



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012128651/10, 07.12.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
07.12.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

10.12.2009 EP 09015310.7;

19.08.2010 EP 10173407.7

(43) Дата публикации заявки: 20.01.2014 Бюл. № 2

(45) Опубликовано: 20.10.2015 Бюл. № 29

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 2009/112245 A1, 17.09.2009. WO 2009/026303 A1, 26.02.2009. ПОДОЛЬЦЕВА Э.И., Колонистимулирующие факторы в онкологии, Практическая онкология, 2001, N1 (5), стр.21-24

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 10.07.2012

(86) Заявка РСТ:
EP 2010/069090 (07.12.2010)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2011/070024 (16.06.2011)

Адрес для переписки:

105082, Москва, Спартаковский пер., д. 2, стр. 1,
секция 1, этаж 3, "Евромаркпат"

(72) Автор(ы):

ДИМОУДИС Николаос (DE),
ФЕРТИГ Георг (DE),
ФИДЛЕР Александер (DE),
КАЛУЦА Клаус (DE),
ПИКЛЬ Марлене (DE),
РИС Карола (DE),
ЗЕБЕР Штефан (DE),
ЛАНЦЕНДЁРФЕР Мартин (DE)

(73) Патентообладатель(и):

Ф.ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ (CH)

(54) АНТИТЕЛА, СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ ПРЕИМУЩЕСТВЕННО С ВНЕКЛЕТОЧНЫМ ДОМЕНОМ 4 ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО CSF-1R, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии, в частности к антителам к человеческому CSF-1R, способам их получения, фармацевтическим композициям, содержащим указанные антитела, и вариантам их применения. Заявлены варианты антитела, связывающегося с CSF-1R, а также фармацевтическая композиция для лечения опосредуемых CSF-1R заболеваний. Также

заявлены варианты применения указанного антитела и способ его получения с необходимыми для этого нуклеиновой кислотой, экспрессионным вектором и клеткой-хозяином. Изобретение позволяет эффективно ингибировать рост клеток, экспрессирующих CSF-1R. 12 н. и 10 з.п. ф-лы, 13 ил., 11 табл., 12 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 565 541** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2012128651/10, 07.12.2010

(24) Effective date for property rights:
07.12.2010

Priority:

(30) Convention priority:
10.12.2009 EP 09015310.7;
19.08.2010 EP 10173407.7

(43) Application published: 20.01.2014 Bull. № 2

(45) Date of publication: 20.10.2015 Bull. № 29

(85) Commencement of national phase: 10.07.2012

(86) PCT application:
EP 2010/069090 (07.12.2010)

(87) PCT publication:
WO 2011/070024 (16.06.2011)

Mail address:

105082, Moskva, Spartakovskij per., d. 2, str. 1,
seksija 1, ehtazh 3, "Evromarkpat"

(72) Inventor(s):

**DIMOUDIS Nikolaos (DE),
FERTIG Georg (DE),
FIDLER Aleksander (DE),
KALUTsA Klaus (DE),
PIKL' Marlene (DE),
RIS Karola (DE),
ZEBER Shtefan (DE),
LANTsENDERFER Martin (DE)**

(73) Proprietor(s):

F.KhOFFMANN-LJa ROSh AG (CH)

(54) **ANTIBODIES PRIMARILY BINDING TO EXTRACELLULAR DOMAIN 4 OF HUMAN CSF-1R, AND USING THEM**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention refers to biochemistry, particularly to anti-human CSF-1R antibodies, methods for producing them, pharmaceutical compositions containing the above antibodies, and applications thereof. There are disclosed versions of the CSF-1R-binding antibody, as well as a pharmaceutical

composition for treating CSF-1R-mediated diseases. There are also disclosed applications of the above antibody and the method for producing them with the necessary nucleic acid, expression vector and host cell.

EFFECT: invention enables inhibiting the CSF-1R-expressing cell growth effectively.

22 cl, 13 dwg, 11 tbl, 12 ex

Настоящее изобретение относится к антителам в человеческому CSF-1R (антитела к CSF-1R), способам их получения, фармацевтическим композициям, которые содержат указанные антитела, и вариантам их применения.

Предпосылки создания изобретения

5 Рецептор человеческого CSF-1 (CSF-1R; рецептор колониестимулирующего фактора 1; синонимы: рецептор M-CSF; рецептор макрофагального колониестимулирующего фактора 1, протоонкоген Fms, c-fms, SEQ ID NO:62) известен с 1986 г. (Coussens L. и др., Nature 320, 1986, сс.277-280). CSF-1R представляет собой фактор роста и кодируется протоонкогеном c-fms (см., например, обзор Roth P. и Stanley E.R., Curr. Top. Microbiol.
10 Immunol. 181, 1992, сс.141-67).

CSF-1R представляет собой рецептор CSF-1 (колониестимулирующий фактор 1, который обозначают также как M-CSF, макрофагальный колониестимулирующий фактор 1) и опосредует биологические действия указанного цитокина (Sherr C.J. и др., Cell 41, 1985, сс.665-676). Клонирование рецептора колониестимулирующего фактора
15 1 (CSF-1R) (который обозначают также как c-fms) впервые описано у Roussel M.F. и др., Nature 325, 1987, сс.549-552. В этой публикации описано, что CSF-1R обладает трансформирующим потенциалом, зависящим от изменений в С-концевом «хвосте» белка, включая утрату способности ингибировать фосфорилирование тирозина 969, который связывается с каннабиоидным рецептором Cbl, и тем самым регулирует
20 понижающую регуляцию рецептора (Lee P.S. и др., Embo J. 18, 1999, сс.3616-3628). В последние годы идентифицирован второй лиганд для CSF-1R, обозначенный как интерлейкин-34 (IL-34) (Lin H. и др., Science, 320, 2008, сс.807-811).

Цитокин CSF-1 (колониестимулирующий фактор 1, который обозначают также как M-CSF, макрофагальный колониестимулирующий фактор 1) присутствует вне клетки
25 в виде связанного дисульфидным мостиком гомодимера (Stanley E.R. и др., Journal of Cellular Biochemistry 21, 1983, сс.151-159; Stanley E.R. и др., Stem Cells 12, приложение 1, 1995, сс.15-24).

Основными биологическими действиями, связанными с передачей сигналов CSF-1R, являются дифференцировка, пролиферация, миграция и выживание гематopoэтических
30 клеток-предшественников линии дифференцировки макрофагов (включая остеокласты). Активация CSF-1R опосредуется его лигандами, т.е. CSF-1 (M-CSF) и IL-34. Связывание CSF-1 (M-CSF) с CSF-1R индуцирует образование гомодимеров и активацию киназы путем фосфорилирования тирозина (Li W. и др., EMBO Journal. 10, 1991, сс.277-288; Stanley E.R. и др., Mol. Reprod. Dev. 46, 1997, сс.4-10).

Биологически активный гомодимер CSF-1 связывается с CSF-1R в субдоменах D1-
D3 внеклеточного домена рецептора CSF-1 (CSF-1R-ECD). CSF-1R-ECD содержит пять иммуноглобулинподобных субдоменов (обозначены как D1-D5). Субдомены D4-D5
внеклеточного домена (CSF-1R-ECD) не участвуют в связывании CSF-1 (Wang Z. и др., Molecular and Cellular Biology 13, 1993, сс.5348-5359). Субдомен D4 участвует в
40 димеризации (Yeung Y-G. и др., Molecular & Cellular Proteomics 2, 2003, сс.1143-1155; Pixley F.J. и др., Trends Cell Biol 14, 2004, сс.628-638).

Кроме того передача сигналов опосредуется p85-субъединицей PI3K и Grb2, связанными с путями PI3K/АКТ и Ras/MAPK соответственно. Указанные два важных
пути передачи сигналов могут регулировать пролиферацию, выживание и апоптоз.
45 Другими сигнальными молекулами, которые связываются с фосфорилированным внутриклеточным доменом CSF-1R, представляют собой STAT1, STAT3, PLC γ и СЫ (Bourette R.P. и Rohrschneider L.R., Growth Factors 17, 2000, сс.155-166).

Передача сигналов CSF-1R имеет физиологическое значение для иммунных ответов,

для ремоделирования кости и для репродуктивной системы. Установлено, что животные, у которых «выключен» либо CSF-1 (Pollard J.W., Mol. Reprod. Dev. 46, 1997, сс.54-61), либо CSF-1R (Dai X.M. и др., Blood, 99, 2002, сс.111-120), имеют такие остеопетрозные, гематопозитические фенотипы, фенотипы тканевых макрофагов и репродуктивной

- 5 системы, которые свидетельствуют о роли CSF-1R в соответствующих типах клеток.
- Sherr C.J. с соавторами в: Blood, 73, 1989, сс.1786-1793 описали некоторые антитела к CSF-1R, которые ингибируют активность CSF-1 (см. Sherr C.J. и др., Blood, 73, 1989, сс.1786-1793). Ashmun R.A. и др., Blood, 73, 1989, сс.827-837 описали антитела к CSF-1R. Lenda, D. и др., Journal of Immunology, 170, 2003, сс.3254-3262 описали снижение
- 10 рекрутмента, пролиферации и активации макрофагов у мышей с дефицитом CSF-1, что приводило к пониженному апоптозу в трубочках при воспалении почек. Kitaura H. и др., Journal of Dental Research, 87, 2008, сс.396-400 описали антитело к CSF-1, которое ингибирует ортодонтическое перемещение зубов. В WO 2001/030381 упомянуты ингибиторы активности CSF-1, включающие антисмысловые нуклеотиды и антитела,
- 15 но описаны только антисмысловые нуклеотиды CSF-1. В WO 2004/045532 описано предупреждение метастазов и потери костной ткани и лечение метастатического рака с помощью антагониста CSF-1, при этом описаны только антагонистические антитела к CSF-1. В WO 2005/046657 описано лечение воспалительного заболевания кишечника в помощью антител к CSF-1. В US 2002/0141994 описаны ингибиторы
- 20 колониестимулирующих факторов. В WO 2006/096489 описано лечение ревматоидного артрита с помощью антител к CSF-1. В WO 2009/026303 и WO 2009/112245 описаны конкретные антитела к CSF-1R, связывающиеся с CSF-1R, в первых трех субдоменах (D1-D3) внеклеточного домена (CSF-1R-ECD).

Краткое изложение сущности изобретения

- 25 Настоящее изобретение относится к антителу, связывающемуся с человеческим CSF-1R, которое отличается тем, что антитело связывается с фрагментом человеческого CSF-1R delD4 (SEQ ID NO:65) и с внеклеточным доменом человеческого CSF-1R (SEQ ID NO:64) в соотношении 1:50 или менее.

- Изобретение относится также к антителу, предлагаемому в изобретении, которое
- 30 отличается тем, что

а) переменная область тяжелой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:7, и переменная область легкой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:8,

- б) переменная область тяжелой цепи имеет последовательность, представленную
- 35 в SEQ ID NO:15, и переменная область легкой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:16,

в) переменная область тяжелой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:75, и переменная область легкой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:76,

- г) переменная область тяжелой цепи имеет последовательность, представленную
- 40 в SEQ ID NO:83, и переменная область легкой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:84, или к его гуманизированной версии.

Изобретение относится также к антителу, предлагаемому в изобретении, которое отличается тем, что

- а) переменная область тяжелой цепи имеет последовательность, представленную
- 45 в SEQ ID NO:7, и переменная область легкой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:8,

б) переменная область тяжелой цепи имеет последовательность, представленную

в SEQ ID NO:15, и переменная область легкой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:16, или к его гуманизированной версии.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, отличается тем, что

а) переменная область тяжелой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:23, и переменная область легкой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:24, или

б) переменная область тяжелой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:31, и переменная область легкой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:32, или

в) переменная область тяжелой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:39, и переменная область легкой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:40, или

г) переменная область тяжелой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:47, и переменная область легкой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:48, или

д) переменная область тяжелой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:55, и переменная область легкой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:56.

Изобретение относится также к антителу, предлагаемому в изобретении, которое отличается тем, что

а) переменная область тяжелой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:1, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:2, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:3, и переменная область легкой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:4, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:5, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:6, или

б) переменная область тяжелой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:9, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:10, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:11, и переменная область легкой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:12, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:13, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:14, или

в) переменная область тяжелой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:17, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:18, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:19, и переменная область содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:20, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:21, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:22, или

г) переменная область тяжелой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:25, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:26, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:27, и переменная область легкой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:28, CDR2-участок,

последовательность которого представлена в SEQ ID NO:29, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:30, или

д) вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:33, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:34, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:35, и вариабельная область легкой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:36, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:37, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:38, или

е) вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:41, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:42 и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:43, и вариабельная область легкой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:44, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:45, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:46, или

ж) вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:49, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:50, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:51, и вариабельная область легкой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:52, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:53, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:54, или

з) вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:69, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:70, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:71, и вариабельная область легкой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:72, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:73, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:74, или

и) вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:77, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:78, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:79, и вариабельная область легкой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:80, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:81, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:82.

Предпо4 тительно антитело, предлагаемое в изобретении, представляет собой 4елове4еское антитело подкласса IgG1 или человеческое антитело подкласса IgG4.

Следующим вариантом осуществления изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая антитело, предлагаемое в изобретении.

Изобретение относится также к применению антитела, предлагаемого в изобретении, для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения опосредуемого CSF-1R заболевания.

Изобретение относится также к применению антитела, предлагаемого в изобретении, для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения рака.

Изобретение относится также к применению антитела, предлагаемого в изобретении,

для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения потери костной ткани.

Изобретение относится также к применению антитела, предлагаемого в изобретении, для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения метастазов.

5 Изобретение относится также к применению антитела, предлагаемого в изобретении, для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения воспалительных заболеваний.

Изобретение относится также к антителу, предлагаемому в изобретении, предназначенному для лечения опосредуемого CSF-1R заболевания.

10 Изобретение относится также к антителу, предлагаемому в изобретении, предназначенному для лечения рака.

Изобретение относится также к антителу, предлагаемому в изобретении, предназначенному для лечения потери костной ткани.

15 Изобретение относится также к антителу, предлагаемому в изобретении, предназначенному для лечения метастазов.

Изобретение относится также к антителу, предлагаемому в изобретении, предназначенному для лечения воспалительных заболеваний.

Следующим вариантом осуществления изобретения является нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, предлагаемое в изобретении, которое отличается тем, что

20 а) вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:1, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:2, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:3, и вариабельная область легкой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:4, CDR2-участок, 25 последовательность которого представлена в SEQ ID NO:5, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:6, или

б) вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:9, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:10, и CDR1-участок, последовательность которого 30 представлена в SEQ ID NO:11, и вариабельная область легкой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:12, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:13, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:14, или

в) вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:17, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:18, и CDR1-участок, последовательность которого 35 представлена в SEQ ID NO:19, и вариабельная область легкой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:20, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:21, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:22, или

г) вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:25, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:26, и CDR1-участок, последовательность которого 40 представлена в SEQ ID NO:27, и вариабельная область легкой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:28, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:29, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:30, или

д) вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR3-участок, последовательность

Следующим вариантом осуществления изобретения является нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, предлагаемое в изобретении, которое отличается тем, что

а) переменная область тяжелой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:23, и переменная область легкой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:24, или

б) переменная область тяжелой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:31, и переменная область легкой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:32, или

в) переменная область тяжелой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:39, и переменная область легкой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:40, или

г) переменная область тяжелой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:47, и переменная область легкой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:48, или

д) переменная область тяжелой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:55, и переменная область легкой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:56.

Изобретение относится также к экспрессионным векторам, которые содержат нуклеиновую кислоту, предлагаемую в изобретении, которые обладают способностью экспрессировать указанную нуклеиновую кислоту в прокариотической или эукариотической клетке-хозяине, и к клеткам-хозяевам, которые содержат указанные векторы, предназначенные для получения методом рекомбинации антитела, предлагаемого в изобретении.

Изобретение относится также к прокариотической или эукариотической клетке-хозяину, которая содержит вектор, предлагаемый в изобретении.

Изобретение относится также к способу получения рекомбинантного человеческого или гуманизированного антитела, предлагаемого в изобретении, отличающемуся тем, что экспрессируют нуклеиновую кислоту, предлагаемую в изобретении, в прокариотической или эукариотической клетке-хозяине и выделяют антитело из клетки или супернатанта клеточной культуры. Изобретение относится также к антителу, полученному методом рекомбинации.

Антитела, предлагаемые в изобретении, оказывают благоприятное действие на пациентов, которые нуждаются в направленной на CSF-1R терапии. Антитела, предлагаемые в изобретении, обладают также высокой антипролиферативной активностью в отношении независимой от лиганда и зависимой от лиганда пролиферации и поэтому их особенно предпочтительно применять для лечения рака и метастазов.

Изобретение относится также к способу лечения пациента, страдающего раком, заключающемуся в том, что пациенту, у которого диагностировано наличие указанного заболевания (и который поэтому нуждается в такой терапии), вводят в эффективном количестве антитело, предлагаемое в изобретении. Антитело вводят предпочтительно в составе фармацевтической композиции.

Следующим вариантом осуществления изобретения является способ лечения пациента, страдающего раком, отличающийся тем, что вводят пациенту антитело, предлагаемое в изобретении.

При создании изобретения неожиданно было установлено, что, используя фрагмент человеческого CSF-1R delD4, в котором D4-субдомен человеческого CSF-1R-ECD удален в результате делеции (SEQ ID NO:65), можно отбирать новые антитела к CSF-1R. Эти антитела обладают ценными свойствами, такими как очень высокое зависящее от

лиганда ингибирование клеточного роста и в то же время независимое от лиганда ингибирование роста клеток линии NIH 3T3, инфицированных ретровирусным экспрессионным вектором, несущим либо полноразмерный CSF-1R дикого типа (SEQ ID NO:62), либо мутант CSF-1R L301S Y969F (SEQ ID NO:63), при этом несущие

5 мутантный CSF-1R рекомбинантные клетки обладают способностью формировать сфероиды вне зависимости от лиганда CSF-1. Кроме того, антитела, предлагаемые в изобретении, ингибируют дифференцировку макрофагов как у человека, так и у яванского макака-крабоеда (циномолгус) (у обоих видов), поскольку они ингибируют выживаемость моноцитов человека и обезьяны цинномолгус.

10 Подробное описание изобретения

Изобретение относится к антителу, связывающемуся с человеческим CSF-1R, которое отличается тем, что антитело связывается с фрагментом человеческого CSF-1R delD4 (который содержит внеклеточные субдомены D1-D3 и D5) (SEQ ID NO:65) и с внеклеточным доменом человеческого CSF-1R (CSF-1R-ECD) (который содержит

15 внеклеточные субдомены D1-D5) (SEQ ID NO:64) в соотношении 1:50 или менее.

Изобретение относится также к антителу, предлагаемому в изобретении, отличающемуся тем, что содержит в качестве CDR3-участка варибельной области тяжелой цепи CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:47 или SEQ ID

20 NO:55.

Изобретение относится также к антителу, предлагаемому в изобретении, отличающемуся тем, что

а) варибельная область тяжелой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:7, и варибельная область легкой цепи имеет последовательность,

25 представленную в SEQ ID NO:8,

б) варибельная область тяжелой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:15, и варибельная область легкой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:16,

или к его гуманизированной версии.

30 Изобретение относится также к антителу, предлагаемому в изобретении, отличающемуся тем, что

а) варибельная область тяжелой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:7, и варибельная область легкой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:8,

35 б) варибельная область тяжелой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:15, и варибельная область легкой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:16,

в) варибельная область тяжелой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 75, и варибельная область легкой цепи имеет последовательность,

40 представленную в SEQ ID NO:76,

г) варибельная область тяжелой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:83, и варибельная область легкой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:84,

или к его гуманизированной версии.

45 Изобретение относится также к антителу, предлагаемому в изобретении, отличающемуся тем, что

варибельная область тяжелой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:7, и варибельная область легкой цепи имеет последовательность,

представлена в SEQ ID NO:34, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:35, и переменная область легкой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:36, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:37, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:38.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, отличается тем, что

переменная область тяжелой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:41, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:42, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:43, и переменная область легкой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:44, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:45, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:46.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения антитело, которое связывается с человеческим CSF-1R, отличается тем, что антитело связывается с фрагментом человеческого CSF-1R delD4 (SEQ ID NO:65) и с человеческим CSF-1R-ECD (SEQ ID NO:64) в соотношении 1:50 или менее, и отличается также тем, что не связывается с фрагментом человеческого CSF-1R D1-D3 (SEQ ID NO:66).

Понятие «антитело» относится к различным формам антител, включая (но не ограничиваясь ими) полные антитела, фрагменты антител, человеческие антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела, антитела с истощенными T-клеточными эпитопами и, кроме того, созданные с помощью генной инженерии антитела, если они сохраняют отличительные признаки, предлагаемые в изобретении. Понятие «фрагменты антитела» относится к части полноразмерного антитела, предпочтительно к его переменной области или по меньшей мере к его антигенсвязывающему центру. Примерами фрагментов антител являются димерные антитела (диабоды), молекулы одноцепочечных антител и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Антитела формата scFv описаны, например, у Houston J.S., *Methods in Enzymol.* 203, 1991, сс.46-88. Кроме того, к фрагментам антитела относятся одноцепочечные полипептиды, которые имеют характеристики V_H -области, связывающейся с CSF-1R, а именно, обладают способностью объединяться с V_L -областью, или V_H -области, связывающейся с CSF-1R, а именно, обладают способностью объединяться с V_L -областью с образованием функционального антигенсвязывающего центра и, следовательно, обладающие требуемым свойством.

Понятия «моноклональное антитело» или «композиция моноклонального антитела» в контексте настоящего описания относятся к препарату молекул антитела, которые имеют одинаковый состав аминокислот.

Понятие «химерное антитело» относится к моноклональному антителу, содержащему мышиную переменную область, т.е. связывающую область, и по меньшей мере одну часть константной области из другого источника или других видов, как правило, полученному с помощью методов рекомбинантной ДНК. Химерные антитела, которые содержат мышиную переменную область и человеческую константную область, являются наиболее предпочтительными. Такие крысиные/человеческие химерные антитела представляют собой продукт экспрессированных генов иммуноглобулина, которые содержат ДНК-сегменты, кодирующие переменные области крысиного иммуноглобулина, и ДНК-сегменты, кодирующие константные области человеческого

иммуноглобулина. Другие формы «химерных антител», подпадающие под объем настоящего изобретения, представляют собой такие формы, в которых класс или подкласс модифицирован или изменен относительно исходного антитела. Такие «химерные» антитела обозначают также как «антитела переключенного класса».

- 5 Методы получения химерных антител включают общепринятые методы, основанные на применении рекомбинантной ДНК и генной трансфекции, которые в настоящее время хорошо известны в данной области (см., например, Morrison S.L. и др., *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1984, сс.6851-6855; US 5202238 и US 5204244).

- 10 Понятие «гуманизированное антитело» относится к антителам, в которых каркасный участок или «гипервариабельные участки» (CDR) модифицированы таким образом, что они содержат CDR иммуноглобулина из других видов по сравнению с родительским иммуноглобулином. В предпочтительном варианте осуществления изобретения мышинный CDR трансплантируют в каркасный участок человеческого антитела, получая «гуманизированное антитело» (см., например, Riechmann L. и др., *Nature* 332, 1988, сс.323-
15 327; и Neuberger M.S. и др., *Nature* 314, 1985, сс.268-270). Необязательно каркасный участок можно модифицировать с помощью дополнительных мутаций. CDR также можно модифицировать с помощью одной или нескольких мутаций с получением антител, предлагаемых в изобретении, например, с помощью мутагенеза, основанного на молекулярном моделировании, который описан у Riechmann L. и др., *Nature*, 332,
20 1988, сс.323-327 и Queen C. и др., *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1989, сс.10029-10033, или у других авторов. Наиболее предпочтительные CDR соответствуют CDR, которые имеют репрезентативные последовательности, распознающие антигены, указанные выше для химерных антител. «Гуманизированная версия антитела, предлагаемого в изобретении» (которое, например, происходит из организма мышей), относится к
25 антителу, основой которого являются последовательности мышинного антитела, в которых V_H и V_L гуманизированы стандартными методами (включая трансплантацию CDR и необязательно последующий мутагенез определенных аминокислот в каркасном участке и CDR). Предпочтительно указанная гуманизированная версия является химеризованной с помощью человеческой константной области (см., например,
30 последовательности SEQ ID NO:57-61).

- Другими формами «гуманизированных антител», подпадающим под объем настоящего изобретения, являются антитела, в которых константная область дополнительно модифицирована или изменена относительно исходного антитела с
35 получением свойств, указанных в изобретении, прежде всего касательно C1q-связывания и/или связывания с Fc-рецептором (FcR).

В приведенных ниже примерах понятия «МАт» и «тиМАт» относятся к мышинным моноклональным антителам, таким как МАт 2F11 или МАт 2E10, а понятие «hМАт» относится к гуманизированным моноклональным версиям указанных мышинных антител, таким как hМАт 2F11-c11, hМАт 2F11-d8, hМАт 2F11-e7, hМАт 2F11-f12 и т.д.

- 40 В контексте настоящего описания подразумевается, что понятие «человеческое антитело» включает антитела, имеющие вариабельную и константную области, выведенные из последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. Человеческие антитела хорошо известны в данной области (van Dijk M.A. и van de Winkel J.G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5, 2001, сс.368-374). Человеческие антитела можно
45 получать также в трансгенных животных (например, мышах), которые обладают способностью после иммунизации вырабатывать полный спектр или определенный набор человеческих антител в отсутствие производства эндогенных иммуноглобулинов. Перенос набора генов иммуноглобулинов человеческой зародышевой линии в указанных

мышей мутантной зародышевой линией может приводить к образованию человеческих антител после антигенной стимуляции (см., например, Jakobovits A. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1993, сс.2551-2555; Jakobovits A. и др., Nature, 362, 1993, сс.255-258; Brueggemann M. и др., Year Immunol. 7, 1993, сс.33-40). Человеческие антитела можно
 5 получать также с помощью фаговых дисплейных библиотек (Hoogenboom H.R. и Winter G.J. Mol. Biol., 227, 1992, сс.381-388; Marks J.D. и др., J. Mol. Biol., 222, 1991, сс.581-597). Для получения человеческих моноклональных антител можно применять также методы, разработанные Cole с соавторами и Boerner с соавторами (Cole S.P.C. и др., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, под ред. Alan R. Liss, 1985, с.77; и Boerner P. и др., J. Immunol.
 10 147, 1991, сс.86-95). Как уже отмечалось для химерных и гуманизированных антител, согласно настоящему изобретению в контексте настоящего описания понятие «человеческое антитело» относится также к таким антителам, которые модифицированы в константной области для придания им свойств, предлагаемых в изобретении, прежде всего касательно C1q-связывания и/или FcR-связывания, например, посредством
 15 «переключения класса», т.е. изменения или мутации Fc-областей (например, посредством замены IgG1 на IgG4 и/или IgG1/IgG4-мутации).

Подразумевается, что понятие «рекомбинантное человеческое антитело» в контексте настоящего описания включает все человеческие антитела, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют методами рекомбинации, такие как антитела,
 20 выделенные из клетки-хозяина, такой как NS0- или CHO-клетка, или из животного (например, из мыши), которое является трансгенным в отношении генов человеческого иммуноглобулина, или антитела, экспрессируемые с помощью рекомбинантного экспрессионного вектора, которым трансфектируют клетку-хозяина. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют переменную и константную области
 25 в преобразованной форме. Рекомбинантные человеческие антитела, предлагаемые в изобретении, подвергали *in vivo* соматической гипермутации. Так, аминокислотные последовательности V_H- и V_L-областей рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и выведены из последовательностей V_H- и
 30 V_L-областей человеческой зародышевой линии и являются родственными им, но могут не встречаться в существующем в естественных условиях *in vivo* спектре зародышевых линий человеческого антитела.

Антитела, предлагаемые в изобретении, включают также указанные антитела, несущие «консервативные модификации последовательностей», т.е. модификации нуклеотидных
 35 и аминокислотных последовательностей, которые не влияют или не изменяют указанные выше характеристики антител, предлагаемых в изобретении. Модификации можно интродуцировать с помощью стандартных методов, известных в данной области, таких как сайнаправленный мутагенез и ПЦР-опосредуемый мутагенез. Консервативные аминокислотные замены включают замены, при которых один аминокислотный остаток
 40 заменяют другим аминокислотным остатком со сходной боковой цепью. Семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, определены в данной области. Эти семейства включают аминокислотные остатки с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми
 45 цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическим боковыми цепями (например,

тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, определенный остаток заменимой аминокислоты в человеческом антителе к CSF-1R можно предпочтительно заменять на другой аминокислотный остаток с боковой цепью из того же семейства боковых цепей.

5 Аминокислотные замены можно осуществлять с помощью мутагенеза, основанного на молекулярном моделировании, который описан у Riechmann L. и др., *Nature* 332, 1988, сс.323-327 и Queen C. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 1989, сс.10029-10033.

Человеческий CSF-1R (рецептор CSF-1; синонимы: рецептор M-CSF; рецептор макрофагального колониестимулирующего фактора 1, протоонкоген Fms, c-fms, SEQ ID NO:22) известен с 1986 г. (Coussens L. и др., *Nature* 320, 1986, сс.277-280). CSF-1R представляет собой фактор роста и кодируется протоонкогеном c-fms (см., например, обзор Roth P. и Stanley E.R., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 181, 1992, сс.141-167).

CSF-1R представляет собой рецептор CSF-1 (колониестимулирующий фактор 1, который обозначают также как M-CSF) и IL-34, и он опосредует биологические действия 15 указанных цитокинов (Sherr C.J. и др., *Cell* 41, 1985, сс.665-676; Lin H. и др., *Science*, 320, 2008, сс.807-811). Клонирование рецептора колониестимулирующего фактора 1 (CSF-1R) (который обозначают также как c-fms) впервые описано у Roussel M.F. и др., *Nature* 325, 1987, сс.549-552. В этой публикации было продемонстрировано, что CSF-1R обладает трансформирующим потенциалом, зависящим от изменений в С-концевом «хвосте» 20 белка, включая утрату способности ингибировать фосфорилирование тирозина 969, который связывается с Cb1, и тем самым регулирует понижающую регуляцию рецептора (Lee P.S. и др., *Embo J.* 18, 1999, сс.3616-3628).

CSF-1R представляет собой одноцепочечный трансмембранный тирозинкиназный рецептор (RTK) и является представителем семейства содержащих иммуноглобулиновый 25 (Ig) мотив RTK, отличающихся присутствием 5 повторяющихся Ig-подобных субдоменов D1-D5 во внеклеточном домене (ECD) рецептора (Wang Z. и др., *Molecular and Cellular Biology* 13, 1993, сс.5348-5359). Внеклеточный домен человеческого CSF-1R (CSF-1R-ECD) (SEQ ID NO:64) содержит все пять внеклеточных Ig-подобных субдоменов D1-D5. Фрагмент человеческого CSF-1R delD4 (SEQ ID NO:65) содержит внеклеточные Ig- 30 подобные субдомены D1-D3 и D5, но в нем отсутствует субдомен D4. Фрагмент человеческого CSF-1R D1-D3 (SEQ ID NO:66) содержит соответствующие субдомены D1-D3. Представленные последовательности не содержат сигнальный пептид MGSGPGVLLL LLVATAWHGQ G (SEQ ID NO:67).

Внутриклеточный протеинтирозинкиназный домен прерывается уникальным 35 доменом-вставкой, который присутствует также в других представителях родственных RTK класса III, к которым относятся рецепторы тромбоцитарного фактора роста (PDGFR), рецептор фактора роста стволовых клеток (c-Kit) и fins-подобный цитокиновый рецептор (FLT3). Несмотря на структурную гомологию, характерную для этого семейства рецепторов факторов роста, они обладают различными тканеспецифическими 40 функциями.

CSF-1R экспрессируется главным образом на клетках линии дифференцировки моноцитов и в женских половых путях и в плаценте. Кроме того, экспрессия CSF-1R описана в клетках Лангерганса, присутствующих в коже, подгруппе клеток гладкой мускулатуры (Inaba T. и др., *J. Biol. Chem.*, 267, 1992, сс.5693-5699), в В-клетках (Baker 45 А.Н. и др., *Oncogene* 8, 1993, сс.371-378) и в микроглии (Sawada M. и др., *Brain Res.* 509, 1990, сс.119-124). Для клеток с мутантным человеческим CSF-1R (SEQ ID NO:23) известна способность к пролиферации, независимой от стимуляции лигандами.

В контексте настоящего описания понятия «связывается с человеческим CSF-1R»

или «специфически связывает с человеческим CSF-1R» относятся к антителу, специфически связывающемуся с человеческим антигеном CSF-1R, при этом аффинность связывания при 35°C характеризуется величиной KD, составляющей $1,0 \times 10^{-8}$ моль/л или ниже, в одном из вариантов осуществления изобретения величина KD при 35°C составляет $1,0 \times 10^{-9}$ моль/л или ниже. Аффинность связывания определяют при 35°C с помощью стандартного анализа связывания, такого как поверхностный плазменный резонанс (SPR) (Biacore®, фирма GE-Healthcare Уппсала, Швеция). Метод определения величин KD, характеризующих аффинность связывания, описан в примере 9. Таким образом, в контексте настоящего описания понятие «антитело, связывающееся с человеческим CSF-1R» относится к антителу, которое специфически связывается с человеческим антигеном CSF-1R, аффинность связывания которого характеризуется величиной KD, составляющей при 35°C $1,0 \times 10^{-8}$ моль/л или ниже (предпочтительно $1,0 \times 10^{-8}$ моль/л - $1,0 \times 10^{-12}$ моль/л), предпочтительно величиной KD, составляющей при 35°C $1,0 \times 10^{-9}$ моль/л или ниже (предпочтительно $1,0 \times 10^{-9}$ моль/л - $1,0 \times 10^{-12}$ моль/л).

Согласно настоящему изобретению «связывание с фрагментом человеческого CSF-1R delD4 (SEQ ID NO:65) и внеклеточным доменом человеческого CSF-1R (SEQ ID NO: 64)» оценивают с помощью метода поверхностного плазменного резонанса (Biacore-анализ), который описан в примере 4. Фрагмент человеческого CSF-1R delD4 (SEQ ID NO:65) или внеклеточный домен человеческого CSF-1R (SEQ ID NO:64) соответственно иммобилизуют на поверхности (каждый на различной поверхности) и добавляют тестируемые антитела (осуществляя для каждого различные измерения) и определяют соответствующие сигналы связывания (единицы ответа (RU)). Вычитают референс-сигналы («пустая» поверхность). Если сигналы для несвязывающихся тестируемых антител несколько ниже 0, то их величины принимают за 0. Затем определяют соотношение соответствующих сигналов связывания (сигнал связывания (RU) с фрагментом человеческого CSF-1R delD4/сигнал связывания (RU) с внеклеточным доменом человеческого CSF-1R (CSF-1R-ECD)). Для антител, предлагаемых в изобретении, характерно соотношение сигналов связывания (RU(delD4)/RU(CSF-1R-ECD), составляющее 1:50 или ниже, предпочтительно 1:100 или ниже (наиболее низкое значение включает конечное значение, равное 0 (например, если величина RU равна 0, то соотношение составляет 0:50 или 0:100)).

Это означает, что указанные антитела к CSF-1R, предлагаемые в изобретении, не связываются с фрагментом человеческого CSF-1R delD4 (типа антитела к CCR5, обозначенного как m<CCR5>Pz03.1C5 (депонировано под регистрационным номером DSM ACC 2683 18.08.2004 г. в DSMZ), и их сигналы связывания, характеризующие связывание с фрагментом человеческого CSF-1R delD4, соответствуют сигналам антитела к CCR5 m<CCR5>Pz03.1C5, которые составляют менее 20 RU (единицы ответа), предпочтительно менее 10 RU при анализе методом поверхностного плазменного резонанса (BIAcore-анализ), изложенного в примере 4.

Понятие «связывание с фрагментом человеческого CSF-1R D1-D3» относится к определению аффинности связывания с помощью поверхностного плазменного резонанса (BIAcore-анализ). Тестируемое антитело иммобилизуют на поверхности и добавляют фрагмент человеческого CSF-1R D1-D3 (SEQ ID NO: 66), определяют соответствующие аффинности связывания. Понятие «отсутствие связывания с фрагментом человеческого CSF-1R D1-D3» означает, что при применении указанного анализа обнаруженный сигнал находился в области, не превышающей больше чем в 1,2 раза фоновый сигнал, и поэтому нельзя определить ни наличие значимой аффинности

связывания, ни отсутствие связывания (см. пример 10).

Одним из вариантов осуществления изобретения является способ скрининга, который предназначен для селекции антител, предлагаемых в изобретении, заключающийся в том, что осуществляют следующие стадии, на которых:

5 а) определяют сигнал связывания (в единицах ответа (RU)) антител к CSF-1R с фрагментом человеческого CSF-1R delD4 (SEQ ID NO:65) и внеклеточным доменом человеческого CSF-1R (CSF-1R-ECD) (SEQ ID NO:64) методом поверхностного плазменного резонанса (Biacore-анализ),

б) отбирают антитела, для которых обнаружено соотношение сигналов связывания (фрагмент человеческого CSF-1R t delD4/внеклеточный домен человеческого CSF-1R (CSF-1R-ECD)), составляющее 50:1 или ниже.

В одном из вариантов осуществления изобретения определение осуществляют при 25°C.

В одном из вариантов осуществления изобретения способ скрининга заключается также в том, что осуществляют дополнительные стадии, на которых измеряют связывание антитела к CSF-1R с фрагментом человеческого CSF-1R D1-D3 (SEQ ID NO: 66) (D1-D3) и отбирают антитела, которые не связываются с указанным фрагментом.

Понятие «эпитоп» относится к белковой детерминанте человеческого CSF-1R, которая обладает способностью специфически связываться с антителом. Эпитопы, как правило, состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи Сахаров, и, как правило, эпитопы имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда.

Конформационные и неконформационные эпитопы различаются тем, что связывание с первыми, в отличие от связывания с последними, утрачивается в присутствии денатурирующих растворителей. Предпочтительно антитело, предлагаемое в изобретении, связывается специфически с нативным и с денатурированным CSF-1R.

Понятие «вариабельная область» (вариабельная область легкой цепи (V_L), вариабельная область тяжелой цепи (V_H)) в контексте настоящего описания в каждом случае обозначает каждую из пары областей легких и тяжелых цепей, которые непосредственно принимают участие в связывании антитела с антигеном. Домены вариабельных областей легких и тяжелых цепей имеют некоторую общую структуру, и каждый домен содержит 4 каркасных участка (FR), последовательности которых являются высококонсервативными, связанных тремя «гипервариабельными участками» (или определяющими комплементарность областями, CDR). Каркасные участки адаптированы к β -складчатой конформации, а CDR-участки могут формировать петли, соединяющие β -складчатую структуру. CDR в каждой цепи поддерживаются в виде трехмерной структуры с помощью каркасных участков и формируют с CDR-участками другой цепи антигенсвязывающий центр. CDR3-участки тяжелой и легкой цепи антитела играют очень важную роль в специфичности связывания/аффинности антител, предлагаемых в изобретении, и вследствие этого являются дополнительным объектом изобретения.

Понятие «антигенсвязывающий участок (центр) антитела» в контексте настоящего описания относится к аминокислотным остаткам антитела, которые ответственны за связывание с антигеном. Антигенсвязывающий участок антитела содержит аминокислотные остатки из «гипервариабельных участков» или «CDR». «Каркасные» или «FR»-участки представляют собой участки вариабельной области, остатки которых отличны от остатков гипервариабельного участка, как они определены в настоящем описании. Таким образом, вариабельные области легких и тяжелых цепей антитела

содержат в направлении от N- к C-концу домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. CDR3 тяжелой цепи представляет собой основной участок, который обеспечивает главным образом связывание с антигеном и определяет свойства антитела. К CDR- и FR-участкам относятся участки, которые определяют согласно стандартному принципу Кэбота и др. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991) и/или остатки из «гипервариабельной петли».

Понятия «нуклеиновая кислота» или «молекула нуклеиновой кислоты» в контексте настоящего описания относятся к молекулам ДНК и молекулам РНК. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной, но предпочтительно представляет собой двухцепочечную ДНК.

Понятие «аминокислота» в контексте настоящего описания обозначает группу встречающихся в естественных условиях карбокси- α -аминокислот, таких как аланин (трехбуквенный код: ala, однобуквенный код: A), аргинин (arg, R), аспарагин (asn, N), аспарагиновая кислота (asp, D), цистеин (cys, C), глутамин (gln, Q), глутаминовая кислота (glu, E), глицин (gly, G), гистидин (his, H), изолейцин (ile, I), лейцин (leu, L), лизин (lys, K), метионин (met, M), фенилаланин (phe, F), пролин (pro, P), серин (ser, S), треонин (thr, T), триптофан (trp, W), тирозин (tyr, Y) и валин (val, V).

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения антитела, предлагаемые в изобретении, ингибируют связывание CSF-1 с CSF-1R. Согласно одному из вариантов осуществления изобретения значение IC_{50} составляет 200 нг/мл или ниже, согласно одному из вариантов осуществления изобретения значение IC_{50} составляет 50 нг/мл или ниже. Значение IC_{50} , характеризующее ингибирование связывания CSF-1 с CSF-1R, можно определять согласно методу, описанному в примере 2.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения антитела, предлагаемые в изобретении, ингибируют индуцируемое CSF-1 фосфорилирование CSF-1R (в рекомбинантных клетках линии NIH3T3-CSF-1R).

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения значение IC_{50} составляет 800 нг/мл или ниже, согласно одному из вариантов осуществления изобретения значение IC_{50} составляет 600 нг/мл или ниже, согласно одному из вариантов осуществления изобретения значение IC_{50} составляет 250 нг/мл или ниже. Значение IC_{50} , характеризующее ингибирование индуцируемого CSF-1 фосфорилирования CSF-1R, можно определять согласно методу, описанному в примере 3.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения антитела, предлагаемые в изобретении, ингибируют рост рекомбинантных NIH3T3-клеток, которые экспрессируют человеческий CSF-1R (SEQ ID NO:62). Согласно одному из вариантов осуществления изобретения значение IC_{50} составляет 10 мкг/мл или ниже, согласно одному из вариантов осуществления изобретения значение IC_{50} составляет 5 мкг/мл или ниже, согласно одному из вариантов осуществления изобретения значение IC_{50} составляет 2 мкг/мл или ниже. Согласно одному из вариантов осуществления изобретения значение IC_{50} составляет 10 мкг/мл или ниже, согласно одному из вариантов осуществления изобретения значение IC_{50} составляет 5 мкг/мл или ниже, согласно одному из вариантов осуществления изобретения значение IC_{50} составляет 2 мкг/мл или ниже. Значения IC_{50} , значения IC_{50} или % ингибирования роста определяют согласно методам, описанным в примере 5.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения антитела, предлагаемые

в изобретении, ингибируют рост рекомбинантных NIH3T3-клеток, которые экспрессируют человеческий мутантный CSF-1R L301S Y969F (SEQ ID NO:63). Согласно одному из вариантов осуществления изобретения значение IC_{50} составляет 15 мкг/мл или ниже, согласно одному из вариантов осуществления изобретения значение IC_{50} составляет 10 мкг/мл или ниже. Согласно одному из вариантов осуществления изобретения значение IC_{50} составляет 10 мкг/мл или ниже, согласно одному из вариантов осуществления изобретения значение IC_{50} составляет 5 мкг/мл или ниже, согласно одному из вариантов осуществления изобретения значение IC_{50} составляет 2 мкг/мл или ниже. Значения IC_{50} , значения IC_{50} или % ингибирования роста определяют согласно методам, описанным в примере 5.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения антитела, предлагаемые в изобретении, ингибируют рост опухолевых клеток линии BeWo (ATCC CCL-98) на 65% или более (при применении антитела в концентрации 10 мкг/мл и в сравнении с вариантом без антитела). Ингибирование роста (в %) определяют согласно методу, описанному в примере 8. Например, установлено, что МАт 2F11 ингибирует рост опухолевых клеток линии BeWo на 70%.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения антитела, предлагаемые в изобретении, ингибируют дифференцировку макрофагов как человека, так и обезьяны циномолгус (т.е. обоих видов) (что определяют по ингибированию выживания моноцитов человека и обезьяны циномолгус согласно методу, описанному в примерах 7 и 8). Согласно одному из вариантов осуществления изобретения антитела, предлагаемые в изобретении, ингибируют выживание человеческих моноцитов, что характеризуется значением IC_{50} , составляющим 0,15 мкг/мл или ниже, согласно одному из вариантов осуществления изобретения значением IC_{50} , составляющим 0,10 мкг/мл или ниже.

Ингибирование выживания человеческих моноцитов определяют согласно методу, описанному в примере 7. Согласно одному из вариантов осуществления изобретения антитела, предлагаемые в изобретении, ингибируют выживание моноцитов обезьяны циномолгус на 80% или более, согласно одному из вариантов осуществления на 90% или более (при применении антитела в концентрации 5 мкг/мл и в сравнении с вариантом без антитела). Ингибирование выживания моноцитов обезьяны циномолгус определяют согласно методу, описанному в примере 8.

Следующим вариантом осуществления изобретения является способ получения антитела к CSF-1R, заключающийся в том, что встраивают последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела класса IgG1, которое связывается с человеческим CSF-1R, предлагаемой в изобретении (указанной модифицированной нуклеиновой кислоты), и нуклеиновой кислоты, которая кодирует легкую цепь указанного антитела, в один или два экспрессионный(ых) вектор(а), указанный(ые) векторы(ы) встраивают в эукариотическую клетку-хозяина, экспрессируют кодируемый белок и выделяют из клетки-хозяина или супернатанта.

Антитела, предлагаемые в изобретении, предпочтительно получают методами рекомбинации. При этом антитело предпочтительно представляет собой выделенное моноклональное антитело. Такие методы рекомбинации широко известны в данной области и они заключаются в том, что осуществляют экспрессию белков в прокариотических и эукариотических клетках с последующим выделением полипептида антитела и, как правило, очистку до фармацевтически приемлемой чистоты. Для экспрессии белка нуклеиновые кислоты, кодирующие легкие и тяжелые цепи или их

фрагменты, встраивают в экспрессионные векторы стандартными методами. Экспрессию осуществляют в пригодных прокариотических или эукариотических клетках-хозяевах типа СНО-клеток, NS0-клеток, SP2/0-клеток, НЕК293-клеток, COS-клеток, клеток дрожжей или клеток *E.coli*, и антитело выделяют из клеток (супернатант или клетки после лизиса).

Рекомбинантное получение антител хорошо известно в данной области и описано, например, в обзорных статьях Makrides S.C., *Protein Expr. Purif.* 17, 1999, сс.183-202; Geisse S. и др., *Protein Expr. Purif.* 8, 1996, сс.271-282; Kaufman R.J., *Mol. Biotechnol.* 16, 2000, сс.151-161; Werner R.G. и др., *Drug Res.*, 48, 1998, сс.870-880.

Антитела могут присутствовать в целых клетках, в клеточном лизате или в частично очищенной или полностью очищенной форме. Очистку осуществляют для удаления других клеточных компонентов или других загрязнителей, например, других клеточных нуклеиновых кислот или белков, стандартными методами, которые включают обработку щелочью/ДСН, CsCl-бэндинг, хроматографию на колонках, электрофорез в агарозном геле и другие методы, хорошо известные в данной области (см. *Current Protocols in Molecular Biology*, под ред. Ausubel F. и др., изд-во Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, 1987).

Экспрессия в NSO-клетках описана, например, у Barnes L.M. и др., *Cytotechnology* 32, 2000, сс.109-123; и Barnes L.M. и др., *Biotech. Bioeng.* 73, 2001, сс.261-270. Кратковременная экспрессия описана, например, у Durocher Y. и др., *Nucl. Acids. Res.* 30, 2002, с.Е9. Клонирование переменных областей описано у Orlandi R. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1989, сс.3833-3837;

Carter P. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1992, сс.4285-4289; и Norderhaug L. и др., *J. Immunol. Methods* 204, 1997, сс.77-87. Предпочтительная система кратковременной экспрессии (НЕК 293) описана у Schlaeger E.-J. и Christensen K. в *Cytotechnology* 30, 1999, сс.71-83 и у Schlaeger E.-J. в *J. Immunol. Methods* 194, 1996, сс.191-199.

Контролирующие последовательности, пригодные для прокариотических организмов, представляют собой, например, промотор, необязательно последовательность оператора и сайт связывания рибосом. Известно, что для эукариотических клеток применяют промоторы, энхансеры и сигналы полиаденилирования.

Нуклеиновая кислота «функционально связана», когда она находится в функциональной связи с другой нуклеотидной последовательностью. Например, ДНК предпоследовательности или лидерной секреторной последовательности функционально связана с ДНК полипептида, если при ее экспрессии образуется предбелок, который участвует в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он оказывает воздействие на транскрипцию последовательности; или сайт связывания рибосом функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен так, что облегчает трансляцию. Как правило, понятие «функционально связаны» означает, что последовательности ДНК, будучи связаны, являются смежными, а в случае лидерной секреторной последовательности, являются смежными и находятся в рамке считывания. Однако для энхансеров не является необходимым, чтобы они были смежными. Связывание осуществляют путем лигирования в соответствующих сайтах рестрикции. Если такие сайты не существуют, то в соответствии с принятой практикой применяют синтетические олигонуклеотидные адаптеры или линкеры.

Моноклональные антитела можно отделять от культуральной среды с помощью общепринятых методов очистки иммуноглобулинов, таких, например, как, хроматография на белок А-сефарозе, хроматография на гидроксилпатите, гель-электрофорез, диализ

или аффинная хроматография. ДНК и РНК, которые кодируют моноклональные антитела, можно легко выделять и секвенировать с помощью общепринятых методов. Клетки гибридом могут служить источником таких ДНК и РНК. После выделения ДНК можно встраивать в экспрессионные векторы, которым затем трансфектируют клетки-хозяева, такие как клетки НЕК 293, СНО-клетки или клетки миеломы, которые иначе не могут продуцировать белок иммуноглобулина, для синтеза рекомбинантных моноклональных антител в клетках-хозяевах.

В контексте настоящего описания понятия «клетка», «клеточная линия» и «клеточная культура» используются взаимозаменяемо, и все такие определения включают потомство. Так, понятия «трансформанты» и «трансформированные клетки» относятся к первичной рассматриваемой клетке и полученным из нее культурам безотносительно к количеству пересевов. Следует понимать также, что все потомство может не быть полностью идентичным по составу ДНК из-за преднамеренных или случайных мутаций. Под объем изобретения подпадает вариант потомства, имеющий такую же функцию или биологическую активность, которая обнаружена у исходной трансформированной клетки.

«Fc-фрагмент» антитела не участвует непосредственно в связывании антитела с антигеном, но обладает различными эффекторными функциями. Понятие «Fc-фрагмент антитела» хорошо известно специалисту в данной области и его определяют на основе расщепления антител папаином. В зависимости от аминокислотной последовательности константной области тяжелых цепей антитела или иммуноглобулины разделяют на следующие классы: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM и некоторые из них можно дополнительно подразделять на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, IgA1 и IgA2. На основе строения константных областей тяжелых цепей различные классы иммуноглобулинов обозначают как α , δ , ϵ , γ и μ соответственно. Fc-фрагмент антител непосредственно участвует в ADCC (антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность) и CDC (комплементзависимая цитотоксичность) в результате активации комплемента, связывания C1q и связывания Fc-рецептора. Активация комплемента (CDC) инициируется связыванием фактора системы комплемента C1q с Fc-фрагментом большинства антител подклассов IgG. Хотя влияние антитела на систему комплемента зависит от определенных условий, связывание с C1q обусловлено определенными сайтами связывания в Fc-фрагменте. Такие сайты связывания известны в данной области и описаны, например, у Boakle R.J. и др., Nature 282, 1979, сс.742-743; Lukas T.J. и др., J. Immunol. 127, 1981, сс.2555-2560; Brunhouse R. и Cebra J.J., Mol. Immunol. 16, 1979, сс.907-917; Burton D.R. и др., Nature 288, 1980, сс.338-344; Thommesen J.E. и др., Mol. Immunol. 37, 2000, сс.995-1004; Idusogie E.E. и др., J. Immunol. 164, 2000, сс.4178-4184; Hezareh M. и др., J. Virology 75, 2001, сс.12161-12168; Morgan A. и др., Immunology 86, 1995, сс.319-324; EP 0307434. Указанные сайты связывания представляют собой, например, L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 и P329 (нумерация согласно EU-нумерации по Кэботу, см. ниже). Антитела подклассов IgG1, IgG2 и IgG3, как правило, обуславливают активацию комплемента и связывание C1q и C3, в то время как IgG4 не активирует систему комплемента, не связывается с C1q и C3.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит Fc-фрагмент человеческого происхождения и предпочтительно все остальные участки человеческих константных областей. В контексте настоящего описания понятие «Fc-фрагмент человеческого происхождения» относится к Fc-фрагменту, котором представляет собой либо Fc-фрагмент человеческого антитела подкласса IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, предпочтительно Fc-фрагмент человеческого

подкласса IgG1, либо мутантный Fc-фрагмент человеческого подкласса IgG1 (предпочтительно с мутацией L234A+L235A), либо Fc-фрагмент человеческого подкласса IgG4, либо мутантный Fc-фрагмент человеческого подкласса IgG4 (предпочтительно с мутацией S228P). Наиболее предпочтительными являются константные области

5 человеческой тяжелой цепи, последовательности которых представлены в SEQ ID NO: 58 (человеческий подкласс IgG1). SEQ ID NO:59 (человеческий подкласс IgG1 с мутациями L234A и L235A), SEQ ID NO:60 (человеческий подкласс IgG4) или SEQ ID NO:61 (человеческий подкласс IgG4 с мутацией S228P).

Предпочтительно антитело, предлагаемое в изобретении, представляет собой

10 человеческий иммуноглобулин подкласса IgG1 или человеческий иммуноглобулин подкласса IgG4. В одном из вариантов осуществления изобретения оно представляет собой человеческий иммуноглобулин подкласса IgG1. В одном из вариантов осуществления изобретения оно представляет собой человеческий иммуноглобулин подкласса IgG4.

15 Согласно одному из вариантов осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, отличается тем, что содержит человеческие константные цепи. Указанные константные цепи хорошо известны в данной области и описаны, например, у Kabat E.A. (см., например, Johnson G. и Wu, T.T., Nucleic Acids Res., 28, 2000, сс.214-218). Например, приемлемая человеческая константная область тяжелой цепи содержит

20 аминокислотную последовательность SEQ ID NO:58. Например, приемлемая человеческая константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность константной области легкой каппа-цепи SEQ ID NO:57.

Другим объектом изобретения является антитело, которое связывается с человеческим CSF-1R, отличающееся тем, что

25 а) вариабельная область тяжелой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:7, и вариабельная область легкой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:8,

б) вариабельная область тяжелой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:15, и вариабельная область легкой цепи имеет последовательность,

30 представленную в SEQ ID NO:16,

или его гуманизированная версия.

Другим объектом изобретения является антитело, которое связывается с человеческим CSF-1R, отличающееся тем, что

а) вариабельная область тяжелой цепи имеет последовательность, представленную

35 в SEQ ID NO:7, и вариабельная область легкой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:8,

б) вариабельная область тяжелой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:15, и вариабельная область легкой цепи имеет последовательность,

представленную в SEQ ID NO:16,

40 в) вариабельная область тяжелой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:75, и вариабельная область легкой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:76,

г) вариабельная область тяжелой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:83, и вариабельная область легкой цепи имеет последовательность,

45 представленную в SEQ ID NO:84,

или его гуманизированная версия.

Другим объектом изобретения является антитело, которое связывается с человеческим CSF-1R, отличающееся тем, что

представленную в SEQ ID NO:40.

Другим объектом изобретения является антитело, которое связывается с человеческим CSF-1R, отличающееся тем, что

5 переменная область тяжелой цепи имеет последовательность, представленную в
SEQ ID NO:47, и переменная область легкой цепи имеет последовательность,
представленную в SEQ ID NO:48.

Другим объектом изобретения является антитело, которое связывается с человеческим CSF-1R, отличающееся тем, что

10 переменная область тяжелой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:15, и переменная область легкой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:16, или его гуманизованная версия.

Другим объектом изобретения является антитело, которое связывается с человеческим CSF-1R, отличающееся тем, что

15 переменная область тяжелой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:75, и переменная область легкой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:76, или его гуманизованная версия.

Другим объектом изобретения является антитело, которое связывается с человеческим CSF-1R, отличающееся тем, что

вариабельная область тяжелой цепи имеет последовательность, представленную в
20 SEQ ID NO:83, и вариабельная область легкой цепи имеет последовательность,
представленную в SEQ ID NO:84, или его гуманизированная версия.

Другим объектом изобретения является антитело, которое связывается с человеческим CSF-1R, отличающееся тем, что

а) переменная область тяжелой цепи содержит CDR3-участок, последовательность
25 которого представлена в SEQ ID NO:1, CDR2-участок, последовательность которого
представлена в SEQ ID NO:2, и CDR1-участок, последовательность которого
представлена в SEQ ID NO:3, и переменная область легкой цепи содержит CDR3-
участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:4, CDR2-участок,
последовательность которого представлена в SEQ ID NO:5, и CDR1-участок,
30 последовательность которого представлена в SEQ ID NO:6, или

б) переменная область тяжелой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:9, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:10, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:11, и переменная область легкой цепи содержит CDR3-
35 участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:12, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:13, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:14, или

в) переменная область тяжелой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:17, CDR2-участок, последовательность которого
40 представлена в SEQ ID NO:18, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:19, и переменная область легкой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:20, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:21, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:22, или

г) варибельная область тяжелой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:25, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:26, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:27, и варибельная область легкой цепи содержит CDR3-

последовательность которого представлена в SEQ ID NO:37, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:38, или

г) вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:41, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:42, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:43, и вариабельная область легкой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:44, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:45, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:46.

Другим объектом изобретения является антитело, которое связывается с человеческим CSF-1R, отличающееся тем, что

вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:17, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:18, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:19, и вариабельная область легкой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:20, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:21, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:22.

Другим объектом изобретения является антитело, которое связывается с человеческим CSF-1R, отличающееся тем, что

вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:25, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:26, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:27, и вариабельная область легкой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:28, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:29, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:30.

Другим объектом изобретения является антитело, которое связывается с человеческим CSF-1R, отличающееся тем, что

вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:33, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:34, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:35, и вариабельная область легкой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:36, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:37, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:38.

Другим объектом изобретения является антитело, которое связывается с человеческим CSF-1R, отличающееся тем, что

вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:41, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:42, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:43, и вариабельная область легкой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:44, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:45, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO:46.

Изобретение относится также к способу лечения пациента, который нуждается в такой терапии, отличающемся тем, что вводят пациенту в терапевтически эффективном количестве антитело, предлагаемое в изобретении.

Изобретение относится также к применению антитела, предлагаемого в изобретении, для указанной терапии.

Одним из предпочтительных вариантов осуществления изобретения являются антитела к CSF-1R, предлагаемые в настоящем изобретении, которые применяют для 5 лечения «опосредуемых CSF-1R заболеваний», или антитела к CSF-1R, предлагаемые в настоящем изобретении, которые применяют для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения «опосредуемых CSF-1R заболеваний», которые можно описать с помощью представленных ниже характеристик:

Известно три различных механизма, посредством которых передача сигналов CSF-1R, вероятно, участвует в росте и метастазах опухолей. Первый из них связан с тем, что экспрессия CSF-лиганда и рецептора обнаружена в опухолевых клетках женской половой системы (молочная железа, яичник, эндометрий, шейка матки) (Scholl S.M. и др., J. Natl. Cancer Inst, 86, 1994, сс.120-126; Kacinski B.M., Mol. Reprod. Dev., 46, 1997, сс.71-74; Ngan H.Y. и др., Eur. J. Cancer 35, 1999, сс.1546-1550; Kirma N. и др., Cancer Res, 67, 2007, сс.1918-15 1926), и экспрессия ассоциирована с ростом ксенотрансплантата рака молочной железы, а также с плохим прогнозом для страдающих раком молочной железы пациентов. В одном из исследований две точковые мутации обнаружены в CSF-1R примерно у 10-20% пациентов, страдающих острым миелолейкозом, хроническим миелолейкозом и миелодисплазией, и одна из этих мутаций, как установлено, приводила к нарушению 20 обновления рецептора (Ridge S.A. и др., Proc.Natl. Acad. Sci USA, 87, 1990, сс.1377-1380). Однако частота встречаемости мутаций не была подтверждена в более поздних исследованиях (Abu-Duhier F.M. и др., Br. J. Haematol., 120, 2003, сс.464-470). Мутации обнаружены также в ряде случаев печеночноклеточного рака (Yang D.H. и др., Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int., 3, 2004, сс.86-89) и идиопатического миелофиброза (Abu-25 Duhier F.M. и др., Br. J. Haematol., 120, 2003, сс.464-470). В настоящее время в клеточной линии GDM-1, полученной из организма пациента, страдающего миеломонобластным лейкозом, идентифицирована мутация Y571D в CSF-1R (Chase A. и др., Leukemia, 23, 2009, сс.358-364).

Пигментированный villonodularный синовиит (PVNS) и теносиновиальные гигантоклеточные опухоли (TGCT) могут возникать в результате транслокации, приводящей к слиянию гена M-CSF с геном коллагена COL6A3 и последующей сверхэкспрессии M-CSF (West R.B. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103, 2006, сс.690-695). Предполагается, что условия окружающей среды оказывают влияние на массу образовавшейся опухоли, которая состоит из моноцитов, привлеченных клетками, 35 которые экспрессируют M-CSF. TGCT представляют собой опухоли меньшего размера, которые относительно легко можно удалять из пальцев, где они наиболее часто встречаются. PVNS представляет собой более агрессивное заболевание, поскольку может затрагивать крупные суставы и его сложно контролировать хирургическим путем.

Второй механизм основан на блокаде передачи сигналов через M-CSF/CSF-1R в областях метастазов в кости, которые вызывают остеокластогенез, резорбцию кости и остеолитические повреждения кости. Рак молочной железы, множественная миелома и рак легкого являются примерами типов рака, при которых могут образовываться метастазы в кость и которые могут вызывать остеолитическую болезнь кости, 40 осложнения которой являются нарушения скелета. M-CSF, высвобождающийся из опухолевых клеток и стромы, индуцирует дифференцировку предшественников гематopoэтических миелоидных моноцитов в зрелые остеокласты в сочетании с лигандом рецептора-активатора ядерного фактора каппа-B (RANKL). В указанном процессе M-

CSF действует в качестве «разрешающего» фактора, передавая сигнал выживания остеокластам (Tanaka S. и др., J. Clin. Invest. 91, 1993, сс.257-263). Ингибирование активности CSF-1R в процессе дифференцировки остеокластов и созревание в присутствии антитела к CSF-1R, вероятно, предупреждает несбалансированную активность остеокластов, которая вызывает остеолитическую болезнь и ассоциированные с ней родственные нарушения скелета при метастатическом заболевании. В то время как рак молочной железы, легкого и множественная миелома, как правило, приводят к остеолитическим повреждениям, метастазы в костную ткань при раке предстательной железы первоначально имеют остеобластное проявление, при котором повышенная активность в отношении образования кости приводит к «переплетенной кости», отличающейся от типичной пластинчатой структуры здоровой кости. По мере развития болезни повреждения кости приобретают выраженный остеолитический компонент, а также высокие уровни в сыворотке маркеров резорбции кости, и предполагается, что при этом может оказаться полезной антирезорбтивная терапия. Установлено, что бисфосфонаты ингибируют образование остеолитических повреждений и снижают количество связанных с повреждением скелета случаев только у мужчин с устойчивым к гормонам метастатическим раком предстательной железы, однако при этом их воздействие на остеобластные повреждения является дискуссионным, и согласно полученным к настоящему времени данным бисфосфонаты не оказывают полезного воздействия в отношении предупреждения костных метастазов или чувствительного к гормонам рака предстательной железы. В настоящее время в клинических условиях проводится изучение воздействия антирезорбтивных средств при смешанном остеолитическом/osteобластном раке предстательной железы (Choueiri M.B. и др., Cancer Metastasis Rev., 25, 2006, сс.601-609; Vessella R.L. и Corey E., Clin. Cancer Res., 12 (20 Pt 2), 2006, сс.6285-6290).

Третий механизм основан на современных данных о том, что уровень ассоциированных с опухолью макрофагов (ТАМ), обнаруженных в плотных опухолях при раке молочной железы, предстательной железы, яичника и шейки матки, коррелировал с плохим прогнозом (Bingle L. и др., J. Pathol., 196 2002 сс.254-265; Pollard J.W., Nat. Rev. Cancer, 4, 2004, сс.71-78). Рекрутмент макрофагов в опухоль происходит с помощью M-CSF и других хемокинов.

Макрофаги могут принимать участие в развитии опухолей посредством секреции ангиогенных факторов, протеаз и других факторов роста и цитокинов и могут блокироваться путем ингибирования передачи сигналов CSF-1R. В настоящее время Zins с соавторами (Zins K. и др., Cancer Res., 67, 2007, сс.1038-1045) установили, что экспрессия siPHK фактора некроза опухоли-альфа (TNF-альфа), M-CSF или их комбинации может снижать рост опухолей на мышинной модели с использованием ксенотрансплантата на 34-50% после внутриопухолевой инъекции соответствующей siPHK. SiPHK, мишенью которой является TNF-альфа, секретируемый человеческими клетками линии SW620, снижала уровни мышинного M-CSF и приводила к снижению уровня макрофагов в опухоли. Кроме того, обработка ксенотрансплантатов опухоли MCF7 антигенсвязывающим фрагментом, мишенью которого является M-CSF, приводила к 40%-ному ингибированию роста опухолей, устранению устойчивости к химиотерапевтическим средствам и улучшенной выживаемости мышей при применении в сочетании с химиотерапевтическими средствами (Paulus P. и др., Cancer Res., 66, 2006, сс.4349-4356).

ТАМ являются только одним примером проявления связи между хроническим воспалением и раком. Известны другие доказательства связи между воспалением и

раком, поскольку многие хронически заболевания ассоциированы с повышенным риском возникновения рака, рак возникает в местах хронического воспаления, химические медиаторы воспаления обнаружены при многих видах рака; устранение клеточных или химических медиаторов воспаления ингибирует развитие некоторых созданных экспериментальным путем типов рака и пролонгированное применение 5 противовоспалительных средств снижает риск возникновения некоторых видов рака. Связь с раком известна для ряда воспалительных состояний, среди которых индуцированный *H. pylori* гастрит в случае рака желудка, шистозомиас в случае рака мочевого пузыря, HHVX в случае саркомы Капоши, эндометриоз в случае рака яичника 10 и простатит в случае рака предстательной железы (Balkwill F. и др., *Cancer Cell*, 7 2005, сс.211-217). Макрофаги представляют собой основные клетки при хроническом воспалении, и они реагируют по разному на их микроокружение. Известно два типа макрофагов, которые рассматриваются в качестве имеющих решающее значение для целого ряда функциональных состояний: M1-макрофаги принимают участие в реакциях 15 типа 1. Эти реакции включают активацию продуктами микробного происхождения и последующее уничтожение патогенных микроорганизмов, что приводит к образованию в качестве промежуточных продуктов реактивных форм кислорода. С другой стороны, к имеющим решающее значение относятся M2-макрофаги, которые принимают участие в реакциях типа 2, которые усиливают клеточную пролиферацию, регулируют 20 воспаления и адаптивный иммунитет и усиливают ремоделирование, ангиогенез и репарацию тканей (Mantovani A. и др., *Trends Immunol.*, 25, 2004, сс.677-686). Хроническое воспаление, приводящее к развитию неоплазм, как правило, ассоциируется с M2-макрофагами. Основным цитокином, опосредующим воспалительные реакции, является TNF-альфа, который в соответствии со своим названием может стимулировать 25 противоопухолевый иммунитет и геморрагический некроз при применении в высоких дозах, но также, как установлено в последние годы, может экспрессироваться опухолевыми клетками и действовать в качестве промотора опухоли (Zins K. и др., *Cancer Res.*, 67, 2007, сс.1038-1045; Balkwill F., *Cancer Metastasis Rev.*, 25, 2006, сс.409-416). Специфическая роль макрофагов в отношении опухолей еще нуждается в дальнейшем 30 изучении, включая исследование потенциальной пространственной и временной зависимости их функции и связи с конкретными типами опухолей.

Таким образом, одним из вариантов осуществления изобретения являются антитела к CSF-1R, предлагаемые в настоящем изобретении, предназначенные для применения при лечении рака. Понятие «рак» в контексте настоящего описания может обозначать, 35 например, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого (NSCL), бронхоальвеолярный рак легкого, рак кости, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, кожную или внутриглазную меланому, рак матки, рак яичника, ректальный рак, рак анальной области, рак желудка, гастральный рак, рак ободочной кишки, рак молочной железы, рак матки, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному 40 шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, болезнь Ходжкина, рак пищевода, рак тонкого кишечника, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечника, саркому мягких тканей, рак мочеиспускательного канала, рак пениса, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, почечноклеточную карциному, карциному почечной 45 лоханки, мезотелиому, печеночноклеточный рак, рак желчных протоков, неоплазмы центральной нервной системы (ЦНС), опухоли спинных позвонков, глиому ствола головного мозга, мультиформную глиобластому, астроцитомы, шваномы, эпендимомы, медуллобластомы, менингиомы, плоскоклеточные карциномы, аденому гипофиза,

лимфому, лимфоцитарный лейкоз, включая устойчивые варианты любого из указанных выше видов рака, или комбинацию любых из указанных выше видов рака.

Предпочтительно рак представляет собой рак молочной железы, рак яичника, рак шейки матки, рак легкого или рак предстательной железы. Предпочтительно указанные 5 виды рака отличаются также экспрессией или сверхэкспрессией CSF-1 или CSF-1R. Еще одним вариантом осуществления изобретения являются антитела к CSF-1R, предлагаемые в настоящем изобретении, предназначенные для применения для одновременного лечения первичных опухолей и новых метастазов.

Таким образом, еще одним вариантом осуществления изобретения являются антитела 10 к CSF-1R, предлагаемые в настоящем изобретении, предназначенные для применения для лечения периодонтита, гистоцитоза Х, остеопороза, болезнь кости Пэджета (PDB), потери костной ткани из-за противораковой терапии, перипростетического остеолита, индуцированного глюкокортикоидами остеопороза, ревматоидного артрита, псориатического артрита, остеоартрита, воспалительных артритов и воспаления.

В статье Rabello D. и др., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 347, 2006, сс.791-796 15 продемонстрировано, что SNP в гене CSF-1 позитивно ассоциированы с агрессивностью периодонтита: воспалительного заболевания тканей периодонта, которое вызывает потерю зубов из-за резорбции альвеолярной кости.

Гистоцитоз Х (который называют также гистозитозом из клеток Лангерганса, LCH) 20 представляет собой пролиферативное заболевание дендритных клеток Лангерганса, которое проявляется в дифференцировке в остеокласты кости и увеличении связанных с LCH костных повреждений. Клетки Лангерганса имеют происхождение из находящихся в кровотоке моноцитов. Установлено, что повышенные уровни М-CSF, обнаруженные в сыворотке, и повреждения коррелируют с серьезностью заболевания (da Costa С.Е. и 25 др., *J. Exp. Med.*, 201, 2005, сс.687-693). Болезнь возникает в основном в детском возрасте и ее лечат химиотерапевтическими средствами, когда болезнь становится системной или является рецидивирующей.

Патофизиология остеопороза опосредована потерей формирующих кость 30 остеобластов и повышением уровня зависящей от остеокластов резорбции кости.

Подтверждающие это данные получены Cenci с соавторами, которые 35 продемонстрировали что инъекция антитела к М-CSF сохраняет плотность костной ткани и ингибирует резорбцию кости у мышей после овариэктомии (Cenci S. и др., *J. Clin. Invest.*, 105, 2000, сс.1279-1287). В последние годы выявлена потенциальная связь между потерей костной ткани в постменопаузальном периоде из-за дефицита эстрогена 40 и установлено присутствие продуцирующих TNF-альфа Т-клеток, оказывающих воздействие на метаболизм костной ткани (Roggia С.и др., *Minerva Med.*, 95, 2004, сс.125-132). Возможный механизм может включать индукцию *in vivo* М-CSF с помощью TNF-альфа. Важная роль М-CSF в индуцируемом TNF-альфа остеокластогенезе подтверждена воздействием антитела к М-CSF, которое блокировало индуцируемый TNF-альфа 40 остеолит у мышей, и по этой причине ингибиторы пути передачи сигналов CSF-1R являются потенциальными мишенями при воспалительном артрите (Kitaura Н. и др., *J. Clin. Invest.*, 115, 2005, сс.3418-3427).

Болезнь кости Пэджета (PDB) представляет собой второе наиболее распространенное 45 нарушение костного метаболизма после остеопороза, при котором локальные аномалии повышенного обновления костной ткани приводят к осложнениям, таким как боль, деформация, патологические переломы кости и глухота. Идентифицированы мутации в четырех генах, которые регулируют нормальную функцию остеокластов и предрасположенность индивидуумов к PDB и родственным нарушениям: инсерционные

мутации в гене TNFRSF11A, который кодирует рецептор-активатора ядерного фактора (NF) каппа-B (RANK), имеющий решающее значение регулятор функции остеокластов, инактивирующие мутации в гене TNFRSF11B, который кодирует остеопротегерин (рецептор-ловушка для лиганда RANK), мутации гена sequestosome 1 (SQSTM1), который
 5 кодирует важный каркасный белок в пути NFκB, и мутации в гене валионсодержащего белка (VCP). Этот ген кодирует VCP, который играет роль в направленном расщеплении ингибитора NFκB протеасомой (Daroszewska A. и Ralston S.H., Nat. Clin. Pract. Rheumatol., 2, 2006, сс.270-277). Ингибиторы, мишенью которых является CSF-1R, косвенно противодействуют блокаде нарушения регуляции
 10 передачи сигналов RANKL, и они представляют собой дополнительный путь лечения наряду с применяемыми в настоящее время бисфосфонатами.

Потеря костной ткани, вызванная противораковой терапией, прежде всего у пациентов, страдающих раком молочной железы и предстательной железы, является еще одним показанием, при котором ингибитор, мишенью которого является CSF-1R,
 15 может предупреждать потерю костной ткани (Lester J.E. и др., Br. J. Cancer, 94, 2006, сс.30-35). При улучшении прогноза в отношении ранней стадии рака молочной железы отдаленные действия вспомогательных терапий становятся более важными, поскольку некоторые из таких терапий, включая химиотерапию, облучение, применение ингибиторов ароматазы и овариэктомии, оказывают воздействие на метаболизм костной
 20 ткани, снижая минеральную плотность костной ткани, что приводит к повышенному риску развития остеопороза и связанных с ним переломов (Lester J.E. и др., Br. J. Cancer, 94, 2006, сс.30-35). Эквивалентом вспомогательной терапии, основанной на ингибировании ароматазы, при раке молочной железы является терапия, основанная на снижении уровня андрогена, при раке предстательной железы, которая приводит к
 25 снижению минеральной плотности костной ткани и значительному повышению риска связанных с остеопорозом переломов (Stoch S.A. и др., J. Clin. Endocrinol. Metab., 86, 2001, сс.2787-2791).

Целенаправленное ингибирование передачи сигналов CSF-1R, вероятно, может оказаться ценным при других показаниях, а также в тех случаях, когда типы клеток,
 30 на которые оказывают направленное воздействие, представляют собой остеокласты и макрофаги, например, при лечении специфических осложнений, связанных с заменой сустава, например, по причине ревматоидного артрита. Нарушение имплантата вследствие перипротезической потери костной ткани и последующее расшатывание протеза является основным осложнением при замене сустава и требует повторного
 35 хирургического вмешательства, что сопровождается высокой социально-экономической нагрузкой на индивидуального пациента и на систему медико-санитарной помощи. К настоящему времени отсутствует удовлетворительная лекарственная терапия предупреждения или ингибирования перипротезического остеолита (Drees P. и др., Nat. Clin. Pract. Rheumatol., 3, 2007, сс.165-171).

Индукцированный глюкокортикоидами остеопороз (GIOP) представляет собой еще одно показание, при котором ингибитор CSF-1R может предупреждать потерю костной
 40 ткани после длительного применения глюкокортикоидов, которые используют при различных состояниях, в том числе при хроническом обструктивном заболевании легких, астме и ревматоидном артрите (Guzman-Clark J.R. и др., Arthritis Rheum., 57, 2007, сс.140-146; Feldstein A.C. и др., Osteoporos. Int., 16, 2005, сс.2168-2174).

Ревматоидный артрит, псориатический артрит и воспалительные артралгии сами являются потенциальными показаниями для применения ингибиторов пути передачи сигналов CSF-1R, поскольку одним из их компонентов являются макрофаги и для них

характерна различная степень деструкции костной ткани (Ritchlin C.T. и др., *J. Clin. Invest.*, 111, 2003, сс.821-831). Остеоартрит и ревматоидный артрит представляют собой воспалительные аутоиммунные заболевания, вызываемые накоплением макрофагов в соединительной ткани и инфильтрацией макрофагов в синовиальную жидкость, что по меньшей мере частично опосредуется М-CSF. В статье Campbell I.K. и др., *J. Leukoc. Biol.*, 68, 2000, сс.144-150 продемонстрировано, что М-CSF продуцируется клетками суставной ткани человека (хондроциты, синовиальные фибробласты) *in vitro* и присутствует в синовиальной жидкости пациентов, страдающих ревматоидным артритом, это позволяет предположить его участие в пролиферации в синовиальной жидкости и инфильтрации макрофагов, что ассоциировано с патогенезом заболевания. Ингибирования передачи сигналов CSF-1R, вероятно, позволяет контролировать количество макрофагов в суставе и облегчает боль, связанную с деструкцией костной ткани. Одним из путей минимизации нежелательных явлений и дополнительного изучения роли передачи сигналов CSF-1R при таких показаниях является специфическое ингибирование CSF-1R без воздействия на множество других киназ, таких как Raf-киназа.

В современной литературе описана корреляция между повышенным уровнем М-CSF в кровотоке и плохим прогнозом и развитием атеросклероза при хронической ишемической болезни сердца (Saitoh T. и др., *J. Am. Coll. Cardiol.*, 35, 2000, сс.655-665; Ikonomidis I. и др., *Eur. Heart. J.*, 26, 2005, сс.1618-1624); М-CSF влияет на процесс атеросклероза, способствуя образованию пенистых клеток (макрофаги с захваченным окисленным ЛПНП), которые экспрессируют CSF-1R и представляют собой начальную бляшку (Murayama T. и др., *Circulation*, 99, 1999, сс.1740-1746).

Экспрессия и передача сигналов М-CSF и CSF-1R обнаружена в активированной микроглии. Микроглия, которая представляет собой местонахождение макрофагов в центральной нервной системе, может активироваться различными нарушениями, включая инфекцию и травматическое повреждение. М-CSF рассматривается в качестве имеющего решающее значение регулятора воспалительных ответов в головном мозге, и уровни М-CSF повышаются при ВИЧ-1, энцефалите, болезни Альцгеймера (AD) и опухолях головного мозга. Микроглиозы, являющиеся результатом аутокринной передачи сигналов М-CSF/CSF-1R, приводят к индукции воспалительных цитокинов и высвобождению оксидов азота, что продемонстрировано например, с помощью экспериментальной модели нейронного повреждения (Hao A.J. и др., *Newscience*, 112, 2002, сс.889-900; Murphy G.M. Jr. и др., *J. Biol. Chem.*, 273, 1998, сс.20967-20971).

Микроглия, для которой характерны повышенные уровни экспрессии CSF-1R, обнаружена в окружении бляшек при AD и на созданной на трансгенных мышах, несущих белок-предшественник V717F, модели AD (Murphy G.M. Jr. и др., *Am. J. Pathol.*, 157, 2000, сс.895-904). С другой стороны, у мышей линии *op/op* с пониженным уровнем микроглии в головном мозге имеет место отложение фибрилл А-бета и потеря нейронов по сравнению со здоровыми контрольными мышами, что позволяет предположить, что микроглия может выполнять нейрозащитную функцию, препятствуя развитию AD, которая отсутствует у мышей линии *op/op* (Kaku M. и др., *Brain Res. Brain Res. Protoc.*, 12, 2003, сс.104-108).

Экспрессия и передача сигналов М-CSF и CSF-1R ассоциированы с воспалительным заболеванием кишечника (IBD) (WO 2005/046657). Понятие «воспалительное заболевание кишечника» относится к серьезным хроническим нарушениям кишечного тракта, отличающимся хроническим воспалением в различных областях желудочно-кишечного тракта, и в частности включает неспецифический язвенный колит (UC) и болезнь Крона.

Изобретение относится к антителу, которое связывается с человеческим CSF-1R, отличающемуся вышеуказанными особенностями связывания с эпитопом или в другом варианте вышеуказанными аминокислотными последовательностями и фрагментами аминокислотных последовательностей, которое предназначено для лечения рака.

5 Изобретение относится к антителу, которое связывается с человеческим CSF-1R, отличающемуся вышеуказанными особенностями связывания с эпитопом или в другом варианте вышеуказанными аминокислотными последовательностями и фрагментами аминокислотных последовательностей, которое предназначено для лечения потери костной ткани.

10 Изобретение относится к антителу, которое связывается с человеческим CSF-1R, отличающемуся вышеуказанными особенностями связывания с эпитопом или в другом варианте вышеуказанными аминокислотными последовательностями и фрагментами аминокислотных последовательностей, которое предназначено для предупреждения или лечения метастазов.

15 Изобретение относится к антителу, которое связывается с человеческим CSF-1R, отличающемуся вышеуказанными особенностями связывания с эпитопом или в другом варианте вышеуказанными аминокислотными последовательностями и фрагментами аминокислотных последовательностей, которое предназначено для лечения воспалительных заболеваний.

20 Изобретение относится к применению антитела, которое связывается с человеческим CSF-1R, отличающемуся вышеуказанными особенностями связывания с эпитопом или в другом варианте вышеуказанными аминокислотными последовательностями и фрагментами аминокислотных последовательностей, для лечения рака или в другом варианте для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения
25 рака.

Изобретение относится к применению антитела, которое связывается с человеческим CSF-1R, отличающемуся вышеуказанными особенностями связывания с эпитопом или в другом варианте вышеуказанными аминокислотными последовательностями и фрагментами аминокислотных последовательностей, для лечения потери костной ткани
30 или в другом варианте для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения потери костной ткани.

Изобретение относится к применению антитела, которое связывается с человеческим CSF-1R, отличающемуся вышеуказанными особенностями связывания с эпитопом или в другом варианте вышеуказанными аминокислотными последовательностями и
35 фрагментами аминокислотных последовательностей, для предупреждения или лечения метастазов или в другом варианте для приготовления лекарственного средства, предназначенного для предупреждения или лечения метастазов.

Изобретение относится к применению антитела, которое связывается с человеческим CSF-1R, отличающемуся вышеуказанными особенностями связывания с эпитопом или
40 в другом варианте вышеуказанными аминокислотными последовательностями и фрагментами аминокислотных последовательностей, для лечения воспалительных заболеваний или в другом варианте для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения воспалительных заболеваний.

Следующим вариантом осуществления изобретения является способ получения
45 предлагаемого в изобретении антитела к CSF-1R, отличающийся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует тяжелую цепь человеческого антитела класса IgG1, связывающегося с человеческим CSF-1R, которая представляет собой модифицированную нуклеиновую кислоту, и нуклеиновую кислоту,

кодирующую легкую цепь указанного антитела, встраивают в экспрессионный вектор, указанный вектор встраивают в эукариотическую клетку-хозяина, кодируемый белок экспрессируют и выделяют из клетки-хозяина или супернатанта.

Антитела, предлагаемые в изобретении, предпочтительно получают методами рекомбинации. Указанные методы хорошо известны в данной области и предусматривают экспрессию белка в прокариотических и эукариотических клетках с последующим выделением полипептида антитела и, как правило, очисткой до фармацевтически приемлемой чистоты. Для экспрессии белка нуклеиновые кислоты, кодирующие легкие и тяжелые цепи или их фрагменты, встраивают в экспрессионные векторы с помощью стандартных методов. Экспрессию осуществляют в приемлемых прокариотических или эукариотических клетках-хозяевах типа CHO-клеток, NS0-клеток, SP2/0-клеток, HEK 293-клеток, COS-клеток, PER-C6-клеток, дрожжей или клеток *E. coli*, и антитело выделяют из клеток (из супернатанта или клеток после лизиса).

Рекомбинантное получение антител хорошо известно в данной области и описано, например, в обзорных статьях Makrides S.C., *Protein Expr. Purif.*, 17, 1999, сс.183-202; Geisse S. и др., *Protein Expr. Purif.*, 8, 1996, сс.271-282; Kaufman R.J., *Mol. Biotechnol.*, 16, 2000, сс.151-161; Werner, R.G., *Drug Res.* 48, 1998, сс.870-880.

Антитела могут присутствовать в целых клетках, в клеточном лизате или в частично очищенной или практически очищенной форме. Очистку осуществляют для удаления других клеточных компонентов или других загрязнителей, например, других клеточных нуклеиновых кислот или белков, стандартными методами, которые включают обработку щелочью/ДСН, CsCl-бэндинг, хроматографию на колонках и другие методы, хорошо известные в данной области (см. в *Current Protocols in Molecular Biology*, под ред. Ausubel F. и др., изд-во Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, 1987).

Экспрессия в NSO-клетках описана, например, у Barnes L.M. и др., *Cytotechnology* 32, 2000, сс.109-123; и Barnes L.M. и др., *Biotech. Bioeng.* 73, 2001, сс.261-270. Кратковременная экспрессия описана, например, у Durocher Y. и др., *Nucl. Acids. Res.* 30, 2002, с.Е9. Клонирование вариабельных областей описано у Orlandi R. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1989, сс.3833-3837; Carter P. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1992, сс.4285-4289; и Norderhaug L. и др., *J. Immunol. Methods* 204, 1997, сс.77-87. Предпочтительная система кратковременной экспрессии (HEK 293) описана у Schlaeger E.-J. и Christensen K. в *Cytotechnology* 30, 1999, сс.71-83 и у Schlaeger E.-J. в *J. Immunol. Methods* 194, 1996, сс.191-199.

Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие варианты аминокислотных последовательностей антитела к CSF-1R, получают различными методами, известными в данной области. Эти методы включают (но не ограничиваясь только ими) выделение из встречающегося в естественных условиях источника (в случае встречающихся в естественных условиях вариантов аминокислотных последовательностей) или получение с помощью опосредованного олигонуклеотидами (или сайтнаправленного) мутагенеза, ПЦР-мутагенеза и кассетного мутагенеза ранее полученной вариантной или невариантной версии гуманизированного антитела к CSF-1R.

Вариабельные области тяжелой и легкой цепи, предлагаемые в изобретении, объединяют с последовательностями промотора, инициации трансляции, константной области, с 3'-нетранслируемой последовательностью, последовательностями полиаденилирования и терминации транскрипции с получением конструкций экспрессионных векторов. Конструкции для экспрессии тяжелой и легкой цепи можно объединять в одном векторе, их можно применять для котрансфекции, серийной трансфекции или отдельной трансфекции клеток-хозяев, которые затем можно сливать

с получением индивидуальной клетки-хозяина, которая экспрессирует обе цепи.

Следующим объектом настоящего изобретения является композиция, например, фармацевтическая композиция, содержащая одно или комбинацию моноклональных антител или их антигенсвязывающих участков, предлагаемых в настоящем изобретении, 5
приготовленная в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем.

В контексте настоящего описания понятие «фармацевтически приемлемый носитель» относится к любому и ко всем растворителям, диспергирующим средам, покрытиям, антибактериальным и противогрибным агентам, регулирующим изотоничность и замедляющим абсорбцию/ресорбцию агентам и подобным веществам, которые являются 10
физиологически совместимыми. Предпочтительно носитель должен быть пригоден для инъекции или инфузии.

Композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, можно вводить различными методами, известными в данной области. Как должно быть очевидно специалисту в данной области, путь и/или механизм введения должен варьироваться в зависимости 15
от требуемых результатов.

Фармацевтически приемлемые носители представляют собой стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки, предназначенные для приготовления стерильных инъеклируемых растворов или дисперсий. Применение указанных сред и агентов для фармацевтических действующих веществ известно в данной области.

Помимо воды носитель может представлять собой, например, изотонический забуференный физиологический раствор. 20

Вне зависимости от выбранного пути введения соединения, предлагаемые в настоящем изобретении, которые можно применять в приемлемой гидратированной форме, и/или фармацевтические композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, приготавливают 25
в виде фармацевтически приемлемых лекарственных форм с помощью общепринятых методов, известных специалистам в данной области.

Фактические уровни доз действующих веществ в фармацевтических композициях, предлагаемых в настоящем изобретении, могут варьироваться так, чтобы получать количество действующего вещества, которое является эффективным для получения 30
требуемого терапевтического ответа у конкретного пациента при использовании конкретной композиции и пути введения, не являясь при этом токсичными для пациента (эффективное количество).

Выбранный уровень доз должен зависеть от разнообразных фармакокинетических факторов, таких как активность конкретных применяемых композиций, предлагаемых 35
в настоящем изобретении, или их сложных эфиров, солей или амидов, путь введения, время введения, скорость экскреции конкретного применяемого соединения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, применяемые в сочетании с конкретными композициями, возраст, пол, вес, общее состояние здоровья и предыдущая история болезни пациента, подлежащего лечению, и подобных факторов, которые 40
хорошо известны в медицине.

Изобретение относится также к применению антител, предлагаемых в изобретении, для лечения пациента, страдающего раком, прежде всего раком ободочной кишки, легкого или поджелудочной железы.

Изобретение относится также к способу лечения пациента, страдающего указанным 45
заболеванием.

В изобретении предложен также способ приготовления фармацевтической композиции, которая содержит антитело, предлагаемое в изобретении, в эффективном количестве в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем, и применение

антитела, предлагаемого в изобретении, в таком способе.

Изобретение относится также к применению антитела, предлагаемого в изобретении, в эффективном количестве для приготовления фармацевтического агента, предпочтительно в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем, предназначенного для лечения пациента, страдающего раком.

Изобретение относится также к применению антитела, предлагаемого в изобретении, в эффективном количестве для приготовления фармацевтического агента, предпочтительно в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем, предназначенного для лечения пациента, страдающего раком.

Представленные ниже примеры, перечень последовательностей и чертежи даны с целью лучшего понимания настоящего изобретения, истинный объем которого изложен в прилагаемой формуле изобретения. Очевидно, что можно осуществлять модификации в изложенных процедурах без отклонения от сущности изобретения.

Описание последовательностей

SEQ ID NO:1 CDR3 тяжелой цепи, МАт 2F11

SEQ ID NO:2 CDR2 тяжелой цепи, МАт 2F11

SEQ ID NO:3 CDR1 тяжелой цепи, МАт 2F11

SEQ ID NO:4 CDR3 легкой цепи, МАт 2F 11

SEQ ID NO:5 CDR2 легкой цепи, МАт 2F11

SEQ ID NO:6 CDR1 легкой цепи, МАт 2F11

SEQ ID NO:7 вариабельная область тяжелой цепи, МАт 2F11

SEQ ID NO:8 вариабельная область легкой цепи, МАт 2F11

SEQ ID NO:9 CDR3 тяжелой цепи, МАт 2E10

SEQ ID NO:10 CDR2 тяжелой цепи, МАт 2E10

SEQ ID NO:11 CDR1 тяжелой цепи, МАт 2E10

SEQ ID NO:12 CDR3 легкой цепи, МАт 2E10

SEQ ID NO:13 CDR2 легкой цепи, МАт 2E10

SEQ ID NO:14 CDR1 легкой цепи, МАт 2E10

SEQ ID NO:15 вариабельная область тяжелой цепи, МАт 2E10

SEQ ID NO:16 вариабельная область легкой цепи, МАт 2E10

SEQ ID NO:17 CDR3 тяжелой цепи, hМАт 2F11-c11

SEQ ID NO:18 CDR2 тяжелой цепи, hМАт 2F11-c11

SEQ ID NO:19 CDR1 тяжелой цепи, hМАт 2F11-c11

SBQ ID NO:20 CDR3 легкой цепи, hМАт 2F11-c11

SEQ ID NO:21 CDR2 легкой цепи, hМАт 2F11-c11

SEQ ID NO:22 CDR1 легкой цепи, hМАт 2F11-c11

SEQ ID NO:23 вариабельная область тяжелой цепи, hМАт 2F11-c11

SEQ ID NO:24 вариабельная область легкой цепи, hМАт 2F11-c11

SEQ ID NO:25 CDR3 тяжелой цепи, hМАт 2F11-d8

SEQ ID NO:26 CDR2 тяжелой цепи, hМАт 2F11-d8

SEQ ID NO:27 CDR1 тяжелой цепи, hМАт 2F11-d8

SEQ ID NO:28 CDR3 легкой цепи, hМАт 2F11-d8

SEQ ID NO:29 CDR2 легкой цепи, hМАт 2F11-d8

SEQ ID NO:30 CDR1 легкой цепи, hМАт 2F11-d8

SEQ ID NO:31 вариабельная область тяжелой цепи, hМАт 2F11-d8

SEQ ID NO:32 вариабельная область легкой цепи, hМАт 2F11-d8

SEQ ID NO:33 CDR3 тяжелой цепи, hМАт 2F11-e7

SEQ ID NO:34 CDR2 тяжелой цепи, hМАт 2F11-e7

- SEQ ID NO:35 CDR1 тяжелой цепи, hMAт 2F11-e7
 SEQ ID NO:36 CDR3 легкой цепи, hMAт 2F11-e7
 SEQ ID NO:37 CDR2 легкой цепи, hMAт 2F11-e7
 SEQ ID NO:38 CDR1 легкой цепи, hMAт 2F11-e7
 5 SEQ ID NO:39 переменная область тяжелой цепи, hMAт 2F11-e7
 SEQ ID NO:40 переменная область легкой цепи, hMAт 2F11-e7
 SEQ ID NO:41 CDR3 тяжелой цепи, hMAт 2F11-f12
 SEQ ID NO:42 CDR2 тяжелой цепи, hMAт 2F11-f12
 SEQ ID NO:43 CDR1 тяжелой цепи, hMAт 2F11-f12
 10 SEQ ID NO:44 CDR3 легкой цепи, hMAт 2F11-f12
 SEQ ID NO:45 CDR2 легкой цепи, hMAт 2F11-f12
 SEQ ID NO:46 CDR1 легкой цепи, hMAт 2F11-f12
 SEQ ID NO:47 переменная область тяжелой цепи, hMAт 2F11-f12
 SEQ ID NO:48 переменная область легкой цепи, hMAт 2F11-f12
 15 SEQ ID NO:49 CDR3 тяжелой цепи, hMAт 2F11-g1
 SEQ ID NO:50 CDR2 тяжелой цепи, hMAт 2F11-g1
 SEQ ID NO:51 CDR1 тяжелой цепи, hMAт 2F11-g1
 SEQ ID NO:52 CDR3 легкой цепи, hMAт 2F11-g1
 SEQ ID NO:53 CDR2 легкой цепи, hMAт 2F11-g1
 20 SEQ ID NO:54 CDR1 легкой цепи, hMAт 2F11-g1
 SEQ ID NO:55 переменная область тяжелой цепи, hMAт 2F11-g1
 SEQ ID NO:56 переменная область легкой цепи, hMAт 2F11-g1
 SEQ ID NO:57 константная область человеческой легкой каппа-цепи
 SEQ ID NO:58 константная область человеческой тяжелой цепи, выведенная из IgG1
 25 SEQ ID NO:59 константная область человеческой тяжелой цепи, выведенная из IgG1,
 с мутациями L234A и L235A
 SEQ ID NO:60 константная область человеческой тяжелой цепи, выведенная из IgG4
 SEQ ID NO:61 константная область человеческой тяжелой цепи, выведенная из IgG4,
 с мутацией S228P
 30 SEQ ID NO:62 человеческий CSF-1R дикого типа (wt CSF-1R)
 SEQ ID NO:63 человеческий CSF-1R с мутациями L301S Y969F
 SEQ ID NO:64 внеклеточный домен человеческого CSF-1R
 SEQ ID NO:65 фрагмент человеческого CSF-1R delD4
 SEQ ID NO:66 фрагмент человеческого CSF-1R D1-D3
 35 SEQ ID NO:67 сигнальный пептид
 SEQ ID NO:68 праймер
 SEQ ID NO:69 CDR3 тяжелой цепи, МАт 1G10
 SEQ ID NO:70 CDR2 тяжелой цепи, МАт 1G10
 SEQ ID NO:71 CDR1 тяжелой цепи, МАт 1G10
 40 SEQ ID NO:72 CDR3 легкой цепи, МАт 1G10
 SEQ ID NO:73 CDR2 легкой цепи, МАт 1G10
 SEQ ID NO:74 CDR1 легкой цепи, МАт 1G10
 SEQ ID NO:75 переменная область тяжелой цепи, МАт 1G10
 SEQ ID NO:76 переменная область легкой цепи, МАт 1G10
 45 SEQ ID NO:77 CDR3 тяжелой цепи, МАт 2H7
 SEQ ID NO:78 CDR2 тяжелой цепи, МАт 2H7
 SEQ ID NO:79 CDR1 тяжелой цепи, МАт 2H7
 SEQ ID NO:80 CDR3 легкой цепи, МАт 2H7

SEQ ID NO:81 CDR2 тяжелой цепи, МАт 2Н7

SEQ ID NO:82 CDR1 тяжелой цепи, МАт 2Н7

SEQ ID NO:83 переменная область тяжелой цепи, МАт 2Н7

SEQ ID NO:84 переменная область легкой цепи, МАт 2Н7.

- 5 Представленные ниже примеры, перечень последовательностей и чертежи даны с целью лучшего понимания настоящего изобретения, истинный объем которого изложен в прилагаемой формуле изобретения. Очевидно, что можно осуществлять модификации в изложенных процедурах без отклонения от сущности изобретения.

Описание чертежей

- 10 На чертежах показано:

на фиг.1 - данные о ингибировании роста опухолевых клеток линии BeWo в виде 3D-культуры после обработки различными моноклональными антителами к CSF-1R при их применении в концентрации 10 мкг/мл.

- 15 Ось X: жизнеспособность, выраженная в виде стандартизованных средних относительных световых единиц (RLU), которые соответствуют содержанию АТФ в клетках (CellTiterGlo-анализ).

- Ось Y: изученные зонды: минимальная среда (0,5% сыворотки плода коровы (FBS)), мышиный IgG1 (mIgG1, 10 мкг/мл), мышиный IgG2a (mIgG2a, 10 мкг/мл), только CSF-1, МАт 2F11, МАт 2E10, МАт2Н7, МАт 1G10 и SC 2-4A5. Наиболее выраженное
20 ингибирование индуцируемого CSF-1 роста обнаружено при применении антител к CSF-1R, предлагаемых в изобретении;

- на фиг.2а - сенсограммы, полученные с помощью Biacore-анализа, которые характеризуют связывание различных антител к CSF-1R с иммобилизованным фрагментом человеческого CSF-1R delD4 (который содержит внеклеточные субдомены
25 D1-D3 и D5) (SEQ ID NO:65) (на оси y: характеризующие связывание сигналы в виде единиц ответа (RU), исходный уровень соответствует 0 RU, на оси x: время в секундах (с)): в то время как для антител МАт 3291 и sc 2-4A5 четко продемонстрировано связывание с указанным clе1 B4-фрагментом, антитела, предлагаемые в изобретении, например МАт 2F11 и МАт 2E10, не связывались с фрагментом CSF-1R delD4.

- 30 Контрольное антитело к CCR5 m<CCR5>Pz03.1C5 также не связывалось с фрагментом CSF-1R delD4;

- на фиг.2б - сенсограммы, полученные с помощью Biacore-анализа, характеризующие связывание различных антител к CSF-1R с иммобилизованным внеклеточным доменом человеческого CSF-1R (CSF-1R-ECD) (который содержит внеклеточные субдомены D1-
35 D5) (SEQ ID NO:64) (на оси y: характеризующие связывание сигналы в виде единиц ответа (RU), исходный уровень соответствует 0 RU, на оси x: время в секундах (с)): для всех антител к CSF-1R обнаружена способность связываться с CSF-1R-ECD. Контрольное антитело к CCR5 m<CCR5>Pz03.1C5 не связывалось с CSF-1R-ECD;

- на фиг.2в: сенсограммы, полученные с помощью Biacore-анализа, характеризующие
40 связывание различных антител к CSF-1R с иммобилизованным фрагментом человеческого CSF-1R delD4 (который содержит внеклеточные субдомены D1-D3 и D5) (SEQ ID NO:65) (на оси y: характеризующие связывание сигналы в виде единиц ответа (RU), исходный уровень соответствует 0 RU, на оси x: время в секундах (с)): МАт 1G10, МАт 2Н7 и гуманизированное антитело hМАт 2F11-е7 не связывались с фрагментом
45 CSF-1R delD4. Контрольное антитело к CCR5 m<CCR5>Pz03.1C5 также не связывалось с фрагментом CSF-1R delD4;

на фиг.2г - сенсограммы, полученные с помощью Biacore-анализа, характеризующие связывание различных антител к CSF-1R с иммобилизованным внеклеточным доменом

человеческого CSF-1R (CSF-1R-ECD) (который содержит внеклеточные субдомены D1-D5) (SEQ ID NO:64) (на оси y: характеризующие связывание сигналы в виде единиц ответа (RU), исходный уровень соответствует 0 RU, на оси x: время в секундах (с)): для всех антител к CSF-1R, таких как МАт 1G10, МАт 2H7 и гуманизированное антитело hМАт 2F11-e7, обнаружена способность связываться с CSF-1R-ECD. Контрольное антитело к CCR5 m<CCR5>Pz03.1C5 не связывалось с CSF-1R-ECD;

на фиг 2д: сенсограммы, полученные с помощью Biacore-анализа, характеризующие связывание различных антител к CSF-1R с иммобилизованным фрагментом человеческого CSF-1R delD4 (который содержит внеклеточные субдомены D1-D3 и D5) (SEQ ID NO:65) (на оси y: характеризующие связывание сигналы в виде единиц ответа (RU), исходный уровень соответствует 0 RU, на оси x: время в секундах (с)): для всех антител к CSF-1R, таких как 1.2.SM, CXIIIG6, ab10676 и МАт3291, обнаружена способность связываться с фрагментом CSF-1R. Контрольное антитело к CCR5 m<CCR5>Pz03.1C5 также не связывалось с фрагментом CSF-1R delD4;

на фиг.2е - сенсограммы, полученные с помощью Biacore-анализа, характеризующие связывание различных антител к CSF-1R с иммобилизованным внеклеточным доменом человеческого CSF-1R (CSF-1R-ECD) (который содержит внеклеточные субдомены D1-D5) (SEQ ID NO:64) (на оси y: характеризующие связывание сигналы в виде единиц ответа (RU), исходный уровень соответствует 0 RU, на оси x: время в секундах (с)): для всех антител к CSF-1R, обнаружена способность связываться с CSF-1R-ECD. Контрольное антитело к CCR5 m<CCR5>Pz03.1C5 не связывалось с CSF-1R-ECD;

на фиг.3а-3г - данные об уровнях CSF-1 у обезьян циномоглус после внесения в различных дозах антитела к CSF-1R, предлагаемого в изобретении;

на фиг.4 - данные об эффективности in vivo - ингибирование роста опухолей антителами к CSF-1R, предлагаемыми в изобретении, при оценке с использованием ксенотрансплантата рака молочной железы линии BT20.

Пример 1

Создание клеточной линии гибридомы, продуцирующей антитела к CSF-1R

Процедура иммунизации NMRI-мышей

NMRI-мышей иммунизировали с использованием экспрессионного вектора pDisplay™ (фирма Invitrogen, США), кодирующего внеклеточный домен huCSF-1R, путем электропорации. Каждую мышь иммунизировали 4 раза, используя по 100 мкг ДНК. Когда титры в сыворотке антител к huCSF-1R достигали достаточного уровня, мышей подвергали одной дополнительной ревакцинации с использованием 50 мкг смеси 1:1 химеры huCSF-1R ECD/huCSF-1R ECDhuFc в 200 мкл ЗФР, которую вводили внутривенно (i.v.) за 4 и 3 дня до осуществления слияния.

Специфический для антигена ELISA

Титры антител к CSF-1R в сыворотке иммунизированных мышей определяли с помощью специфического для антигена ELISA.

0,3 мкг/мл химеры huCSF-1R-huFc (растворимый внеклеточный домен) иммобилизовывали на сенсibiliзироваанном стрептавидином планшете (MaxiSorb; фирма MicroCoat, Германия, каталожный №.11974998/MC1099) с помощью биотинилированного антитела к Fcγ, взятого в концентрации 0,1 мг/мл (фирма Jackson ImmunoResearch., каталожный №109-066-098), и добавляли конъюгированный с пероксидазой из хрена (HRP) F(ab')₂-фрагмент антимышиного IgG (фирма GE Healthcare, Великобритания, каталожный X2.NA9310V), разведенный в соотношении 1/800 в ЗФР/0,05% Твин 20/0 5% БСА. Сыворотку, полученную после электропорации, разводили в соотношении 1/40 в ЗФР/0,05% Твин 20/0,5% БА и серийно разводили вплоть до 1/

1638400. Разведенную сыворотку вносили в лунки. Сыворотку, взятую до осуществления электропорации, применяли в качестве отрицательного контроля. Серийные разведения мышиногo антитела к человеческому CSF-1R МАт3291 (фирма R&D Systems, Великобритания) с концентрацией от 500 до 0,25 нг/мл применяли в качестве
 5 положительного контроля. Все компоненты инкубировали вместе в течение 1,5 ч, лунки отмывали 6 раз ЗФРТ (ЗФР/0,2% Твин 20) и осуществляли анализы с использованием свежеприготовленного раствора АВТС (1 мг/мл) (АВТС: 2,2'-азинобис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновая кислота) в течение 10 мин при КТ. Абсорбцию измеряли при длине волны 405 нм.

10 Создание гибридом

Мышьиные лимфоциты можно выделять и сливать с клеточной линией мышиной миеломы, используя основанные на применении ПЭГ стандартные протоколы, с получением гибридом. Затем полученные гибридомы подвергали скринингу в отношении производства антигенспецифических антител. Например, суспензии единичных клеток
 15 спленоцитов, выведенных из лимфоцитов, которые получали из иммунизированных мышей, сливали с с несекретирующими Ag8 клетками мышиной миеломы линии Р3Х63Аg8.653 (АТСС, CRL-1580) с использованием 50% ПЭГ. Клетки высевали с плотностью примерно 10^4 в плоскодонный 96-луночный титрационный микропланшет с последующей инкубацией в течение примерно двух недель в селективной среде. Затем
 20 содержимое индивидуальных лунок подвергали скринингу с помощью ELISA в отношении моноклональных антител к CSF-1R типа IgM и IgG. На стадии интенсивного роста гибридом секретирующие антитела гибридомы пересевали, вновь подвергали скринингу, и если они еще были позитивными в отношении моноклональных антител к CSF-1R человеческого IgG-типа, то их можно было субклонировать с помощью FACS.
 25 Затем стабильные субклоны культивировали *in vitro* с получением антитела в среде для культуры ткани для характеристики. Антитела, предлагаемые в изобретении, можно отбирать на основе оценки связывания антител к CSF-1R с фрагментом человеческого CSF-1R delD4 и с внеклеточным доменом человеческого CSF-1R (CSF-1R-ECD), согласно методу, описанному в примере 4, а также на основе оценки ингибирования роста NH3T3-
 30 клеток, трансфектированных CSF-1R дикого типа (зависящая от лиганда передача сигналов) или мутантным CSF-1R L301S Y969F (не зависящая от лиганда передача сигналов) при обработке моноклональными антителами к CSF-1R согласно методу, описанному в примере 5.

35 Культура гибридом

Продуцирующие тиМАт гибридомы культивировали в среде RPMI 1640 (фирма PAN, каталожный № (кат. №) P04-17500), дополненной 2 мМ L-глутамином (фирма GIBCO, кат. №35050-038), 1 мМ Na-пируватом (фирма GIBCO, кат. №.11360-039), 1×NEAA (фирма GIBCO, кат. №. 1140-035), 10% FCS (фирма PAA, кат. №A15-649), 1×Pen Strep (пенициллин-стрептомицин) (фирма Roche, кат. №.1074440), 1×Nutridoma-CS (фирма
 40 Roche, кат. №1363743), 50 мкМ меркаптоэтанолом (фирма GIBCO, кат. №31350-010) и 50 ед./мл мышиногo IL 6 (фирма Roche, кат. №1444581), при 37°C и 5% CO₂. Некоторые из образовавшихся мышиных антител гуманизировали (например, МАт 2F11) и экспрессировали рекомбинантно.

45 Пример 2

Ингибирование связывания CSF-1 с CSF-1R (ELISA)

При проведении указанного анализа прежде всего осуществляли связывание антитела к CSF-1R с CSF-1R-ECD, после чего путем обнаружения лиганда, не связанного с рецептором, можно было оценивать как распознающие лиганд антитела, так и

являющиеся ингибиторами димеризации антитела к CSF-1R. Анализ осуществляли на 384-луночных титрационных микропланшетах (фирма MicroCoat, Германия, кат. №464718) при КТ. После каждой стадии инкубации планшеты отмывали трижды 3ФРТ.

Прежде всего планшеты сенсibilизировали с помощью козьего биотинилированного F(ab')₂-фрагмента антитела к Fcγ (фирма Jackson ImmunoResearch., кат. №109-006-170) в концентрации 0,5 мг/мл в течение 1 часа (ч).

Затем лунки блокировали с помощью 3ФР, дополненного 0,2% Tween[®]-20 и 2% БСА (фирма Roche Diagnostics GmbH, Германия), в течение 0,5 ч. Химеру huCSF-1R-huFc (75 нг/мл) (которая образовывала димерный растворимый внеклеточный домен huCSF-1R) иммобилизовывали на планшете в течение 1 ч. Затем разведения очищенных антител в 3ФР/0,05% Твин 20/0 5% БСА инкубировали в течение 1 ч. После добавления смеси, содержащей 3 нг/мл CSF-1 (фирма Biomol, Германия, кат. №.60530), 50 нг/мл биотинилированного клона антитела к CSF-1 BAF216 (фирма R&D Systems, Великобритания) и разведенного в соотношении 1:5000 конъюгата стрептавидина и HRP (фирма Roche Diagnostics GmbH, Германия, кат. №11089153001), и выдерживания в течение 1 ч планшеты отмывали 6 раз 3ФРТ. Антитело к CSF-1R SC 2-4A5 (фирма Santa Cruz Biotechnology, США), которое ингибирует взаимодействие лиганд-рецептор, применяли в качестве положительного контроля. Планшеты обрабатывали свежеприготовленным раствором субстрата BM blue POD (BM blue[®]: 3,3'-5,5'-тетраметилбензидин, фирма Roche Diagnostics GmbH, Германия, кат. №11484281001) в течение 30 мин при КТ. Абсорбцию измеряли при длине волны 370 нм. Выявляли снижение абсорбции, если антитело к CSF-1R вызывало высвобождение CSF-1 из димерного комплекса. Все антитела к CSF-1R вызывали выраженное ингибирование взаимодействия CSF-1 с CSF-1R (см. таблицу 1). Антитело к CSF-1R SC 2-4A5 (фирма Santa Cruz Biotechnology, США, см. также у Sherr C.J. и др., Blood, 73, 1989, сс.1786-1793), которое ингибирует взаимодействие лиганд-рецептор, применяли в качестве референс-контроля.

Таблица 1:

Рассчитанные значения IC₅₀, характеризующие ингибирование взаимодействие CSF-1/CSF-1R

МАт к CSF-1R	Значения IC ₅₀ , характеризующие ингибирование CSF-1/CSF-1R [нг/мл]
МАт 2F11	19,3
МАт 2E10	20,6
МАт 2H7	18,2
МАт 1G10	11,8
SC-2-4A5	35,2

Пример 3

Ингибирование индуцируемого CSF-1 фосфорилирования CSF-1R в рекомбинантных клетках линии NIH3T3-CSF-1R

4,5×10³ клеток линии NIH3T3, зараженных ретровирусным экспрессионным вектором, несущим полноразмерный CSF-1R, культивировали в среде DMEM (фирма PAA, кат. №E 15-011), дополненной 2 mM L-глутамином (фирма Sigma, кат. №G7513), 2 mM пируватом натрия, 1хзаменимыми аминокислотами, 10% FKS (фирма PAA, кат. №A 15-649) и 100 мкг/мл PenStrep (фирма Sigma, кат. №P4333 (10 мг/мл)), до достижения конfluэнтности. Затем клетки отмывали бессывороточной средой DMEM (фирма PAA кат. №15-011), дополненной селенитом натрия (5 нг/мл) (фирма Sigma, кат. №S9133), трансферрином (10 мкг/мл) (фирма Sigma, кат. №T8158), БСА (400 мкг/мл) (фирма Roche Diagnostics GmbH, кат. №10735078), 4 mM L-глутамином (фирма Sigma, кат.

№07513), 2 мМ пируватом натрия (фирма Gibco, кат. №11360), 1×заменимыми аминокислотами (фирма Gibco, кат. №11140-035), 2-меркаптоэтанолом (0,05 мМ) (фирма Merck, кат. №M7522), 100 мкг/мл PenStrep (фирма Sigma, кат. №P4333), и инкубировали в 30 мкл этой среды в течение 16 ч, в результате чего происходила повышающая регуляция рецептора. К клеткам добавляли 10 мкл разведенных антител к CSR-1R в течение 1,5 ч. Затем клетки стимулировали с помощью 10 мкл (концентрация 100 нг/мл) huM-CSF-1 (фирма Biomol, кат. №60530) в течение 5 мин. После инкубации супернатант удаляли, клетки отмывали дважды 80 мкл охлажденного на льду 3ФР и добавляли 50 мкл свежеприготовленного охлажденного на льду буфера для лизиса (150 мМ NaCl/20 мМ Трис, рН 7,5/1 мМ ЭДТКЛмМ ЭГТК/1% Тритон X-100/1 таблетка ингибитора протеаз (фирма Roche Diagnostics GmbH, кат. №1836170) на 10 мл буфера 10 мкл/мл/коктейль ингибиторов фосфатаз 1 (фирма Sigma, кат. №P-2850, 100× маточный раствор)/10 мкл/мл ингибитора протеаз 1 (фирма Sigma, кат. №P-5726, 100× маточный раствор)/10 мкл/мл 1 М NaF). После выдерживания в течение 30 мин на льду планшеты интенсивно встряхивали на шейкере для планшетов в течение 3 мин и затем центрифугировали в течение 10 мин при 2200 об/мин (тип Heraeus Megafuge 10).

Присутствие фосфорилированного рецептора CSF-1 и общее количество рецепторов анализировали с помощью ELISA. Для обнаружения фосфорилированного рецептора применяли набор фирмы R&D Systems (кат. №DYC3268-2) согласно инструкциям поставщика. Для обнаружения общего количества рецептора CSF-1R 10 мкл лизата иммобилизовывали на планшете с помощью захватывающего антитела, входящего в набор. Затем добавляли разведенное в соотношении 1:750 биотинилированное антитело к CSF-1R BAF329 (фирма R&D Systems) и разведенный в соотношении 1:1000 конъюгат стрептавидин-HRP. Через 60 мин планшеты обрабатывали свежеприготовленным раствором ABTS® и определяли абсорбцию. Данные рассчитывали в виде % относительно положительного контроля без антитела и выражали в виде соотношения: количество фосфорилированного рецептора/общее количество рецептора. В качестве отрицательного контроля использовали вариант без добавления M-CSF-1. Антитело к CSF-1R SC 2-4A5 (фирма Santa Cruz Biotechnology, США, см. также Sherr C.J. и др., Blood, 73, 1989, сс.1786-1793), которое ингибирует взаимодействие лиганд-рецептор, применяли в качестве референс-контроля.

Таблица 2:	
Рассчитанные значения IC ₅₀ , характеризующие ингибирование фосфорилирования рецептора CSF-1	
МАт к CSF-1R	Значения IC ₅₀ , характеризующие ингибирование фосфорилирования CSF-1R [нг/мл]
МАт 2F11	219,4
МАт 2E10	752,0
МАт 2H7	703,4
МАт 1G10	56,6
SC-2-4A5	1006,6

Пример 4

Оценка связывания антител к CSF-1R с фрагментом человеческого CSF-1R delD4 и с внеклеточным доменом человеческого CSF-1R (CSF-1R-ECD)

Получение внеклеточного домена человеческого CSF-1R (CSF-1R-ECD) (который содержит внеклеточные субдомены D1-D5, hCSF-1R-ECD), последовательность которого представлена в SEQ ID NO:64:

Плазмидар pCMV-Fc-hCSF-1R-ECD (7836 пар оснований) кодирует полный ECD человеческого CSF-1R (SEQ ID NO:64), слитый на С-конце с сайтом расщепления протеазой PreScission, за которым располагается состоящий из аминокислот 100-330

человеческий IgG1 и метка 6xHis, под контролем промотора CMV. Встречающийся в естественных условиях сигнальный пептид изменяли путем инсерции аминокислот G и S после первого M для создания сайта рестрикции BamHI.

Получение фрагмента человеческого CSF-1R delD4. Скоторый содержит внеклеточные субдомены D1-D3 и D5. hCSF-1R-delD4), последовательность которого представлена в SEQ ID NO:65:

hCSF1R-delD4-V1-PreSc-hFc-His клонировали из плазмиды pCMV-preS-Fc-hCSF-1R-ECD согласно протоколу сайтнаправленного мутагенеза QuikChange XL фирмы Stratagene, используя delD4-for, который имеет последовательность CACCTCCATGTTCTTCCGGTACCCCCCAGAGGTAAG (SEQ ID NO:68) в качестве «прямого» праймера и delD4-rev, который имеет обратную комплементарную последовательность, в качестве «обратного» праймера. Перед осуществлением обычного протокола фирмы Stratagene применяли вариант протокола, опубликованный в BioTechniques, 26, 1999, с.680, для удлинения обоих праймеров в отдельных реакциях с осуществлением трех циклов:

Приготавливали две различные реакционные смеси объемом 50 мкл согласно руководству производителя, каждая из которых содержала 10 нг плазмиды pCMV-preS-Fc-hCSF1R-ECD в качестве матрицы и 10 пМ один из праймеров delD4-for или delD4-rev и 0,5 мкл ДНК-полимеразы Pfu, входящей в набор. Осуществляли три ПЦР-цикла (95°C 30 с/55°C 60 с/68°C 8 мин), после чего по 25 мкл каждой из двух реакционных смесей объединяли в новой пробирке и добавляли 0,5 мкл свежеприготовленной ДНК-полимеразы Pfu. Осуществляли обычный ПЦР-протокол, предусматривающий применение 18 температурных циклов согласно руководству по применению набора фирмы Stratagene с последующим конечным расщеплением в течение 2 ч с помощью рестриктазы DpnI, входящей в набор. Клоны с делецией выявляли путем расщепления с помощью Cel II и Not I и подтверждали секвенированием.

Для получения белка осуществляли кратковременную трансфекцию системы суспензионных клеток Hek293 FreeStyle (фирма Invitrogen) согласно спецификациям производителя. Через 1 неделю 500 мл супернатанта отфильтровывали и вносили в 1-миллилитровую колонку HiTrap MabSelect Xtra (фирма GE healthcare), заполненную белком А (0,2 мл/мин). Колонку отмывали сначала 3ФР, затем 50 мМ Трис/150 мМ NaCl/1 мМ ЭДТК/рН 7,3. В колонку вносили 75 мкл протеазы PreScission (фирма GE, кат. №27-0843-01), разведенной в 375 мкл такого же буфера, и закрытую колонку инкубировали в течение ночи при 4°C с вращением. Колонку помещали на верхнюю часть 1-миллилитровой колонки GStrap FF (фирма GE healthcare) и требуемый белок элюировали (0,2 мл/мин, фракции объемом 0,2 мл). Объединенные фракции концентрировали, снижая объем с 1,8 мл до 0,4 мл путем центрифужной ультрафильтрации с использованием устройства 3k Nanosep и хроматографировали с помощью устройства для гель-фильтрации S200 HR в 3ФР (0,5 мл/мин).

Фрагмент человеческого CSF-1R delD4 получали в виде двух фракций в виде димерной молекулы (пул 1, V=1,5 мл; c=0,30 мг/мл; кажущаяся масса по данным ДСН-ПААГ 83 кДа, в восстанавливающих условиях 62 кДа), и в виде мономера (пул 2, V=1,4 мл; c=0,25 мг/мл кажущаяся масса по данным ДСН-ПААГ 62 кДа). Во всех экспериментах применяли димерную форму.

Оценка связывания антител к CSF-1R с фрагментом человеческого CSF-1R delD4 и с внеклеточным доменом человеческого CSF-1R (CSF-1R-ECD) (сигналы связывания в виде единиц ответа (RU):

Устройство:
программа:

Biacore T100 (фирма GE Healthcare),
T100 Control, версия 2.0.1,

CSF-1R-фрагмент иммобилизовывали посредством аминного сочетания. Для
сравнения связывания различных антител к CSF-1R, предлагаемых в изобретении,
тестируемое антитело инъецировали в одной концентрации. Антитела к CSF-1R МАт3291
(фирма R&D-Systems) и SC 2-4A5 (фирма Santa Cruz Biotechnology, США, см. также Sherr
C.J. и др., Blood, 73, 1989, сс.1786-1793) применяли в качестве референс-контроля,
антитело к CCR5 m<CCR5>Pz03.1C5 (депонировано под номером DSM ACC 2683
18.08.2004 г в DSMZ) применяли в качестве отрицательного контроля, все эти антитела
применяли в таких же условиях, что и антитела к CSF-1R, предлагаемые в изобретении.

Аминное сочетание CSF-1R-фрагментов

Применяли стандартный метод аминного сочетания согласно инструкциям
производителя: подвижный буфер: 3ФР-Т (фирма Roche, кат. №11666789+0,05% Твин20,
кат. №11332465), активация с помощью смеси EDC/NHS, инъекция фрагмента
человеческого CSF-1R delD4 (который содержит внеклеточные субдомены D1-D3 и D5)
(SEQ ID NO:65) и внеклеточного домена человеческого CSF-1R (CSF-1R-ECD) (который
содержит внеклеточные субдомены D1-D5) (SEQ ID NO:64) в течение 600 с при скорости
потока 10 мкл/мин; разбавление в буфере для сочетания NaAc, pH 5,0, c=10 мкг/мл;
оставшиеся в конце активированные карбоксильные группы блокировали путем
инъекции 1М этаноламина.

Связывание <CSF-1R> МАт 2F11. МАт 2E10. МАт 3291 и sc2-4A5 и других антител
к CSF-1R с фрагментом человеческого CSF-1R delD4 и внеклеточным доменом
человеческого CSF-1R (CSF-1R-ECD) при 25°C

Подвижный буфер: 3ФР-Т (фирма Roche, кат. №11666789+0,05% Твин20, кат.
№11332465),

Анализируемый образец:

Связывание оценивали при скорости потока 30 мкл/мин с помощью одной инъекции
анализируемого образца в концентрации (с), составлявшей 10 нМ (для МАт 1G10, МАт
2H7 и гуманизированного hМАт 2F11-e7 во втором эксперименте). Продолжительность
каждой инъекции составляла 700 с, продолжительность последующей фазы диссоциации
180 с. Конечную стадию регенерации осуществляли после каждого цикла с помощью
50 мМ NaOH, продолжительность контакта 60 с, скорость потока 30 мкл/мин.

Сигналы оценивали в определенной предназначенной для измерения точке через 10
с после окончания инъекции. Референс-сигналы (сигналы от пустой проточной референс-
ячейки (которую обрабатывали только EDC/NHS и этаноламином) вычитали с
получением сигналов связывания (в виде RU). Если сигналы связывания
несвязывающихся антител были несколько ниже нуля О (МАт 2F11=-3; МАт 2E10=-2;
МАт 1G10=-6, МАт 2H7=-9; и гуманизированное hМАт 2F11-e7=-7), то значения
принимали за нуль.

Таблица 3а: Связывание <CSF-1R> МАт к человеческому фрагменту CSF-1R delD4 и CSF-1R-ECD и соотношение при 25°C, оцененное с помощью SPR			
	Связывание с delD4 [RU]	Связывание с CSF-1R-ECD [RU]	Соотношение связывания антител к CSF-1R с фрагментом CSF-1R delD4/CSF-1R-ECD
МАт 3291	1015	627	1015/627= 1,61
sc2-4A5	374	249	374/249=1,50
МАт 2F11	0	176	0/176=0
hМАт 2F11-e7	0	237	0/237=0

МАТ 2Е10	0	120	0/120=0
МАТ 1G10	0	2708	0/2708=0
МАТ 2Н7	0	147	0/147=0
m<CCR5>Pz03.1C5	2	5	-

У МАТ 2F11 и МАТ 2Е10 обнаружена способность связываться с внеклеточным доменом человеческого CSF-1R (CSF-1R-ECD) (см. фиг.2б); но отсутствие способности связываться с фрагментом CSF-1R delD4 (см. фиг.2а).

У Sc2-4A5 и МАТ 3291 обнаружена способность связываться и с CSF-1R-ECD, и с delD4 (см. фиг.2б и 2а).

Таким образом, соотношение связывания с фрагментом CSF-1R delD4/CSF-1R-ECD антител к CSF-1R МАТ 2F11 и МАТ 2Е10 заметно ниже чем 1:50 (=0,02), в то время как соотношение связывания МАТ 3291 и Sc2-e4A5 составляло 1,61 и 1,50 соответственно и существенно превышало 1:50 (=0,02). У применяемого в качестве отрицательного контроля антитела m<CCR5>Pz03.1C5 не выявлено никакой способности связываться (как и ожидалось).

У МАТ 1G10, МАТ 2Н7 и гуманизированного hМАТ 2F11-e7 обнаружена способность связываться с внеклеточным доменом человеческого CSF-1R (CSF-1R-ECD) (см. фиг.2 г); но не выявлена способность связываться с фрагментом CSF-1R delD4 (см. фиг.2в). Таким образом, соотношение связывания с фрагментом CSF-1R delD4/CSF-1R-ECD антител к CSF-1R МАТ 1G10, МАТ 2Н7 и гуманизированного hМАТ 2F11-e7 заметно ниже чем 1:50 (=0,02).

В другом эксперименте изучали антитела к CSF-1R 1,2.SM (лигандзамещающее антитело к CSF-1R, описанное в WO 2009/026303), CXIIIG6 (лигандзамещающее антитело к CSF-1R, описанное в WO 2009/112245), козье поликлональное антитело к CSF-1R ab10676 (фирма Abeam). Антитело к CSF-1R МАТ 3291 (фирма R&D-Systems) использовали в качестве референс-контроля. Антитело к CCR5 m<CCR5>Pz03.1C5 (депонировано под номером DSM ACC 2683 18.08.2004 г в DSMZ) применяли в качестве отрицательного контроля.

Таблица 3б: Связывание <CSF-1R> МАТ к человеческому фрагменту CSF-1R delD4 и CSF-1R-ECD и соотношение при 25°C, оцененное с помощью SPR			
	Связывание с delD4 [RU]	Связывание с CSF-1R-ECD [RU]	Соотношение связывания антител к CSF-1Rc фрагментом CSF-1R delD4/CSF-1R-ECD
МАТ3291	1790	1222	1790/1222=1,47
1.2.SM	469	704	469/704=0,67
CXIIIG6	1983	1356	1983/1356=1,46
ab10676	787	547	787/547=1,44
m<CCR5>Pz03.1C5	0	0	-

У антител 1.2.SM, CXIIIG6, ab10676 и МАТ 3291 обнаружена способность связываться и с CSF-1R-ECD, и с del D4 (см. фиг.2е и 2ж).

Соотношение связывания 1.2.SM, CXIIIG6, ab10676 и МАТ 3291 существенно превышало 1:50 (=0,02). У применяемого в качестве отрицательного контроля антитела m<CCR5>Pz03.1C5 не выявлено никакой способности связываться (как и ожидалось).

Пример 5

Ингибирование роста рекомбинантных клеток NIH3T3-CSF-1R в 3D-культуре путем обработки моноклональными антителами к CSF-1R (CellTiterGlo-анализ)

Клетки линии NIH3T3, зараженные с помощью ретровируса либо экспрессионным вектором полноразмерного CSF-1R (SEQ ID NO:62), либо мутантом CSF-1R L301S Y969F (SEQ ID NO:63), культивировали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы

(фирма РАА, Пашинг, Австрия), дополненной 2 мМ L-глутамином, 2 мМ пируватом натрия и заменимыми аминокислотами, 10% фетальной бычьей сыворотки (фирма Sigma, Тауфкирхен, Германия), в сенсibilизированных поли-НЭМА (поли(2-гидроксиэтилметакрилат)) (фирма Polysciences, Уоррингтон, шт. Пенсильвания, США)) чашках для предупреждения прилипания к пластиковой поверхности. Клетки высевали в среду, в которой сыворотку заменяли на селенит натрия (5 нг/мл), трансферрин (10 мг/мл), БСА (400 мкг/мл) и 2-меркаптоэтанол (0,05 мМ). При обработке 100 нг/мл huCSF-1 (фирма Biomol, Гамбург, Германия) экспрессирующие wtCSF-1R клетки формировали плотные сфероиды, которые росли в трех направлениях, свойство, которое называют отсутствием зависимости от прикрепления. Эти сфероиды *in situ* очень напоминали по их трехмерному строению и организации плотные опухоли. Несущие мутантный CSF-1R рекомбинантные клетки обладали способностью образовывать сфероиды вне зависимости от лиганда CSF-1. Сфероидные культуры инкубировали в течение 3 дней в присутствии антитела в различных концентрациях для определения значений IC₅₀ (концентрация, при которой жизнеспособность клеток ингибировалась на 50%). CellTiterGlo-анализ применяли для оценки жизнеспособности путем измерения содержания АТФ в клетках.

Таблица 5а:

МАт к CSF-1R	wtCSF-1R, IC ₅₀ [мкг/мл]	Мутантный CSF-1R, IC ₅₀ [мкг/мл]
МАт2F11	1,1	8,0
МАт 2E10	0,49	4,9
МАт 2H7	0,31	5,3
МАт 1G10	0,29	14,2
SC 2-4A5	10,0	10,0

У применяемого в качестве референс-контроля МАт фирмы R&D-Systems 3291 не обнаружена способность ингибировать пролиферцию несущих мутант CSF-1R рекомбинантных клеток.

В другом эксперименте изучали антитело к CSF-1R, предлагаемое в изобретении, такое как hМАт 2F11-e7, и антитела к CSF-1R 1,2.SM (лигандзамещающее антитело к CSF-1R, описанное в WO 2009/026303), CXIIIG6 (лигандзамещающее антитело к CSF-1R, описанное в WO 2009/112245), козье поликлональное антитело к CSF-1R ab10676 (фирма Abcam) и SC 2-4A5 (фирма Santa Cruz Biotechnology, США, см. также Sherr C.J. и др., Blood, 73, 1989, cc.1786-1793).

Сфероидные культуры инкубировали в течение 3 дней в присутствии антитела в различных концентрациях для определения значений IC₃₀ (концентрация, при которой жизнеспособность клеток ингибировалась на 30%). Максимальная концентрация составляла 20 мкг/мл. CellTiterGlo-анализ применяли для оценки жизнеспособности путем измерения содержания АТФ в клетках.

Таблица 5б:

Мат к CSF-1R	wtCSF-1R, IC ₃₀ [мкг/мл]	Мутант CSF-1R, IC ₃₀ [мкг/мл]
hМАт 2F11-e7	4,91	0,54
1,2.SM	1,19	>20 мкг/мл (-19%-ное ингибирование при 20 мкг/мл = 19%-ное стимулирование)
CXIIIG6	>20 мкг/мл (21%-ное ингибирование при 20 мкг/мл)	>20 мкг/мл (-36%-ное ингибирование при 20 мкг/мл = 36%-ное стимулирование)
ab10676	14,15	>20 мкг/мл (0% ингибирование при 20 мкг/мл)
SC 2-4A5	16,62	2,56

Пример 6

Ингибирование роста опухолевых клеток линии BeWo в 3D-культуре путем обработки моноклональными антителами к CSF-1R (CellTiterGlo-анализ)

Клетки хориокарциномы линии BeWo (ATCC CCL-98) культивировали в среде F12K (фирма Sigma, Штайнхайм, Германия), дополненной 10% FBS (фирма Sigma) и 2 мМ L-

5 глутамином. Высевали по 5×10^4 клеток/лунку в 96-луночные, сенсibilизированные поли-HEMA (поли(2-гидроксиэтилметакрилат)) планшеты, которые содержали среду F12K, дополненную 0,5% FBS и 5% БСА. Затем добавляли в концентрации 200 нг/мл huCSF-1 и в концентрации 10 мкг/мл различные моноклональные антитела к CSF-1R и инкубировали в течение 6 дней. CeUTiterGlo-анализ применяли для оценки
10 жизнеспособности путем измерения содержания АТФ в клетках, которое выражали в относительных световых единицах (RLU). При обработке имеющих форму сфероидов культур BeWo различными антителами к CSF-1R (10 мкг/мл), было обнаружено ингибирование индуцируемого CSF-1 роста. Для оценки опосредуемого антителом ингибирования среднее значение RLU для нестимулированных BeWo-клеток вычитали
15 из значений, полученных для всех образцов. Средние значения RLU клеток, стимулированных CSF-1, принимали за 100%. Средние значения RLU клеток, стимулированных CSF-1 и обработанных антителами к CSF-1R, рассчитывали в виде % по отношению к RLU, полученным при стимуляции CSF-1. В таблице 6 представлены
20 расчетные данные ингибирования роста опухолевых клеток линии BeWo в 3D-культуре после обработки моноклональными антителами к CSF-1R; на фиг. 1а и б представлены стандартизованные средние значения RLU.

Таблица 6:

МАТ к CSF-1R	% ингибирования при применении антитела в концентрации 10 мкг/мл
только CSF-1	0
МАТ 2F11	70
МАТ 2E10	102
МАТ 2H7	103
МАТ 1G10	99
SC 2-4A5	39

Пример 7

Ингибирование дифференцировки человеческих макрофагов путем обработки моноклональными антителами к CSF-1R (CellTiterGlo-анализ)

Человеческие моноциты выделяли из периферической крови с помощью обогащенного коктейля человеческих моноцитов RosetteSep (фирма StemCell Tech., кат. №15028).

35 Обогащенные популяции моноцитов высевали в 96-луночные титрационные

40 микропланшеты ($2,5 \times 10^4$ клеток/лунку) в 100 мкл среды RPMI 1640 (фирма Gibco, кат. №31870), дополненной 10% FCS (фирма GIBCO, кат. №011-090014M), 4 мМ L-глутамином (фирма GIBCO, кат. №25030) и 1×PenStrep (фирма Roche, кат. №1074440), при 37°C и 5% CO₂ в увлажненной атмосфере. При добавлении в среду huCSF-1 в концентрации 150 нг/мл можно было обнаружить выраженную дифференцировку с превращением в прикрепленные макрофаги. Эту дифференцировку можно ингибировать, добавляя антитела к CSF-1R. Кроме того, было обнаружено воздействие на выживание моноцитов, которое можно анализировать с помощью CellTiterGlo (CTO)-анализа. На основе
45 зависящего от концентрации ингибирования выживания моноцитов при обработке антителами рассчитывали значения IC₅₀ (см. таблицу 7).

Таблица 7:

МАТ к CSF-1R	IC ₅₀ [МКГ/МЛ]
--------------	---------------------------

МАТ 2F11	0,08
МАТ 2E10	0,06
МАТ 2H7	0,03
МАТ 1G10	0,06
SC 2-4A5	0,36

При исследовании различных гуманизированных версий МАТ 2 F11, например, hМАТ 2F11-с11, hМАТ 2F11-d8, hМАТ 2F11-e7, hМАТ 2F11-П2, обнаружены значения IC₅₀, составляющие 0,07 мкг/мл (hМАТ 2F11-с11), 0,07 мкг/мл (hМАТ 2F11-d8), 0,04 мкг/мл (hМАТ 2F11-e7) и 0,09 мкг/мл (hМАТ 2F11-f12).

Пример 8

Ингибирование дифференцировки макрофагов обезьяны циномолгус путем обработки моноклональными антителами к CSF-1R (CellTiterGlo-анализ)

Моноциты обезьяны циномолгус выделяли из периферической крови с помощью набора для приматов кроме человека, включающего CD 14-микрогранулы (фирма Miltenyi Biotec, кат. №130-091-097) согласно описанию производителя. Обогащенные популяции моноцитов высевали в 96-луночные титрационные микропланшеты (1-3×10⁴ клеток/лунку) в 100 мкл среды RPMI 1640 (фирма Gibco, кат. №31870), дополненной 10% FCS (фирма GIBCO, кат. №011-090014M), 4 mM L-глутамином (фирма GIBCO, кат. №25030) и 1×PenStrep (фирма Roche, кат. №1074440), при 37°C и 5% CO₂ в увлажненной атмосфере. При добавлении в среду huCSF-1 в концентрации 150 нг/мл можно было обнаружить выраженную дифференцировку в прикрепленные макрофаги. Эту дифференцировку можно ингибировать, добавляя антитела к CSF-1R. Кроме того, было обнаружено воздействие на выживание моноцитов, которое можно анализировать с помощью CellTiterGlo (СТО)-анализа. Жизнеспособность определяли при обработке антителом в концентрации 5 мкг/мл (см. таблицу 8).

Таблица 8:

МАТ к CSF-1R	% выживания	% ингибирование (выживания)=(100%-% выживания)
МАТ 2F11	4*	96
МАТ 2E10	17**	83
МАТ 2H7	8	92
МАТ 1G10	2	98
SC 2-4A5	31	69

*среднее значение по 4 экспериментам (3 эксперимента с использованием мышиного, 1 эксперимент с использованием химерного МАТ)

**среднее значение по 2 экспериментам с использованием только мышиного МАТ

Пример 9

Оценка аффинности связывания антител к CSF-1R с человеческим CSF-1R

Устройство:

BIACORE® A 100,

чип:

CM5 (Biacore BR-1006-68),

сочетание:

аминное сочетание,

буфер:

ЗФР (Biacore BR-1006-72), pH 7,4, 35°C.

Для оценки аффинности 36 мкг/мл антител к мышиному Fcγ (козы, фирма Jackson Immuno Research, JIR 115-005-071) связывали с поверхностью чипа для иммобилизации антител к CSF-1R. Внеклеточный домен человеческого CSF-1R (CSF-1R-ECD) (который содержит внеклеточные субдомены D1-D5) (SEQ ID NO: 64) (фирма R&D-Systems, 329-MR или субклонированную плазмиду pCMV-presS-HisAvitag-hCSF-1R-ECD) добавляли в раствор в различных концентрациях. Ассоциацию измеряли путем инъекции CSF-1R в течение 1,5 мин при 35°C; диссоциацию измеряли путем отмывки поверхности чипа

с помощью буфера в течение 10 мин при 35°C. Для расчета кинетических параметров применяли модель связывания 1:1 Лэнгмюра.

Таблица 9:

Данные об аффинности, оцененные с помощью SPR

МАт к CSF-1R	K _D (нМ)	k _a (1/Мс)	k _d (1/с)	t _{1/2} (МИН)
МАт 2F11	0,29	1,77E ⁺⁰⁵	5,18E ⁻⁰⁵	223
МАт 2E10	0,2	1,52E ⁺⁰⁵	2,97E ⁻⁰⁵	389
МАт 2H7	0,21	1,47E ⁺⁰⁵	3,12E ⁻⁰⁵	370
МАт 1G10	0,36	1,75E ⁺⁰⁵	6,28E ⁻⁰⁵	184

В другом анализе связывания, который осуществляли с помощью устройства Biacore с использованием CSF-1R ECD (данные не представлены), обнаружена определенная конкуренция антител МАт 2F11 и МАт 2E10 с антителом (Ат) SC-2-4A5. Однако МАт 2F11/МАт 2E10 не связывались с фрагментом человеческого CSF-1R delD4, в то время как Ат SC-2-4A5 связывалось с указанным delD4-фрагментом (см. пример 4 и фиг.2а). Таким образом, очевидно, что область связывания МАт 2F11/МАт 2E10 отличается от области связывания Ат SC-2-4A5, но, вероятно, локализована вблизи нее. При осуществлении указанного конкурентного анализа установлено, что оба антитела МАт 2F11 и МАт 2E10 не конкурировали с МАт 3291 фирмы R&D-Systems (данные не представлены).

Пример 10

Оценка связывания антител к CSF-1R с фрагментом человеческого CSF-1R D1-D3

Устройство:

Biacore T100 (фирма GE Healthcare),
программа: T 100 Control, версия 1.1.11,
B3000 Evaluation, версия 4.01,
Scrubber, версия 2.0a
чип CM5

формат анализа:

Антитела к CSF-1R «захватывали» с помощью молекул, иммобилизованных путем аминного сочетания. Используя один цикл кинетических исследований, инъецировали пять возрастающих концентраций фрагмента человеческого CSF-1R D1-D3 (SEQ ID NO:66). Фрагмент человеческого CSF-1R D1-D3 субклонировали в экспрессионном векторе pCMV-presS-HisAvitag.

Антитело к CSF-1R SC 2-4A5 (фирма Santa Cruz Biotechnology, США; Sherr C.J и др., Blood, 73, 1989, сс.1786-1793), которое ингибирует взаимодействие лиганд-рецептор, и МАт 3291 (фирма R&D-Systems) использовали в качестве референс-контролей.

Молекулы для иммобилизации: антитела к мышинному Fey (козы, фирма Jackson Immuno Research, JIR 115-005-071) для антител, предлагаемых в изобретении, и контрольное антитело фирмы R&D-Systems МАт 3291 и антитела к крысиному Fey (козы, фирма Jackson Immuno Research, JIR 112-005-071) для антител, применяемых в качестве референс-контролей и для антитела к CSF-1R SC 2-4A5.

Аминное сочетание для иммобилизации молекул

Использовали стандартные условия аминного сочетания согласно инструкциям производителя: подвижный буфер: буфер HBS-N, активация с помощью смеси EDC/NHS, требуемая плотность лиганда 2000 RU; предназначенные для иммобилизации Ат разводили в буфере для сочетания, таком как NaAc, pH 4,5, c=10 мкг/мл; оставшиеся в конце активированные карбоксильные группы блокировали инъекцией 1 М этаноламина.

Кинетические характеристики связывания фрагментов человеческого CSF-1R D1-D3 с МАт <CSF-1R> (МАт к CSF-1R) при 37°C

Подвижный буфер: ЗФР (Biacore BR-1006-72)

Иммобилизация МАт <CSF-1R> на проточных ячейках 2-4: скорость потока 20 мкл/мин, продолжительность контакта 90 с, концентрация (Ат<CSF-1R>)=50 нМ, разведение с помощью подвижного буфера+1 мг/мл БСА.

5 Анализируемый образец:

Измерение кинетических характеристик в одном цикле проводили при скорости потока 30 мкл/мин, осуществляя пять последовательных инъекций анализируемого вещества в концентрациях (с), составляющих 7, 8, 31, 25, 125, 500 и 2000 нМ, без регенерации. Продолжительность каждой инъекции составляла 30 с» за ней следовала фаза диссоциации продолжительностью 120 с для первых четырех инъекций и 1200 с для наиболее высокой концентрации (последняя инъекция).

Конечную регенерацию осуществляли после каждого цикла, используя 10 мМ глицин, рН 1,5 (Biacore, BR-1003-54), продолжительность контакта 60 с, скорость потока 30 мкл/мин.

15 Кинетические параметры рассчитывали с использованием общепринятых двух референс-стандартов (референс-контроль: связывание анализируемого вещества с предназначенной для иммобилизации молекулой; проточная ячейка: субдомен CSF-1R, концентрация «0» в качестве «пустого» контроля) и расчет с помощью модели «кинетика титрования при связывании 1:1 с выделением».

20

Таблица 10: Данные об аффинности связывания фрагмента CSF-1R D1-D3, оцененные с помощью SPR					
МАт к CSF-1R	Субдомен	K _D (нМ)	k _a (1/Мс)	k _d (1/с)	t _{1/2} (мин)
МАт 2F11	D1-D3	отсутствие связывания			
МАт 2E10	D1-D3	отсутствие связывания			
МАт 2H7	D1-D3	отсутствие связывания			
МАт 1G10	D1-D3	отсутствие связывания			
SC-2-4A5	D1-D3	отсутствие связывания			
3291 фирмы R&D-Systems	D1-D3	5,4	2,2E ⁺⁵	1,2E ⁻³	9,6

30 Установлено, что у антител МАт 2F11, МАт 2E10 и МАт 1G10 отсутствует связывание с фрагментом человеческого CSF-1R D1-D3.

Кроме того, применяемое в качестве референс-контроля Ат SC-2-4A5 не связывалось с фрагментом человеческого CSF-1R D1-D3.

У применяемого в качестве референс-контроля МАт 3291 фирмы R&D-Systems обнаружена способность связываться с фрагментом человеческого CSF-1R D1-D3.

Пример 11

Повышение уровня CSF-1 в процессе ингибирования CSF-1R у обезьян циномоглус

Уровни сывороточного CSF-1 являются фармакодинамическим маркером нейтрализующей активности в отношении CSF-1R антитела ЫМАт 2F11-e7, которое представляет собой ингибитор димеризации человеческого CSF-1R. В каждой обрабатываемой группе (1 и 10 мг/кг) одному самцу и одной самке обезьян циномоглус вводили внутривенно антитело к CSF-1R hМАт 2F11-e7. Для анализа уровней CSF-1 отбирали образцы крови за 1 неделю до обработки (перед дозированием), через 2, 24, 48, 72, 96, 168 ч после дозирования и еженедельно в течение еще двух недель. Для оценки уровней CSF-1 использовали поступающий в продажу набор для ELISA (Quantikine® для человеческого М-CSF) согласно инструкциям производителя (фирма R&D Systems, Великобритания). Уровни CSF-1 в крови обезьян определяли путем сравнения с применяемыми для построения стандартной кривой образцами CSF-1, входящими в

набор.

Введение hMAт 2F11-е7 приводило к резкому повышению уровня CSF-1 ~ в 1000 раз, которое в зависимости от вводимой дозы сохранялось в течение 48 ч (1 мг/кг) или 15 дней (10 мг/кг). Таким образом, ингибитор димеризации CSF-1R обладает

5 преимуществом, заключающимся в отсутствии непосредственной конкуренции с лигандом за связывание с рецептором, и для него характерна резкая повышающая регуляция, по сравнению с лигандзамещающим антителом.

Пример 12

Эффективность *in vivo* - ингибирование роста опухолей антителами к CSF-1R у SCID-мышей с врожденным отсутствием естественных клеток-киллеров, несущих

ксенотрансплантат опухолевых клеток рака молочной железы линии BT20

Линия клеток человеческого рака молочной железы BT-20 экспрессирует человеческий CSF-1R, но у нее отсутствует экспрессия CSF-1 (Sapi E. и др., Cancer Res, 59, 1999, сс.5578-5585). Поскольку мышинный CSF-1 не обладает способностью активировать человеческий

15 CSF-1R на опухолевых клетках, мышам вводили рекомбинантный человеческий CSF-1 (фирма Biomol, Гамбург, Германия) с помощью осмотических мининаносов (фирма ALZET, Купертино, шт.Калифорния), которые обеспечивали скорость постоянной инфузии CSF-1, составляющую 2 мкг/день (Martin T.A., Carcinogenesis, 24, 2003, сс.1317-1323).

20 Для непосредственного сравнения эффективности антител, оказывающих воздействие на димеризацию CSF-1R, наряду с лигандзамещающим антителом к CSF-1R при создании изобретении исследовали химерное антитело к CSF-1R МАт 2F11 (антитело, оказывающее воздействие на димеризацию CSF-1R) и антитело 1.2.SM (лигандзамещающее антитело к CSF-1R, описанное в WO 2009/026303) на модели

25 ксенотрансплантата BT-20.

SCID-мышам с врожденным отсутствием естественных клеток-киллеров (фирма Charles River, Сульцфельд, Германия) подкожно совместно инъецировали 1×10^7 клеток

линии BT-20 (ATCC HTB-19) и 100 мкл матригеля. Обработку животных начинали в

30 день произвольного деления на группы, когда средний объем опухолей достигал 100 мм^3 . Мышей обрабатывали один раз в неделю *i.p.* соответствующими антителами (см. фиг.4) в буфере, содержащем 20 mM гистидин, 140 mM NaCl, pH 6,0. Размеры опухолей определяли с помощью кронциркуля, начиная с дня определения стадии, и затем дважды в неделю в течение всего периода обработки. Объем опухолей

35 рассчитывали согласно протоколу NCI (Национальный онкологический институт) (масса опухоли = $1/2ab^2$, где «а» и «б» представляют собой длинный и короткий диаметры опухоли соответственно).

Данные анализа роста опухолей представлены на фиг.4. Ингибирование человеческого CSF-1R на опухолевых клетках химерным антителом к CSF-1R МАт

40 2F11 оказалось статистически более эффективным в отношении опосредуемого ингибирования роста опухолей, чем эффективность антитела к CSF-1R 1.2.SM (антитело к CSF-1R, описанное в WO 2009/026303).

Формула изобретения

45 1. Антитело, связывающееся с человеческим CSF-1R, отличающееся тем, что переменная область тяжелой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, и переменная область легкой цепи имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8.

участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 36, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 37, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 38, или

д) вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 41, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 42 и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 43, и вариабельная область легкой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 44, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 45, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 46, или

ж) вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 49, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 50, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 51, и вариабельная область легкой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 52, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 53, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 54.

6. Антитело по п. 5, отличающееся тем, что вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 25, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 26, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 27, и вариабельная область легкой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 28, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 29, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 30.

7. Антитело по п. 5, отличающееся тем, что вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 33, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 34, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 35, и вариабельная область легкой цепи содержит CDR3-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 36, CDR2-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 37, и CDR1-участок, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 38.

8. Антитело по одному из пп. 1-7, отличающееся тем, что антитело представляет собой человеческое антитело подкласса IgG1 или человеческое антитело подкласса IgG4.

9. Антитело по одному из пп. 1-7, отличающееся тем, что антитело представляет собой человеческое антитело подкласса IgG1.

10. Антитело по пп. 1-7, предназначенное для лечения рака.

11. Антитело по пп. 1-7, предназначенное для лечения потери костной ткани.

12. Антитело по пп. 1-7, предназначенное для предупреждения или лечения метастазов.

13. Антитело по пп. 1-7, предназначенное для лечения воспалительных заболеваний.

14. Фармацевтическая композиция, предназначенная для лечения опосредуемых CSF-1R заболеваний, отличающаяся тем, что содержит в эффективном количестве антитело по пп. 1-7 и приемлемые добавки.

15. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по пп. 1-7.

16. Экспрессионный вектор, отличающийся тем, что содержит нуклеиновую кислоту по п. 15, для экспрессии антитела по пп. 1-7 в прокариотической или эукариотической

клетке-хозяине.

17. Прокариотическая или эукариотическая клетка-хозяин для экспрессии антитела по пп. 1-7, содержащая вектор по п. 16.

18. Применение антитела по пп. 1-7 для получения лекарственного средства, предназначенного для лечения рака.

19. Применение антитела по пп. 1-7 для получения лекарственного средства, предназначенного для лечения потери костной ткани.

20. Применение антитела по пп. 1-7 для получения лекарственного средства, предназначенного для лечения метастазов.

21. Применение антитела по пп. 1-7 для получения лекарственного средства, предназначенного для лечения воспалительных заболеваний.

22. Способ получения рекомбинантного антитела по пп. 1-7, отличающийся тем, что экспрессируют нуклеиновую кислоту по п. 15 в прокариотической или эукариотической клетке-хозяине и выделяют антитело из клетки или супернатанта клеточной культуры.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Ф. Хоффманн-Ля Рош АГ
 <120> Антитела к человеческому CSF-1R и их применение
 <130> 26143 WO
 <150> EP09015310
 <151> 2009-12-10
 <150> EP10173407
 <151> 2010-08-19
 <160> 84
 <170> PatentIn, версия 3.5
 <210> 1
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 1

Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val
 1 5

<210> 2
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 2

Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Phe Met Ser
 1 5 10 15

<210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 3

Thr Tyr Asp Ile Ser
 1 5

<210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 4

Gly Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr
 1 5

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 5

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 6

Lys Ala Ser Glu Asp Val Asn Thr Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 7
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 7

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr
 20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Phe Met
 50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Arg Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80

Lys Met Asn Arg Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val
 85 90 95

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

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 8
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 8

Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

RU 2565 541 C2

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

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

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

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

<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 9

Asp Pro Arg Leu Tyr Phe Asp
1 5

<210> 10
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 10

Val Ile Trp Thr Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Gly Phe Met Ser
1 5 10 15

<210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 11

Ser Phe Asp Ile Ser
1 5

<210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 12

Gly Gln Thr Phe Ser Tyr Pro Thr
1 5

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 13

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 14

Lys Ala Ser Glu Asp Val Val Thr Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 15
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 15

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Ser Ser Leu Asp Ser Phe
 20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Thr Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Gly Phe Met
 50 55 60

Ser Arg Leu Arg Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Leu Leu
 65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 16
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 16

Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

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

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

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

<210> 17
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> CDR3 тяжелой цепи, hMAт 2F11-c11
<400> 17

Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val
1 5

<210> 18
<211> 16
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> CDR2 тяжелой цепи, hMAт 2F11-c11
<400> 18

Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Phe Met Ser
1 5 10 15

<210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> CDR1 тяжелой цепи, hMAт 2F11-c11
<400> 19

Thr Tyr Asp Ile Ser
1 5

<210> 20
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> CDR3 легкой цепи, hMAт 2F11-c11
<400> 20

Gly Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr
1 5

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> CDR2 легкой цепи, hMAт 2F11-c11
<400> 21

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
1 5

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> CDR1 легкой цепи, hMAт 2F11-c11
<400> 22

Arg Ala Ser Glu Asp Val Asn Thr Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 23
<211> 116
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> вариабельная область тяжелой цепи, hMAт 2F11-c11
<400> 23

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

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

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

Gly Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Phe Met
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 24
<211> 106
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> переменная область легкой цепи, hMAт 2F11-c11
<400> 24

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

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

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

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

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

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

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

<210> 25
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> CDR3 тяжелой цепи, hMAт 2F11-d8
<400> 25

Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val
1 5

<210> 26
<211> 16
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> CDR2 тяжелой цепи, hMAт 2F11-d8
<400> 26

Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly
1 5 10 15

<210> 27
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> CDR1 тяжелой цепи, hMAт 2F11-d8

<400> 27

Thr Tyr Asp Ile Ser
 1 5

<210> 28
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> CDR3 легкой цепи, hMAт 2F11-d8

<400> 28

Gly Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr
 1 5

<210> 29
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> CDR2 легкой цепи, hMAт 2F11-d8

<400> 29

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
 1 5

<210> 30
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> CDR1 легкой цепи, hMAт 2F11-d8

<400> 30

Lys Ala Ser Glu Asp Val Asn Thr Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 31
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> переменная область тяжелой цепи, hMAт 2F11-d8

<400> 31

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

RU 2565541 C2

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

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

Gly Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 32
<211> 106
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> вариабельная область легкой цепи, hMAт 2F11-d8
<400> 32

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

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

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

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

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

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

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

<210> 33
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> CDR3 тяжелой цепи, hMAт 2F11-e7

<400> 33

Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val
1 5

<210> 34
<211> 16
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> CDR2 тяжелой цепи, hMAт 2F11-e7

<400> 34

Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln Gly
1 5 10 15

<210> 35
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> CDR1 тяжелой цепи, hMAт 2F11-e7

<400> 35

Ser Tyr Asp Ile Ser
1 5

<210> 36
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> CDR3 легкой цепи, hMAт 2F11-e7

<400> 36

Gln Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr
1 5

<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> CDR2 легкой цепи, hMAт 2F11-e7

<400> 37

Ala Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
1 5

<210> 38
<211> 11
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> CDR1 легкой цепи, hMAт 2F11-e7

<400> 38

Arg Ala Ser Glu Asp Val Asn Thr Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 39
<211> 116
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> переменная область тяжелой цепи, hMAт 2F11-e7

<400> 39

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

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

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

Gly Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 40
<211> 106
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> переменная область легкой цепи, hMAт 2F11-e7

<400> 40

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

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

RU 2565541 C2

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

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

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

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

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

<210> 41
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> CDR3 тяжелой цепи, hMAт 2F11-f12
<400> 41

Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val
1 5

<210> 42
<211> 16
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> CDR2 тяжелой цепи, hMAт 2F11-f12
<400> 42

Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Phe Met Ser
1 5 10 15

<210> 43
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> CDR1 тяжелой цепи, hMAт 2F11-f12
<400> 43

Thr Tyr Asp Ile Ser
1 5

<210> 44
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> CDR3 легкой цепи, hMAт 2F11-f12

<400> 44

Gly Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr
1 5

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> CDR2 легкой цепи, hMAт 2F11-f12

<400> 45

Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 46

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> CDR1 легкой цепи, hMAт 2F11-f12

<400> 46

Arg Ala Ser Glu Asp Val Asn Thr Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 47

<211> 116

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> переменная область тяжелой цепи, hMAт 2F11-f12

<400> 47

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

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

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

Gly Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Phe Met
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 48
<211> 106
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> переменная область легкой цепи, hMAт 2F11-f12

<400> 48

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

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

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

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

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

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

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

<210> 49
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> CDR3 тяжелой цепи, hMAт 2F11-g1

<400> 49

Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val
1 5

<210> 50
<211> 16
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> CDR2 тяжелой цепи, hMAт 2F11-g1

<400> 50

Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 51
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> CDR1 тяжелой цепи, hMAт 2F11-g1

<400> 51

Thr Tyr Asp Ile Ser
 1 5

<210> 52
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> CDR3 легкой цепи, hMAт 2F11-g1

<400> 52

Gly Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr
 1 5

<210> 53
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> CDR2 легкой цепи, hMAт 2F11-g1

<400> 53

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

<210> 54
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> CDR1 легкой цепи, hMAт 2F11-g1

<400> 54

Arg Ala Ser Glu Asp Val Asn Thr Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 55
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> переменная область тяжелой цепи, hMAт 2F11-g1

<400> 55

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

RU 2565 541 C2

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Leu Lys
50 55 60

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 56
<211> 106
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> переменная область легкой цепи, hMAт 2F11-g1
<400> 56

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

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

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

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

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

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

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

<210> 57
<211> 107

RU 2 565 541 C2

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 58
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

RU 2565 541 C2

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 59

<211> 330

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> константная область человеческой тяжелой цепи, выведенная из IgG1, несущего мутации L234A и L235A

<400> 59

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

RU 2565541 C2

	20		25		30														
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser				
	35						40					45							
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser				
	50					55					60								
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr				
	65				70					75					80				
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys				
			85						90					95					
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys				
			100					105					110						
Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro				
		115					120					125							
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys				
	130					135					140								
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp				
	145				150					155					160				
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu				
				165					170					175					
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu				
			180					185					190						
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn				
		195					200					205							
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly				
	210					215					220								
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu				
	225				230					235					240				
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr				
				245					250					255					
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn				
			260					265					270						
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe				
		275					280					285							
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn				
	290					295					300								

RU 2565541 C2

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 60
<211> 327
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

RU 2565 541 C2

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 61

<211> 327

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> константная область человеческой тяжелой цепи, выведенная из IgG4, несущего мутацию S228P

<400> 61

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

RU 2565541 C2

115					120					125					
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
130						135					140				
Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
145					150					155					160
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe
				165					170					175	
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
			180					185					190		
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu
		195					200					205			
Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
	210					215					220				
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys
225					230					235					240
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
				245					250					255	
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
			260					265					270		
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
		275					280					285			
Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
	290					295					300				
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
305					310					315					320
Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys									
				325											
<210>	62														
<211>	972														
<212>	PRT														
<213>	Homo sapiens														
<400>	62														
Met	Gly	Pro	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Thr	Ala	Trp	His
1				5					10					15	
Gly	Gln	Gly	Ile	Pro	Val	Ile	Glu	Pro	Ser	Val	Pro	Glu	Leu	Val	Val
			20					25					30		

RU 2 565 541 C2

Lys Pro Gly Ala Thr Val Thr Leu Arg Cys Val Gly Asn Gly Ser Val
 35 40 45
 Glu Trp Asp Gly Pro Pro Ser Pro His Trp Thr Leu Tyr Ser Asp Gly
 50 55 60
 Ser Ser Ser Ile Leu Ser Thr Asn Asn Ala Thr Phe Gln Asn Thr Gly
 65 70 75 80
 Thr Tyr Arg Cys Thr Glu Pro Gly Asp Pro Leu Gly Gly Ser Ala Ala
 85 90 95
 Ile His Leu Tyr Val Lys Asp Pro Ala Arg Pro Trp Asn Val Leu Ala
 100 105 110
 Gln Glu Val Val Val Phe Glu Asp Gln Asp Ala Leu Leu Pro Cys Leu
 115 120 125
 Leu Thr Asp Pro Val Leu Glu Ala Gly Val Ser Leu Val Arg Val Arg
 130 135 140
 Gly Arg Pro Leu Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His
 145 150 155 160
 Gly Phe Thr Ile His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln
 165 170 175
 Cys Ser Ala Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg
 180 185 190
 Leu Lys Val Gln Lys Val Ile Pro Gly Pro Pro Ala Leu Thr Leu Val
 195 200 205
 Pro Ala Glu Leu Val Arg Ile Arg Gly Glu Ala Ala Gln Ile Val Cys
 210 215 220
 Ser Ala Ser Ser Val Asp Val Asn Phe Asp Val Phe Leu Gln His Asn
 225 230 235 240
 Asn Thr Lys Leu Ala Ile Pro Gln Gln Ser Asp Phe His Asn Asn Arg
 245 250 255
 Tyr Gln Lys Val Leu Thr Leu Asn Leu Asp Gln Val Asp Phe Gln His
 260 265 270
 Ala Gly Asn Tyr Ser Cys Val Ala Ser Asn Val Gln Gly Lys His Ser
 275 280 285
 Thr Ser Met Phe Phe Arg Val Val Glu Ser Ala Tyr Leu Asn Leu Ser
 290 295 300
 Ser Glu Gln Asn Leu Ile Gln Glu Val Thr Val Gly Glu Gly Leu Asn
 305 310 315 320

RU 2565 541 C2

Leu Lys Val Met Val Glu Ala Tyr Pro Gly Leu Gln Gly Phe Asn Trp
 325 330 335
 Thr Tyr Leu Gly Pro Phe Ser Asp His Gln Pro Glu Pro Lys Leu Ala
 340 345 350
 Asn Ala Thr Thr Lys Asp Thr Tyr Arg His Thr Phe Thr Leu Ser Leu
 355 360 365
 Pro Arg Leu Lys Pro Ser Glu Ala Gly Arg Tyr Ser Phe Leu Ala Arg
 370 375 380
 Asn Pro Gly Gly Trp Arg Ala Leu Thr Phe Glu Leu Thr Leu Arg Tyr
 385 390 395 400
 Pro Pro Glu Val Ser Val Ile Trp Thr Phe Ile Asn Gly Ser Gly Thr
 405 410 415
 Leu Leu Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Pro Gln Pro Asn Val Thr Trp Leu
 420 425 430
 Gln Cys Ser Gly His Thr Asp Arg Cys Asp Glu Ala Gln Val Leu Gln
 435 440 445
 Val Trp Asp Asp Pro Tyr Pro Glu Val Leu Ser Gln Glu Pro Phe His
 450 455 460
 Lys Val Thr Val Gln Ser Leu Leu Thr Val Glu Thr Leu Glu His Asn
 465 470 475 480
 Gln Thr Tyr Glu Cys Arg Ala His Asn Ser Val Gly Ser Gly Ser Trp
 485 490 495
 Ala Phe Ile Pro Ile Ser Ala Gly Ala His Thr His Pro Pro Asp Glu
 500 505 510
 Phe Leu Phe Thr Pro Val Val Val Ala Cys Met Ser Ile Met Ala Leu
 515 520 525
 Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Tyr Lys Tyr Lys Gln Lys Pro
 530 535 540
 Lys Tyr Gln Val Arg Trp Lys Ile Ile Glu Ser Tyr Glu Gly Asn Ser
 545 550 555 560
 Tyr Thr Phe Ile Asp Pro Thr Gln Leu Pro Tyr Asn Glu Lys Trp Glu
 565 570 575
 Phe Pro Arg Asn Asn Leu Gln Phe Gly Lys Thr Leu Gly Ala Gly Ala
 580 585 590

RU 2 565 541 C2

Phe Gly Lys Val Val Glu Ala Thr Ala Phe Gly Leu Gly Lys Glu Asp
595 600 605

Ala Val Leu Lys Val Ala Val Lys Met Leu Lys Ser Thr Ala His Ala
610 615 620

Asp Glu Lys Glu Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Met Ser His Leu
625 630 635 640

Gly Gln His Glu Asn Ile Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr His Gly
645 650 655

Gly Pro Val Leu Val Ile Thr Glu Tyr Cys Cys Tyr Gly Asp Leu Leu
660 665 670

Asn Phe Leu Arg Arg Lys Ala Glu Ala Met Leu Gly Pro Ser Leu Ser
675 680 685

Pro Gly Gln Asp Pro Glu Gly Gly Val Asp Tyr Lys Asn Ile His Leu
690 695 700

Glu Lys Lys Tyr Val Arg Arg Asp Ser Gly Phe Ser Ser Gln Gly Val
705 710 715 720

Asp Thr Tyr Val Glu Met Arg Pro Val Ser Thr Ser Ser Asn Asp Ser
725 730 735

Phe Ser Glu Gln Asp Leu Asp Lys Glu Asp Gly Arg Pro Leu Glu Leu
740 745 750

Arg Asp Leu Leu His Phe Ser Ser Gln Val Ala Gln Gly Met Ala Phe
755 760 765

Leu Ala Ser Lys Asn Cys Ile His Arg Asp Val Ala Ala Arg Asn Val
770 775 780

Leu Leu Thr Asn Gly His Val Ala Lys Ile Gly Asp Phe Gly Leu Ala
785 790 795 800

Arg Asp Ile Met Asn Asp Ser Asn Tyr Ile Val Lys Gly Asn Ala Arg
805 810 815

Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ser Ile Phe Asp Cys Val Tyr
820 825 830

Thr Val Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Ile Leu Leu Trp Glu Ile
835 840 845

Phe Ser Leu Gly Leu Asn Pro Tyr Pro Gly Ile Leu Val Asn Ser Lys
850 855 860

Phe Tyr Lys Leu Val Lys Asp Gly Tyr Gln Met Ala Gln Pro Ala Phe
865 870 875 880

RU 2565 541 C2

Ala Pro Lys Asn Ile Tyr Ser Ile Met Gln Ala Cys Trp Ala Leu Glu
885 890 895

Pro Thr His Arg Pro Thr Phe Gln Gln Ile Cys Ser Phe Leu Gln Glu
900 905 910

Gln Ala Gln Glu Asp Arg Arg Glu Arg Asp Tyr Thr Asn Leu Pro Ser
915 920 925

Ser Ser Arg Ser Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser Ser Glu Leu Glu Glu
930 935 940

Glu Ser Ser Ser Glu His Leu Thr Cys Cys Glu Gln Gly Asp Ile Ala
945 950 955 960

Gln Pro Leu Leu Gln Pro Asn Asn Tyr Gln Phe Cys
965 970

<210> 63
<211> 972
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> мутант CSF-1R L301S Y969F

<400> 63

Met Gly Pro Gly Val Leu Leu Leu Leu Leu Val Ala Thr Ala Trp His
1 5 10 15

Gly Gln Gly Ile Pro Val Ile Glu Pro Ser Val Pro Glu Leu Val Val
20 25 30

Lys Pro Gly Ala Thr Val Thr Leu Arg Cys Val Gly Asn Gly Ser Val
35 40 45

Glu Trp Asp Gly Pro Pro Ser Pro His Trp Thr Leu Tyr Ser Asp Gly
50 55 60

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

Thr Tyr Arg Cys Thr Glu Pro Gly Asp Pro Leu Gly Gly Ser Ala Ala
85 90 95

Ile His Leu Tyr Val Lys Asp Pro Ala Arg Pro Trp Asn Val Leu Ala
100 105 110

Gln Glu Val Val Val Phe Glu Asp Gln Asp Ala Leu Leu Pro Cys Leu
115 120 125

Leu Thr Asp Pro Val Leu Glu Ala Gly Val Ser Leu Val Arg Val Arg
130 135 140

RU 2565 541 C2

Gly	Arg	Pro	Leu	Met	Arg	His	Thr	Asn	Tyr	Ser	Phe	Ser	Pro	Trp	His
145					150					155					160
Gly	Phe	Thr	Ile	His	Arg	Ala	Lys	Phe	Ile	Gln	Ser	Gln	Asp	Tyr	Gln
				165					170					175	
Cys	Ser	Ala	Leu	Met	Gly	Gly	Arg	Lys	Val	Met	Ser	Ile	Ser	Ile	Arg
			180					185					190		
Leu	Lys	Val	Gln	Lys	Val	Ile	Pro	Gly	Pro	Pro	Ala	Leu	Thr	Leu	Val
		195					200					205			
Pro	Ala	Glu	Leu	Val	Arg	Ile	Arg	Gly	Glu	Ala	Ala	Gln	Ile	Val	Cys
	210					215					220				
Ser	Ala	Ser	Ser	Val	Asp	Val	Asn	Phe	Asp	Val	Phe	Leu	Gln	His	Asn
225					230					235					240
Asn	Thr	Lys	Leu	Ala	Ile	Pro	Gln	Gln	Ser	Asp	Phe	His	Asn	Asn	Arg
				245					250					255	
Tyr	Gln	Lys	Val	Leu	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp	Gln	Val	Asp	Phe	Gln	His
			260					265					270		
Ala	Gly	Asn	Tyr	Ser	Cys	Val	Ala	Ser	Asn	Val	Gln	Gly	Lys	His	Ser
		275					280					285			
Thr	Ser	Met	Phe	Phe	Arg	Val	Val	Glu	Ser	Ala	Tyr	Ser	Asn	Leu	Ser
	290					295					300				
Ser	Glu	Gln	Asn	Leu	Ile	Gln	Glu	Val	Thr	Val	Gly	Glu	Gly	Leu	Asn
305					310					315					320
Leu	Lys	Val	Met	Val	Glu	Ala	Tyr	Pro	Gly	Leu	Gln	Gly	Phe	Asn	Trp
				325					330					335	
Thr	Tyr	Leu	Gly	Pro	Phe	Ser	Asp	His	Gln	Pro	Glu	Pro	Lys	Leu	Ala
			340					345					350		
Asn	Ala	Thr	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Arg	His	Thr	Phe	Thr	Leu	Ser	Leu
		355					360					365			
Pro	Arg	Leu	Lys	Pro	Ser	Glu	Ala	Gly	Arg	Tyr	Ser	Phe	Leu	Ala	Arg
	370					375					380				
Asn	Pro	Gly	Gly	Trp	Arg	Ala	Leu	Thr	Phe	Glu	Leu	Thr	Leu	Arg	Tyr
385					390					395					400
Pro	Pro	Glu	Val	Ser	Val	Ile	Trp	Thr	Phe	Ile	Asn	Gly	Ser	Gly	Thr
				405					410					415	

RU 2 565 541 C2

Leu Leu Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Pro Gln Pro Asn Val Thr Trp Leu
 420 425 430
 Gln Cys Ser Gly His Thr Asp Arg Cys Asp Glu Ala Gln Val Leu Gln
 435 440 445
 Val Trp Asp Asp Pro Tyr Pro Glu Val Leu Ser Gln Glu Pro Phe His
 450 455 460
 Lys Val Thr Val Gln Ser Leu Leu Thr Val Glu Thr Leu Glu His Asn
 465 470 475 480
 Gln Thr Tyr Glu Cys Arg Ala His Asn Ser Val Gly Ser Gly Ser Trp
 485 490 495
 Ala Phe Ile Pro Ile Ser Ala Gly Ala His Thr His Pro Pro Asp Glu
 500 505 510
 Phe Leu Phe Thr Pro Val Val Val Ala Cys Met Ser Ile Met Ala Leu
 515 520 525
 Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Tyr Lys Tyr Lys Gln Lys Pro
 530 535 540
 Lys Tyr Gln Val Arg Trp Lys Ile Ile Glu Ser Tyr Glu Gly Asn Ser
 545 550 555 560
 Tyr Thr Phe Ile Asp Pro Thr Gln Leu Pro Tyr Asn Glu Lys Trp Glu
 565 570 575
 Phe Pro Arg Asn Asn Leu Gln Phe Gly Lys Thr Leu Gly Ala Gly Ala
 580 585 590
 Phe Gly Lys Val Val Glu Ala Thr Ala Phe Gly Leu Gly Lys Glu Asp
 595 600 605
 Ala Val Leu Lys Val Ala Val Lys Met Leu Lys Ser Thr Ala His Ala
 610 615 620
 Asp Glu Lys Glu Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Met Ser His Leu
 625 630 635 640
 Gly Gln His Glu Asn Ile Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr His Gly
 645 650 655
 Gly Pro Val Leu Val Ile Thr Glu Tyr Cys Cys Tyr Gly Asp Leu Leu
 660 665 670
 Asn Phe Leu Arg Arg Lys Ala Glu Ala Met Leu Gly Pro Ser Leu Ser
 675 680 685
 Pro Gly Gln Asp Pro Glu Gly Gly Val Asp Tyr Lys Asn Ile His Leu
 690 695 700

RU 2565 541 C2

Glu 705	Lys	Lys	Tyr	Val	Arg 710	Arg	Asp	Ser	Gly	Phe 715	Ser	Ser	Gln	Gly	Val 720
Asp	Thr	Tyr	Val	Glu 725	Met	Arg	Pro	Val	Ser 730	Thr	Ser	Ser	Asn	Asp 735	Ser
Phe	Ser	Glu	Gln 740	Asp	Leu	Asp	Lys	Glu 745	Asp	Gly	Arg	Pro	Leu 750	Glu	Leu
Arg	Asp	Leu 755	Leu	His	Phe	Ser	Ser 760	Gln	Val	Ala	Gln	Gly 765	Met	Ala	Phe
Leu 770	Ala	Ser	Lys	Asn	Cys	Ile 775	His	Arg	Asp	Val	Ala 780	Ala	Arg	Asn	Val
Leu 785	Leu	Thr	Asn	Gly	His 790	Val	Ala	Lys	Ile	Gly 795	Asp	Phe	Gly	Leu	Ala 800
Arg	Asp	Ile	Met	Asn 805	Asp	Ser	Asn	Tyr	Ile 810	Val	Lys	Gly	Asn	Ala 815	Arg
Leu	Pro	Val	Lys 820	Trp	Met	Ala	Pro	Glu 825	Ser	Ile	Phe	Asp	Cys 830	Val	Tyr
Thr	Val	Gln 835	Ser	Asp	Val	Trp	Ser 840	Tyr	Gly	Ile	Leu	Leu 845	Trp	Glu	Ile
Phe 850	Ser	Leu	Gly	Leu	Asn	Pro 855	Tyr	Pro	Gly	Ile	Leu 860	Val	Asn	Ser	Lys
Phe 865	Tyr	Lys	Leu	Val	Lys 870	Asp	Gly	Tyr	Gln	Met 875	Ala	Gln	Pro	Ala	Phe 880
Ala	Pro	Lys	Asn	Ile 885	Tyr	Ser	Ile	Met	Gln 890	Ala	Cys	Trp	Ala	Leu 895	Glu
Pro	Thr	His	Arg 900	Pro	Thr	Phe	Gln	Gln 905	Ile	Cys	Ser	Phe	Leu 910	Gln	Glu
Gln	Ala	Gln 915	Glu	Asp	Arg	Arg	Glu 920	Arg	Asp	Tyr	Thr	Asn 925	Leu	Pro	Ser
Ser 930	Ser	Arg	Ser	Gly	Gly	Ser 935	Gly	Ser	Ser	Ser	Ser 940	Glu	Leu	Glu	Glu
Glu 945	Ser	Ser	Ser	Glu	His 950	Leu	Thr	Cys	Cys	Glu 955	Gln	Gly	Asp	Ile	Ala 960
Gln	Pro	Leu	Leu	Gln 965	Pro	Asn	Asn	Phe	Gln 970	Phe	Cys				

<210> 64
 <211> 493
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> внеклеточный домен человеческого CSF-1R
 <400> 64

```

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

Ala Thr Val Thr Leu Arg Cys Val Gly Asn Gly Ser Val Glu Trp Asp
          20          25          30

Gly Pro Pro Ser Pro His Trp Thr Leu Tyr Ser Asp Gly Ser Ser Ser
          35          40          45

Ile Leu Ser Thr Asn Asn Ala Thr Phe Gln Asn Thr Gly Thr Tyr Arg
50          55          60

Cys Thr Glu Pro Gly Asp Pro Leu Gly Gly Ser Ala Ala Ile His Leu
65          70          75          80

Tyr Val Lys Asp Pro Ala Arg Pro Trp Asn Val Leu Ala Gln Glu Val
          85          90          95

Val Val Phe Glu Asp Gln Asp Ala Leu Leu Pro Cys Leu Leu Thr Asp
          100          105          110

Pro Val Leu Glu Ala Gly Val Ser Leu Val Arg Val Arg Gly Arg Pro
          115          120          125

Leu Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His Gly Phe Thr
130          135          140

Ile His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln Cys Ser Ala
145          150          155          160

Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg Leu Lys Val
          165          170          175

Gln Lys Val Ile Pro Gly Pro Pro Ala Leu Thr Leu Val Pro Ala Glu
          180          185          190

Leu Val Arg Ile Arg Gly Glu Ala Ala Gln Ile Val Cys Ser Ala Ser
195          200          205

Ser Val Asp Val Asn Phe Asp Val Phe Leu Gln His Asn Asn Thr Lys
210          215          220

Leu Ala Ile Pro Gln Gln Ser Asp Phe His Asn Asn Arg Tyr Gln Lys
225          230          235          240

Val Leu Thr Leu Asn Leu Asp Gln Val Asp Phe Gln His Ala Gly Asn
    
```

RU 2 565 541 C2

245										250					255														
Tyr	Ser	Cys	Val	Ala	Ser	Asn	Val	Gln	Gly	Lys	His	Ser	Thr	Ser	Met														
			260					265					270																
Phe	Phe	Arg	Val	Val	Glu	Ser	Ala	Tyr	Leu	Asn	Leu	Ser	Ser	Glu	Gln														
		275					280					285																	
Asn	Leu	Ile	Gln	Glu	Val	Thr	Val	Gly	Glu	Gly	Leu	Asn	Leu	Lys	Val														
	290					295					300																		
Met	Val	Glu	Ala	Tyr	Pro	Gly	Leu	Gln	Gly	Phe	Asn	Trp	Thr	Tyr	Leu														
305					310					315					320														
Gly	Pro	Phe	Ser	Asp	His	Gln	Pro	Glu	Pro	Lys	Leu	Ala	Asn	Ala	Thr														
				325					330					335															
Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Arg	His	Thr	Phe	Thr	Leu	Ser	Leu	Pro	Arg	Leu														
			340					345					350																
Lys	Pro	Ser	Glu	Ala	Gly	Arg	Tyr	Ser	Phe	Leu	Ala	Arg	Asn	Pro	Gly														
		355					360					365																	
Gly	Trp	Arg	Ala	Leu	Thr	Phe	Glu	Leu	Thr	Leu	Arg	Tyr	Pro	Pro	Glu														
	370					375					380																		
Val	Ser	Val	Ile	Trp	Thr	Phe	Ile	Asn	Gly	Ser	Gly	Thr	Leu	Leu	Cys														
385					390					395					400														
Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Pro	Gln	Pro	Asn	Val	Thr	Trp	Leu	Gln	Cys	Ser														
				405					410					415															
Gly	His	Thr	Asp	Arg	Cys	Asp	Glu	Ala	Gln	Val	Leu	Gln	Val	Trp	Asp														
			420					425					430																
Asp	Pro	Tyr	Pro	Glu	Val	Leu	Ser	Gln	Glu	Pro	Phe	His	Lys	Val	Thr														
		435					440					445																	
Val	Gln	Ser	Leu	Leu	Thr	Val	Glu	Thr	Leu	Glu	His	Asn	Gln	Thr	Tyr														
	450					455					460																		
Glu	Cys	Arg	Ala	His	Asn	Ser	Val	Gly	Ser	Gly	Ser	Trp	Ala	Phe	I														

```
<210> 65
<211> 388
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> фрагмент человеческого CSF-1R delD4
```

<400> 65

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

Ala Thr Val Thr Leu Arg Cys Val Gly Asn Gly Ser Val Glu Trp Asp
20 25 30

Gly Pro Pro Ser Pro His Trp Thr Leu Tyr Ser Asp Gly Ser Ser Ser
35 40 45

Ile Leu Ser Thr Asn Asn Ala Thr Phe Gln Asn Thr Gly Thr Tyr Arg
50 55 60

Cys Thr Glu Pro Gly Asp Pro Leu Gly Gly Ser Ala Ala Ile His Leu
65 70 75 80

Tyr Val Lys Asp Pro Ala Arg Pro Trp Asn Val Leu Ala Gln Glu Val
85 90 95

Val Val Phe Glu Asp Gln Asp Ala Leu Leu Pro Cys Leu Leu Thr Asp
100 105 110

Pro Val Leu Glu Ala Gly Val Ser Leu Val Arg Val Arg Gly Arg Pro
115 120 125

Leu Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His Gly Phe Thr
130 135 140

Ile His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln Cys Ser Ala
145 150 155 160

Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg Leu Lys Val
165 170 175

Gln Lys Val Ile Pro Gly Pro Pro Ala Leu Thr Leu Val Pro Ala Glu
180 185 190

Leu Val Arg Ile Arg Gly Glu Ala Ala Gln Ile Val Cys Ser Ala Ser
195 200 205

Ser Val Asp Val Asn Phe Asp Val Phe Leu Gln His Asn Asn Thr Lys
210 215 220

Leu Ala Ile Pro Gln Gln Ser Asp Phe His Asn Asn Arg Tyr Gln Lys
225 230 235 240

Val Leu Thr Leu Asn Leu Asp Gln Val Asp Phe Gln His Ala Gly Asn
245 250 255

Tyr Ser Cys Val Ala Ser Asn Val Gln Gly Lys His Ser Thr Ser Met
260 265 270

RU 2565541 C2

Phe Phe Arg Tyr Pro Pro Glu Val Ser Val Ile Trp Thr Phe Ile Asn
275 280 285

Gly Ser Gly Thr Leu Leu Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Pro Gln Pro Asn
290 295 300

Val Thr Trp Leu Gln Cys Ser Gly His Thr Asp Arg Cys Asp Glu Ala
305 310 315 320

Gln Val Leu Gln Val Trp Asp Asp Pro Tyr Pro Glu Val Leu Ser Gln
325 330 335

Glu Pro Phe His Lys Val Thr Val Gln Ser Leu Leu Thr Val Glu Thr
340 345 350

Leu Glu His Asn Gln Thr Tyr Glu Cys Arg Ala His Asn Ser Val Gly
355 360 365

Ser Gly Ser Trp Ala Phe Ile Pro Ile Ser Ala Gly Ala His Thr His
370 375 380

Pro Pro Asp Glu
385

<210> 66
<211> 292
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> фрагмент человеческого CSF-1R D1-D3

<400> 66

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

Ala Thr Val Thr Leu Arg Cys Val Gly Asn Gly Ser Val Glu Trp Asp
20 25 30

Gly Pro Pro Ser Pro His Trp Thr Leu Tyr Ser Asp Gly Ser Ser Ser
35 40 45

Ile Leu Ser Thr Asn Asn Ala Thr Phe Gln Asn Thr Gly Thr Tyr Arg
50 55 60

Cys Thr Glu Pro Gly Asp Pro Leu Gly Gly Ser Ala Ala Ile His Leu
65 70 75 80

Tyr Val Lys Asp Pro Ala Arg Pro Trp Asn Val Leu Ala Gln Glu Val
85 90 95

Val Val Phe Glu Asp Gln Asp Ala Leu Leu Pro Cys Leu Leu Thr Asp
100 105 110

RU 2565541 C2

Pro Val Leu Glu Ala Gly Val Ser Leu Val Arg Val Arg Gly Arg Pro
115 120 125

Leu Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His Gly Phe Thr
130 135 140

Ile His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln Cys Ser Ala
145 150 155 160

Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg Leu Lys Val
165 170 175

Gln Lys Val Ile Pro Gly Pro Pro Ala Leu Thr Leu Val Pro Ala Glu
180 185 190

Leu Val Arg Ile Arg Gly Glu Ala Ala Gln Ile Val Cys Ser Ala Ser
195 200 205

Ser Val Asp Val Asn Phe Asp Val Phe Leu Gln His Asn Asn Thr Lys
210 215 220

Leu Ala Ile Pro Gln Gln Ser Asp Phe His Asn Asn Arg Tyr Gln Lys
225 230 235 240

Val Leu Thr Leu Asn Leu Asp Gln Val Asp Phe Gln His Ala Gly Asn
245 250 255

Tyr Ser Cys Val Ala Ser Asn Val Gln Gly Lys His Ser Thr Ser Met
260 265 270

Phe Phe Arg Val Val Glu Ser Ala Tyr Leu Asn Leu Ser Ser Glu Gln
275 280 285

Asn Leu Ile Gln
290

<210> 67
<211> 21
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> сигнальный пептид

<400> 67

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

Trp His Gly Gln Gly
20

<210> 68
<211> 36
<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> праймер

<400> 68

cacctccatg ttcttccggt accccccaga ggtaag
36

<210> 69

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 69

Asp Leu Arg Leu Tyr Phe Asp Val
1 5

<210> 70

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 70

Val Ile Trp Ser Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Phe Met Ser
1 5 10 15

<210> 71

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 71

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Asp Ile Ser
1 5 10

<210> 72

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 72

Gly Gln Ser Phe Thr Tyr Pro Thr
1 5

<210> 73

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 73

Gly Ser Ser Asn Arg Tyr Thr
1 5

<210> 74

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 74

Lys Ala Ser Glu Asp Val Gly Thr Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 75

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 75

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Phe Met
50 55 60

Ser Arg Leu Arg Ile Ser Lys Asp Asp Ser Arg Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Lys Val Asn Arg Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val
85 90 95

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 76

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 76

Lys Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

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

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

RU 2565541 C2

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

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

<210> 77
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 77

Asp Pro Arg Leu Tyr Phe Asp Val
1 5

<210> 78
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 78

Val Ile Trp Thr Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Gly Phe Met Ser
1 5 10 15

<210> 79
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 79

Gly Ser Ser Leu Asp Ser Phe Asp Ile Ser
1 5 10

<210> 80
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 80

Gly Gln Thr Phe Ser Tyr Pro Thr
1 5

<210> 81
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 81

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
1 5

<210> 82
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 82

Lys Ala Ser Glu Asp Val Val Thr Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 83

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 83

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Ser Ser Leu Asp Ser Phe
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Thr Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Gly Phe Met
50 55 60

Ser Arg Leu Arg Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Lys Met Ser Ser Leu Gln Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val
85 90 95

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 84

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 84

Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly
1 5 10 15

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

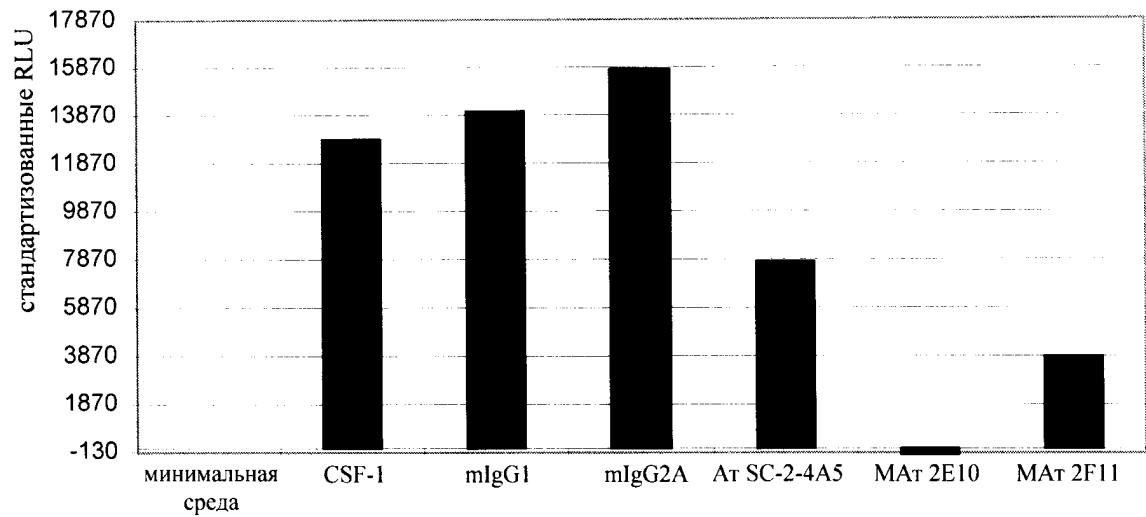
Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

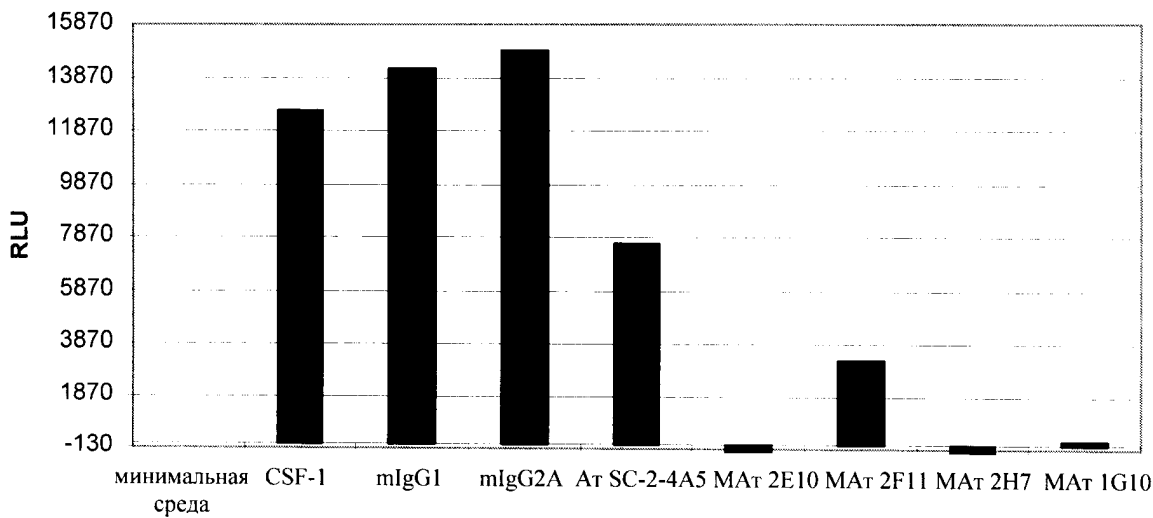
Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Gln Thr Phe Ser Tyr Pro Thr
85 90 95
Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

Клетки линии BeWo, 5×10⁴ клеток/лунку, 3D

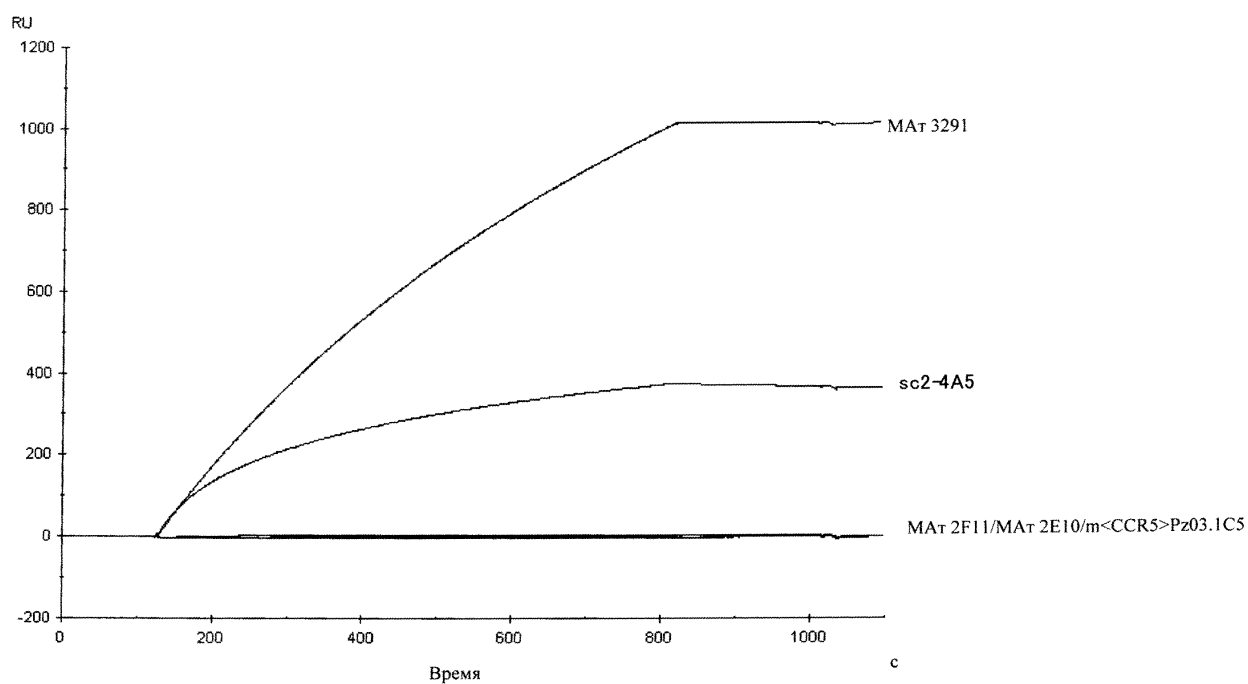


Фиг. 1а

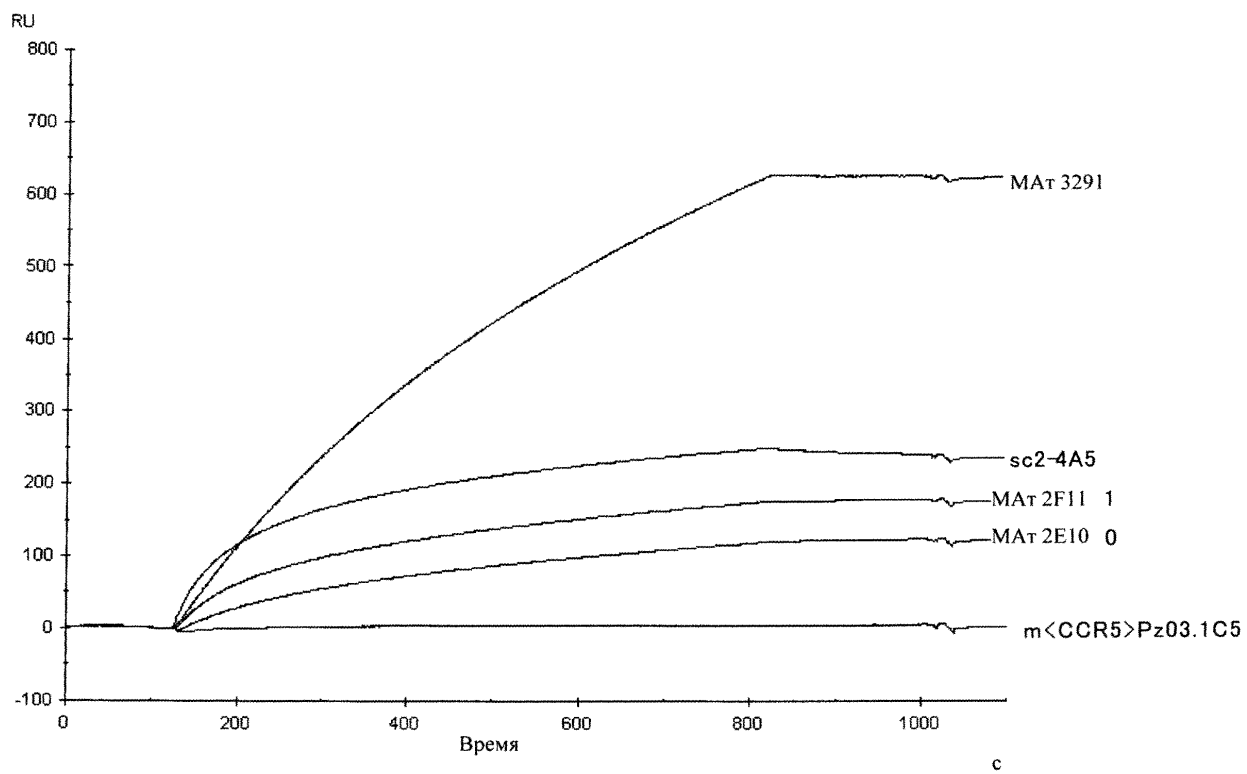
Клетки линии BeWo, 5×10⁴ клеток/лунку, 3D



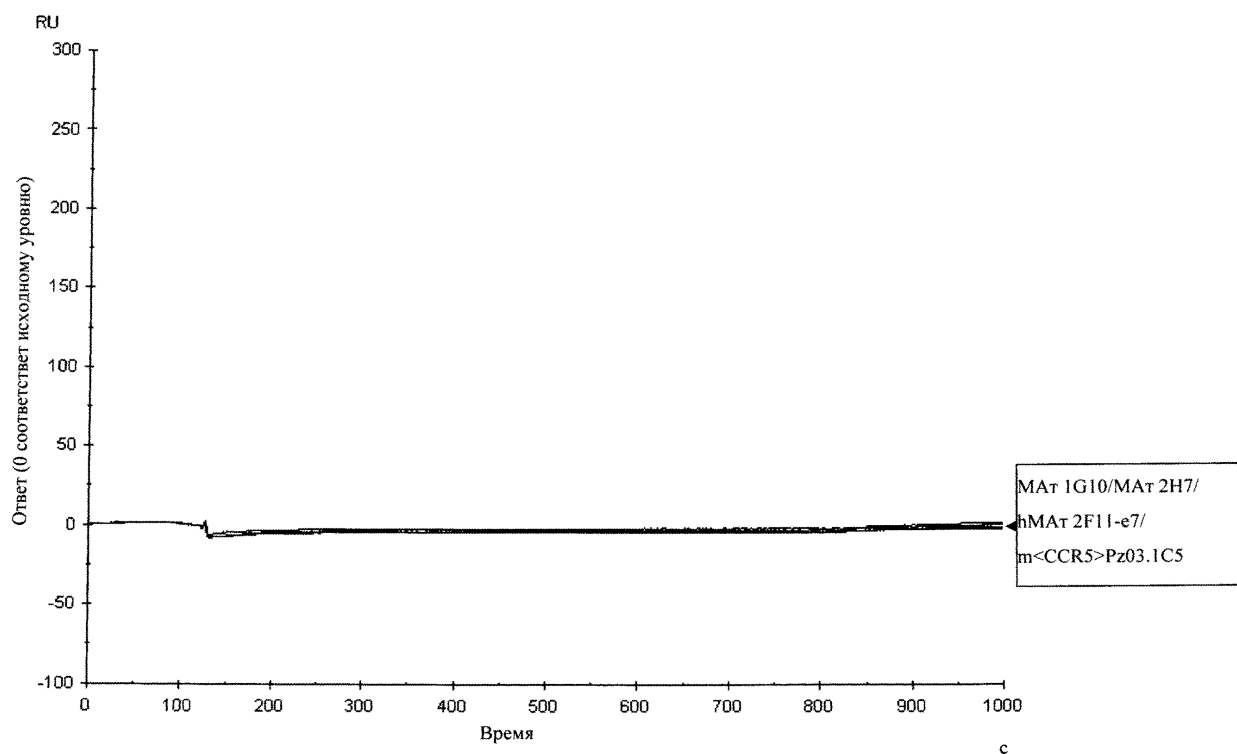
Фиг. 1б



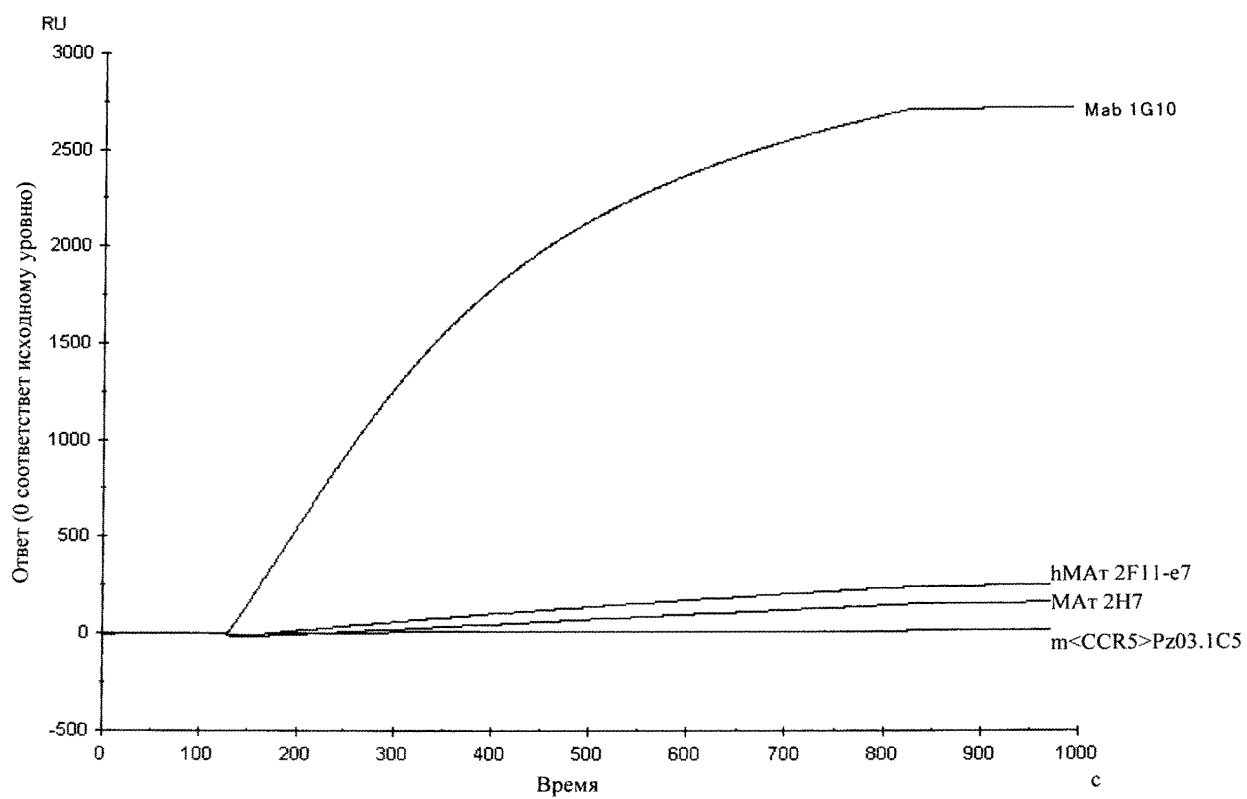
Фиг. 2а



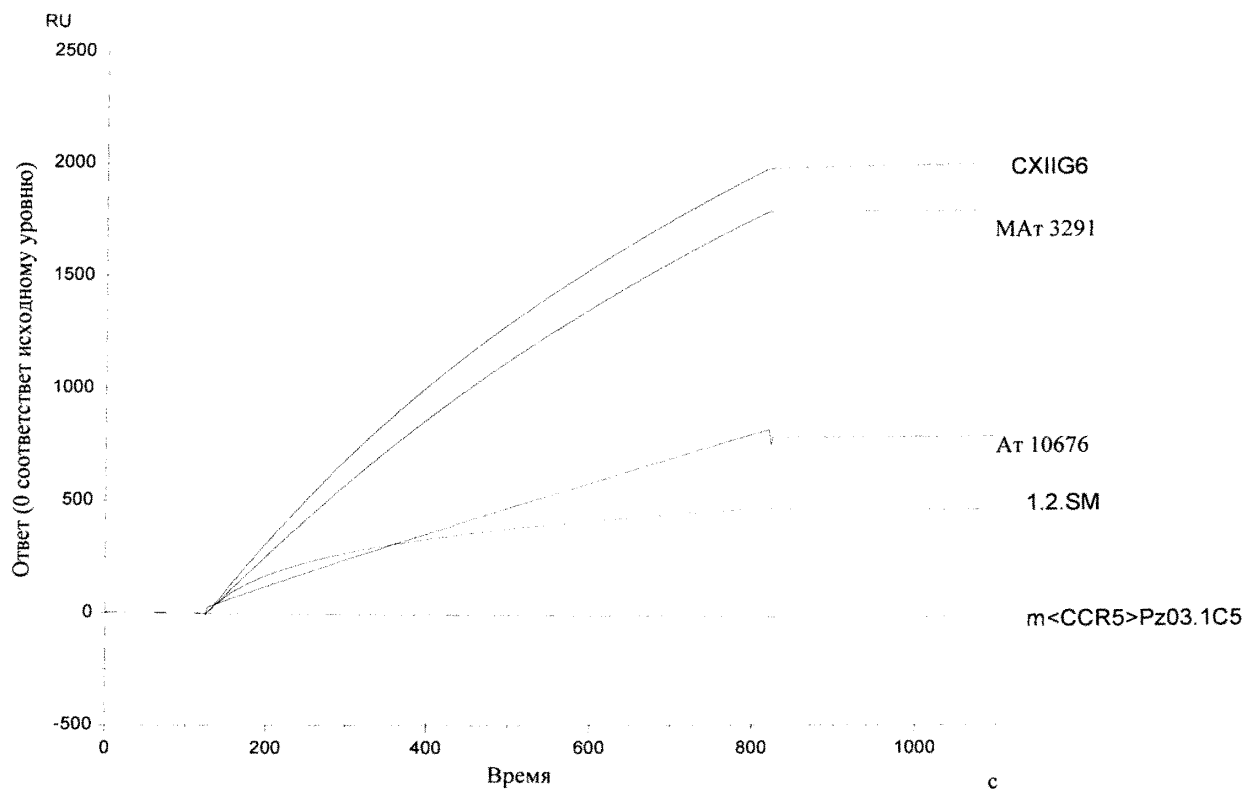
Фиг. 2б



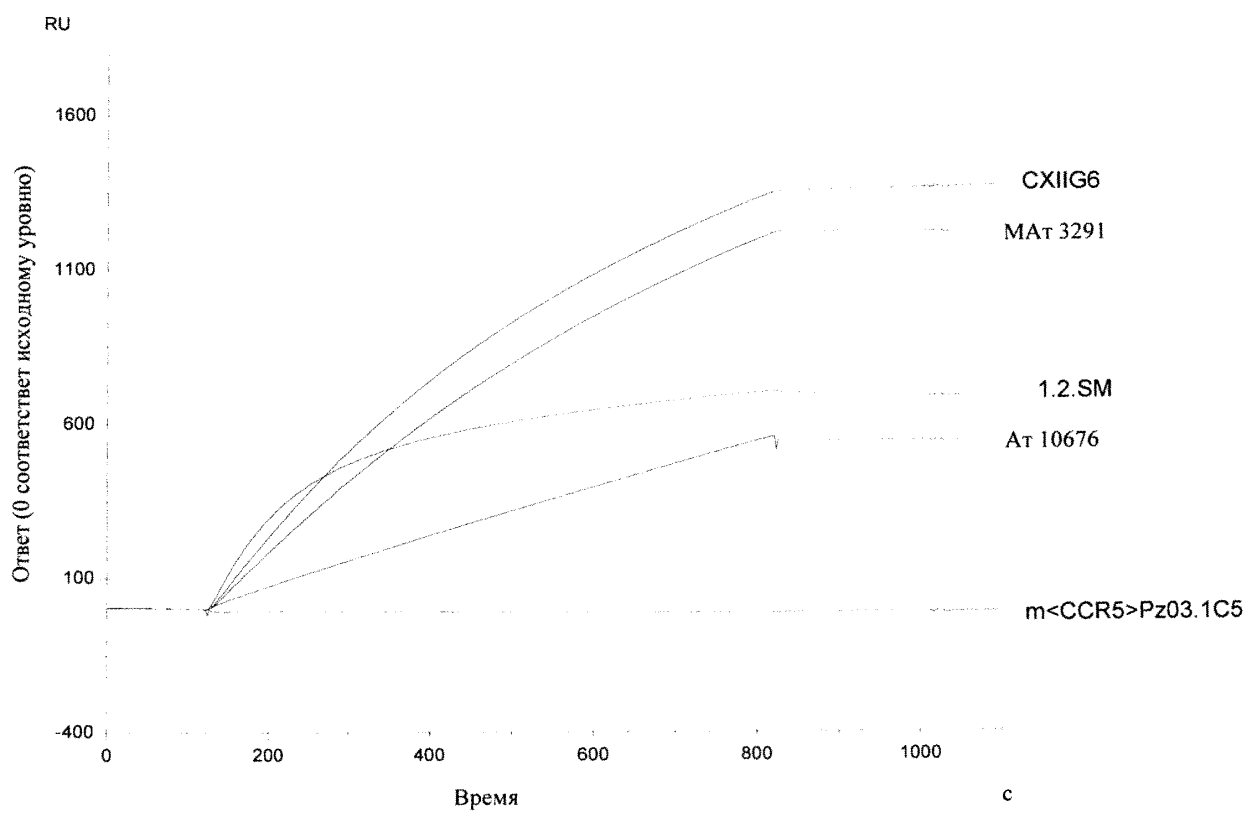
Фиг. 2в



Фиг. 2г

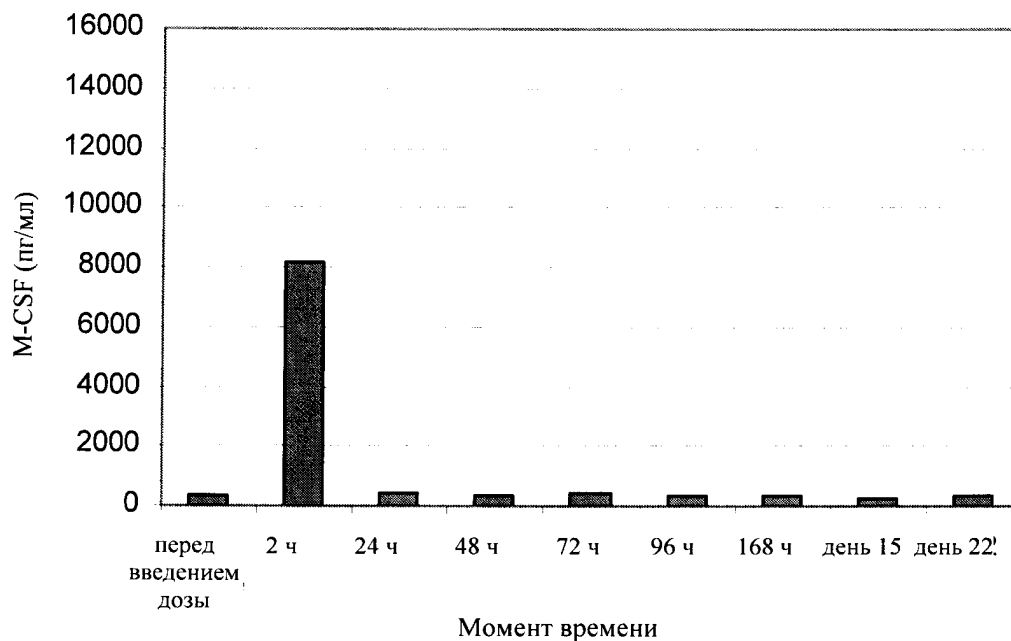


Фиг. 2д



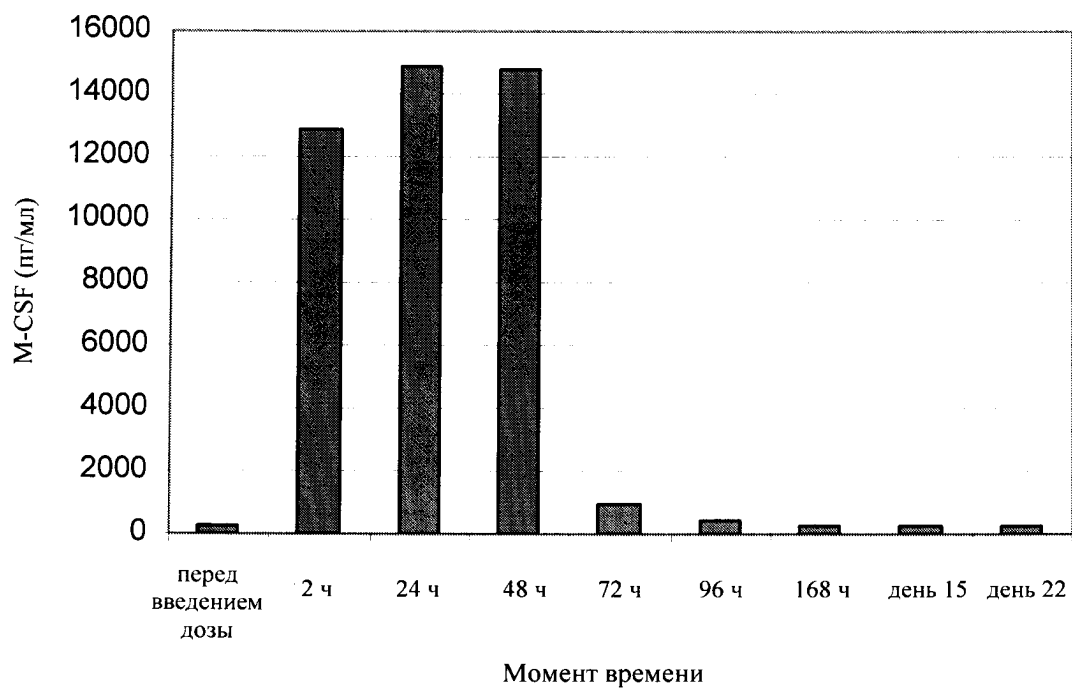
Фиг. 2е

CSF-1-специфический ELISA, плазма обезьяны-циномолгус, партия 1
(0,1 мг/кг, антитело к CSF1R hMAт 2F11-e7, животное 1)



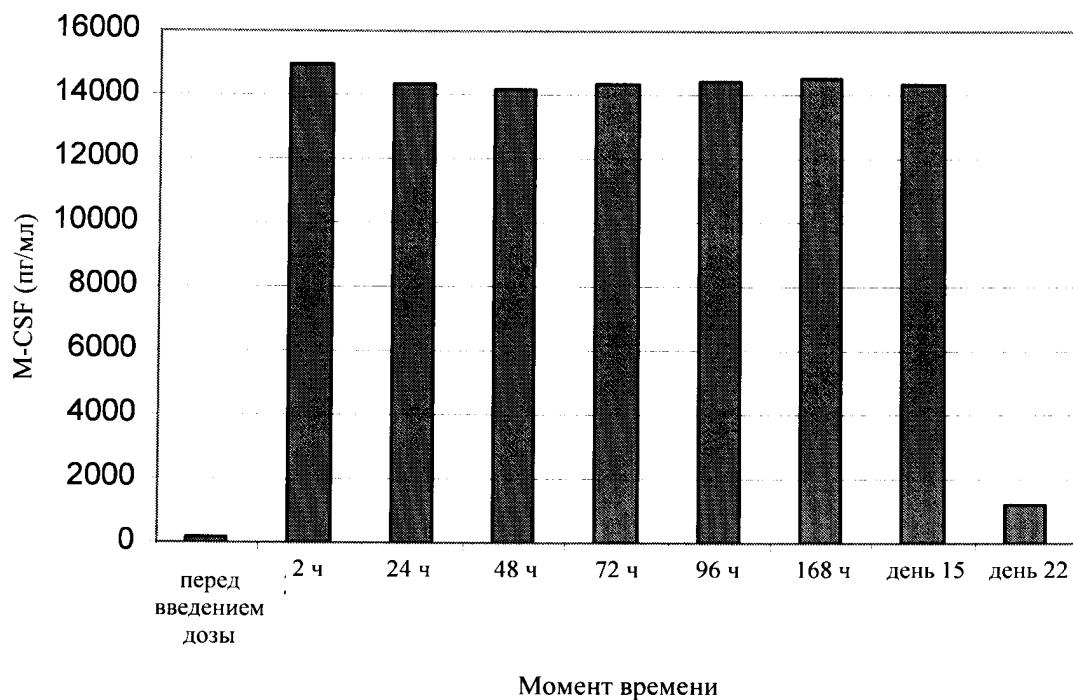
Фиг. 3а

CSF-1-специфический ELISA, плазма обезьяны-циномолгус,
партия 1 (1 мг/кг, антитело к CSF1R hMAт 2F11-e7, животное 1)



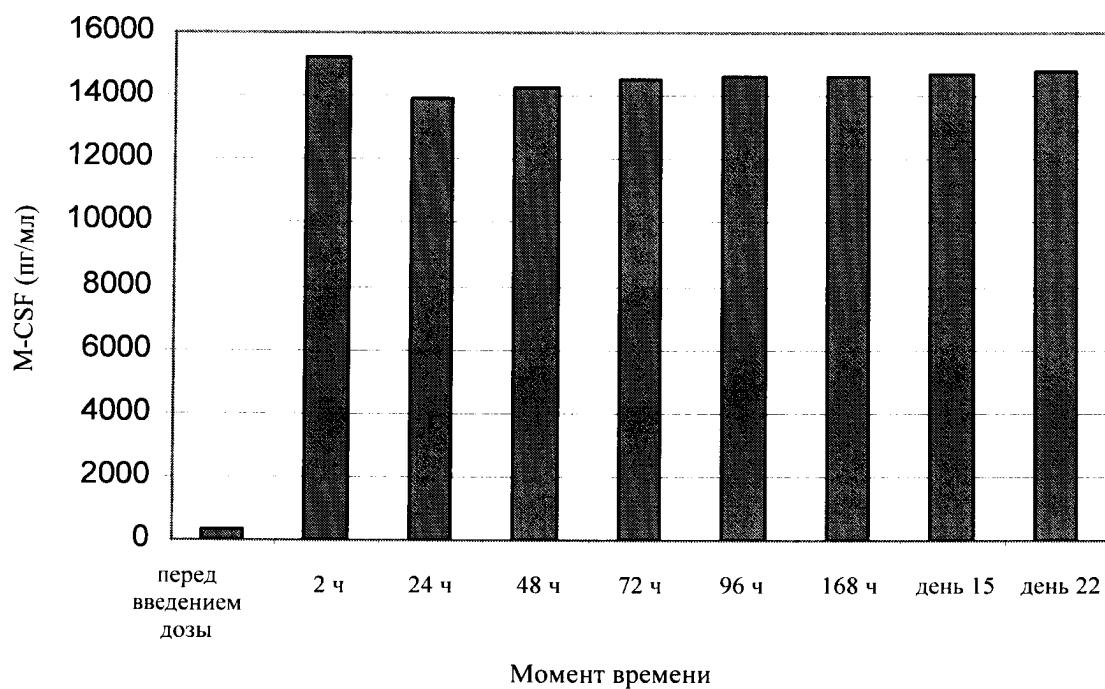
Фиг. 3б

CSF-1-специфический ELISA, плазма обезьяны-циномолгус, партия 1
(10 мг/кг, антитело к CSF1R hMAт 2F11-е7, животное 1)

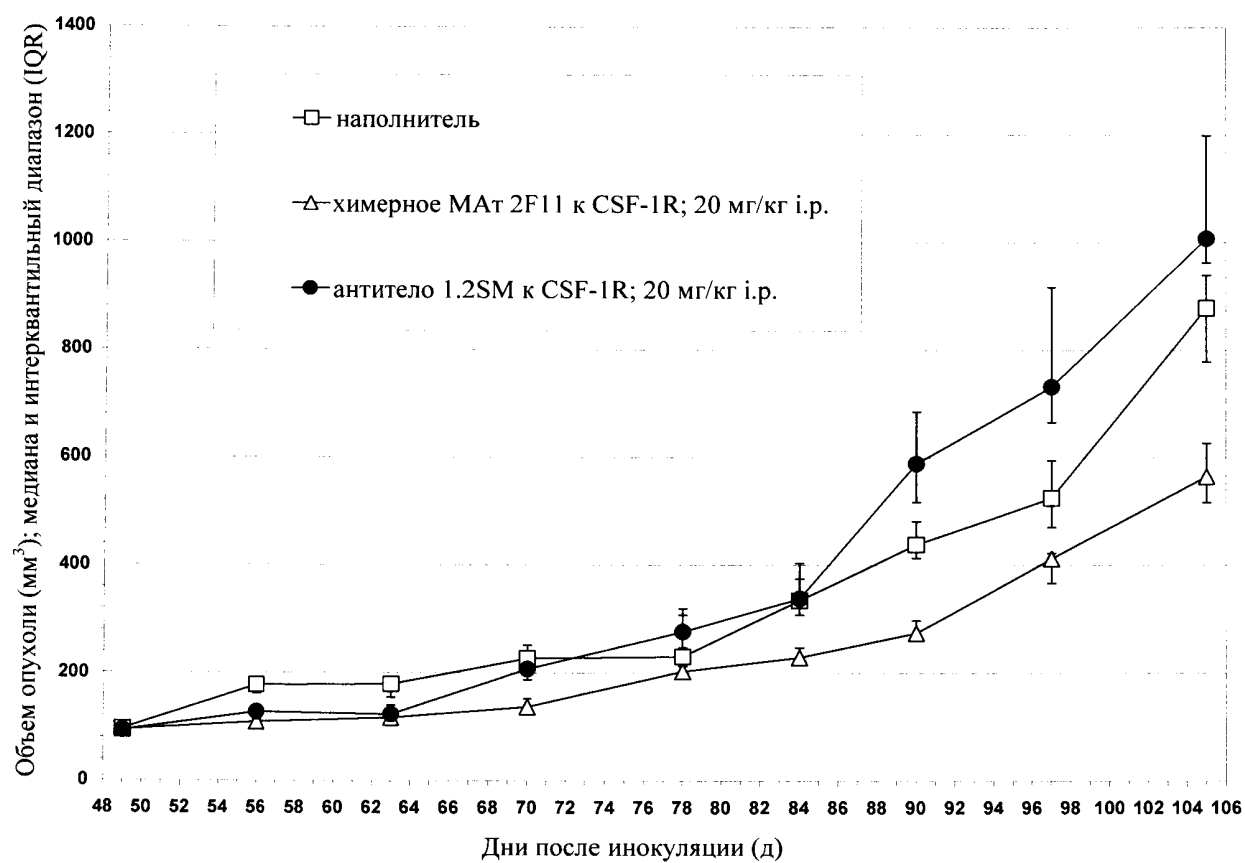


Фиг. 3в

CSF-1-специфический ELISA, плазма обезьяны-циномолгус, партия 1
(100 мг/кг, антитело к CSF1R hMAт 2F11-е7, животное 1)



Фиг. 3г



Фиг. 4