgggtggcg gcactaaagt agaaatcaaa cgtacggtag cggcccccac tgtcttcac 360

15 ttccccccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat 420

aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt 480

aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc 540

accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc 600

catcaggggcc tgagctcacc agtaacaaaa agttttaata gaggggagtg t 651

20 <210> 48

<211> 235

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

25 <223> 4856 gL3 легкая цепь с сигнальной последовательностью

<400> 48

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1 5 10 15

Tyr Ser Ala Tyr Asp Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser

30 20 25 30

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr

35 35 40 45

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

50 55 60

35 Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe

65 70 75 80

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu

85 90 95

Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Trp Thr Asp

40 100 105 110

Gly Gly Ile Asp Asn Pro Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

115 120 125

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

130 135 140

45 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

145 150 155 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

165 170 175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
180 185 190
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
195 200 205
5 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
210 215 220
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235
<210> 49
10 <211> 705
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> 4856 gL3 легкая цепь с сигнальной последовательностью (экспрессия в млекопитающих)
15 <400> 49
atgaagtggg tcaccttcat ctccctgctg tttctgttct cctccgccta ctccgcctac 60
gacatgaccc agtccccctc aaccctctcc gcttccgtgg gagatcgcg gaccatcact 120
tgccaagcct ccgaatcgat ctactcgggt ctggcctggt atcagcagaa gccagggaag 180
gcacctaaagc tgttgatcta cgcggcctca gacctggcca gcggagtgcc cagccggttc 240
20 tccggctccg gaagcggcac tgagtacacc ctgaccattt cctcgcttca accggatgac 300
ttcgcgacct actactgtca gcagacttgg acggacgggg gcatcgacaa cccgtttggt 360
ggaggcacca aagtcgagat taagcgtacg gtagcggccc catctgtctt catcttcccg 420
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480
tatcccagag aggccaaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 540
25 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg 600
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 660
ggcctgagct cgcgcgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 705
<210> 50
<211> 238
30 <212> Белок
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> 4856 gL3 легкая цепь с сигнальной последовательностью (экспрессия в E. coli)
<400> 50
35 Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15
Thr Val Ala Gln Ala Ala Tyr Asp Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu
20 25 30
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu
40 35 40 45
Ser Ile Tyr Ser Gly Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
50 55 60
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80
45 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile
85 90 95
Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr
100 105 110

	Trp	Thr	Asp	Gly	Gly	Ile	Asp	Asn	Pro	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	
				115				120					125				
	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	
			130				135					140					
5	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	
			145			150				155					160		
	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	
				165					170						175		
	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	
10				180				185					190				
	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	
			195				200				205						
	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	
			210			215					220						
15	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys			
			225			230				235							
	<210>	51															
	<211>	714															
	<212>	ДНК															
20	<213>	Искусственная последовательность															
	<220>																
	<223>	4856 gL3 легкая цепь с сигнальной последовательностью														(экспрессия в E. coli)	
	<400>	51															
	atgaaaaaga	cagctatcgc	aattgcagtg	gccttggctg	gtttcgctac	cgtagcgcaa										60	
25	gctgcgtatg	atatgaccca	gagtccaagc	accctctccg	ccagcgtagg	cgatcgtgtg										120	
	actattacct	gtcaggccag	tgaagcatc	tatagcggcc	tggcgtggta	tcagcaaaaa										180	
	ccgggcaaag	ccccgaagct	gctcatctat	gcggcgccg	atctggcgag	cggtgtgcca										240	
	agccgtttca	gtggcgagcg	cagcggcacc	gaatataccc	tcacaatttc	gtctctccag										300	
	ccggatgatt	tcgccactta	ctattgtcag	caaacctgga	ccgatggcgg	cattgataac										360	
30	ccgttcggtg	gcggcactaa	agtagaaaatc	aaacgtacgg	tagcggcccc	atctgtcttc										420	
	atcttcccg	catctgatga	gcagttgaaa	tctggaactg	cctctgttgt	gtgcctgctg										480	
	aataacttct	atcccagaga	ggccaaaagta	cagtgggaag	tggaataacgc	cctccaatcg										540	
	ggtaactccc	aggagagtgt	cacagagcag	gacagcaagg	acagcaccta	cagcctcagc										600	
	agcaccctga	cgctgagcaa	agcagactac	gagaaacaca	aagtctacgc	ctgcgaagtc										660	
35	acccatcagg	gcctgagctc	accagtaaca	aaaagtttta	atagagggga	gtgt										714	
	<210>	52															
	<211>	124															
	<212>	Белок															
	<213>	Искусственная последовательность															
40	<220>																
	<223>	4856gH13 V-область															
	<400>	52															
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly	
	1			5				10					15				
45	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Ser	Tyr	
			20					25					30				
	Asp	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
			35					40					45				

Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Ala
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Lys Asn Ser Val Tyr
65 70 75 80
5 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asn Gly Tyr Ser
100 105 110
Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
10 115 120
<210> 53
<211> 372
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
15 <220>
<223> 4856gH13 V-область (экспрессия в млекопитающих)
<400> 53
gaagtgcaac tgggtggaag cggaggaggt ttggtgaaac cgggagggtc actgcggtc 60
tcctgtgccg cctccggatt cagcctctcg tcctacgaca tgagctgggt cagacaggcc 120
20 cccgggaagg gcctggagtg gattgggtatc atctacggcg gctccgggtc gacttggtac 180
gcttcgtggg ccaagggacg gttcaccatc tcccgcgatt ccgcgaagaa cagcgtgtat 240
ctgcagatga actctctcg ggccgaggac accgcagtgt actactgcgc gagggggcgc 300
gacgccggcg ccgggggatc acgcaacggt tactcccttt ggggacaggg aaccctggtc 360
actgtctcca gc 372
25 <210> 54
<211> 372
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
30 <223> 4856gH13 V-область (экспрессия в E. coli)
<400> 54
gagggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtcaaac ctggaggag cctgctctc 60
tcttgtgcag caagcggtt cagcctgtcc tcttacgata tgtcctgggt gcgccaggca 120
cctgggaagg gcctggagtg gattggcatt atttatggcg gcagcggcag cacatggtac 180
35 gcgagctggg cgaagggccg ttccaccatc tcccgggaca gcgcaaagaa tagcgtgtac 240
ctccagatga actctctccg cgcagaggac acagcagtct attactgtgc gcggggccgc 300
gatgcaggcg cgggcggcag ccgcaacggc tatagcctgt ggggacaggg gacccttgtg 360
acagtctcga gc 372
40 <210> 55
<211> 142
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> 4856gH13 V-область с сигнальной последовательностью (экспрессия в млекопитающих)
45 <400> 55
Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15
Tyr Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro

	20	25	30
	Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser		
	35	40	45
5	Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu		
	50	55	60
	Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser		
	65	70	75
	Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Lys Asn Ser		
	85	90	95
10	Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr		
	100	105	110
	Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asn Gly		
	115	120	125
	Tyr Ser Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
15	130	135	140
	<210> 56		
	<211> 426		
	<212> ДНК		
	<213> Искусственная последовательность		
20	<220>		
	<223> 4856gH13 V-область с сигнальной последовательностью (экспрессия в млекопитающ		
	<400> 56		
	atgaagtggg tcaccttcat ctccctgctg tttctgttct ccagcgccta ctccgaagtg	60	
	caactgggtgg aaagcggagg aggtttggtg aaaccgggag ggtcactgcg gctctcctgt	120	
25	gccgcctccg gattcagcct ctcgtcctac gacatgagct gggtcagaca ggcccccg	180	
	aagggcctgg agtggattgg tatcatctac ggcgggtccg gctcgacttg gtacgcttcg	240	
	tgggccaagg gacgggttcac catctcccg c gattccgcga agaacagcgt gtatctgcag	300	
	atgaactctc tgcggggccga ggacaccgca gtgtactact gcgcgagggg gcgcgacgcc	360	
	ggcgccgggg gatcacgcaa cggttactcc ctttgggggac agggaaccct ggtcactgtc	420	
30	tccagc	426	
	<210> 57		
	<211> 145		
	<212> Белок		
	<213> Искусственная последовательность		
35	<220>		
	<223> 4856gH13 V-область с сигнальной последовательностью (экспрессия в E. coli)		
	<400> 57		
	Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala		
	1 5 10 15		
40	Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu		
	20 25 30		
	Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe		
	35 40 45		
	Ser Leu Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys		
45	50 55 60		
	Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp		
	65 70 75 80		
	Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala		

		85		90		95										
	Lys	Asn	Ser	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr
				100				105						110		
	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Arg	Asp	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Ser
5			115				120					125				
	Arg	Asn	Gly	Tyr	Ser	Leu	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser
		130					135					140				
	Ser															
	145															
10	<210>	58														
	<211>	435														
	<212>	ДНК														
	<213>	Искусственная последовательность														
	<220>															
15	<223>	4856gH13 V-область с сигнальной последовательностью (экспрессия в E. coli)														
	<400>	58														
	atgaagaaga	ctgctatagc	aattgcagtg	gcgctagctg	gtttcgccac	cgtaggcgcaa										60
	gctgagggttc	agctggtcga	gtctggaggc	gggcttgta	aacctggagg	gagcctgcgt										120
	ctctcttggtg	cagcaagcgg	cttcagcctg	tcctcttacg	atatgtcctg	ggtgcgccag										180
20	gcacctggga	agggcctgga	gtggattggc	attatattatg	gcggcagcgg	cagcacatgg										240
	tacgcgagct	gggcgaaggg	ccgtttcacc	atctcccggg	acagcgcaaa	gaatagcgtg										300
	tacctccaga	tgaactctct	ccgcgcagag	gacacagcag	tctattactg	tgcgcggggc										360
	cgcgatgcag	gcgcggggcg	cagccgcaac	ggctatagcc	tgtggggaca	ggggaccctt										420
	gtgacagtct	cgagc														435
25	<210>	59														
	<211>	227														
	<212>	Белок														
	<213>	Искусственная последовательность														
	<220>															
30	<223>	Тяжелая цепь 4856 gH13 Fab														
	<400>	59														
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
	1			5						10					15	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Ser	Tyr
35			20					25					30			
	Asp	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35				40						45				
	Gly	Ile	Ile	Tyr	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser	Thr	Trp	Tyr	Ala	Ser	Trp	Ala
		50			55						60					
40	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Ser	Ala	Lys	Asn	Ser	Val	Tyr
	65			70				75							80	
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85				90						95			
	Ala	Arg	Gly	Arg	Asp	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Ser	Arg	Asn	Gly	Tyr	Ser
45			100				105						110			
	Leu	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys
			115				120						125			
	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly

	130		135		140	
	Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro					
	145		150		155	160
	Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr					
5		165		170		175
	Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val					
		180		185		190
	Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn					
		195		200		205
10	Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro					
	210		215		220	
	Lys Ser Cys					
	225					
	<210> 60					
15	<211> 681					
	<212> ДНК					
	<213> Искусственная последовательность					
	<220>					
	<223> Тяжелая цепь 4856 gH13 Fab (экспрессия в млекопитающих)					
20	<400> 60					
	gaagtgcaac tgggtggaag cggaggaggt ttggtgaaac cgggaggggtc actgctggctc					60
	tcctgtgccg cctccggatt cagcctctcg tcctacgaca tgagctgggt cagacaggcc					120
	cccgggaagg gcctggagtg gatttggtatc atctacggcg gctccggctc gacttggtac					180
	gcttcgtggg ccaagggacg gtccaccatc tcccgcgatt ccgcgaagaa cagcgtgtat					240
25	ctgcagatga actctctgcg ggccgaggac accgcagtgt actactgcgc gagggggcgc					300
	gacgccggcg ccgggggatc acgcaacggg tactcccttt ggggacaggg aaccctggtc					360
	actgtctcca gcgcttctac aaagggccca tcggtcttcc ccctggcacc ctctccaag					420
	agcacctctg ggggacacgc ggccctgggc tgcttggtca aggactactt ccccgaaccg					480
	gtgacggtgt cgtggaactc aggcgccctg accagcggcg tgacacactt cccggctgtc					540
30	ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg					600
	ggcaccacaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag					660
	aaagttgagc ccaaactctt t					681
	<210> 61					
	<211> 681					
35	<212> ДНК					
	<213> Искусственная последовательность					
	<220>					
	<223> Тяжелая цепь 4856 gH13 Fab (экспрессия в E. coli)					
	<400> 61					
40	gaggttcagc tggctcagtc tggaggcggg cttgtcaaac ctggaggag cctgcgtctc					60
	tcttgtagcag caagcggctt cagcctgtcc tcttacgata tgtcctgggt gcgccaggca					120
	cctgggaagg gcctggagtg gattggcatt atttatggcg gcagcggcag cacatggtac					180
	gcgagctggg cgaagggccg tttcaccatc tcccgggaca gcgcaaagaa tagcgtgtac					240
	ctccagatga actctctccg cgcagaggac acagcagtct attactgtgc gcggggccgc					300
45	gatgcaggcg cgggcggcag ccgcaacggc tatagcctgt ggggacaggg gacccttggtg					360
	acagtctcga gcgcttctac aaagggccca tcggtcttcc ccctggcacc ctctccaag					420
	agcacctctg ggggacacgc ggccctgggc tgcttggtca aggactactt ccccgaaccg					480
	gtgacggtgt cgtggaactc aggcgccctg accagcggcg tgacacactt cccggctgtc					540

ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtgggtga ccbtgccctc cagcagcttg 600
ggcaccacaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtcgacaag 660
aaagttgagc ccaaattcttg t 681

<210> 62

5 <211> 245

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тяжелая цепь 4856 gH13 Fab с сигнальной последовательностью (экспрессия в мле

10 <400> 62

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15
Tyr Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro
20 25 30
15 Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser
35 40 45
Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60
20 Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser
65 70 75 80
Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Lys Asn Ser
85 90 95
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110
25 Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asn Gly
115 120 125
Tyr Ser Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
130 135 140
30 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
145 150 155 160
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
165 170 175
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
180 185 190
35 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
195 200 205
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
210 215 220
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
40 225 230 235 240
Glu Pro Lys Ser Cys
245

<210> 63

<211> 735

45 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тяжелая цепь 4856 gH13 Fab с сигнальной последовательностью (экспрессия в мле

<400> 63
atgaagtggg tcaccttcat ctccctgctg tttctgttct ccagcgccta ctccgaagtg 60
caactggtgg aaagcggagg aggtttggtg aaaccgggag ggtcactgcg gctctcctgt 120
gccgcctccg gattcagcct ctcgctctac gacatgagct gggtcagaca ggcccccg 180
5 aagggcctgg agtggattgg tatcatctac ggcggtccg gctcgacttg gtacgcttcg 240
tgggccaagg gacgggttcac catctcccg gattccgcga agaacagcgt gtatctgcag 300
atgaactctc tgcggggccga ggacaccgca gtgtactact gcgcgagggg gcgcgacgcc 360
ggcgccgggg gatcacgcaa cggttactcc ctttgggggac agggaaccct ggtcactgtc 420
tccagcgctt ctacaaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc 480
10 tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 540
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag 600
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc 660
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaagggtga caagaaagtt 720
gagcccaaatt cttgt 735
15 <210> 64
<211> 248
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность
<220>
20 <223> Тяжелая цепь 4856 gH13 Fab с сигнальной последовательностью (экспрессия в E.
<400> 64
Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15
Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
25 20 25 30
Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35 40 45
Ser Leu Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60
30 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp
65 70 75 80
Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala
85 90 95
Lys Asn Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
35 100 105 110
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser
115 120 125
Arg Asn Gly Tyr Ser Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
130 135 140
40 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
145 150 155 160
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
165 170 175
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
45 180 185 190
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
195 200 205
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln

210 215 220
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
225 230 235 240
Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
5 245
<210> 65
<211> 744
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
10 <220>
<223> Тяжелая цепь 4856 gH13 Fab с сигнальной последовательностью (экспрессия в Е.
<400> 65
atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa 60
gctgagggttc agctggtcga gtctggaggc gggcttgta aacctggagg gagcctgcgt 120
15 ctctcttggtg cagcaagcgg cttcagcctg tcctcttacg atatgtcctg ggtgcgccag 180
gcacctggga agggcctgga gtggattggc attattttatg gcggcagcgg cagcacatgg 240
tacgcgagct gggcggaagg ccgtttcacc atctcccggg acagcgcaaa gaatagcgtg 300
tacctccaga tgaactctct ccgcgcagag gacacagcag tctattactg tgcgcggggc 360
cgcgatgcag gcgcggggcg cagccgcaac ggctatagcc tgtggggaca ggggaccctt 420
20 gtgacagtct cgagcgcttc taaaaagggc ccatcggtct tccccctggc accctcctcc 480
aagagcacct ctgggggcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 540
ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct 600
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 660
ttggggcacc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtcgac 720
25 aagaaagttg agcccaaadc ttgt 744
<210> 66
<211> 124
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность
30 <220>
<223> 4856gH20 V-область
<400> 66
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
35 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30
Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Ser Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Ala
40 50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Lys Asp Ser Ala Lys Asn Ser Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
45 Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asn Gly Tyr Ser
100 105 110
Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 67
 <211> 372
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 5 <220>
 <223> 4856gH20 V-область
 <400> 67
 gaagtgcaac tgggtggaag cggaggaggt ttggtgaaac cgggagggtc actgcggtc 60
 tcctgtgccg cctccggatt cagcctctcg tcctacgaca tgagctgggt cagacaggcc 120
 10 cccgggaagg gcctggagtg gatttccatc atctacggcg gctccggctc gacttggtac 180
 gcttcgtggg ccaagggacg gttcaccatg tccaaggatt ccgcaagaa cagcgtgtat 240
 ctgcagatga actctctgcg ggccgaggac accgcagtgt actactgctc gagggggcgc 300
 gacgccggcg ccgggggatc acgcaacggg tactcccttt ggggacaggg aaccctggtc 360
 actgtctcca gc 372
 15 <210> 68
 <211> 372
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 20 <223> 4856gH20 V-область (экспрессия в E. coli)
 <400> 68
 gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtcaaac ctggaggag cctgctctc 60
 tcttgtgcag caagcggtt cagcctgtcc tcttacgata tgtcctgggt gcgccaggca 120
 cctgggaagg gcctggagtg gatttctatt atttatggcg gcagcggcag cacatggtac 180
 25 gcgagctggg cgaagggccg tttcaccatg tccaaagaca gcgcaaagaa tagcgtgtac 240
 ctccagatga actctctccg cgcagaggac acagcagtct attactgtgc gcggggccgc 300
 gatgcaggcg cgggcggcag ccgcaatggg tatagcctgt ggggacaggg gacccttgtg 360
 acagtctcga gc 372
 <210> 69
 30 <211> 142
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> 4856gH20 V-область с сигнальной последовательностью (экспрессия в млекопитающ
 35 <400> 69
 Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 1 5 10 15
 Tyr Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro
 20 25 30
 40 Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser
 35 40 45
 Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 50 55 60
 Trp Ile Ser Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser
 45 65 70 75 80
 Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Lys Asp Ser Ala Lys Asn Ser
 85 90 95
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr

100 105 110
 Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asn Gly
 115 120 125
 Tyr Ser Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 5 130 135 140
 <210> 70
 <211> 426
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 10 <220>
 <223> 4856gH20 V-область с сигнальной последовательностью (экспрессия в млекопитающ
 <400> 70
 atgaagtggg tcaccttcac ctccctgctg tttctgttct ccagcgccta ctccgaagtg 60
 caactggtgg aaagcggagg aggtttggtg aaaccgggag ggtcactgcg gctctcctgt 120
 15 gccgcctccg gattcagcct ctcgtcctac gacatgagct gggtcagaca ggcccccggg 180
 aagggcctgg agtggatttc catcatctac ggcggctccg gctcgacttg gtacgcttcg 240
 tgggccaagg gacggttcac catgtccaag gattccgcga agaacagcgt gtatctgcag 300
 atgaactctc tgcggggccga ggacaccgca gtgtactact gcgcgagggg gcgcgacgcc 360
 ggcgcggggg gatcacgcaa cggttactcc ctttgggggac agggaaccct ggtcactgtc 420
 20 tccagc 426
 <210> 71
 <211> 145
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 25 <220>
 <223> 4856gH20 V-область с сигнальной последовательностью (экспрессия в E. coli)
 <400> 71
 Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
 1 5 10 15
 30 Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 20 25 30
 Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 35 40 45
 Ser Leu Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 35 50 55 60
 Gly Leu Glu Trp Ile Ser Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp
 65 70 75 80
 Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Lys Asp Ser Ala
 85 90 95
 40 Lys Asn Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 100 105 110
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser
 115 120 125
 Arg Asn Gly Tyr Ser Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 45 130 135 140
 Ser
 145
 <210> 72

<211> 435
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 5 <223> 4856gH20 V-область с сигнальной последовательностью (экспрессия в E. coli)
 <400> 72
 atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa 60
 gctgagggttc agctggtcga gtctggaggc gggcttgtca aacctggagg gagcctgcgt 120
 ctctcttgtg cagcaagcgg cttcagcctg tcctcttacg atatgtcctg ggtgcgccag 180
 10 gcacctggga agggcctgga gtggatttct attatttatg gcggcagcgg cagcacatgg 240
 tacgcgagct gggcgaaggg ccgtttcacc atgtccaaag acagcgcaaa gaatagcgtg 300
 tacctccaga tgaactctct ccgcgcagag gacacagcag tctattactg tgcgcggggc 360
 cgcgatgcag gcgcggggcg cagccgcaat gggatatagcc tgtggggaca ggggaccctt 420
 gtgacagtct cgagc 435
 15 <210> 73
 <211> 227
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 20 <223> 4856 gH20 Fab тяжелая цепь
 <400> 73
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
 25 20 25 30
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Ser Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Ala
 50 55 60
 30 Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Lys Asp Ser Ala Lys Asn Ser Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asn Gly Tyr Ser
 35 100 105 110
 Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 130 135 140
 40 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 45 180 185 190
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 195 200 205
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro

	210	215	220
	Lys Ser Cys		
	225		
	<210> 74		
5	<211> 681		
	<212> ДНК		
	<213> Искусственная последовательность		
	<220>		
	<223> 4856 gH20 Fab тяжелая цепь (V + человеческая гамма1 CH1) (экспрессия в млекоп.		
10	<400> 74		
	gaagtgcaac tgggtggaag cggaggaggt ttggtgaaac cgggagggtc actgcggtc	60	
	tcctgtgccg cctccggatt cagcctctcg tcctacgaca tgagctgggt cagacaggcc	120	
	cccgggaagg gcctggagtg gatttccatc atctacggcg gctccggctc gacttggtac	180	
	gcttcgtggg ccaagggacg gttcaccatg tccaaggatt ccgcgaagaa cagcgtgtat	240	
15	ctgcagatga actctctgcg ggccgaggac accgcagtgt actactgcgc gagggggcgc	300	
	gacgccggcg ccgggggac acgcaacggt tactcccttt ggggacaggg aaccctggtc	360	
	actgtctcca gcgcttctac aaaggggcca tcggtcttcc ccctggcacc ctctccaag	420	
	agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc tgccctggta aggactactt ccccgaaaccg	480	
	gtgacggtgt cgtggaactc aggcgccctg accagcggcg tgacacactt cccggctgtc	540	
20	ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg	600	
	ggcaccacaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag	660	
	aaagttgagc ccaaactctt t	681	
	<210> 75		
	<211> 681		
25	<212> ДНК		
	<213> Искусственная последовательность		
	<220>		
	<223> 4856 gH20 Fab тяжелая цепь (V + человеческая гамма-1 CH1) (экспрессия в Е. со		
	<400> 75		
30	gaggttcagc tgggtcgagtc tggaggcggg cttgtcaaac ctggagggag cctgcgtctc	60	
	tcttgtgcag caagcggctt cagcctgtcc tcttacgata tgcctgggt gcgccaggca	120	
	cctgggaagg gcctggagtg gatttctatt atttatggcg gcagcggcag cacatggtac	180	
	gcgagctggg cgaagggccg ttccaccatg tccaaagaca gcgcaaagaa tagcgtgtac	240	
	ctccagatga actctctccg cgcagaggac acagcagtct attactgtgc gcggggccgc	300	
35	gatgcaggcg cgggcggcag ccgcaatggg tatagcctgt ggggacaggg gacccttgtg	360	
	acagtctcga gcgcttctac aaaggggcca tcggtcttcc ccctggcacc ctctccaag	420	
	agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc tgccctggta aggactactt ccccgaaaccg	480	
	gtgacggtgt cgtggaactc aggcgccctg accagcggcg tgacacactt cccggctgtc	540	
	ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg	600	
40	ggcaccacaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtcgacaag	660	
	aaagttgagc ccaaactctt t	681	
	<210> 76		
	<211> 245		
	<212> Белок		
45	<213> Искусственная последовательность		
	<220>		
	<223> 4856 gH20 Fab тяжелая цепь с сигнальной последовательностью (экспрессия в мле		
	<400> 76		

RU 2746926 C2

	Met	Lys	Trp	Val	Thr	Phe	Ile	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Phe	Ser	Ser	Ala	
	1				5					10					15		
	Tyr	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	
				20					25					30			
5	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	
			35					40					45				
	Ser	Tyr	Asp	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	
		50					55					60					
	Trp	Ile	Ser	Ile	Ile	Tyr	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser	Thr	Trp	Tyr	Ala	Ser	
10	65					70					75					80	
	Trp	Ala	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Met	Ser	Lys	Asp	Ser	Ala	Lys	Asn	Ser	
					85					90					95		
	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	
				100					105					110			
15	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Arg	Asp	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Ser	Arg	Asn	Gly	
			115					120					125				
	Tyr	Ser	Leu	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	
			130					135					140				
	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	
20	145					150					155					160	
	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	
					165					170					175		
	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	
				180					185					190			
25	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	
			195					200					205				
	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	
			210					215				220					
	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	
30	225					230					235					240	
	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys												
					245												
	<210>	77															
	<211>	735															
35	<212>	ДНК															
	<213>	Искусственная последовательность															
	<220>																
	<223>	4856 gH20 Fab тяжелая цепь с сигнальной последовательностью (экспрессия в мле															
	<400>	77															
40	atgaagtggg	tcaccttcat	ctccctgctg	tttctgttct	ccagcgccta	ctccgaagtg											60
	caactggtgg	aaagcggagg	aggtttggtg	aaaccgggag	ggtcactgcg	gctctcctgt											120
	gccgcctccg	gattcagcct	ctcgtcctac	gacatgagct	gggtcagaca	ggcccccg											180
	aagggcctgg	agtggatttc	catcatctac	ggcggctccg	gctcgacttg	gtacgcttcg											240
	tgggccaagg	gacggttcac	catgtccaag	gattccgcga	agaacagcgt	gtatctgcag											300
45	atgaactctc	tgcgggccga	ggacaccgca	gtgtactact	gcgcgagggg	gcgcgacgcc											360
	ggcgccgggg	gatcacgcaa	cggttactcc	ctttggggac	agggaaccct	ggtcactgtc											420
	tccagcgctt	ctacaaaggg	cccacgggtc	ttccccctgg	caccctcctc	caagagcacc											480
	tctgggggca	cagcggccct	gggctgcctg	gtcaaggact	acttccccga	accggtgacg											540

gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag 600
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc 660
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt 720
gagcccaaat cttgt 735

5 <210> 78
<211> 248
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность
<220>

10 <223> 4856 gH20 Fab тяжелая цепь с сигнальной последовательностью (экспрессия в E.
<400> 78

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15
Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
15 20 25 30
Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35 40 45
Ser Leu Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60
20 Gly Leu Glu Trp Ile Ser Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp
65 70 75 80
Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Lys Asp Ser Ala
85 90 95
Lys Asn Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
25 100 105 110
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser
115 120 125
Arg Asn Gly Tyr Ser Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
130 135 140
30 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
145 150 155 160
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
165 170 175
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
35 180 185 190
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
195 200 205
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
210 215 220
40 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
225 230 235 240
Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
245

<210> 79
45 <211> 744
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>

<223> 4856 gH20 Fab тяжелая цепь с сигнальной последовательностью (экспрессия в E.
 <400> 79

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa 60
 gctgagggttc agctggtcga gtctggaggc gggcttgta aacctggagg gagcctgcgt 120
 5 ctctcttgtg cagcaagcgg cttcagcctg tcctcttacg atatgtcctg ggtgcgccag 180
 gcacctggga agggcctgga gtggatttct attatttatg gcggcagcgg cagcacatgg 240
 tacgcgagct gggcgaaggg ccgtttcacc atgtccaaag acagcgcaaa gaatagcgtg 300
 tacctccaga tgaactctct ccgcgcagag gacacagcag tctattactg tgcgcggggc 360
 cgcgatgcag gcgcggggcg cagccgcaat gggatatagc tgtggggaca ggggaccctt 420
 10 gtgacagtct cgagcgcttc taaaaagggc ccatcggtct tccccctggc accctcctcc 480
 aagagcacct ctggggggcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 540
 ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggtc 600
 gtccctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 660
 ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtcgac 720
 15 aagaaagtgt agcccaaatac ttgt 744

<210> 80
 <211> 124
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

20 <220>
 <223> 4856gH23 V-область
 <400> 80

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 25 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Ala
 30 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Lys Asn Ser Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 35 Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asn Ala Tyr Ser
 100 105 110
 Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 81
 40 <211> 372
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> 4856gH23 V-область

45 <400> 81

gaagtgaac tgggtgaaaag cggaggaggt ttggtgaaac cgggagggtc actgcggctc 60
 tcctgtgccg cctccggatt cagcctctcg tcctacgaca tgagctgggt cagacaggcc 120
 cccgggaagg gcctggagtg gattgggtatc atctacggcg gctccggctc gacttggtag 180

gcttcgtggg ccaagggacg gttcaccatc tcccgcgatt ccgcgaagaa cagcgtgtat 240
ctgcagatga actctctgcg ggccgaggac accgcagtgt actactgcgc gagggggcgc 300
gacgccggcg ccgggggatc acgcaacgcc tactcccttt ggggacaggg aaccctggtc 360
actgtctcca gc 372

5 <210> 82
<211> 372
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>

10 <223> 4856gH23 V-область (экспрессия в E. coli)
<400> 82

gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtcaaac ctggagggag cctgcgtctc 60
tcttgtgcag caagcggctt cagcctgtcc tcttacgata tgtcctgggt gcgccaggca 120
cctgggaagg gcctggagtg gattggcatt atttatggcg gcagcggcag cacatggtac 180
15 gcgagctggg cgaagggccg ttccaccatc tcccgggaca gcgcaaagaa tagcgtgtac 240
ctccagatga actctctccg cgcagaggac acagcagtct attactgtgc gcggggccgc 300
gatgcaggcg cgggcggcag ccgcaacgcg tatagcctgt ggggacaggg gacccttgtg 360
acagtctcga gc 372

<210> 83

20 <211> 142
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность
<220>

<223> 4856gH23 V-область с сигнальной последовательностью (экспрессия в млекопитающих)
25 <400> 83

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15
Tyr Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro
20 25 30
30 Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser
35 40 45
Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60
Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser
35 65 70 75 80
Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Lys Asn Ser
85 90 95
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110
40 Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asn Ala
115 120 125
Tyr Ser Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 84

45 <211> 426
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>

<223> 4856gH23 V-область с сигнальной последовательностью (экспрессия в млекопитающ

<400> 84

atgaagtggg tcaccttcat ctccctgctg tttctgttct ccagcgccta ctccgaagtg 60

caactggtgg aaagcggagg aggtttggtg aaaccgggag ggtcactgcg gctctcctgt 120

5 gccgcctccg gattcagcct ctcgctctac gacatgagct gggtcagaca ggcccccggg 180

aagggcctgg agtggattgg tatcatctac ggcgggtccg gctcgacttg gtacgcttcg 240

tgggccaagg gacggttcac catctccgcg gattccgcga agaacagcgt gtatctgcag 300

atgaactctc tgcggggccga ggacaccgca gtgtactact gcgcgagggg gcgcgacgcc 360

ggcgccgggg gatcacgcaa cgcctactcc ctttggggac agggaaccct ggtcactgtc 420

10 tccagc 426

<210> 85

<211> 145

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

15 <220>

<223> 4856gH23 V-область с сигнальной последовательностью (экспрессия в E. coli)

<400> 85

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala

1 5 10 15

20 Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu

20 25 30

Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe

35 40 45

Ser Leu Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys

25 50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp

65 70 75 80

Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala

85 90 95

30 Lys Asn Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr

100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser

115 120 125

Arg Asn Ala Tyr Ser Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

35 130 135 140

Ser

145

<210> 86

<211> 435

40 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> 4856gH23 V-область с сигнальной последовательностью (экспрессия в E. coli)

<400> 86

45 atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa 60

gctgaggttc agctggtcga gtctggaggc gggcttgctc aacctggagg gagcctgcgt 120

ctctcttggtg cagcaagcgg cttcagcctg tcctcttacg atatgtcctg ggtgcgccag 180

gcacctggga agggcctgga gtggattggc attatttatg gcggcagcgg cagcacatgg 240

tacgcgagct gggcgaaggg ccgtttcacc atctcccggg acagcgcaaa gaatagcgtg 300
 tacctccaga tgaactctct ccgcgcagag gacacagcag tctattactg tgcgcggggc 360
 cgcgatgcag gcgcgggagg cagccgcaac gcgtatagcc tgtggggaca ggggaccctt 420
 gtgacagtct cgagc 435

5 <210> 87
 <211> 227
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

10 <223> 4856 gH23 Fab тяжелая цепь (V + человеческая гамма-1 CH1)
 <400> 87

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
 15 20 25 30
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Ala
 50 55 60

20 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Lys Asn Ser Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asn Ala Tyr Ser
 25 100 105 110
 Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 130 135 140

30 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 35 180 185 190
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 195 200 205
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 210 215 220

40 Lys Ser Cys
 225
 <210> 88
 <211> 681
 <212> ДНК
 45 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> 4856 gH23 Fab тяжелая цепь (V + человеческая гамма-1 CH1) (экспрессия в млеко
 <400> 88

	gaagtgcaac tgggtggaaaag cggaggaggt ttggtgaaac cgggaggggtc actgcggtctc	60
	tcctgtgccg cctccggatt cagcctctcg tcctacgaca tgagctgggt cagacaggcc	120
	cccgggaagg gcctggagtg gatttggtatc atctacggcg gctccgggtc gacttggtac	180
	gcttcgtggg ccaagggacg gttcaccatc tcccgcgatt ccgcgaagaa cagcgtgtat	240
5	ctgcagatga actctctgcg ggccgaggac accgcagtgt actactgcg cagggggcg	300
	gacgccggcg ccgggggac acgcaacgcc tactcccttt ggggacaggg aaccctggtc	360
	actgtctcca gcgcttctac aaaggggcca tcggtcttcc ccctggcacc ctctccaag	420
	agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc tgcttggtca aggactactt ccccgaaccg	480
	gtgacggtgt cgtggaactc aggcgccctg accagcggcg tgacacactt cccggctgtc	540
10	ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg	600
	ggcaccacaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag	660
	aaagttgagc ccaaactctt t	681
	<210> 89	
	<211> 681	
15	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> 4856 gH23 Fab тяжелая цепь (V + человеческая гамма-1 CH1) (экспрессия в Е. со	
	<400> 89	
20	gaggttcagc tgggtcagtc tggaggcggg cttgtcaaac ctggaggag cctgctctc	60
	tcttgtagcag caagcggctt cagcctgtcc tcttacgata tgcctgggt gcgccaggca	120
	cctgggaagg gcctggagtg gattggcatt atttatggcg gcagcggcag cacatggtag	180
	gcgagctggg cgaagggccg ttccaccatc tcccgggaca gcgcaaagaa tagcgtgtac	240
	ctccagatga actctctccg cgcagaggac acagcagtct attactgtgc gcggggccgc	300
25	gatgcaggcg ccggcggcag ccgcaacgcg tatagcctgt ggggacaggg gacccttgtg	360
	acagtctcga gcgcttctac aaaggggcca tcggtcttcc ccctggcacc ctctccaag	420
	agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc tgcttggtca aggactactt ccccgaaccg	480
	gtgacggtgt cgtggaactc aggcgccctg accagcggcg tgacacactt cccggctgtc	540
	ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg	600
30	ggcaccacaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtcgacaag	660
	aaagttgagc ccaaactctt t	681
	<210> 90	
	<211> 245	
	<212> Белок	
35	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> 4856 gH23 Fab тяжелая цепь с сигнальной последовательностью (экспрессия в мле	
	<400> 90	
	Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala	
40	1 5 10 15	
	Tyr Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro	
	20 25 30	
	Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser	
	35 40 45	
45	Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu	
	50 55 60	
	Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser	
	65 70 75 80	

RU 2746926 C2

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Lys Asn Ser
85 90 95
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110
5 Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asn Ala
115 120 125
Tyr Ser Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
130 135 140
10 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
145 150 155 160
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
165 170 175
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
180 185 190
15 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
195 200 205
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
210 215 220
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
20 225 230 235 240
Glu Pro Lys Ser Cys
245
<210> 91
<211> 735
25 <212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> 4856 gH23 Fab тяжелая цепь с сигнальной последовательностью (экспрессия в мле
<400> 91
30 atgaagtggg tcaccttcat ctccctgctg tttctgttct ccagcgccta ctccgaagtg 60
caactggtgg aaagcggagg aggtttggtg aaaccgggag ggtcactgcg gctctcctgt 120
gccgcctccg gattcagcct ctcgctctac gacatgagct gggtcagaca ggcccccggg 180
aagggcctgg agtggtattg tatcatctac ggcgggctccg gctcgacttg gtacgcttcg 240
tgggccaagg gacggttcac catctcccgc gattccgcga agaacagcgt gtatctgcag 300
35 atgaactctc tgcggggccga ggacaccgca gtgtactact gcgcgagggg gcgcgacgcc 360
ggcgccgggg gatcacgcaa cgcctactcc ctttggggac agggaaacct ggtcactgtc 420
tccagcgctt ctacaaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc 480
tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 540
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag 600
40 tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc 660
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag ccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt 720
gagcccaaat cttgt 735
<210> 92
<211> 248
45 <212> Белок
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> 4856 gH23 Fab тяжелая цепь с сигнальной последовательностью (экспрессия в Е.

<400> 92

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15
Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
5 20 25 30
Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35 40 45
Ser Leu Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60
10 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp
65 70 75 80
Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala
85 90 95
Lys Asn Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
15 100 105 110
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser
115 120 125
Arg Asn Ala Tyr Ser Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
130 135 140
20 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
145 150 155 160
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
165 170 175
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
25 180 185 190
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
195 200 205
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
210 215 220
30 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
225 230 235 240
Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
245

<210> 93

<211> 744

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> 4856 gH23 Fab тяжелая цепь с сигнальной последовательностью (экспреция в E.

<400> 93

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa 60
gctgaggttc agctggtcga gtctggaggc gggcttgta aacctggagg gagcctgcgt 120
ctctcttggtg cagcaagcgg cttcagcctg tcctcttacg atatgtcctg ggtgcgccag 180
gcacctggga agggcctgga gtggattggc attatttatg gcggcagcgg cagcacatgg 240
45 tacgcgagct gggcgaaggg ccgtttcacc atctcccggg acagcgcaaa gaatagcgtg 300
tacctccaga tgaactctct ccgcgcagag gacacagcag tctattactg tgcgcggggc 360
cgcgatgcag gcgcggggcg cagccgcaac gcgtatagcc tgtggggaca ggggaccctt 420
gtgacagtct cgagcgcttc taaaaagggc ccatcggtct tccccctggc accctcctcc 480

aagagcacct ctggggggcac agcgggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 540
 ccggtgacgg tgtcgtggaa ctacggcgcc ctgaccagcg gctgacacac cttcccggct 600
 gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 660
 ttggggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggctcgac 720
 5 aagaaagttg agcccaaatac ttgt 744
 <210> 94
 <211> 124
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 10 <220>
 <223> 4856gH29 V-область
 <400> 94
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 15 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Ala
 20 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Lys Asn Ser Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 25 Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asp Gly Tyr Ser
 100 105 110
 Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 95
 30 <211> 372
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> 4856gH29 V-область (экспрессия в млекопитающих)
 35 <400> 95
 gaagtgaac tgggtgaaaag cggaggaggt ttggtgaaac cgggagggtc actgcggtc 60
 tcctgtgccg cctccggatt cagcctctcg tcctacgaca tgagctgggt cagacaggcc 120
 cccgggaagg gcctggagtg gattgggtatc atctacggcg gctccgggtc gacttggtac 180
 gcttcgtggg ccaagggacg gttcaccatc tcccgcgatt ccgcgaagaa cagcgtgtat 240
 40 ctgcagatga actctctcgc ggccgaggac accgcagtgt actactgcgc gagggggcgc 300
 gacgccggcg ccgggggatc acgcgacggt tactcccttt ggggacaggg aacctggtc 360
 actgtctcca gc 372
 <210> 96
 <211> 372
 45 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> 4856gH29 V-область (экспрессия в E. coli)

<400> 96
gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtcaaac ctggaggag cctgcgtctc 60
tcttgtgcag caagcggtt cagcctgtcc tcttacgata tgtcctgggt gcgccaggca 120
cctgggaagg gcctggagtg gattggcatt atttatggcg gcagcggcag cacatggtac 180
5 gcgagctggg cgaagggccg tttcaccatc tcccgggaca gcgcaaagaa tagcgtgtac 240
ctccagatga actctctccg cgcagaggac acagcagtct attactgtgc gcggggccgc 300
gatgcaggcg cgggcggcag ccgcgatggg tatagcctgt ggggacaggg gacccttgtg 360
acagtctcga gc 372

<210> 97
10 <211> 142
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> 4856gH29 V-область с сигнальной последовательностью (экспрессия в млекопитающ

15 <400> 97
Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15
Tyr Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro
20 20 25 30
20 Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser
35 40 45
Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60
Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser
25 65 70 75 80
Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Lys Asn Ser
85 90 95
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110
30 Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asp Gly
115 120 125
Tyr Ser Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 98
35 <211> 426
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> 4856gH29 V-область с сигнальной последовательностью (экспрессия в млекопитающ

40 <400> 98
atgaagtggg tcaccttcat ctccctgctg tttctgttct ccagcgccta ctccgaagtg 60
caactggtgg aaagcggagg aggtttggtg aaaccgggag ggtcactgcg gctctcctgt 120
gccgcctccg gattcagcct ctcgctctac gacatgagct gggtcagaca ggcccccg 180
aagggcctgg agtggattgg tatcatctac ggcggctccg gctcgacttg gtacgcttcg 240
45 tgggccaagg gacggttcac catctcccg cgttccgcga agaacagcgt gtatctgcag 300
atgaactctc tgcggggccga ggacaccgca gtgtactact gcgcgagggg gcgcgacgcc 360
ggcgccgggg gatcacgcga cggttactcc ctttggggac agggaaccct ggtcactgtc 420
tccagc 426

<210> 99
 <211> 145
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 5 <220>
 <223> 4856gH29 V-область с сигнальной последовательностью (экспрессия в E. coli)
 <400> 99
 Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
 1 5 10 15
 10 Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 20 25 30
 Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 35 40 45
 Ser Leu Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 15 50 55 60
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp
 65 70 75 80
 Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala
 85 90 95
 20 Lys Asn Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 100 105 110
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser
 115 120 125
 Arg Asp Gly Tyr Ser Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 25 130 135 140
 Ser
 145
 <210> 100
 <211> 435
 30 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> 4856gH29 V-область с сигнальной последовательностью (экспрессия в E. coli)
 <400> 100
 35 atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa 60
 gctgaggttc agctggtcga gtctggaggc gggcttgta aacctggagg gacacctgct 120
 ctctcttggtg cagcaagcgg cttcagcctg tcctcttacg atatgtcctg ggtgcgccag 180
 gcacctggga agggcctgga gtggattggc attatttatg gcggcagcgg cagcacatgg 240
 tacgcgagct gggcggaagg ccgtttcacc atctcccggg acagcgcaaa gaatagcgtg 300
 40 tacctccaga tgaactctct ccgcgcagag gacacagcag tctattactg tgcgcggggc 360
 cgcgatgcag gcgcggggcg cagccgcgat gggatatagc tgtggggaca ggggaccctt 420
 gtgacagtct cgagc 435
 <210> 101
 <211> 227
 45 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> 4856 gH29 Fab тяжелая цепь (V + человеческая гамма-1 CH1)

<400> 101
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
 5 20 25 30
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Ala
 50 55 60
 10 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Lys Asn Ser Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asp Gly Tyr Ser
 15 100 105 110
 Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 130 135 140
 20 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 25 180 185 190
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 195 200 205
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 210 215 220
 30 Lys Ser Cys
 225
 <210> 102
 <211> 681
 <212> ДНК
 35 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> 4856 gH29 Fab тяжелая цепь (V + человеческая гамма-1 CH1) (экспрессия в млеко
 <400> 102
 gaagtgcaac tgggtgaaaag cggaggaggt ttggtgaaac cgggaggggtc actgcggtc 60
 40 tcctgtgccg cctccggatt cagcctctcg tcctacgaca tgagctgggt cagacaggcc 120
 cccgggaagg gcctggagtg gatttggtatc atctacggcg gctccgggtc gacttggtac 180
 gcttcgtggg ccaagggacg gttcaccatc tcccgcgatt ccgcgaagaa cagcgtgtat 240
 ctgcagatga actctctgcg ggccgaggac accgcagtgt actactgcgc gagggggcgc 300
 gacgccggcg ccgggggac acgcgacgggt tactcccttt ggggacaggg aaccctgggtc 360
 45 actgtctcca gcgcttctac aaagggccca tcggtcttcc ccctggcacc ctctccaag 420
 agcacctctg ggggcacacg ggccctgggc tgctgggtca aggactactt ccccgaaccg 480
 gtgacggtgt cgtggaactc aggcgccctg accagcggcg tgacacactt cccggctgtc 540
 ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtgggtga ccgtgccctc cagcagcttg 600

ggcaccacaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 660
aaagttgagc ccaaactcttg t 681
<210> 103
<211> 681
5 <212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> 4856 gH29 Fab тяжелая цепь (V + человеческая гамма-1 CH1) (экспрессия в E. со
<400> 103
10 gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtcaaac ctggagggag cctgcgctctc 60
tcttgtgcag caagcggcctt cagcctgtcc tcttacgata tgtcctgggt gcgccaggca 120
cctgggaagg gcctggagtg gattggcatt atttatggcg gcagcggcag cacatggtac 180
gcgagctggg cgaaggggccg tttcaccatc tcccgggaca gcgcaaagaa tagcgtgtac 240
ctccagatga actctctccg cgcagaggac acagcagtct attactgtgc gcggggccgc 300
15 gatgcaggcg cgggcggcag ccgcgatggg tatagcctgt ggggacaggg gacccttgtg 360
acagtctcga gcgcttctac aaagggccca tcggtcttcc ccctggcacc ctctccaag 420
agcacctctg ggggcacacg gccctgggc tgcttggtca aggactactt cccgaaccg 480
gtgacggtgt cgtggaactc aggcgccttg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc 540
ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg 600
20 ggcaccacaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtcgacaag 660
aaagttgagc ccaaactcttg t 681
<210> 104
<211> 245
<212> Белок
25 <213> Искусственная последовательность
<220>
<223> 4856 gH29 Fab тяжелая цепь с сигнальной последовательностью (экспрессия в мле
<400> 104
Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
30 1 5 10 15
Tyr Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro
20 25 30
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser
35 35 40 45
Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60
Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser
65 70 75 80
Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Lys Asn Ser
40 85 90 95
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110
Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asp Gly
115 120 125
45 Tyr Ser Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
130 135 140
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
145 150 155 160

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
165 170 175
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
180 185 190
5 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
195 200 205
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
210 215 220
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
10 225 230 235 240
Glu Pro Lys Ser Cys
245
<210> 105
<211> 735
15 <212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> 4856 gH29 Fab тяжелая цепь с сигнальной последовательностью (экспреессия в мле
<400> 105
20 atgaagtggg tcaccttcat ctccctgctg tttctgttct ccagcgccta ctccgaagtg 60
caactggtgg aaagcggagg aggtttggtg aaaccgggag ggtcactgcg gctctcctgt 120
gccgcctccg gattcagcct ctcgctctac gacatgagct gggtcagaca ggccccggg 180
aagggcctgg agtggtattg tatcatctac ggcggtccg gctcgacttg gtacgcttcg 240
tgggccaagg gacggttcac catctcccg c gattccgcga agaacagcgt gtatctgcag 300
25 atgaactctc tgcggggccga ggacaccgca gtgtactact gcgcgagggg gcgcgacgcc 360
ggcgccgggg gatcacgcga cggttactcc ctttggggac agggaaccct ggtcactgtc 420
tccagcgctt ctacaaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctctc caagagcacc 480
tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 540
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag 600
30 tctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc 660
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt 720
gagcccaaat cttgt 735
<210> 106
<211> 248
35 <212> Белок
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> 4856 gH29 Fab тяжелая цепь с сигнальной последовательностью (экспреессия в Е.
<400> 106
40 Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15
Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30
Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
45 35 40 45
Ser Leu Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp

RU 2 746 926 C2

	65				70					75					80	
	Tyr	Ala	Ser	Trp	Ala	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Ser	Ala
					85					90					95	
	Lys	Asn	Ser	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr
5				100					105					110		
	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Arg	Asp	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Ser
				115				120					125			
	Arg	Asp	Gly	Tyr	Ser	Leu	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser
				130				135					140			
10	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser
	145					150				155					160	
	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp
					165					170					175	
	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr
15				180					185					190		
	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr
				195				200					205			
	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln
				210				215					220			
20	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp
	225					230					235				240	
	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys								
					245											
	<210>	107														
25	<211>	744														
	<212>	ДНК														
	<213>	Искусственная последовательность														
	<220>															
	<223>	4856 gH29 Fab тяжелая цепь с сигнальной последовательностью (экспрессия в E.														
30	<400>	107														
	atgaagaaga	ctgctatagc	aattgcagtg	gcgctagctg	gtttcgccac	cgtggcgcaa									60	
	gctgaggttc	agctggtcga	gtctggaggc	gggcttgta	aacctggagg	gagcctgcgt									120	
	ctctcttggtg	cagcaagcgg	cttcagcctg	tcctcttacg	atatgtcctg	ggtgcgccag									180	
	gcacctggga	agggcctgga	gtggattggc	attattttatg	gcggcagcgg	cagcacatgg									240	
35	tacgcgagct	gggcgaaggg	ccgtttcacc	atctcccggg	acagcgcaaa	gaatagcgtg									300	
	tacctccaga	tgaactctct	ccgcgcagag	gacacagcag	tctattactg	tgcgcggggc									360	
	cgcgatgcag	gcgcggggcgg	cagccgcgat	gggtatagcc	tgtggggaca	ggggaccctt									420	
	gtgacagtct	cgagcgcttc	tacaaagggc	ccatcgggtct	tccccctggc	accctcctcc									480	
	aagagcacct	ctggggggcac	agcggccctg	ggctgcctgg	tcaaggacta	cttccccgaa									540	
40	ccggtgacgg	tgtcgtggaa	ctcaggcgcc	ctgaccagcg	gcgtgcacac	cttccccggct									600	
	gtcctacagt	cctcaggact	ctactccctc	agcagcgtgg	tgaccgtgcc	ctccagcagc									660	
	ttgggcaccc	agacctacat	ctgcaacgtg	aatcacaagc	ccagcaaacac	caaggtcgac									720	
	aagaaaagttg	agcccaaata	ttgt												744	
	<210>	108														
45	<211>	262														
	<212>	Белок														
	<213>	Искусственная последовательность														
	<220>															

<223> 4856 scFv

<400> 108

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30
Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Ile Ile Tyr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Ala
10 50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Lys Asn Ser Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
15 Ala Arg Gly Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Ser Arg Asn Gly Tyr Ser
100 105 110
Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 130 135 140
Ala Tyr Asp Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
145 150 155 160
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Ser Gly
165 170 175
25 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
180 185 190
Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
195 200 205
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
30 210 215 220
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Trp Thr Asp Gly Gly
225 230 235 240
Ile Asp Asn Pro Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
245 250 255
35 Glu Asn Leu Tyr Phe Gln
260

<210> 109

<211> 107

<212> Белок

40 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Человеческий IGKV1-5 JK4 акцепторный каркас

<400> 109

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

	35		40		45	
	Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu 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
	Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Leu					
		85		90		95
	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys					
		100		105		
10	<210> 110					
	<211> 321					
	<212> ДНК					
	<213> Искусственная последовательность					
	<220>					
15	<223> Человеческий IGKV1-5 JK4 акцепторный каркас					
	<400> 110					
	gacatccaga tgacccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc				60	
	atcacttgcc gggccagtca gagtattagt agctgggttg cctggtatca gcagaaacca				120	
	gggaaagccc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca				180	
20	aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttactctca ccatcagcag cctgcagcct				240	
	gatgatatttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt attctctcac tttcggcgga				300	
	gggaccaagg tggagatcaa a				321	
	<210> 111					
	<211> 114					
25	<212> Белок					
	<213> Искусственная последовательность					
	<220>					
	<223> Человеческий IGHV3-21 JH5 акцепторный каркас					
	<400> 111					
30	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly					
	1 5 10 15					
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr					
	20 25 30					
	Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val					
35	35 40 45					
	Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val					
	50 55 60					
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr					
	65 70 75 80					
40	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
	85 90 95					
	Ala Arg Asn Trp Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val					
	100 105 110					
	Ser Ser					
45	<210> 112					
	<211> 342					
	<212> ДНК					
	<213> Искусственная последовательность					

<220>

<223> Человеческий IGHV3-21 JH5 акцепторный каркас

<400> 112

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ctggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 5 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta catatactac 180
 gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240
 ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaaactgg 300
 ttcgactcct gggggccaagg aaccctggtc accgtctcct ca 342

10 <210> 113

<211> 361

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

15 <223> Человеческий LAP и TGFb1

<400> 113

Leu Ser Thr Cys Lys Thr Ile Asp Met Glu Leu Val Lys Arg Lys Arg
 1 5 10 15
 Ile Glu Ala Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Ala Ser
 20 20 25 30
 Pro Pro Ser Gln Gly Glu Val Pro Pro Gly Pro Leu Pro Glu Ala Val
 35 40 45
 Leu Ala Leu Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Arg Val Ala Gly Glu Ser Ala
 50 55 60
 25 Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Ala Asp Tyr Tyr Ala Lys Glu Val Thr
 65 70 75 80
 Arg Val Leu Met Val Glu Thr His Asn Glu Ile Tyr Asp Lys Phe Lys
 85 90 95
 Gln Ser Thr His Ser Ile Tyr Met Phe Phe Asn Thr Ser Glu Leu Arg
 30 100 105 110
 Glu Ala Val Pro Glu Pro Val Leu Leu Ser Arg Ala Glu Leu Arg Leu
 115 120 125
 Leu Arg Leu Lys Leu Lys Val Glu Gln His Val Glu Leu Tyr Gln Lys
 130 135 140
 35 Tyr Ser Asn Asn Ser Trp Arg Tyr Leu Ser Asn Arg Leu Leu Ala Pro
 145 150 155 160
 Ser Asp Ser Pro Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Gly Val Val Arg
 165 170 175
 Gln Trp Leu Ser Arg Gly Gly Glu Ile Glu Gly Phe Arg Leu Ser Ala
 40 180 185 190
 His Cys Ser Cys Asp Ser Arg Asp Asn Thr Leu Gln Val Asp Ile Asn
 195 200 205
 Gly Phe Thr Thr Gly Arg Arg Gly Asp Leu Ala Thr Ile His Gly Met
 210 215 220
 45 Asn Arg Pro Phe Leu Leu Leu Met Ala Thr Pro Leu Glu Arg Ala Gln
 225 230 235 240
 His Leu Gln Ser Ser Arg His Arg Arg Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys
 245 250 255

Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp
260 265 270

Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr
275 280 285

5 His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp
290 295 300

Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly
305 310 315 320

Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro
10 325 330 335

Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn
340 345 350

Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser
355 360

15 <210> 114
<211> 112
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность
<220>

20 <223> зрелый человеческий TGFb1
<400> 114

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys
1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp
25 20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys
35 40 45

Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu
50 55 60

30 Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser
35 100 105 110

<210> 115
<211> 394
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

40 <220>
<223> Человеческий LAP и TGFb2
<400> 115

Leu Ser Thr Cys Ser Thr Leu Asp Met Asp Gln Phe Met Arg Lys Arg
1 5 10 15

45 Ile Glu Ala Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Lys Leu Thr Ser
20 25 30

Pro Pro Glu Asp Tyr Pro Glu Pro Glu Glu Val Pro Pro Glu Val Ile
35 40 45

	Ser	Ile	Tyr	Asn	Ser	Thr	Arg	Asp	Leu	Leu	Gln	Glu	Lys	Ala	Ser	Arg
	50						55					60				
	Arg	Ala	Ala	Ala	Cys	Glu	Arg	Glu	Arg	Ser	Asp	Glu	Glu	Tyr	Tyr	Ala
	65					70					75					80
5	Lys	Glu	Val	Tyr	Lys	Ile	Asp	Met	Pro	Pro	Phe	Phe	Pro	Ser	Glu	Asn
					85					90					95	
	Ala	Ile	Pro	Pro	Thr	Phe	Tyr	Arg	Pro	Tyr	Phe	Arg	Ile	Val	Arg	Phe
					100				105					110		
	Asp	Val	Ser	Ala	Met	Glu	Lys	Asn	Ala	Ser	Asn	Leu	Val	Lys	Ala	Glu
10			115					120					125			
	Phe	Arg	Val	Phe	Arg	Leu	Gln	Asn	Pro	Lys	Ala	Arg	Val	Pro	Glu	Gln
	130					135						140				
	Arg	Ile	Glu	Leu	Tyr	Gln	Ile	Leu	Lys	Ser	Lys	Asp	Leu	Thr	Ser	Pro
	145					150					155					160
15	Thr	Gln	Arg	Tyr	Ile	Asp	Ser	Lys	Val	Val	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu	Gly
					165					170					175	
	Glu	Trp	Leu	Ser	Phe	Asp	Val	Thr	Asp	Ala	Val	His	Glu	Trp	Leu	His
				180				185						190		
	His	Lys	Asp	Arg	Asn	Leu	Gly	Phe	Lys	Ile	Ser	Leu	His	Cys	Pro	Cys
20			195					200					205			
	Cys	Thr	Phe	Val	Pro	Ser	Asn	Asn	Tyr	Ile	Ile	Pro	Asn	Lys	Ser	Glu
	210						215					220				
	Glu	Leu	Glu	Ala	Arg	Phe	Ala	Gly	Ile	Asp	Gly	Thr	Ser	Thr	Tyr	Thr
	225					230					235					240
25	Ser	Gly	Asp	Gln	Lys	Thr	Ile	Lys	Ser	Thr	Arg	Lys	Lys	Asn	Ser	Gly
					245					250					255	
	Lys	Thr	Pro	His	Leu	Leu	Leu	Met	Leu	Leu	Pro	Ser	Tyr	Arg	Leu	Glu
			260					265						270		
	Ser	Gln	Gln	Thr	Asn	Arg	Arg	Lys	Lys	Arg	Ala	Leu	Asp	Ala	Ala	Tyr
30			275					280					285			
	Cys	Phe	Arg	Asn	Val	Gln	Asp	Asn	Cys	Cys	Leu	Arg	Pro	Leu	Tyr	Ile
	290					295						300				
	Asp	Phe	Lys	Arg	Asp	Leu	Gly	Trp	Lys	Trp	Ile	His	Glu	Pro	Lys	Gly
	305					310					315					320
35	Tyr	Asn	Ala	Asn	Phe	Cys	Ala	Gly	Ala	Cys	Pro	Tyr	Leu	Trp	Ser	Ser
					325					330					335	
	Asp	Thr	Gln	His	Ser	Arg	Val	Leu	Ser	Leu	Tyr	Asn	Thr	Ile	Asn	Pro
			340					345						350		
	Glu	Ala	Ser	Ala	Ser	Pro	Cys	Cys	Val	Ser	Gln	Asp	Leu	Glu	Pro	Leu
40			355					360					365			
	Thr	Ile	Leu	Tyr	Tyr	Ile	Gly	Lys	Thr	Pro	Lys	Ile	Glu	Gln	Leu	Ser
	370					375						380				
	Asn	Met	Ile	Val	Lys	Ser	Cys	Lys	Cys	Ser						
	385				390											
45	<210>	116														
	<211>	112														
	<212>	Белок														
	<213>	Искусственная последовательность														

$\langle 220 \rangle$

<223> зрелый человеческий TGFb2

<400> 116

Ala Leu Asp Ala Ala Tyr Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys
1 5 10 15

Leu Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Trp Lys Trp

20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Tyr Leu Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu
50 55 60

Tyr Asn Thr Ile Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro
85 90 95

Lys Ile Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser
100 105 110

<210> 117

<211> 389

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

 $\langle 220 \rangle$

<223> Человеческий LAP и TGFb3

<400> 117

Leu Ser Thr Cys Thr Thr Leu Asp Phe Gly His Ile Lys Lys Lys Arg
1 5 10 15

Val Glu Ala Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Thr Ser

Pro	Pro	Glu	Pro	Thr	Val	Met	Thr	His	Val	Pro	Tyr	Gln	Val	Leu	Ala
		35					40					45			

Leu Tyr Asn Ser Thr Arg Glu Leu Leu Glu Glu Met His Gly Glu Arg
50 55 60

Glu Glu Gly Cys Thr Gln Glu Asn Thr Glu Ser Glu Tyr Tyr Ala Lys
65 70 75 80

Glu Ile His Lys Phe Asp Met Ile Gln Gly Leu Ala Glu His Asn Glu
85 90 95

Leu Ala Val Cys Pro Lys Gly Ile Thr Ser Lys Val Phe Arg Phe Asn
100 105 110

Val	Ser	Ser	Val	Glu	Lys	Asn	Arg	Thr	Asn	Leu	Phe	Arg	Ala	Glu	Phe
		115					120					125			

Arg Val Leu Arg Val Pro Asn Pro Ser Ser Lys Arg Asn Glu Gln Arg
130 135 140

Ile Glu Leu Phe Gln Ile Leu Arg Pro Asp Glu His Ile Ala Lys Gln
145 150 155 160

Arg Tyr Ile Gly Gly Lys Asn Leu Pro Thr Arg Gly Thr Ala Glu Trp
165 170 175

Leu Ser Phe Asp Val Thr Asp Thr Val Arg Glu Trp Leu Leu Arg Arg
180 185 190

RU 2746926 C2

	Glu	Ser	Asn	Leu	Gly	Leu	Glu	Ile	Ser	Ile	His	Cys	Pro	Cys	His	Thr
			195					200					205			
	Phe	Gln	Pro	Asn	Gly	Asp	Ile	Leu	Glu	Asn	Ile	His	Glu	Val	Met	Glu
			210				215					220				
5	Ile	Lys	Phe	Lys	Gly	Val	Asp	Asn	Glu	Asp	Asp	His	Gly	Arg	Gly	Asp
						225		230			235					240
	Leu	Gly	Arg	Leu	Lys	Lys	Gln	Lys	Asp	His	His	Asn	Pro	His	Leu	Ile
					245				250						255	
	Leu	Met	Met	Ile	Pro	Pro	His	Arg	Leu	Asp	Asn	Pro	Gly	Gln	Gly	Gly
10				260					265					270		
	Gln	Arg	Lys	Lys	Arg	Ala	Leu	Asp	Thr	Asn	Tyr	Cys	Phe	Arg	Asn	Leu
			275					280					285			
	Glu	Glu	Asn	Cys	Cys	Val	Arg	Pro	Leu	Tyr	Ile	Asp	Phe	Arg	Gln	Asp
			290				295					300				
15	Leu	Gly	Trp	Lys	Trp	Val	His	Glu	Pro	Lys	Gly	Tyr	Tyr	Ala	Asn	Phe
						305		310			315					320
	Cys	Ser	Gly	Pro	Cys	Pro	Tyr	Leu	Arg	Ser	Ala	Asp	Thr	Thr	His	Ser
					325				330						335	
	Thr	Val	Leu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Thr	Leu	Asn	Pro	Glu	Ala	Ser	Ala	Ser
20				340					345				350			
	Pro	Cys	Cys	Val	Pro	Gln	Asp	Leu	Glu	Pro	Leu	Thr	Ile	Leu	Tyr	Tyr
			355					360					365			
	Val	Gly	Arg	Thr	Pro	Lys	Val	Glu	Gln	Leu	Ser	Asn	Met	Val	Val	Lys
			370				375				380					
25	Ser	Cys	Lys	Cys	Ser											
			385													
	<210>		118													
	<211>		112													
	<212>		Белок													
30	<213>		Искусственная последовательность													
	<220>															
	<223>		зрелый человеческий TGFb3													
	<400>		118													
	Ala	Leu	Asp	Thr	Asn	Tyr	Cys	Phe	Arg	Asn	Leu	Glu	Glu	Asn	Cys	Cys
35	1				5				10					15		
	Val	Arg	Pro	Leu	Tyr	Ile	Asp	Phe	Arg	Gln	Asp	Leu	Gly	Trp	Lys	Trp
			20					25					30			
	Val	His	Glu	Pro	Lys	Gly	Tyr	Tyr	Ala	Asn	Phe	Cys	Ser	Gly	Pro	Cys
			35				40					45				
40	Pro	Tyr	Leu	Arg	Ser	Ala	Asp	Thr	Thr	His	Ser	Thr	Val	Leu	Gly	Leu
		50				55					60					
	Tyr	Asn	Thr	Leu	Asn	Pro	Glu	Ala	Ser	Ala	Ser	Pro	Cys	Cys	Val	Pro
	65				70				75						80	
	Gln	Asp	Leu	Glu	Pro	Leu	Thr	Ile	Leu	Tyr	Tyr	Val	Gly	Arg	Thr	Pro
45					85				90					95		
	Lys	Val	Glu	Gln	Leu	Ser	Asn	Met	Val	Val	Lys	Ser	Cys	Lys	Cys	Ser
			100					105					110			

(57) Формула изобретения

1. Антагонистическое антитело или его связывающий фрагмент, который специфично связывается с человеческим TGF-beta 1, человеческим TGF-beta 2 и человеческим TGF-beta 3, содержащее тяжелую цепь, где переменный домен тяжелой цепи содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4 для CDR-H1, последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5 для CDR-H2, и последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9 для CDR-H3, и содержащее легкую цепь, где переменный домен легкой цепи содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1 для CDR-L1, последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2 для CDR-L2, и последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3 для CDR-L3.

2. Антагонистическое антитело или его связывающий фрагмент по п.1, где антагонистическое антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 80 или SEQ ID NO: 94.

3. Антагонистическое антитело или его связывающий фрагмент по любому из пп.1, 2, где антагонистическое антитело содержит легкую цепь, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38.

4. Антагонистическое антитело или его связывающий фрагмент по любому из пп.1-3, где молекула антагонистического антитела или его связывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из: полной молекулы антитела, имеющей полноразмерные тяжелую и легкую цепи или их фрагменты, например, выбранные из группы, содержащей Fab, модифицированный Fab', Fab', F(ab')₂, Fv и scFv-фрагмент.

5. Антагонистическое антитело, которое специфично связывается с человеческим TGF-beta 1, человеческим TGF-beta 2 и человеческим TGF-beta 3, содержащее тяжелую цепь, имеющую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 80 или SEQ ID NO: 94, и легкую цепь, имеющую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38.

6. Антагонистическое антитело, которое специфично связывается с человеческим TGF-beta 1, человеческим TGF-beta 2 и человеческим TGF-beta 3, содержащее тяжелую цепь, имеющую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 87 или SEQ ID NO: 101, и легкую цепь, имеющую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 45.

7. Антагонистическое антитело или его связывающий фрагмент по любому из пп.1-6, обладающее аффинностью связывания с человеческим TGF-beta 1 200 пМ или лучше, аффинностью связывания с человеческим TGF-beta 2 300 пМ или лучше и аффинностью связывания с человеческим TGF-beta 3 2500 пМ или лучше.

8. Антагонистическое антитело или его связывающий фрагмент по п.7, обладающее аффинностью связывания с человеческим TGF-beta 1 100 пМ или лучше, аффинностью связывания с человеческим TGF-beta 2 200 пМ или лучше и аффинностью связывания с человеческим TGF-beta 3 2000 пМ или лучше.

9. Антагонистическое антитело или его связывающий фрагмент по любому из пп.1-8, отличающееся тем, что в анализе репортерного гена в клетках HEK-SEAP-SBE с рекомбинантным TGF-beta 1, TGF-beta 2 или TGF-beta 3 антитело ингибирует активность человеческого TGF-beta 1 с IC₅₀ 0,5 нМ или лучше, ингибирует активность человеческого TGF-beta 2 с IC₅₀ 0,05 нМ или лучше и ингибирует активность человеческого TGF-beta 3 с IC₅₀ 2 нМ или лучше.

10. Антагонистическое антитело по любому из пп.1-9, где в анализе репортерного гена в клетках HEK-SEAP-SBE с эндогенным TGF-beta антитело ингибирует человеческий

TGF-beta с IC50 10 нМ или лучше.

11. Антагонистическое антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанное антагонистическое антитело представляет собой моноклональное гуманизированное антитело.

5 12. Выделенная последовательность ДНК, кодирующая тяжелую и легкую цепь антитела по любому из пп.1-11.

13. Выделенная последовательность ДНК по п.12, отличающаяся тем, что выделенная последовательность ДНК содержит последовательность ДНК тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 53; SEQ ID NO: 54; SEQ ID NO: 67; SEQ ID NO: 68; SEQ ID NO: 81; SEQ ID NO: 82; SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, и последовательность ДНК легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 40.

14. Выделенная последовательность ДНК по п.12, отличающийся тем, что выделенная последовательность ДНК содержит последовательность ДНК легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 46 или SEQ ID NO: 47, и последовательность ДНК тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 102 или SEQ ID NO: 103.

15. Экспрессирующий вектор, содержащий одну или более последовательностей ДНК по п.13 или 14.

16. Клетка-хозяин для продуцирования антагонистического антитела или его связывающего фрагмента, содержащая один или более экспрессирующих векторов по п.15.

17. Способ получения антагонистического антитела по любому из пп.1-11, включающий культивирование клетки-хозяина по п.16 и выделение антитела.

18. Фармацевтическая композиция для ингибирования биологической сигнальной активности TGF-beta 1, TGF-beta 2 и TGF-beta 3, содержащая эффективное количество антагонистического антитела по любому из пп.1-11 в комбинации с одним или более из фармацевтически приемлемого вспомогательного вещества, разбавителя или носителя.

19. Фармацевтическая композиция по п.18, дополнительно содержащая другие активные ингредиенты.

20. Фармацевтическая композиция по п.18 или 19, отличающаяся тем, что указанная фармацевтическая композиция подходит для ингаляционного введения, например, с помощью распыления, аэрозоля и/или сухого порошка.

21. Применение антагонистического антитела по любому из пп.1-11 или композиции по пп.18-20 при лечении или для профилактики патологического расстройства, которое опосредовано TGF-beta 1, 2 или 3 или которое связано с повышенным уровнем TGF-beta 1, 2 или 3.

22. Применение антитела по любому из пп.1-11 при изготовлении лекарственного средства для лечения или профилактики патологического расстройства, которое опосредовано TGF-beta 1, 2 или 3 или которое связано с повышенным уровнем TGF-beta 1, 2 или 3.

23. Способ лечения пациента, страдающего или подверженного риску патологического расстройства, опосредованного TGF-beta 1, 2 или 3 или связанного с повышенным уровнем TGF-beta 1, 2 или 3, причем способ включает введение пациенту эффективного количества антитела по любому из пп.1-11.

24. Антагонистическое антитело Fab или Fab'-фрагмент по любому из пп.1-11, который связывается человеческим TGF-beta 1, человеческим TGF-beta 2 и человеческим TGF-beta 3, для применения путем ингаляционного введения, например, с помощью распыления, аэрозоля и/или сухого порошка при лечении или для профилактики

легочного расстройства, которое опосредовано TGF-beta 1, 2 или 3 или которое связано с повышенным уровнем TGF-beta 1, 2 или 3.

25. Применение антагонистического антитела Fab или Fab'-фрагмента по любому из пп. 1-11, которое связывается с человеческим TGF-beta 1, человеческим TGF-beta 2 и
5 человеческим TGF-beta 3, в изготовлении лекарственного средства для лечения или профилактики легочного расстройства, которое опосредовано TGF-beta 1, 2 или 3 или которое связано с повышенным уровнем TGF-beta 1, 2 или 3, путем ингаляционного введения, например, с помощью распыления, аэрозоля и/или сухого порошка.

26. Способ лечения пациента, страдающего или подверженного риску легочного
10 расстройства, которое опосредовано TGF-beta 1, 2 или 3 или которое связано с повышенным уровнем TGF-beta 1, 2 или 3, причем способ включает введение пациенту путем ингаляционного введения, например, с помощью распыления, аэрозоля и/или сухого порошка эффективного количества антагонистического антитела Fab или Fab'-фрагмента по любому из пп. 1-11, который связывается с человеческим TGF-beta 1,
15 человеческим TGF-beta 2 и человеческим TGF-beta 3.

27. Антитело по п.24, применение по п. 25 или способ по п. 26, отличающиеся тем, что антитело такое, как определено по любому из пп.1-11.

28. Антитело по п.24, применение по п. 25 или способ по п. 26, отличающиеся тем, что легочное заболевание выбрано из группы, состоящей из фиброза легких, такого
20 как идиопатический фиброз легких, кистозного фиброза или вторичного по отношению к системному склерозу, и легочной гипертензии, такой как легочная артериальная гипертензия.

25

30

35

40

45

ФИГ.1А

Ab 4856

CDRL1

QASESIYSGLA SEQ ID NO: 1

CDRL2

AASDLAS SEQ ID NO: 2

CDRL3

QQTWTDGGIDNP SEQ ID NO: 3

CDRH1

GFSLSSYDMS SEQ ID NO: 4

CDRH2

LIYGGSGSTWYASWAKG SEQ ID NO: 5

CDRH3

GRDGGAGGSRNGYSL SEQ ID NO: 6

CDRH3 вариант 1 - присутствует в gH13 и gH20

GRDAGAGGSRNGYSL SEQ ID NO: 7

CDRH3 вариант 2 - присутствует в gH23

GRDAGAGGSRNAYSL SEQ ID NO: 8

CDRH3 вариант 3 - присутствует в gH29

GRDAGAGGSRDGYSL SEQ ID NO: 9

2/47

ФИГ.1В

VL-область кроличьего Ab 4856 SEQ ID NO: 10

AYDMTQTPAS VEVAVGGT VT IKQASESIY SGLAWYQQTP GQRPKLLIYA
 ASDLASGVPS RFKSGSGSTE YTLTISGV EC ADAATYYCQQ TWTGGIDNP
 FGGGTEVVVK

VL-область кроличьего Ab 4856 SEQ ID NO: 11

gcctatgata tgaccagac tccagcctct gtggaggtag ctgtgggagg
 cacagtcacc atcaagtgc aggccagtga gagcatttac agtggtttgg
 cctggatca gcagacacca gggcagcgtc ccaagctcct gatctatgct
 gcatccgac tggcatctgg ggtcccatcg cgattcaaa gcatgggac
 tgggacagag tacactctca ccatcagcgg cgtggaggtgt gccgatgctg
 ccacttacta ctgtcaacag acttggactg atgggtggtat tgataatcct
 ttggcgagg ggcacgaggt ggtggtcaaa

VL-область кроличьего Ab 4856 с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной
 последовательностью SEQ ID NO: 12

MMRAFTQLL GLLLLNLPGA RCAYDMTQTP ASVEVAVGGT VTIKQASES
 IYSGLAWYQQ TPGQRPKLLI YAASDLASGV PSRFKSGSGS TEYTLTISGV
 ECADAATYYC QQTWTDGGID NPFGGGTEVV VK

VL-область кроличьего Ab 4856 с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной
 последовательностью SEQ ID NO: 13

atgaacatga gggcccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct
cccaggtgcc agatgtgcct atgatatgac ccagactcca gcctctgtgg
 aggtagctgt gggaggcaca gtcaccatca agtgccaggc cagtgaagac
 atttacagt gtttggcctg gtatcagcag acaccagggc agcgtcccaa
 gctctgac tatgtctgat ccgactctggc atctgggggc ccatcgcgat
 tcaaaaggcag tggatctggg acagagtaca ctctcaccat cagcggcgtg
 gagtgtgccc atgtctgccac ttactactgt caacagactt ggactgatgg
 tggattgat aatcctttcg gcgaggaggc cgaggtggtg gtcaaa

VH-область кроличьего Ab 4856 SEQ ID NO: 14

QSLIESGGRL VTPGTPLTLT CTASGFSLS YDMSWVRQAP GKGLEWIGII
 YGGSGSTWYA SWAKGRFTMS KTSTTVDLKI TSPTTEDMAT YFCARGRDGG
 AGGSRNGYSL WGQGTLVTVS S

Rabbit Ab 4856 VH region SEQ ID NO: 15

cagtcgctgg aggagtccgg gggctgcctg gtcacgcctg ggacaccct

3/47

ФИГ.1В (продолжение)

gacactcacc tgcacagcct ctggattctc cctcagcagc tacgacatga
 gctgggtccg ccagggtcca ggggaagggc tggaatggat cggaatcatt
 tatgggtggta gtggtagcac atggtagcgc agctgggcga aaggccgatt
 caccatgtcc aaaacgtcga ccacgggtga tctgaaaatc accagtcgga
 cgaccgagga catgggcacc tatttctgtg ccagaggacg ggatgggtgg
 gctgggtgggt ctcgtaatgg ctattccttg tggggccaag gcaccctggg
 caccgtctcg agt

VH-область кроличьего Ab 4856 с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью SEQ ID NO: 16

MTGLRWLL VAVLKGVCQ SLEESGGRLV TPGTPLTLTC TASGFSLSY
 DMSWVRQAPG KGLEWIGLIY GSGSTWYAS WAKGRFTMSK TSTTVDLKIT
 SPITTEDMATY FCARGRDGGA GSRNGYSLW GQCTLTVSS

VH-область кроличьего Ab 4856 с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью SEQ ID NO: 17

atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaggtgt
ccagtgtcag tcgctggagg agtccggggg tcgctgggtc acgcctggga
 cacccttgac actcacctgc acagcctctg gattctccct cagcagctac
 gacatgagct gggtcgcgca ggctccaggg aaggggctgg aatggatcgg
 aatcatttat ggtggtagtg gtagcacatg gtacgcgagc tgggcgaaag
 gccgattcac catgtccaaa acgtcgacca cggtgatct gaaaatcacc
 agtccgacga ccgaggacat ggccacctat ttctgtgcca gaggacggga
 tgggtggtgt ggtgggtctc gtaatggcta ttctgtgtgg ggccaaggca
 cccgtgtcac cgtctcgagt

Легкая цепь кроличьего Ab 4856 (V + константная) SEQ ID NO: 18

AYDMTQTPAS VEVAVGGTGT IKQCASESIY SGLAWYQQTF GQRPKLLIYA
 ASDLASGVPS RFKSGSGSTE YTLTISGVEC ADAATYYCQQ TWTGGIDNP
 FGGGTEVVVK RTPVAPTCLI FPPAADQVAT GTVTIVCVAN KYFPDVTVTW
 EVDGTTQTG IENSKTPQNS ADCTYNLSST LTLTSTQYNS HKEYTCKVTQ
 GTTSVVQSFN RGDC

Легкая цепь кроличьего Ab 4856 (V + константная) SEQ ID NO: 19

gcctatgata tgacccagac tccagcctct gtggaggtag ctgtgggagg
 cacagtcaac atcaagtgcc aggccagtga gagcatttac agtggtttgg
 cctgggtatca gcagacacca gggcagcgtc ccaagctcct gatctatgot
 gcatccgacg tggcatctgg ggtcccatcg cgattcaaag gcagtggatc
 tgggacagag tacactctca coactcagcg cgtggagtgt gccgatgctg
 ccaattacta ctgtcaacag acttggaact atgggtggat tgataatcct
 ttccggcggag ggcaccgaggt ggtgggtcaaa cgtacgccag ttgcacctac
 tgtctctatc ttcccaccag ctgctgatca ggtggcaact ggaacagtea
 ccatcgtgtg tgtggcgaat aaatacttto ccgatgtcac cgtcacctgg
 gaggtggatg gcaccaacca aacaactggc atcgagaaca gtaaaacacc

4/47

ФИГ.1В (продолжение)

gcagaaattct gcagattgta cctacaacct cagcagcaact ctgacactga
 ccagcacaca gtacaacagc cacaagaggt acacctgcaa ggtgacctag
 ggacagacct cagtcgtcca gagcttcaat aggggtgact gt

Легкая цепь кроличьего Ab 4856 с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью SEQ ID NO: 20

MMRAFTQLL GLLLLWLPGA RCAYDMTQTP ASVEVAVGGT VTIKCQASES
 IYSGLAHYQQ TPGQRPKLLI YAASDLASGV PSRFRGSGSG TEYTLTISGV
 ECADAATYYC QQTWTDGGID NPFGGGTEVV VKRTPVAPT V LIFFPAADQV
 ATCTVTIVCV ANKYFPDVTV TWEVDGTTQT TGIENSKTPQ NSADCTYNLS
 STLTLTSTQY NSHKEYTCRV TQGTTSVVQS FNRGDC

Легкая цепь кроличьего Ab 4856 с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью SEQ ID NO: 21

atgaacatga gggccccac tcagctgctg gggctcctgc tgetctggct
 ccaggtgccc agatgtgcct atgatatgac ccagactcca gcctctgtgg
 aggtagctgt gggaggcaca gtcaccatca agtgccaggc cagttagagc
 atttacagtg gtttgccctg gtatcagcag acaccagggc agcgtcccaa
 gctcctgac tatgtgcat ccgatctggc atctgggggc ccactcgcat
 tcaaaggcag tggatctggg acagagtaca ctctcaccat cagcggcgtg
 gagtgtgccg atgctgccac ttactactgt caacagactt ggactgatgg
 tggattatgat aatcctttcg gcggagggac cgagggtggg gtcaaacgta
 cgccagttgc acctactgtc ctcatcttcc caccagctgc tgatcagggtg
 gcaactggaa cagtcaccat cgtgtgtgtg gcgaataaat actttcccca
 tgtcaccgtc acctgggagg tggatggcac caccacaaca actggcatcg
 agaacagtaa aacaccgcag aattctgcag attgtacct caacctcagc
 agcactctga cactgaccag cacacagtac aacagccaca aagagtacac
 ctgcaagggtg acccagggca cgacctcagt cgtccagagc ttcaataggg
 gtgactgt

Тяжелая цепь кроличьего Ab 4856 Fab SEQ ID NO: 22

QSLEESGGR L VTPGTPLILT CTASGFSLSS YDMSWVRQAP GKGLEWIGLI
 YGGSGSTWYA SWAKGRFTMS KTSTIVDLKI TSPTTEDMAT YFCARGRDGG
 AGGSRNGYSL WQGGTLVTVS SGQPKAPSVF PLAPCCGDTF SSTVTLGCLV
 KGYLPEPVTV TWNSGTLTNG VRTFPSVRQS SGLYSLSSVV SVTSSSQPVT
 CNVAHPAINT KVDKTV

Тяжелая цепь кроличьего Ab 4856 Fab SEQ ID NO: 23

cagtcgctgg aggagtcagg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacacccct
 gacactcacc tgcacagcct ctggattctc cctcagcagc taagacatga
 gctgggtccg ccaggctcca ggggaagggc tggaaatggat cggaatcatt
 tatggtggta gtggtagcac atggtacgcg agctgggcca aaggccgatt
 caccatgtcc aaaacgtoga ccacggtgga tctgaaaatc accagtcoga

5/47

ФИГ.1В (продолжение)

cgaccgagga catggccacc tattttctgtg ccagaggacg ggaatggtggt
 gctggtggtt ctctgaatgg ctattccttg tggggccaag gcaccctggt
 caccgtctcg agtgggcaac ctaaggctcc atcagtcctc ccaactggccc
 cctgctgcgg ggacacaccc agctccacgg tgaccctggg ctgcctggtc
 aaagggtacc tcccggagcc agtgaccgtg acctggaact cgggcaccct
 caccaatggg gtacgcacct tcccgtccgt ccggcagtc tcaaggcctct
 actcgtgag cagcgtggtg agcgtgacct caagcagcca gcccgccacc
 tgcaacgtgg cccacccagc caccaacacc aaagtggaca agaccgtt

Тяжелая цепь кроличьего Ab 4856 Fab с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью SEQ ID NO: 24

METGLRWLL VAVLKGVCQ SLEESGGRLV TPGTPLTLTC TASGFSLSSY
 DMSWVRQAPG KGLEWIGIIY GSGSTWYAS WAKGRFTMSK TSTTVDLKIT
 SPTTDMATY FCARGRDGGA GGSRRNGYSLW GQGLVTVSS GQPKAPSVFP
 LAPCCGDTFS STVTLGCLVK GYLPEPVTVT WNSGTLTNGV RTFFPSVRQSS
 GLYSLSSVVS VTSSSQPVTC NVANPATNTK VDKTV

Тяжелая цепь кроличьего Ab 4856 Fab с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью SEQ ID NO: 25

atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgtgtgc tcaaaaggtg
ccagtgtcag tcgctggagg agtccggggg tcgcctggtc acgcctggga
 caccctgac actcacctgc acagcctctg gattctccct cagcagctac
 gacatgagct gggtcgccca ggctccaggg aaggggctgg aatggatcgg
 aatcatttat ggtggtagtg gtagcacatg gtacgcgagc tgggcgaaaag
 gccgattcac catgtccaaa acgtcgacca cgggtggtatc gaaaatcacc
 agtccgacga ccgaggacat ggccacctat ttctgtgcca gaggacggga
 ttggtggtgct ggtggttctc gtaatggcta ttcttggg ggccaaggca
 ccttggtcac cgtctcagat gggcaacctc aggtccatc agtcttccca
 ctggcccccct gctgcgggga cacaccagc tccacgggta ccttgggctg
 cctgggtcaa ggctacctcc cggagccagt gaccgtgacc tggaaactcg
 gcacccctca caatggggta cgcaccttcc cgtccgtccg gcagtcctca
 ggctcttact cgtgagcag cgtgggtgagc gtgacctcaa gcagccagcc
 cgtcacctgc aacgtggccc acccagccac caacacccaa gtggacaaga
 ccgtt

6/47

ФИГ.1С

V-область муринизированного 4856 mL1.1 SEQ ID NO: 26

AYDMNQSPSS LSASLGDTIT ITCQASESIY SGLAWYQQKP GNIPKLLIYA
 ASDLASGVPS RFKSGSGSTE YTLTISSLQF EDIATYYCQQ TWTGGIDNP
 FGGGTKLEIK

V-область муринизированного 4856 mL1.1 SEQ ID NO: 27

gcctacgaca tgaaccagtc gccatcaagc ctgagcgccct cccttggcga
 caccatcacc attacttgcc aagcctccga aagcatctac tccggactcg
 cctgggtatca gcagaaaccg gggaacattc ccaagctcct gatctacgcc
 gcttccgact tggcatcggg agtgccgtca cggttcaagg ggtccggatc
 gggaaccgag tacaccctga ctatctcttc cctgcaaccg gaggatattg
 cgacctacta ctgtcagcag acttggacgg atggtggaat cgacaaccct
 ttcggtggcg gcaccaagct ggaatcaag

V-область муринизированного 4856 mL1.1 с подчеркнутой и выделенной курсивом
 сигнальной последовательностью SEQ ID NO: 28

MSVPTQVLGL LLLWLTDARC AYDMNQSPSS LSASLGDTIT ITCQASESIY
 SGLAWYQQKP GNIPKLLIYA ASDLASGVPS RFKSGSGSTE YTLTISSLQF
 EDIATYYCQQ TWTGGIDNP FGGGTKLEIK

V-область муринизированного 4856 mL1.1 с подчеркнутой и выделенной курсивом
 сигнальной последовательностью SEQ ID NO: 29

atgtctgtcc ccaaccaagt cctcggactc ctgtactctt ggttacaga
tgccagatgc gcctacgaca tgaaccagtc gccatcaagc ctgagcgccct
 cccttggcga caccatcacc attacttgcc aagcctccga aagcatctac
 tccggactcg cctgggtatca gcagaaaccg gggaacattc ccaagctcct
 gatctacgcc ccttccgact tggcatcggg agtgccgtca cggttcaagg
 ggtccggatc gggaaccgag tacaccctga ctatctcttc cctgcaaccg
 gaggatattg cgacctacta ctgtcagcag acttggacgg atggtggaat
 cgacaaccct ttcggtggcg gcaccaagct ggaatcaag

V-область муринизированного 4856 mH2.1 SEQ ID NO: 30

EVKLLLESGGG LVQPGGSLKL SCTASGFSL SYDMSWVRQA PGKGLEWIGI
 IYGGSGSTWY ASWAKGKFIM SKDSAKNTVY LQMSKVRSED MATYFCARGR
 DGGAGGSRNG YSLWGQGTIV TVSS

V-область муринизированного 4856 mH2.1 SEQ ID NO: 31

gaggtcaagc tgctggaatc ggggggaggt ctggtgcagc cgggcggatc
 tctgaagctg tcatgcaccg catccgggtt tagcctttcg tctacgaca
 tgtcctgggt gcgccaggcc cccggaaagg gattggaatg gatcggcatt
 atctacgggg gctccggttc cacttggtac gcgagctggg ccaaggggaa
 gttcatcatg tcgaaggact ccgctaagaa cacogtgtac ctccaaatga
 gcaaagtcog gacgaggat atggccacct atttctgcgc cgggggaagg
 gacggaggag ccggcggttc cagaaacggc tactactgt ggggacaggg
 caccctcgtg actgtctcga gt

7/47

ФИГ.1С (продолжение)

V-область муринизированного 4856 mH2.1 с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью SEQ ID NO: 32

MEWSWVFLFF LSVTTGVHSE VKLLESGGGL VQPGGSLKLS CTASGFSLS
YDMSWVRQAP GKGLEWIGII YGGSGSTWYA SWAKGKFIMS KDSAKNTVYL
QMSKVRSEDM ATYFCARGRD GGAGGSRNGY SLWGQCTLVT VSS

V-область муринизированного 4856 mH2.1 с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью SEQ ID NO: 33

atgggaatgga gctgggtctt tctcttcttc ctgtcagtaa ctacaggagt
ccattctgag gtcaagctgc tggaatcggg gggaggtctg gtgcagccgg
gcggatctct gaagctgtca tgccaccgat ccgggtttag cctttcgtcc
tacgacatgt cctgggtgcg ccaggccccc gaaaagggat tggaaatgat
cggcattatc tacgggggct ccggttccac ttggtacgcg agctgggcca
aggggaagtt catcatgtcg aaggactccg ctaagaacac cgtgtacctc
caaatgagca aagtccggag cgaggatatg gccacctatt tctgcgcccg
gggaaggggc ggaggagccg gcggttccag aaacgggtac tcactgtggg
gacagggcac cctcgtgact gtctcgagt

Мышиный IGV15-103 JK1 акцепторный каркас SEQ ID NO: 34

DIQMNQSPSS LSASLGDTIT ITCHASQIN VVLSWYQOKP GNIPKLLIYK
ASNLTGTGPS RFGSGSGTGT FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GQSYFPTFGG
GTKLEIK

Мышиный IGV15-103 JK1 акцепторный каркас SEQ ID NO: 35

gacatccaga tgaaccagtc tccatccagt ctgtctgcat cccctggaga
cacaattacc atcacttgcc atgccagtc gaacattaat gtttggttaa
gctggtacca gcagaaacca ggaatattc ctaactatt gatctataag
gcttccaact tgcacacagg cgtcccatca aggttttagtg gcagtggatc
tggaacagggt ttcacattaa ccatcagcag cctgcagcct gaagacattg
ccacttacta ctgtcaacag ggtcaaaagt atccctggac gttcgggtgga
ggcaccacagc tggaatcaa a

Мышиный IGHV4-S1 JH3 акцепторный каркас SEQ ID NO: 36

EVKLLESGGG LVQPGGSLKL SCAASGFDFS RYMSWVRQA PGKLEWIGE
INPDSSTINY TFSLKDKFII SRDNAKNTLY LQMSKVRSED TALYYCARWF
AYWGQCTLVT VSA

Мышиный IGHV4-S1 JH3 акцепторный каркас SEQ ID NO: 37

gagggtgaagc ttctcgagtc tggaggtggc ctggtgcagc ctggaggatc
cctgaaactc tctgtgtcag cctcaggatt cgatttttagt agatactgga
tgagttgggt ccggcaggct ccagggaag ggctagaatg gattggagaa
attaatccag atagcagtac gataaactat acgcatctc taaaggataa
attcatcatc tccagagaca acgcaaaaaa tacgctgtac ctgcaaatga
gcaaatgtgag atctgaggac acagcccttt attactgtgc aagatggttt
gcttactggg gccaaaggac tctggtcact gtctctgca

8/47

ФИГ.1D

4856 gL3 V-область SEQ ID NO: 38

AYDMTQSPST LSASVGDRVT ITCQASESIY SGLAWYQQKP GKAPKLLIYA
 ASDLASGVPS RFSGSGSGTE YTLTISSLQP DDFATYYCQQ TWIDGGIDNP
 FGGGTKVEIK

4856 gL3 V-область (экспрессия в млекопитающих) SEQ ID NO: 39

gcctacgaca tgaccagtc cccctcaacc ctctccgctt ccgtgggaga
 tcgctgacc attacttgcc aagcctccga atcgatctac tcgggtcttg
 cctgggtatca gcagaagcca ggaaggcac ctaagctgtt gatctacgcg
 gcctcagacc tggccagcgg agtgcccagc cggttctccg gctccggaag
 cggcactgag tacaccctga ccatttcctc gcttcaaccg gatgacttcg
 cgacctacta ctgtcagcag acttggaagg acgggggcat cgacaaccgg
 tttggtggag gcaccaaagt cgagattaag

4856 gL3 V-область (экспрессия в *E. coli*) SEQ ID NO: 40

gcgtatgata tgaccagag tccaagcac ctctccgccg ccgtaggcga
 tcgtgtgact attacctgtc aggcagtgga aagcatctat agcggcctgg
 cgtgggtatca gcaaaaaccg gccaagccc cgaagctgct catctatgag
 gcgtccgata tggcgagcgg tgtgccaagc cgtttcagtg gcagcggcag
 cggcacccgaa tataccctca caatttcgtc tctccagccg gatgatttcg
 ccacttacta ttgtcagcaa acctggaccg atggcgggcat tgataaccgg
 ttcggtggcg gcactaaagt agaaatcaaa

4856 gL3 V-область с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной
 последовательностью (экспрессия в млекопитающих) SEQ ID NO: 41

MKWVTFISLL FLESSAYSAY DMTQSPSTLS ASVGDRVTIT CQASESIYSG
 LAWYQQKPGK APKLLIYANS DLASGVPSRF SGSGSGTEYT LTISSLQPD
 FATYYCQQTW TDGGIDNPFQ GGTKVEIK

4856 gL3 V-область с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной
 последовательностью (экспрессия в млекопитающих) SEQ ID NO: 42

atgaagtggg tcaccttcac ctccctgctg tttctgttct cctccgccta
ctccgcctac gacatgaccc agtcccccct aacctctctc gcttcggtgg
 gagatcgcggt gaccatcact tgccaagcct ccgaatcgat ctactcgggt
 ctggcctggt atcagcagaa gccagggaag gcaactaagc tgttgatcta
 cgcggcctca gacctggcca gcggagtgcc cagccgggtc tccggctccg
 gaagcggcac tgagtacacc ctgaccatct cctcgcttca accggatgac
 ttcgcgacct actactgtca gcagacttgg acggacgggg gcctcgacaa
 cccgttttgtt ggaggcacca aagtcgagat taag

9/47

ФИГ.1D (продолжение)

4856 gL3 V-область с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью (экспрессия в *E. coli*) SEQ ID NO: 43

MKKTAIAIAV ALAGFATVAQ *AYDMTQSPS* *TLASVGVDRV* *TITCQASESI*
 YSGLAWYQQK PGKAPKLLIY AASDLASGVP SRPSGSGSGT EYTLTISSLQ
 PDDFATYYCQ QTWTDGGIDN PFGGKTKEI K

4856 gL3 V-область с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью (экспрессия в *E. coli*) SEQ ID NO: 44

atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gocttggctg gtttcgctac
cgtagcgcaa gctgcgtatg atatgaccca gattccaagc accctctccg
 ccagcgtagg cgatcgtgtg actattacct gtcaggccag tgaagcacc
 tatagcggcc tggcgtggtg tcagcaaaaa ccgggcaaaag cccggaagct
 gctcatctat gggcgtccg atctggcgag cgggtgtcca agccgtttca
 gtggcagcgg cagcggcacc gaataatccc tcacaatttc gtctctccag
 ccggatgatt tcgccactta ctattgtcag caaacctgga ccgattggcg
 cattgataac ccgttcggtg ggggcactaa agtagaaatc aaa

4856 gL3 легкая цепь (V + константная) SEQ ID NO: 45

AYDMTQSPST LSASVGVDRV ITQASESIY SGLAWYQQK GKAPKLLIYA
 ASDLASGVPS RFGSGSGSTE YTLTISSLQP DDFATYYCQ QTWTDGGIDNP
 FGGGKTKEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ
 WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYLSL TLTLSKADYE KHKVYACEVT
 HQGLSSPVTK SFNRGKC

4856 gL3 легкая цепь (V + константная) (экспрессия в млекопитающих) SEQ ID NO: 46

gcctacgaca tgaccagtc ccctcaacc ctctccgctt ccgtgggaga
 tcgcgtgacc atcacttgcc aagcctccga atcgatctac tcgggtcttg
 cctgggtatca gcagaagcca gggaaggcac ctaagctgtt gatctacgag
 gcctcagacc tggccagcgg agtcccagc cggttctccg gctccggaag
 cggcactgag tacaccctga ccatttcctc gcttcaaccg gatgacttcg
 cgacctacta ctgtcagcag acttggacgg acgggggcat cgacaaccg
 tttggtggag gcaccaaagt cgagattaag cgtacggtag cggcccatc
 tgtcttcate ttcccggcat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct
 ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag
 tggaaaggtg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac
 agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc
 tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtccac
 catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaag agcttcaaca ggggagagtg
 t

4856 gL3 легкая цепь (V + константная) (экспрессия в *E. coli*) SEQ ID NO: 47

10/47

ФИГ.1D (продолжение)

```

gcgtatgata tgaccagag tccaagcacc ctctccgcca gcgtaggcga
tcgtgtgact attacctgtc aggccagtga aagcatctat agcggcctgg
cgtggtatca gcaaaaaccg ggcaaaagccc cgaagctgct catctatgcg
gcgtccgata tggcgagcgg tgtgccaaagc cgtttcaagt gcagcggcag
cggcaccgaa tataccctca caatttcgtc tctccagccg gatgatttcg
ccacttacta ttgtcagcaa acctggaccg atggcggcat tgataaccgg
ttcgggtggc gcactaaagt agaaatcaaa cgtacggtag cggccccaac
tgtcttcata ttcccggcat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct
ctgttgtgtg cctgctgaat aactctata ccagagaggg caaagtacag
tggaaggtgg ataacgcctt ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac
agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc
tgagcaaaag agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc
catcagggcc tgagctcacc agtaacaaaa agttttaata gaggggagtg
t

```

4856 gL3 легкая цепь с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью (экспрессия в млекопитающих) SEQ ID NO: 48

```

MKWVTFISLL FLSSAYSAY DMTQSPSTLS ASVGDRTIT CQASESIYSG
LAWYQQKPGK APKLLIYAAS DLASGVPSRF SGSGSGTEYT LTISSLQPD
FATYYCQQTW TDGGIDNPFQ GSTRVETKRT VAAPSVFIFP FSDEQLKSGT
ASVVCLLNFP YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSTL
TLKADYKHK KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEK

```

4856 gL3 легкая цепь с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью (экспрессия в млекопитающих) SEQ ID NO: 49

```

atgaagtggg tcaacttcac ctccctgctg tttctgttct cctccgcta
ctccgctac gacatgacc agtccccctc aacctctcc gttccgtgg
gagatcgctg gacctacat tgccaagcct ccgaatcgat ctactcgggt
ctggcctggt atcagcagaa gccagggaag gcacctaaagc tgttgatcta
cgcgccctca gacctggcca gcggagtgc cagccggttc tccgctccg
gaagcggcac tgagtacacc ctgaccattt cctcgcttca accggatgac
ttcgcgacct actactgtca gcagacttgg acggacgggg gcacgcacaa
ccggtttggt ggaggcacca aagtcgagat taagcgtaag gtagcggccc
catctgtctt catcttcccg ccatctgatg agcagttgaa atctggaact
gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc tatcccagag aggccaaagt
acagtgggaag gtggataacg cctccaatc gggttaactcc caggagagtg
tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt
caccatcag ggcctgagct cggccgtcac aaagagcttc aacaggggag
agtgt

```

4856 gL3 легкая цепь с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью (экспрессия в *E. coli*) SEQ ID NO: 50

```

MKKTAIAIAV ALAGFATVAQ AAYDMTQSPS TLSASVGDRT TITCQASESI
YSGLAWYQQK PGKAPKLLIY AASDLASGVF SRFSGSGST EYTLTISLQ

```

11/47

ФИГ.1D (продолжение)

PDDFATYYCQ QTWTDGGIDN PFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK
 SGTASVVCLL NNFYPREAKV QNKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS
 STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

4856 gL3 легкая цепь с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной
 последовательностью (экспрессия в *E. coli*) SEQ ID NO: 51

atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggctg gtttcgctac
cgtagcgcaa gctgcgtatg atatgacca gagtccaagc accctctccg
 ccagcgtagg cgatcgtgtg actattacct gtcaggccag tgaagcatc
 tatacgggcc tggcgtggta tcagcaaaaa ccgggcaaag cccgaagct
 gctcatctat gcggcgctccg atctggcgag cgggtgtgcca agccgtttca
 gtggcagcgg cagcggcacc gaatataccc tcacaatttc gtctctccag
 ccggatgatt tcgccactta ctattgtcag caaacctgga cogatggcgg
 cattgataac ccgttcggtg gcggcaactaa agtagaaaac aaacgtacgg
 tagcggcccc atctgtcttc atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa
 tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg aataacttct atcccagaga
 ggccaaagta cagtggaaag tggataacgc cctccaatcg ggtaactccc
 aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc
 agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaacaca aagtctacgc
 ctgcgaagtc accatcagg gcctgagctc accagtaaca aaaagtttta
 atagagggga gtgt

12/47

ФИГ.1Е

4856gH13 V-область SEQ ID NO: 52

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFSLS SYDMSWVRQA PGKGLEWIGI
 IYGGSGSTWY ASWAKGRFTI SRDSAKNSVY LQMNSLRAED TAVYYCARGR
 DAGAGGSRNG YSLWGQSTLV TVSS

4856gH13 V-область (экспрессия в млекопитающих) SEQ ID NO: 53

gaagtgcacg tgggtgaaag cggaggaggt ttggtgaaac cgggaggggc
 actgcggctc tcctgtgccg cctccggatt cagcctctcg tcctacgaca
 tgagctgggt cagacaggcc cccgggaagg gcctggagtg gattggtatc
 atctacggcg gctccggctc gacttggtac gcttcgtggg ccaagggaag
 gttcaccatc tcccgcgatt ccgcgaagaa cagcgtgtat ctgcagatga
 actctctcgg gcccgaggac acgcagtggt actactgcgc gagggggcgc
 gacgcccggc cggggggatc acgcaacggt tactcccttt ggggacaggg
 aaccctgtgc actgtctcca gc

4856gH13 V-область (экспрессия в *E. coli*) SEQ ID NO: 54

gaggttcacg tgggtcagtc tggaggcggg cttgtcaaac ctggagggag
 cctgcgtctc tcctgtgcag caagcggcct cagcctgtcc tcctacgata
 tgtcctgggt gccccaggca cctgggaagg gcctggagtg gattggcatt
 atttatggcg gcagcggcag cacatggtac gcgagctggg cgaaggggcg
 tttcaccatc tcccgggaca gcgcaagaa tagcgtgtac ctccagatga
 actctctcgg ccgagaggac acgcagtggt attactgtgc gccggggcgc
 gatgcaggcg cggggcggcag ccgcaacggc tatagcctgt ggggacaggg
 gacccttgtg acagtctcga gc

4856gH13 V-область с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной
 последовательностью (экспрессия в млекопитающих) SEQ ID NO: 55

MKWVTFISLL FLFSSAYSEV QLVESGGGLV KPGGSLRLSC AASGFSLSY
 DMSWVRQAPG KGLEWIGIIY GSGSGTWYAS WAKGRFTISR DSAKNSVYLQ
 MNSLRAEDTA VYYCARGRDA GAGGSRNGYS LWGQSTLVTV SS

4856gH13 V-область с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной
 последовательностью (экспрессия в млекопитающих) SEQ ID NO: 56

atgaagtggg tcaoccttcac ctccctgctg tttctgtctc ccagcgccta
ctccgaagtg caactggtgg aaagcggagg aggtttggtg aaaccgggag
 ggtcactgcg gctctcctgt gccgcctccg gattcagcct ctgctcctac
 gacatgagct gggtcagaca gggccccggg aagggcctgg agtggattgg
 tatcatctac ggcggctccg gctcgacttg gtacgcttcg tgggccaagg
 gacgggttcac catctcccgc gattccgcga agaacagcgt gtatctgcag

13/47

ФИГ.1Е (продолжение)

atgaactctc tgcgggcccga ggacaccgca gtgtactact gcgcgagggg
gcgcgacgcc ggccgcccggg gatcacgcaa cggttactcc ctttggggac
agggaacctt ggtcactgtc tccagc

4856gH13 V-область с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью (экспрессия в *E. coli*) SEQ ID NO: 57

MKKTAIAIAV ALAGFATVAQ AEVQLVESGG GLVKPGGSLR LSCAASGFSL
SSYDMSWVRQ APGKGLEWIG ILYGGSGSTW YASWAKGRFT ISRDSAKNSV
YLQMNSLRAE DTAIVYVCARG RDAGAGGSRN GYSLWGQGTLL VTVSS

4856gH13 V-область с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью (экспрессия в *E. coli*) SEQ ID NO: 58

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac
cgtagggcga gctgaggttc agctggtoga gtctggaggg gggcttgta
aacctggagg gagcctgcgt ctctcttggt cagcaagcgg cttcagcctg
tcctcttacg atatgtcctg ggtgcgccag gcacctggga agggcctgga
gtggattggc attatttatg gcggcagcgg cagcacatgg tacgcgagct
gggcgaaggg ccgtttcacc atctcccggg acagcgcaaa gaatagcgtg
tacctccaga tgaactctct ccgcgcagag gacacagcag tctattactg
tgccgggggc cgcgatgcag gcggggggcg cagccgcaac ggctatagcc
tgtggggaca ggggacctt gtgacagtct cgaagc

4856 gH13 Fab тяжелая цепь (V + человеческая гамма-1 CH1) SEQ ID NO: 59

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFSLS SYDMSWVRQA PGKLEWIGI
IYGGSGSTWY ASWAKGRFTI SRDSAKNSVY LQMNSLRAD TAVYYCARGR
DAGAGGSRNG YSLWGQGTLLV TVSSASTKGP SVFPLAPSSK STSGGTAALG
CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVFSSSL
GTQTYICNVN HKPSNTKVDK KVEPKSC

4856 gH13 Fab тяжелая цепь (V + человеческая гамма-1 CH1) (экспрессия в млекопитающих) SEQ ID NO: 60

gaagtgcacc tgggtgaaag cggaggaggt ttggtgaaac cgggaggggc
actcgggctc tctgtgccc cctccgatt cagcctctcg tctacgaca
tgagctgggt cagacaggcc cccgggaagg gcctggagtg gattggtatc
atctacggcg gctccggctc gacttggtac gcttcgtggg ccaagggacg
gttcaccatc tcccgcgatt ccgcgaagaa cagcgtgtat ctgcagatga
actctctgcg ggccgaggac accgcagtgt actactgcgc gagggggcgc
gacgcggcg cggggggatc acgcaacggt tactcccttt ggggacaggg
aaccttggtc actgtctcca gcgcttctac aaaggggcca tcggtcttcc
ccctggcacc ctctccaaag agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc
tgcttggtca aggactact ccccgaaagg gtgacggtgt cgtgggaactc
aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc ctacagctct
caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccttc cagcagcttg
ggcaccocaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacacca
ggtggacaag aaagttagag ccaaatcttg t

14/47

ФИГ. 1Е (продолжение)

4856 gH13 Fab тяжелая цепь (V + человеческая гамма-1 CH1) (экспрессия в *E. coli*)
SEQ ID NO: 61

```
gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtcaaac ctggagggag
cctgcgtctc tcttgtgcag caagcggcctt cagcctgtcc tcttacgata
tgtcctgggt gcgccaggca cctgggaagg cctgggagtg gattggcatt
atttatggcg gcagcggcag cacatggtac gcgagctggg cgaagggccg
tttcaccatc tcccgggaca gcgcaaagaa tagcgtgtac ctccagatga
actctctccg cgcagaggac acagcagctct attactgtgc gcggggccgc
gatgcaggcg cgggcggcag ccgcaacggc tatagcctgt ggggacaggg
gacccttggt acagtctcga gcgcttctac aaagggccca tcggtcttcc
ccctggcacc ctccctcaaag agcacctctg ggggcacagc gccctgggc
tgccctggtca aggaactact cccgaaaccg gtgacggtgt cgtggaactc
agggccctcg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc ctacagtctc
caggactcta ctccctcagc agcgtggtga cgtgcctc cagcagcttg
ggcaccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacacca
gtcgcacaag aaagttagc ccaatcttg t
```

4856 gH13 Fab тяжелая цепь с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной
последовательностью (экспрессия в млекопитающих) SEQ ID NO: 62

```
MKWVTFISLL FLFSSAYSEV QLVESGGGLV KPGGSLRLSC AASGFSLSY
DMSWVRQAPG KGLEWIGIY GSGSTWYAS WAKGRFTISR DSAKNSVYLQ
MNSLRAEDTA VYYCARGRDA GAGGSRNGYS LWQGTLVTV SSASTKGPSV
FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSV VTPSSSLGT QTYICNVNHK PSNTKVDKKV EPKSC
```

4856 gH13 Fab тяжелая цепь с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной
последовательностью (экспрессия в млекопитающих) SEQ ID NO: 63

```
atgaagtggg tcaccttcac ctccctgctg tttctgttct ccagcccta
ctccgaagt caactggtg aaagcggagg aggtttggtg aaaccgggag
ggtcactgcg gctctcctgt gccgcctccg gattcagcct ctgctcctac
gacatgagct gggtcagaca ggcggcgggg aagggcctgg agtggattgg
tatcatctac ggcggctccg gctcgacttg gtacgcttcg tgggccaagg
gacgggttcc catctcccg gattccgcga agaacagcgt gtatctgcag
atgaactctc tgcgggccga ggacaccgca gtgtactact gcgcgagggg
gcgcgacgcc ggcggcgggg gatcacgcaa cggttactcc ctttggggac
agggaaacct ggtcactgtc tccagcgctt ctacaaggg cccatcggtc
ttcccccctg caccctcctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct
gggtgcctg gtcaaggact acttccccga accgggtgacg gtgtcgtgga
actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccgcc tgtcctacag
tctcaggac tetactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag
cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca
ccaaggtgga caagaaagt gagcccaat cttgt
```

15/47

ФИГ.1Е (продолжение)

4856 gH13 Fab тяжелая цепь с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью (экспрессия в *E. coli*) SEQ ID NO: 64

MKKTATATAV ALAGFATVAQ AEFVLVESGG GLVKPGGSLR LSCAASGFSL
 SSYDMSWVRQ AFGKGLEWIG IYGGSGSTW YASWAKGRFT ISRDSAKNSV
 YLQMNSLRAE DTAIVYICARG RDAGAGGSRN GYSLWGQGTI VTVSSASTKG
 PSVFPLAPSS KSTSGGTAAI GCLVKDYFPE FVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSL SSVVTVFSSS LGTQTYICNV NHKFSNTKVD KKVEPKSC

4856 gH13 Fab тяжелая цепь с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью (экспрессия в *E. coli*) SEQ ID NO: 65

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac
cgtaggcgcaa gctgaggttc agctgggtcga gtctggaggc gggcttggtca
 aacctggagg gagcctgcgt ctctctttgtg cagcaagcgg cttcagcctg
 tcctcttacg atatgtcctg ggtgcgccag gcacctggga agggcctgga
 gtggattggc attatttatg gcggcagcgg cagcacatgg tacgcgagct
 gggcgaaggc ccgtttcacc atctcccggg acagcgcaaa gaatagcgtg
 taactocaga tgaactctct cgcgcagag gacacagcag tctattactg
 tgcccggggc cgcgatgcag gcgcggggcg cagccgcaac ggctatagcc
 tgtggggaca ggggaccctt gtgacagtct cgagcgcttc tacaaagggc
 ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac
 agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta ctccccgaa ccggtgacgg
 tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggt
 gtctacagc cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc
 ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc
 ccagcaacac caaggtcgac aagaaagttg agcccaaatc ttgt

16/47

ФИГ.1F

4856gH2O V-область SEQ ID NO: 66

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFSL SYDMSWVRQA PGKLEWISI
IYGGSGSTWY ASWAKGRFTM SKDSAKNSVY LQMNSLRAED TAVYYCARGR
DAGAGGSRNG YSLWGQGLV TVSS

4856gH2O V-область (экспрессия в млекопитающих) SEQ ID NO: 67

gaagtgcaac tgggtgaaag cggaggaggt ttgtgaaac cgggagggtc
actgcggctc tcctgtgccg cctccggatt cagcctctcg tcctacgaca
tgagctgggt cagacaggcc ccgggaaagg gcttgagtg gatttccatc
atctacggcg gctccggctc gacttggtac gcttcgtgg ccaaggagcg
gttcaccatg tccaaggatt ccgcgaagaa cagcgtgtat ctgcagatga
actctctgcg ggccgaggac accgcagtgt actactgcgc gagggggcgc
gacgcggcg ccgggggata acgcaacggt tactcccttt ggggacaggg
aacctctggtc actgtctcca gc

4856gH2O V-область (экспрессия в *E. coli*) SEQ ID NO: 68

gaggttcagc tgggtcagtc tggaggcggg cttgtcaaac ctggagggag
cctgcgtctc tcctgtgcag caagcggtt cagcctgtcc tcctacgata
tgtcctgggt gcgccaggca cctgggaagg gcttgagtg gatttctatt
atttatggcg gcagcggcag cacatggtac gcagcgtgg cgaagggccg
tttcaccatg tccaaagaca gcgcaaaaga tagcgtgtac ctccagatga
actctctccg cgcagaggac acagcagtct attactgtgc gcggggcgc
gatgcaggcg cgggcggcag ccgcaatgg tatagcctgt ggggacaggg
gaaccttggt acagtctcga gc

4856gH2O V-область с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью (экспрессия в млекопитающих) SEQ ID NO: 69

MKWVTFISLL *PLFSSAYSEV* QLVESGGGLV KPGGSLRLSC AASGFSLSY
DMSWVRQAPG KGLEWISIIY GSGSTWYAS WAKGRFTMSK DSAKNSVYLQ
MNSLRAEDTA VYYCARGRDA GAGGSRNGYS LWGQGLVTV SS

4856gH2O V-область с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью (экспрессия в млекопитающих) SEQ ID NO: 70

atgaagtggg *taaccttcac* *ctccctgctg* *ttctgttct* *ccagcgccca*
ctccgaagt *caactggtg* *aaagcggag* *aggtttggtg* *aaaccggag*
ggtcactgcg gctctctgt gccgcctccg gattcagcct ctgcctctac
gacatgagct gggtcagaca ggcggggggg aaggccctgg agtgatttc
catcatctac ggcggctccg gctcgacttg gtacgcttcg tgggccaagg
gacggttcac catgtccaag gattccgcga agaacagcgt gtatctgcag
atgaactctc tgcggggcga ggaacccga gtgtactact gcgcgagggg
gcgcgacgcc ggcgggggg gatcacgcaa cggttactcc ctttggggac

17/47

ФИГ.1F (продолжение)

agggaaccct ggtcactgtc tccagc

4856gH20 V-область с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью (экспрессия в *E. coli*) SEQ ID NO: 71

MKKTAIAIAV ALAGFATVAQ AEVQLVESGG GLVKPGGSLR LSCAASGFSL
SSYDMSWVRQ APGKLEWIS IYGGSGSTW YASWAKGRFT MSKDSAKNSV
YMQNSLRAE DTAVYYCARG RDAGAGGSRN GYSLWGQGTLL VTVSS

4856gH20 V-область с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью (экспрессия в *E. coli*) SEQ ID NO: 72

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagt gcgctagctg gtttcgccac
cgtagggcga gctgaggttc agctgggtcga gctcggaggc gggcttgta
aacctggagg gagcctgcgt ctctcttggt cagcaagcgg ctccagcctg
tcctcttacg atatgtcctg ggtgcgcag gcaacctgga agggcctgga
gtggatttct attatttatg gcggcagcgg cagcacatgg tacgcgagct
gggcgaaggg ccgtttcacc atgtccaaag acagcgcaaa gaatagcgtg
tacctccaga tgaactctct ccgcgcagag gacacagcag tctattactg
tcgcgggggc cgcgatgcag gcgcggggcg cagccgcaat gggatatgcc
tgtggggaca ggggaccctt gtgacagtct cgagc

4856 gH20 Fab тяжелая цепь (V + человеческая гамма-1 CH1) SEQ ID NO: 73

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFSL S YDMSWVRQA PGRGLEWISI
IYGGSGSTWY ASWAKGRFTM SKDSAKNSVY LQMSLRAED TAVYYCARGR
DAGAGGSRNG YSLWGQGTIV TVSSASTKGP SVFPLAPSSK STSGGTAALG
CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSSSL
GTQTYICNVN HKPSNTKVDK KVEPKSC

4856 gH20 Fab тяжелая цепь (V + человеческая гамма-1 CH1) (экспрессия в млекопитающих) SEQ ID NO: 74

gaagtccaac tgggtgaaag cggaggaggt ttggtgaaac cgggagggtc
actgcggctc tcctgtgccg cctccggatt cagcctctcg tcctacgaca
tgagctgggt cagacaggcc ccggggaagg gcctggagt gatttccatc
atctacggcg gctccggctc gacttggtac gcttcgtggg ccaagggacg
gttcaccatg tccaaggatt ccgcgaagaa cagcgtgtat ctgcagatga
actctctgcg ggcgaggac accgcagtgt actactgcgc gagggggcgc
gacgcggcg ccgggggac acgcaacggt tactcccttt ggggacaggg
aacctgggtc actgtctcca gcgttctac aaagggccca tcggtcttc
ccctggcacc ctctcccaag agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc
tgcttggtca aggactactt ccccgaaacc gtgacggtgt cgtggaactc
aggcgcctg accagcggcg tgcacacctt cccggtgtc ctacagtcct
caggactota ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg
ggcaccacaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa
ggtggacaag aaagttagag ccaatcttg t

4856 gH20 Fab тяжелая цепь (V + человеческая гамма-1 CH1) (экспрессия в *E. coli*)
SEQ ID NO: 75

18/47

ФИГ.1F (продолжение)

```

gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtcaaac ctggagggag
cctgcgtctc tcttgtgcag caagcggcct cagcctgtcc tcttacgata
tgtcctgggt gcgccaggca cctgggaagg gcctggagtg gatttctatt
atztatggcg gcagcggcag cacatggtac gcgagctggg cgaagggccg
tttaccatg tccaaagaca gcgcaaagaa tagcgtgtac ctccagatga
actctctccg cgcagaggac acagcagtc attactgtgc gcggggccgc
gatgcaggcg cgggcggcag ccgcaatggg tatagcctgt ggggacaggg
gacccttggt acagtctcga gcgcttctac aaagggccca tcggtcttcc
ccctggcacc ctctccaag agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc
tgcttggtca aggactactt ccccgaaacc gtgacggtgt cgtggaactc
aggcgcctgt accagcggcg tgcacacett cccgctgtc ctacagtctt
caggactota ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg
ggcaccacaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaaccacaa
ggtcgacaag aaagttgagc ccaaattctg t

```

4856 gH20 Fab тяжелая цепь с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью (экспрессия в млекопитающих) SEQ ID NO: 76

```

MKWVTFISLL FLFSSAYSEV QLVESGGGLV KPGGSLRLSC AASGFSLSY
DMSWVRQAPG KGLEWISIIY GSGSTWYAS WAKGRFTMSK DSAKNSVYLQ
MNSLRAEDTA VYYCARGRDA GAGGSRNGYS LWGGQTLVTV SSASTKGPSV
FLAPSSKST SGGTALGCL VKDYFFFPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ
SSGLYSLSV VTPSSSLGT QTYICNVNHK PSNTKVDKKV EPKSC

```

4856 gH20 Fab тяжелая цепь с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью (экспрессия в млекопитающих) SEQ ID NO: 77

```

atgaagtggg toaccttcac ctccctgctg tttctgttct ccagcgcta
ctccgaagtg caactgggtg aaagcggagg aggtttggtg aaaccgggag
ggtcactgcg gctctcctgt gccgcctccg gattcagcct ctctcctac
gacatgagct gggtcagaca ggcccccgag aaggccctgg agtggatttc
catcatctac ggcggctccg gctcgacttg gtacgcttcg tgggccaagg
gacggttoac catgtccaag gattccgcga agaacagcgt gtatctgcag
atgaactctc tgcggggcga ggacaccgca gtgtactact gcgcgagggg
gcgcgacgcc ggcgcggggg gatcacgcaa cggttactcc ctttggggac
agggaaacct ggtcactgtc tccagcgctt ctacaaaggg cccatcggtc
ttccccctgg caccctctc caagagcacc tctgggggca cagcgccctt
gggctgcctg gtcaaggact acttcccga accggtgacg gtgtcgtgga
actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag
cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaaag cccagcaaca
ccaaggtgga caagaaagt t gagcccaat cttgt

```

4856 gH20 Fab тяжелая цепь с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью (экспрессия в *E. coli*) SEQ ID NO: 78

```

MKKTAIAIAV ALAGFATVAQ AEVQLVESGG GLVKPGGSLR LSCAASGFSL
SSYDMSWVRQ APGKLEWIS IYGGSGSTW YASWAKGRFT MSKDSAKNSV
YLQMNSLRAE DTAVYYCARG RDAGAGGSRN GYSLWGQGLT VTVSSASTKG

```

19/47

ФИГ.1F (продолжение)

PSVFPLAPSS KSTSGGTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
VLQSSGLYSL SSVVTVFSSS LGTQTYICNV NHKPSNTKVD KKVEPKSC

4856 gH20 Fab тяжелая цепь с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью (экспрессия в *E. coli*) SEQ ID NO: 79

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac
cgtagcgcaa gctgaggttc agctgggtoga gtctggaggc gggcttgctca
aacctggagg gaggctgcgt ctctcttggtg cagcaagcgg cttcagcctg
tcctcttacg atatgtcctg ggtgcgcag gcacctggga agggcctgga
gtggatttct attatttatg gcggcagcgg cagcacatgg tacgcgagct
gggCGAAGGG ccgtttcacc atgtccaaag acagcgcaaa gaatagcgtg
tacctccaga tgaactctct ccgcgcagag gacacagcag tctattactg
tgcgcggggc cgcgatgcag gcgcgggchg cagccgcaat gggatatagcc
tgtggggaca ggggaccctt gtgacagtct cgagcgcttc tacaagggc
ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac
agcgccctg ggtgcctgg tcaaggacta ctccccgaa ccggtgacgg
tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccgct
gtctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc
ctccagcagc ttgggcacc agacotacat ctgcaacgtg aatcacaagc
ccagcaacac caaggtcgac aagaaagttg agcccaaatc ttgt

20/47

ФИГ.1G

4856gH23 V-область SEQ ID NO: 80

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFSLS SYDMSWVRQA PGKLEWIGI
IYGGSGSTWY ASWAKGRFTI SRDSAKNSVY LQMNSLRAED TAVVYCARGR
DAGAGGSRNA YSLWGQGLTV TVSS

4856gH23 V-область (экспрессия в млекопитающих) SEQ ID NO: 81

gaagtgcac tggtgaaaag cggaggaggt ttggtgaaac cgggagggtc
actgcggctc tcctgtgccg cctccggatt cagcctctcg tcctacgaca
tgagctgggt cagacaggcc cccgggaagg gcctggagtg gattggtatc
atctacggcg gctccggctc gacttggtag gcttcgtggg ccaaggagcg
gttcaccatc tcccgcgatt ccgcgaagaa cagcgtgtat ctgcagatga
actctctgcg ggccgaggac accgcagtgt actactgcgc gagggggcgc
gacgccggcg ccgggggata acgcaacgcct actcccttt ggggacaggg
aaccctggtc actgtctcca gc

4856gH23 V-область (экспрессия в E. coli) SEQ ID NO: 82

gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtcaaac ctggaggag
cctgcgtctc tcttgtgcag caagcggctt cagcctgtcc tcttacgata
tgtcctgggt gcgccaggca cctgggaagg gcctggagtg gattggcatt
atztatggcg gcagcggcag cacatggtag gcgagctggg cgaagggccg
tttcaccatc tcccgggaca gcgcaagaa tagcgtgtac ctccagatga
actctctccg cgcagaggac acagcagtct attactgtgc gcggggccgc
gatgcaggcg cgggcggcag ccgcaacgcg tatagcctgt ggggacaggg
gacccttgtg acagtctcca gc

4856gH23 V-область с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной
последовательностью (экспрессия в млекопитающих) SEQ ID NO: 83

MKWVTFISLL FLFS SAYSEV QLVESGGGLV KPGGSLRLSC AASGFSLSY
DMSWVRQAPG KGLEWIGIIY GSGSTWYAS WAKGRFTISR DSAKNSVYLQ
MNSLRAEDTA VVYCARGDA GAGGSRNAYS LWGQGLTVTV SS

4856gH23 V-область с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной
последовательностью (экспрессия в млекопитающих) SEQ ID NO: 84

atgaagtggg taaccttcac ctccctgctg tttctgttct ccagcgccta
*ctccg*aaagt caactgggtg aaagcggagg aggtttgttg aaaccgggag
ggtcaactgc gctctcctgt gccgcctccg gattcagcct ctgcctctac
gacatgagct gggtcagaca ggcggggggg aagggccttg agtgatttg
tatcatctac ggcggctccg gctcgacttg gtacgcttcg tgggccaagg
gacggttcac catctccgcg gattccgcga agaacagcgt gtatctgcag
atgaactctc tgcggggcga ggacaccgca gtgtactact gcgcgagggg

21/47

ФИГ.1G (продолжение)

gcgcgcacgcc ggcgcgcggg gatcacgcaa cgcctactcc ctttggggac
agggaacctt ggtcactgtc tccagc

4856gH23 V-область с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью (экспрессия в *E. coli*) SEQ ID NO: 85

МККТАИАИАВ АЛАГПАТВАQ AEVQLVESGG GLVKPGGSLR LSCAASGFSL
SSYDMSWVRQ APGKGLEWIG IIYGGSGSTW YASWAKGRFT ISRDSAKNSV
YIQMNSLRAE DTAIVYVCARG RDAGAGGSRN AYSLWGQCTL VTVSS

4856gH23 V-область с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью (экспрессия в *E. coli*) SEQ ID NO: 86

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gttccgccac
cgtaggcgcaa gctgaggttc agctggtcga gtctggaggc gggcttgta
aacctggagg gacgttcgtc ctctcttctg cagcaagcgg cttcagcctg
tcctcttacg atatgtcctg ggtgcgcag gcacctggga agggcctgga
gtggattggc attatttatg gcggcagcgg cagcacatgg tacgcgagct
gggcgaaggc ccgttttcacc atctcccggg acagcgcaaa gaatagcgtg
tacctccaga tgaactctct ccgcgcagag gacacagcag tctattactg
tgccgggggc cgcgatgcag gcgcggggcg cagccgcaac gcgtatagcc
gtgggggaca ggggacctt gtgacagtct cgaac

4856 gH23 Fab тяжелая цепь (V + человеческая гамма-1 CH1) SEQ ID NO: 87

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFSLD SYDMSWVRQA PGKGLEWIGI
IYGGSGSTWY ASWAKGRFTI SRDSAKNSVY IQMNSLRAED TAVYVCARGR
DAGAGGSRNA YSLWGQGLTV TVSSASTKGP SVEPLAPSSK STSGGTAAALG
CLVKDYFPEP TVTWSNNGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSSSL
GTQTYICNVN HKPSNTKVDK KVEPKSC

4856 gH23 Fab тяжелая цепь (V + человеческая гамма-1 CH1) (экспрессия в млекопитающих) SEQ ID NO: 88

gaagtgaac tgggtgaaag cggaggaggt ttggtgaaac cgggagggtc
actgcggctc tcctgtgccg cctccggatt cagcctctcg tcctacgaca
tgagctgggt cagacaggcc cccgggaagg gcctggagtg gattggtatc
atctacggcg gctccggctc gacttggtag gcttcgtggg ccaaggagcg
gttcaccatc tcccgcgatt ccgcgaagaa cagcgtgtat ctgcagatga
actctctgcg ggcgcaggac accgcagtgt actactgcgc gagggggcgc
gacgcggcg cccgggggac acgcaacgcc tactcccttt ggggacaggg
aaccttggtc actgtctcca gcgcttctac aaaggggcca tcggtcttcc
ccctggcacc ctctctccaag agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc
tgcttggtca aggactactt ccccgaaagg gtgacggtgt cgtggaaactc
aggcgccctg accagcgcg tgacacacct cccggtgtc ctacagtcct
caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg
ggcaccacaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacacca
ggtggacaag aaagttgagc ccaaatcttg t

4856 gH23 Fab тяжелая цепь (V + человеческая гамма-1 CH1) (экспрессия в *E. coli*)

22/47

ФИГ.1G (продолжение)

SEQ ID NO:89
gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtcaaac ctggaggag
cctgcgtctc tcttgtcag caagcggctt cagcctgtcc tcttacgata
tgtcctgggt gcgccaggca cctgggaagg gcctggagtg gattggcatt
atztatggcg gcagcggcag cacatggtag gcgagctggg cgaagggccg
tttcaccatc tcccgggaca gcgcaaaaga tagcgtgtac ctccagatga
actctctccg cgcagaggac acagcagtcct attactgtgc gcggggccgc
gatgcaggcg cgggcggcag ccgcaacgcg tatagcctgt ggggacaggg
gacctttgtg acagtctcga gcgcttctac aaaggccca tcggtcttcc
ccctggccac ctctccaag agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc
tgcctggtca aggactactt ccccgaaacg gtgacggtgt cgtggaactc
aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt ccggcgtgtc ctacagtcct
caggactcta ctccctcagc agcgtggtag ccgtgccctc cagcagcttg
ggcaccacga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacacca
ggtcgacaag aaagttgagc ccaaatottg t

4856 gH23 Fab тяжелая цепь с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью (экспрессия в млекопитающих) SEQ ID NO: 90

MKWTFISLL FLFSSAYSEV QLVESGGGLV KPGGSLRLSC AASGFSLSY
DMSWVRQAPG KGLEWIGIY GSGGSTWYAS WAKGRFTISR DSAKNSVYLQ
MNSLRAEDTA VYYCARGRDA GAGGSRNAYS LWGQGTILTV SSASTKGPSV
FPLAPSSKST SGCTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFFAVLQ
SSGLYLSLSSV VTFPSSSLGT QTYICNVNHNK PSNTKVDKKV EPRKSC

4856 gH23 Fab тяжелая цепь с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью (экспрессия в млекопитающих) SEQ ID NO: 91

atgaagtggg *taaccttoat* *ctccctgctg* *tttctgttct* *ccagcgccct*
ctccgaagtg caactggttg aaagcggagg aggtttgttg aaaccgggag
ggctactcgc gctctcctgt gcgcctccg gattcagcct ctgctctac
gacatgagct gggtcagaca ggcgccggg aagggccttg agtgagttg
tatcatctac ggcggctccg gctcgacttg gtacgcttcg tgggccaagg
gacggttcac catctccgcg gattccgcga agaacagcgt gtatctgcag
atgaactctc tgcgggccga ggacacgcga gtgtactact gcgcagggg
gcgcgacgcc ggcgcgggg gatcacgcaa gcctactcc ctttggggac
agggaaccct ggtcactgtc tccagcgctt ctacaaagg cccatcggtc
ttcccccctg caccctctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct
gggctgcctg gtcaaggact acttcccga accggtgacg gtgtcgtgga
actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca cttcccggc tgtcctacag
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag
cttggggacc cagacctaca tctgcaact gaatcacaag cccagcaaca
ccaaggtgga caagaaagtt gagcccaat cttgt

4856 gH23 Fab тяжелая цепь с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью (экспрессия в *E. coli*) SEQ ID NO: 92

MKKTATATAV ALAGFATVAQ *AEVQLVESGG* GLVKPGGSLR LSCAASGPSL
SSYDMSWVRQ APCKGLEWIC IYGGSGSTW YASWAKGRFT ISRDSAKNSV
YLQMNSLRAE DTAVYYCARG RDAGAGGSRN AYSLWGQGTIL VTVSSASTKG

ФИГ.1G (продолжение)

PSVFPLAPSS KSTSGGTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
VLQSSGLYSL SSVVTVPSSS LGTQT^YICNV NHKPSNTKVD KKVEPKSC

4856 gH23 Fab тяжелая цепь с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью (экспрессия в *E. coli*) SEQ ID NO: 93

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgcaac
cgtggcgcaa gctgaggttc agctggtcga gtctggaggc gggettgtca
aacctggagg gagcctgcgt ctctcttgtg cagcaagcgg cttcagcctg
tcctcttacg atatgtectg ggtgcgccag gcacctggga agggcctgga
gtggattggc attatttatg gcggcagcgg cagcacatgg tacgcgagct
gggcgaaggg ccgtttcacc atctcccggg acagcgcaaa gaatagcgtg
tacctccaga tgaactctct ccgcgcagag gacacagcag tctattactg
tgccgggggc cgcgatgcag gcgcggggcg cagccgcaac gcgtatagcc
tgtggggaca ggggaccctt gtgacagtct cgcgcgcttc tacaaggggc
ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac
agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg
tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggt
gtcttacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc
ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc
ccagcaaacac caaggtcgac aagaaagtgt agcccaaatc ttgt

24/47

ФИГ.1Н

4856gH29 V-область SEQ ID NO: 94

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFSLs SYDMSWVRQA PGKGLEWIGI
IYGGSGSTWY ASWAKGRFTI SRDSAKNSVY LQMNSLRAED TAVYYCARGR
DAGAGGSRDG YSLWGQCTLV TVSS

4856gH29 V-область (экспрессия в млекопитающих) SEQ ID NO: 95

gaagtgcAAC tggTggaAag cggagggaggt ttggtgaaac cgggagggtc
actgcggctc tcctgtgccc cctccggatt cagcctctcg tcctacgaca
tgagctgggt cagacaggcc ccggggaagg gcctggagtg gattggtatc
atctacggcg gctccggctc gacttggtac gcttcgtggg ccaagggaag
gttcaccatc tcccgcgatt ccgcgaagaa cagcgtgtat ctgcagatga
actctctgcg ggccgaggac accgcagtgt actactgcgc gagggggcgc
gacgcggcg ccgggggato accgcagcgt tactcccttt ggggacaggg
aaccttggtc actgtctcca gc

4856gH29 V-область (экспрессия в *E. coli*) SEQ ID NO: 96

gaggttcagc tggTcgagtc tggagcgagg cttgtcaaac ctggaggag
cctgcgtctc tcttgtgcag caagcggctt cagcctgtcc tcctacgata
tgtctgggt gcgccaggca cctgggaagg gcctggagtg gattggcatt
atztatggcg gcagcggcag cacatggtac gcgagctggg cgaaggggcg
tttaccatc tcccgggaca gcgcaaaagaa tagcgtgtac ctccagatga
actctctccg cgcagaggac acagcagtct attactgtgc gcggggccgc
gatgcaggcg cgggcggcag ccgcgatggg tatacctgt ggggacaggg
gaccttgtg acagtctcga gc

4856gH29 V-область с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью (экспрессия в млекопитающих) SEQ ID NO: 97

MKWVTFISLL *FLPSSAYSEV* QLVESGGGLV KPGGSLRLSC AASGFSLSY
DMSWVRQAPG KGLEWIGIY GSGSTWYAS WAKGRFTISR DSAKNSVYLQ
MNSLRAEDTA VYYCARGRDA GAGGSRDGYS LWGQCTLVTV SS

4856gH29 V-область с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью (экспрессия в млекопитающих) SEQ ID NO: 98

atgaagtggg *tcacctcat* *ctccctgctg* *tttctgttct* *ccagcgccca*
ctccgaagtg caactggtgg aaagcggagg aggtttggtg aaaccgggag
ggTcactgcg gctctcctgt gccgcctccg gattcagcct ctcgTcctac
gacatgagct gggTcagaca ggcTcccggg aagggcctgg agTggattgg
tatcatctac ggcggctccg gctcgacttg gTacgcttcg Tgggccaagg
gacggTtcac catctcccg cgttccgcga agaacagcgt gtatctgcag
atgaactctc Tgcgggcccga ggacaccga gTgtactact gcgcgagggg

25/47

ФИГ.1Н (продолжение)

gcgcgcacgcc ggcgcggggg gatcacgcga cggttactcc ctttggggac
aggggaacctt ggtcactgtc tccagc

4856gH29 V-область с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью (экспрессия в *E. coli*) SEQ ID NO: 99

МККТАИАИАВ АЛАГФАТВАQ ΔEVQLVESGG GLVKPGGSLR LSCAASGFSL
SSYDMSWVRQ APKGLEWIG IYGGSGSTW YASWAKGRFT ISRDSAKNSV
YLQMNSLRAE DTAVYVCARG RDAGAGGSRD GYSLWGQGT L VTVSS

4856gH29 V-область с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью (экспрессия в *E. coli*) SEQ ID NO: 100

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac
cgtggcgcaa gctgaggttc agctggtcga gtcggaggc gggcttgta
aacctggagg gagcctgcgt ctctcttggt cagcaagcgg cttcagcctg
tcctcttacg atatgtcctg ggtgcgccag gcacctggga agggcctgga
gtggattggc attatttatg gcgcgcagcg cagcacatgg tacgcgagct
gggcgaaggc cgttttcacc atctcccggt acagcgcaaa gaatagcgtg
tacctccaga tgaactctct ccgcgcagag gacacagcag tctattactg
tgccgggggc cgcgatgcag gcgcggggcg cagccgcgat gggatatagc
tgtggggaca ggggacctt gtgacagtct cgagc

4856 gH29 Fab тяжелая цепь (V + человеческая гамма-1 CH1) SEQ ID NO: 101

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFSL SYDMSWVRQA PGKLEWIGI
IYGGSGSTWY ASWAKGRFTI SRDSAKNSVY LQMNSLRAED TAVYVCARGR
DAGAGGSRDG YSLWGQGT L VTVSSASTKGP SVFPLAPSSK STSGGTAALG
CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSSSL
GTQTYICNVN HKFSNTKVDK KVERKSC

4856 gH29 Fab тяжелая цепь (V + человеческая гамма-1 CH1) (экспрессия в млекопитающих) SEQ ID NO: 102

gaagtgaac tggtgaaag cggaggaggt ttggtgaac cgggagggtc
actgcggctc tcctgtgccg cctccggatt cagcctctcg tcctacgaca
tgagctgggt cagacaggcc cccgggaagg gcctggagtg gattggtatc
atctacggcg gctccggctc gacttggtac gottcgtggg ccaagggacg
gttcaccatc tcccgcgatt ccgcgaagaa cagcgtgtat ctgcagatga
actctctgcg ggcgcaggac accgcagtgt actactgcgc gagggggcgc
gagccggcg cggggggatc acgcgacgt tactcccttt ggggacagg
aacctgggtc actgtctcca gccttctac aaaggggcca tcggttcttc
ccctggcacc ctctccaaag agcactctg ggggcacagc ggcctgggc
tgcttggtca aggaactact cccgaaccg gtgacggtgt cgtggaactc
aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggtgtc ctacagtct
caggactcta ctccctcagc agcgtggtga cctgcccctc cagcagctt
ggcaccacaga cctacatctg caactggaat cacaagccca gcaacaccaa
ggtggacaag aaagttgagc ccaaatcttg t

4856 gH29 Fab тяжелая цепь (V + человеческая гамма-1 CH1) (экспрессия в *E. coli*)

26/47

ФИГ.1Н (продолжение)

SEQ ID NO:103

```

gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtcaaac ctggaggag
cctgcgtctc tcttgtgcag caagcggtt cagcctgtcc tcttacgata
tgtcctgggt gcgccaggca cctgggaagg gcttggagtg gattggcatt
atttatggcg gcagcggcag cacatggtac gcgagctggg cgaagggccg
tttcaccatc tcccgggaca gcgcaaagaa tagcgtgtac ctccagatga
actctctccg cgcagaggac acagcagtct attactgtgc gcggggccgc
gatgcaggcg cgggcggcag ccgcgatggg tatagcctgt ggggacaggg
gacccttgtg acagtctcga gcgcttctac aaagggccca tcggtcttcc
ccctggcacc ctctccaag agcacctctg ggggcacagc gccctgggc
tgcttggtca aggactactt cccgaaccg gtgacgggtg cgtggaactc
aggcgccctg accagcggcg tgccacacct cccggctgtc ctacagctct
caggactcta ctccctcagc agcgtggtag ccgtgccctc cagcagcttg
ggcaccacaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa
ggtcgacaag aaagttgagc ccaaatcttg t

```

4856 gH29 Fab тяжелая цепь с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью (экспрессия в млекопитающих) SEQ ID NO: 104

```

MKWVTFISLL FLFSSAYSEV QLVESGGGLV KPGGSLRLSC AASGFSLSY
DMSWVRQAPG KGLEWIGIY GSGSTWYAS WAKGRFTISR DSAKNSVYLQ
MNSLRAEDTA VYYCARGRDA GAGSRDGY S LWGQTLTV SSASTKPSV
FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSV VTFPSSSLGT QTYICNVNHK PSNTKVDKKV EPKSC

```

4856 gH29 Fab тяжелая цепь с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью (экспрессия в млекопитающих) SEQ ID NO: 105

```

atgaagtggg teaccttcac ctccctgctg tttctgttct ccagcgccta
ctccgaagtg caactggtag aaagcggagg aggttttggt aaaccgggag
ggteactgcg gctctcctgt gccgcctccg gattcagcct ctgctcctac
gacatgagct gggtoagaca ggcgcccggg aagggcctgg agtggtattg
tatcatctac ggcggctccg gctcgacttg gtacgcttcg tgggccaagg
gacggttcac catctccgcg gattccgcga agaacagcgt gtatctgcag
atgaaactctc tgcgggccga ggacaccgca gtgtactact gcgcgagggg
gcgcgacgcc ggcgcggggg gatcacgcga cggttactcc ctttggggac
agggaaccct ggteactgtc tccagcgctt ctacaaaggg cccatcggtc
ttccccctgg caccctctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct
gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga
actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag
cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca
ccaaggtgga caagaaagtt gagcccaaat cttgt

```

4856 gH29 Fab тяжелая цепь с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью (экспрессия в *E. coli*) SEQ ID NO: 106

```

MKKTAIAIAY ALAGFATVAQ ABVQLVESGG GLVKPGGSLR LSCAASGFSI
SSYDMSWVRQ APCKGLEWIG ILYGSGSTW YASWAKGRFT ISRDSAKNSV
YLQMNLSLRAE DTAVYYCARG RDAGAGGSRD GYSLWGQGTI VTVSSASTKG

```

27/47

ФИГ.1Н (продолжение)

PSVFPLAPSS KSTSGGTAAL GCLVKDYFPE FVIVSWNSGA LTSGVHTFPA
VLQSSGLYSL SSVVIVFSSS LGTQTYICNV NHKPSNTKVD KKVEPKSC

4856 gH29 Fab тяжелая цепь с подчеркнутой и выделенной курсивом сигнальной последовательностью (экспрессия в *E. coli*) SEQ ID NO: 107

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac
cgtagcgcaa gctgaggttc agctggtcga gtctggaggg gggcttgcca
aacctggagg gaggctgcgt ctctcttgtg cagcaagcgg cttcagcctg
tcctcttacg atatgtcctg ggtgcgccag gcacctggga agggcctgga
gtggattggc attatttatg gggcagcgg cagcaocatg tacgogagct
gggcgaaggg ccgtttcacc atctcccggg acagcgcaaa gaatagcgtg
tacctccaga tgaactctct ccgcgcagag gacacagcag tctattactg
tgcccggggc cgcgatgcag cgcggggcgg cagccgcgat gggatatgcc
tgtggggaca ggggaccctt gtgacagtct cgagcgcttc tacaaagggc
ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac
agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg
tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggt
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc
ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc
ccagcaacac caaggtcgac aagaaagttag agcccaaatc ttgt

4856 scFv

SEQ ID NO:108

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFSLs SYDMSWVRQA PGKCLEWIGI
IYGSGSTWY ASWAKGRFTI SRDSAKNSVY LQMNSLRAED TAVYYCARGR
DAGAGGSRNG YSLWGQGTIV TVSSGGGGSG GGGSGGGGSG GGGsAYDMTQ
SPSTLSASVG DRVITTCQAS ESIYSGLAWY QQKPGKAPKL LIYAASDLAS
GVPSRFSGSG SGTEYTLTIS SLQPDFFATY YCQQTWTDGG IDNPFPGCGTK
VEIKRTENLY FQ

28/47

ФИГ.11

Человеческий IGKV1-5 JK4 акцепторный каркас SEQ ID NO: 109

DIQMTQSPST LSASVGDRTV ITCRASQSSIS SWLAWYQQKP GKAPKLLIYD
 ASSLESQVPS RFSGSGSGTE FTLTISSLQF DDFATYYCQQ YNSYSLTPEG
 GTKVEIK

Человеческий IGKV1-5 JK4 акцепторный каркас SEQ ID NO: 110

gacatccaga tgacccagtc tcttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga
 cagagtcacc atcacttgcc gggccagtc gagtattagt agctgggtgg
 cctgggtatca gcagaaacca gggaaagccc ctaagctcct gatctatgat
 gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca aggttcagcg gcagtggatc
 tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct gatgatattg
 caacttatta ctgccaacag tataatagtt attctctcac ttccggcgga
 gggaccaagg tggagatcaa a

Человеческий IGHV3-21 JH5 акцепторный каркас SEQ ID NO: 111

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYMNWVRQA PGKGLEWVSS
 ISSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAD TAVYYCARNW
 FDSWGQGTLV TVSS

Человеческий IGHV3-21 JH5 акцепторный каркас SEQ ID NO: 112

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ctggtcaagc ctggggggtc
 cctgagactc tctgtgagc cctctggatt cacttcagtc agctatagca
 tgaactgggt ccgccaggct ccagggaagg ggctggagtg ggtctcatcc
 attagtagta gtagtagtta catatactac gcagactcag tgaagggccg
 attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat ctgcaaatga
 acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaaactgg
 ttcgactcct ggggccaagg aacctggtc accgtctcct ca

ФИГ.2А

ТРАНСПЛАНТАТ ЛЕГКОЙ ЦЕПИ 4856

Легкая цепь 4856 AХDМТQТRАSVЕVAVGGIVTITКСQ**QASSTITSGDIA**WQQTRGQGRKLLA**YAAADILAS**GVPSPRFKSGSGTFTLTISGVESCAADATYTC**QGVITDGGIDMP**GGGTGVYVK
100 105
IGKV1-5 DQMTQGFSTLSASVGDVNTITCT**ASQGISISWIA**WQQKQKQKQKLLA**YDASSLES**GVPSPRFSGSGGTFTLTISLQDDDFATYTCQQTN---**SYSLT**FGGKTVELK
4856gJ.3 AХDМТQGRSTLSASVGDVNTITCT**QASSTITSGDIA**WQQKQKQKQKLLA**YAAADILAS**GVPSPRFSGSGGTFTLTISLQDDDFATYTC**QGVITDGGIDMP**GGGTGVYVK
4856mL1.1 AХDМТQGFSTLSASVGDVNTITCT**QASSTITSGDIA**WQQKQKQKQKLLA**YAAADILAS**GVPSPRFKSGSGGTFTLTISLQDDDFATYTC**QGVITDGGIDMP**GGGTGVYVK

Подпись

Легкая цепь 4856 = последовательность варибельной области кроличьей легкой цепи (SEQ ID NO: 10)
IGKV1-5 = акцепторная кармашная последовательность VK1 человеческой зародышевой линии IGKV1-5 с JK4 (SEQ ID NO: 108)
4856gJ.3 = гуманизированный трансплантат варибельной области легкой цепи 4856 с использованием человеческой зародышевой линии в качестве акцепторного каркаса (SEQ ID NO: 38)
4856mL1.1 = мураинизированный трансплантат варибельной области легкой цепи 4856 с использованием мышиной зародышевой линии в качестве акцепторного каркаса (SEQ ID NO: 26)

CDR показаны жирным шрифтом/подчеркнуты
Донорные остатки показаны жирным шрифтом/курсивом и выделены: A1, Y2, D3 и Y71

ФИГ.2В

ТРАНСПЛАНТАТ ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ 4856

184856
 184857
 184858
 184859
 184860
 184861
 184862
 184863
 184864
 184865
 184866
 184867
 184868
 184869
 184870
 184871
 184872
 184873
 184874
 184875
 184876
 184877
 184878
 184879
 184880
 184881
 184882
 184883
 184884
 184885
 184886
 184887
 184888
 184889
 184890
 184891
 184892
 184893
 184894
 184895
 184896
 184897
 184898
 184899
 184900
 184901
 184902
 184903
 184904
 184905
 184906
 184907
 184908
 184909
 184910
 184911
 184912
 184913
 184914
 184915
 184916
 184917
 184918
 184919
 184920
 184921
 184922
 184923
 184924
 184925
 184926
 184927
 184928
 184929
 184930
 184931
 184932
 184933
 184934
 184935
 184936
 184937
 184938
 184939
 184940
 184941
 184942
 184943
 184944
 184945
 184946
 184947
 184948
 184949
 184950
 184951
 184952
 184953
 184954
 184955
 184956
 184957
 184958
 184959
 184960
 184961
 184962
 184963
 184964
 184965
 184966
 184967
 184968
 184969
 184970
 184971
 184972
 184973
 184974
 184975
 184976
 184977
 184978
 184979
 184980
 184981
 184982
 184983
 184984
 184985
 184986
 184987
 184988
 184989
 184990
 184991
 184992
 184993
 184994
 184995
 184996
 184997
 184998
 184999
 185000

Подпись

4856 = последовательность вариабельной области кроличьей легкой цепи (SEQ ID NO:14)
IGHV3-21 = человеческая зародышевая акцепторная карксовая последовательность VH3 IGHV3-21 с JH5 (SEQ ID NO:110)
4856gH13 (SEQ ID NO:52), gH20 (SEQ ID NO:66), gH23 (SEQ ID NO:80) и gH29 (SEQ ID NO:94) = Гуманизированные
трансплантаты вариабельной области легкой цепи 4856 с использованием человеческой зародышевой последовательности
IGHV3-21 в качестве акцепторного каркса.
4856gH2.1 = Муринизированный трансплантат вариабельной области тяжелой цепи 4856 с использованием мышиной
зародышевой последовательности в качестве акцепторного каркса (SEQ ID NO:30)

31/47

ФИГ.3А

Человеческий латентно-ассоциированный пептид и трансформирующий фактор роста

бета-1 SEQ ID NO: 113

LSTCKTIDMELVKKRIEAIKQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAK
 EVTRVLNVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLRLKLVQHVELYQKYSNNSWRYLS
 NRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVQWLNRGGIEGFRLSAHSCDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPEPLL
 MATPLERAQHLQSSRRRALDTHNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGKWIHEPKGYHANFCLGCPYIWSLDTQYS
 KVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS

ФИГ.3В

Зрелый человеческий трансформирующий фактор роста бета-1 SEQ ID NO: 114

ALDTHNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGKWIHEPKGYHANFCLGCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPC
 CVPQALEPLPIVYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS

ФИГ.3С

Человеческий латентно-ассоциированный пептид и трансформирующий фактор роста

бета-2 SEQ ID NO: 115

LSTCSTLDMQFMKRIEAIKQILSKLRITSPPEPEPEPEEVIISIYNSTRDLLQEKASRRAAACERERSDEE
 YYAKEVYKIDMPFFPSENAIPPTFYRPFYRIVRFDVSAMEKNASNLVKAEFVRFRLQNPKEVPEQRIELYQILKS
 KDLTSPITQRYIDSQVVKTRAEGEWLSFDVTDVHVEWLLHKKDRNLGFKISLHCPCTFVPSNNYIIPNKSEELARFA
 GIDGSTYTSGDQKTIKSTRKKNKSGKTPHLLMLLPSYRLESQQTNRKKRALDAAYCFRNVDNCCRLPLYIDFKR
 DLGKWIHEPKGYANFCAGACPYLWSSDTQHSRVLSTYNTINFEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSN
 MIVKSCCKCS

ФИГ.3D

Зрелый человеческий трансформирующий фактор роста бета-2 SEQ ID NO: 116

ALDAAYCFRNVDNCCRLPLYIDFKRDLGKWIHEPKGYANFCAGACPYLWSSDTQH
 SRVLSYNTINFEASASPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSCCKCS

ФИГ.3Е

Человеческий латентно-ассоциированный пептид и трансформирующий фактор роста

бета-3 SEQ ID NO: 117

LSTCTLDFGHIKKRVEAIKQILSKLRITSPPEPTVMTHVPYQVLALYNSTRELLBEMHGEREEGCTQRNTESEY
 YAKEIHKFDMIQGLAEHNELAVCPKGITSKVFRFNVSSVEKNRTNLFRAEFVLRVPNPSSKRNEQRIELFQILRPD
 EHIKQRYIGGKNLPTRGTAEWLSFDVTDVREWLLRRESNLGLEISIHCPCHTFQPNGDILENIHEVMEIKFKGVD
 NEDDHGRGDLGRLKKQKDHNNPHILIMMIPPHRLDNPGQGGQRKRALDTHNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGK
 WVHEPKGYANFCSGPCPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNFEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMIVK
 CKCS

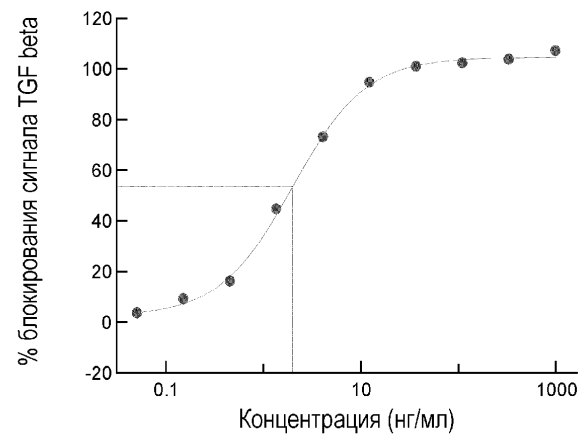
ФИГ.3F

Зрелый человеческий трансформирующий фактор роста бета-3 SEQ ID NO: 118

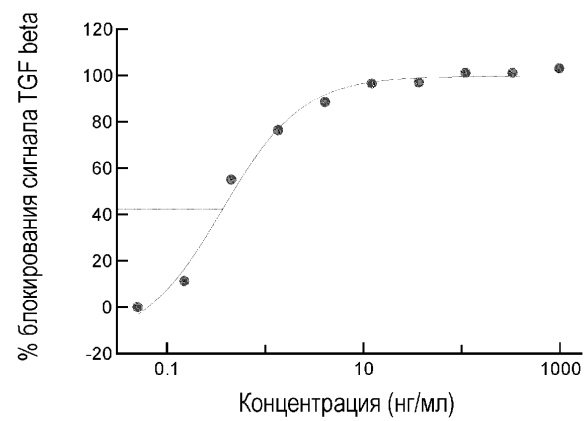
ALDTHNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGKWIHEPKGYANFCSGPCPYLRSADTTHST
 VLGLYNTLNFEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMIVKSCCKCS

32/47

ФИГ.4А

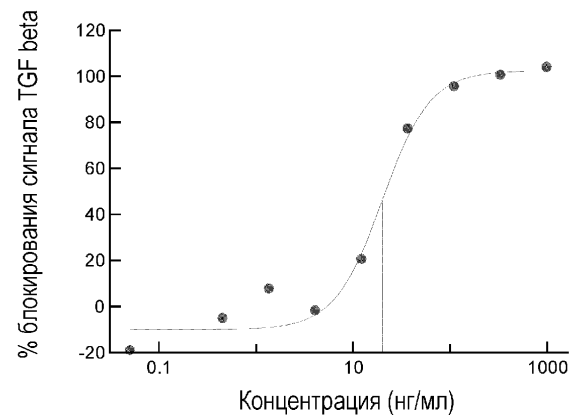


ФИГ.4В



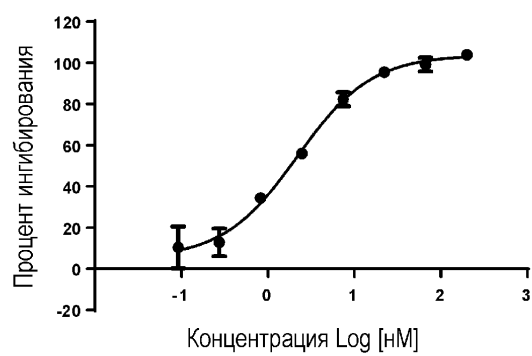
33/47

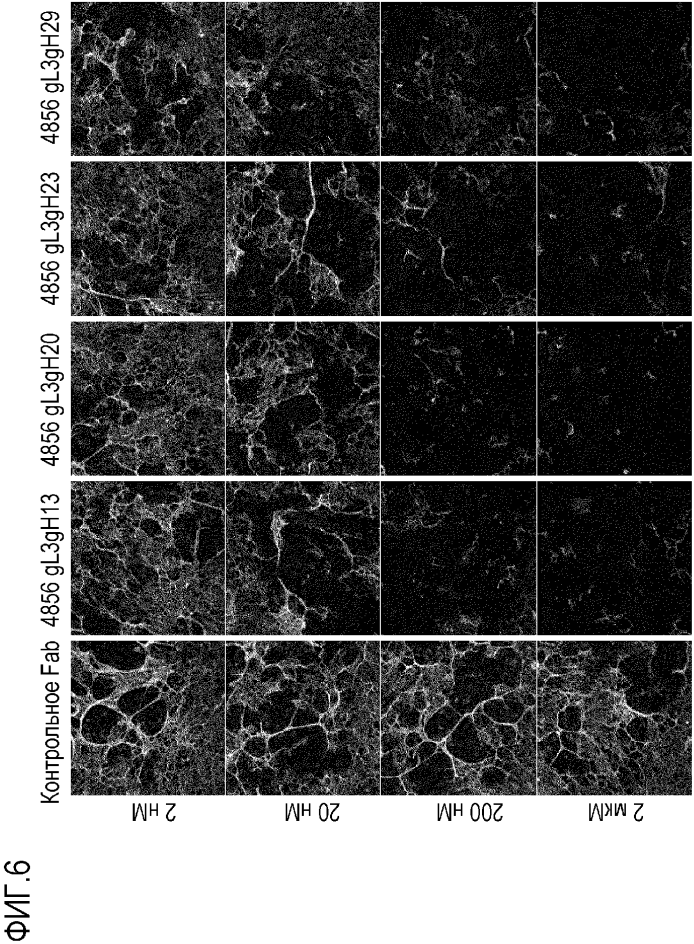
ФИГ.4С



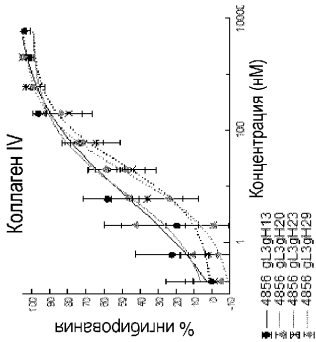
34/47

ФИГ.5

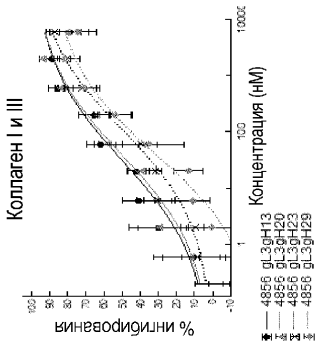




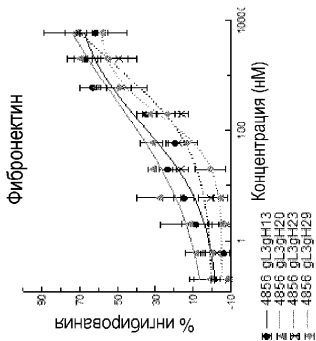
ФИГ.7С



ФИГ.7В

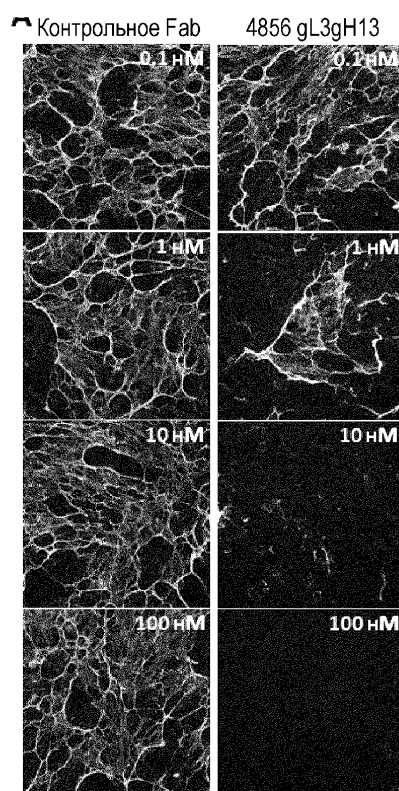


ФИГ.7А



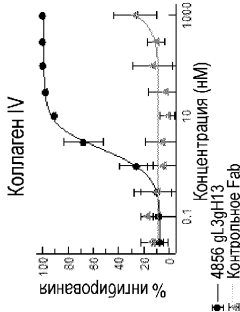
37/47

ФИГ.8

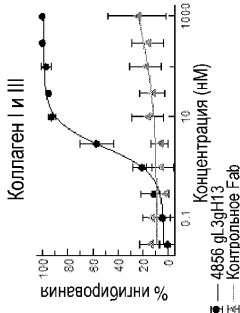


38/47

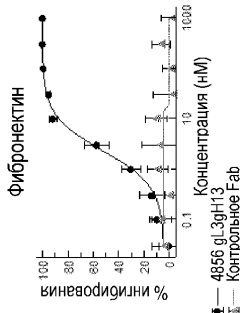
ФИГ.9С



ФИГ.9В

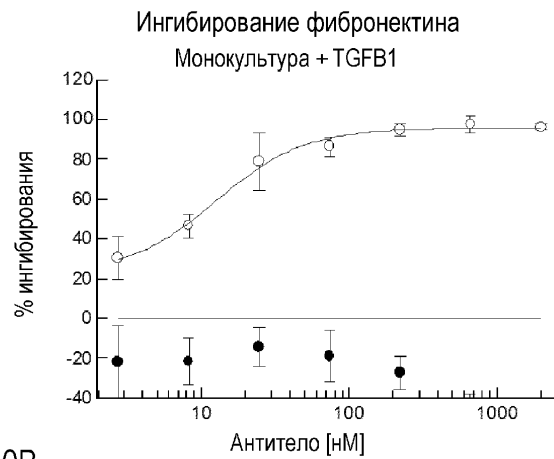


ФИГ.9А

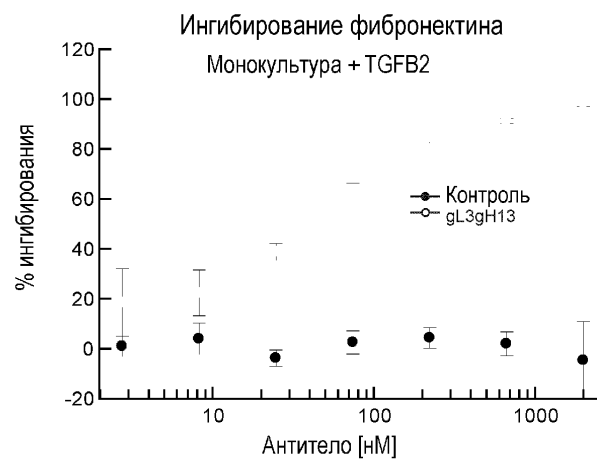


39/47

ФИГ.10А

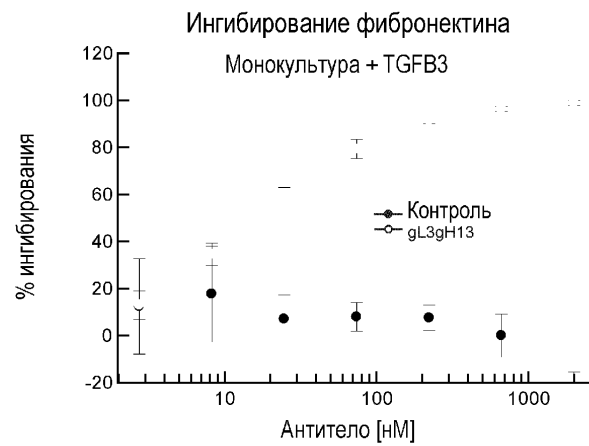


ФИГ.10В

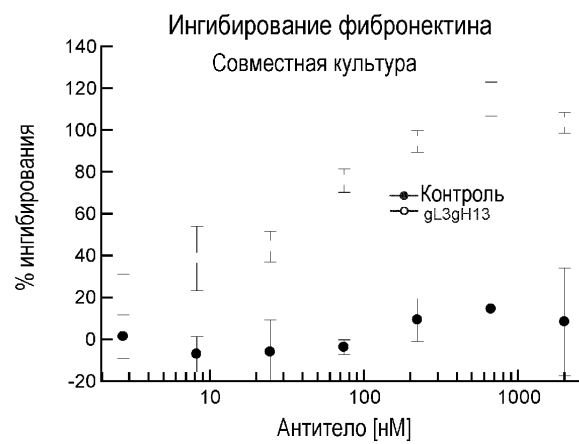


40/47

ФИГ.10С

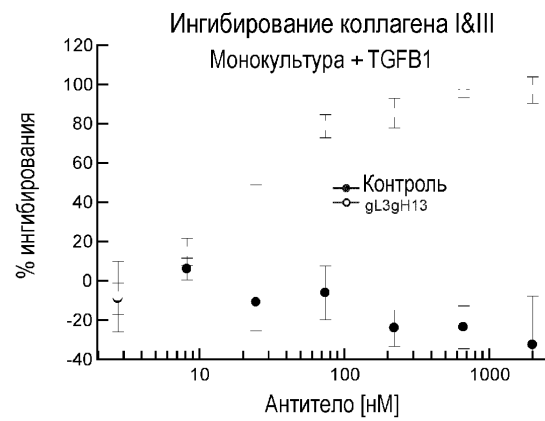


ФИГ.10D

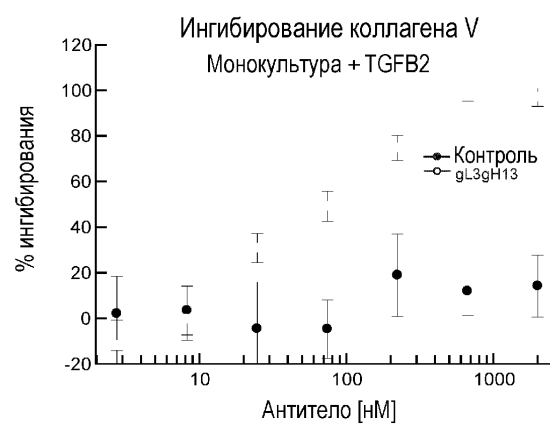


41/47

ФИГ.11А

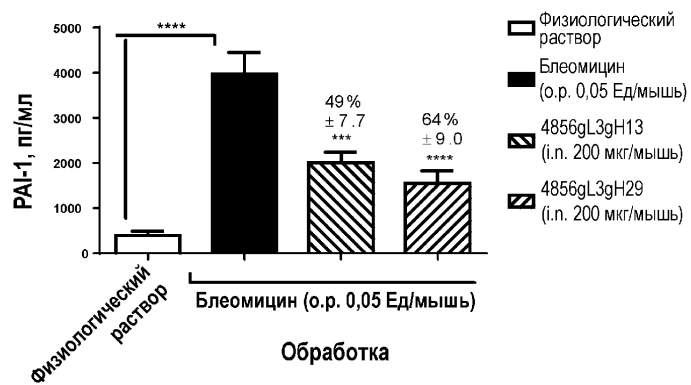


ФИГ.11В

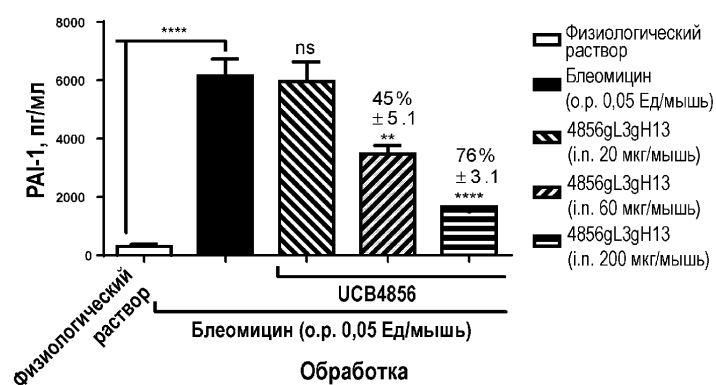


42/47

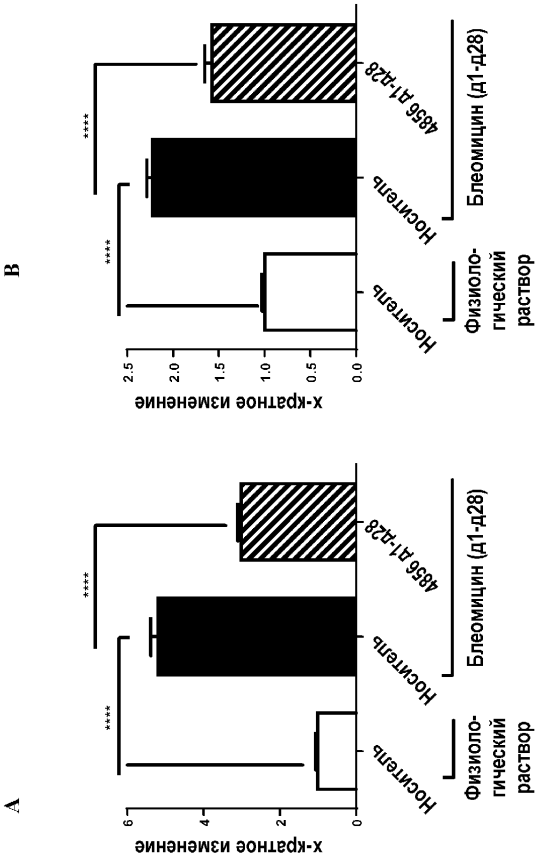
ФИГ.12



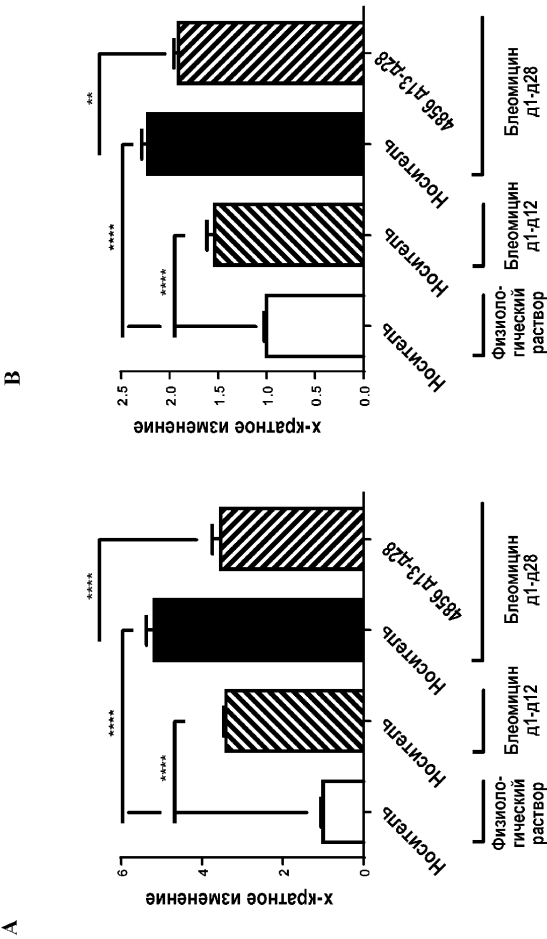
ФИГ.13



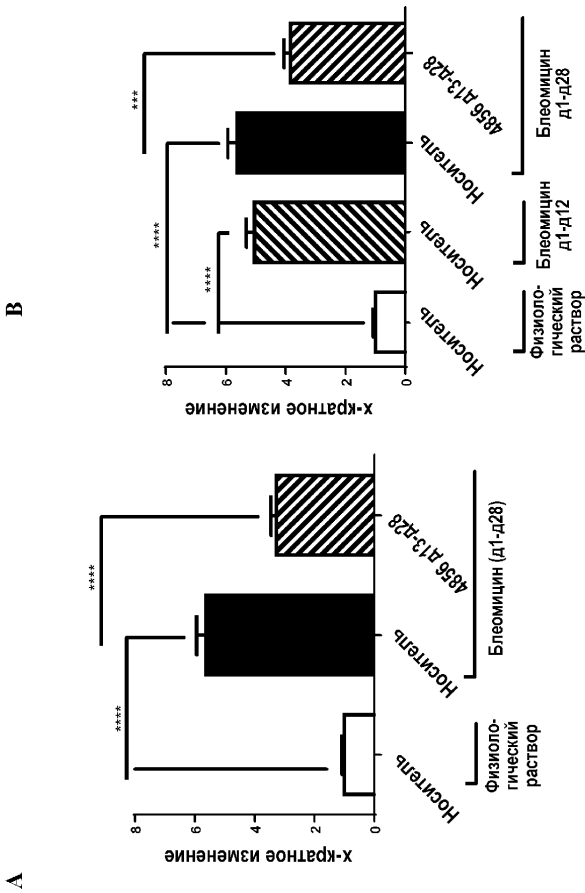
ФИГ.14



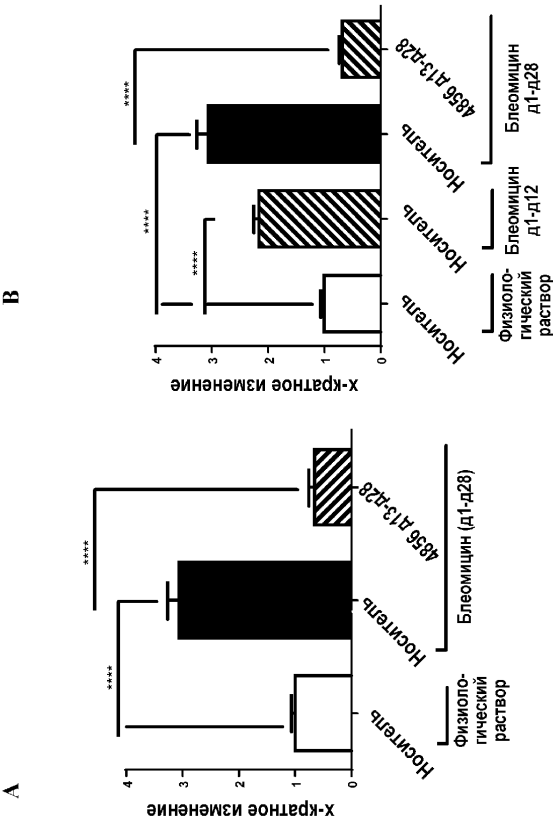
ФИГ.15



ФИГ.16



ФИГ.17



47/47

ФИГ.18А

Зрелый человеческий TGF-beta 1 (SEQ ID NO:114), демонстрирующий остатки, вовлеченные во взаимодействие с 4856 Fab gL3gH13 (подчеркнуто), и остатки, критичные для взаимодействия с TbetaRI и TbetaRII (выделено жирным шрифтом). Контактирующие остатки с разрешением 4Å.

1
ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDF**FKDLGWKWI**HEPKGY
40
HANFCLGPCPY**I**WSLDTQYS**K**VLA**L**YNQHNPASAAAPCCV
80
PQALEPLPIV**Y****Y****V****G****R****K****P****K**VEQLSNMIVRSCKCS

4856: R25, K26, D27, L28, G29, W30, K31, W32, I33, H34, K60, L64, H68, Y90, V92, G93, R94, K97, E99, L101

ФИГ.18В

Зрелый человеческий TGF-beta 1 (SEQ ID NO:114), демонстрирующий остатки, вовлеченные во взаимодействие с 4856 Fab gL3gH13 (подчеркнуто), и остатки, критичные для взаимодействия с TbetaRI и TbetaRII (выделено жирным шрифтом). Контактирующие остатки с разрешением 5Å.

1
ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDF**FKDLGWKWI**HEPKGY
40
HANFCLGPCPY**I**WSLDTQYS**K**VLA**L**YNQHNPASAAAPCCV
80
PQALEPLPIV**Y****Y****V****G****R****K****P****K**VEQLSNMIVRSCKCS

4856: R25, K26, D27, L28, G29, W30, K31, W32, H34, I33, Q57, K60, L64, H68, I88, Y90, Y91, V92, G93, R94, K95, K97, E99, L101

ФИГ.18С

Зрелый человеческий TGF-beta 2 (SEQ ID NO:116), демонстрирующий остатки, вовлеченные во взаимодействие с scFv 4856 (подчеркнуто). Контактирующие остатки с разрешением 4Å.

ALDAAYCFRN VQDNCCLRPL YIDF**K****R****D****L****G****W** **K****W****I**HEPKGYN ANFCAGACPY **L**WSSDTQHSR
VLS**L**YNTINP EASAPCCVS QDLEPLTILY **Y****I****G****K**TPKIEQ **L**SNMIVKSCK CS