

Область изобретения

Изобретение относится, в общем, к области молекулярной биологии, и конкретно к антителам против $\alpha_v\beta_6$ -интегринов.

Предпосылки изобретения

Интегрины представляют собой надсемейство рецепторов клеточной поверхности, которые опосредуют адгезию клетка-клетка и клетка-матрикс. Данные белки, как известно, обеспечивают закоривание, а также сигналы клеточного роста, миграции и дифференцировки во время развития и восстановления ткани. Интегрины также вовлечены в обратную дифференцировку и инвазию клеток, особенно когда клетки теряют свою специализированную форму и становятся метастазирующими раковыми клетками.

Интегрины представляют собой гетеродимерные белки, составленные из двух нековалентно связанных субъединиц, α и β . Специфичность связывания интегринными диктуется комбинацией некоторых из 18 различных α -цепей с некоторыми из 8 различных β -цепей. $\alpha_v\beta_6$ -Интегрин может связываться с некоторым количеством лигандов, включая фибронектин, тенасцин, витронектин и недавно идентифицированный ассоциированный с латентностью пептид "LAP", пептид из 278 аминокислот, синтезированный в виде части белка-предшественника TGF- β (Munger et al., Cell 96 (3): 319-328 (1999)). LAP отщепляется от зрелой формы TGF- β в виде N-концевого пептида во время секреции, но остается нековалентно ассоциированным с TGF- β для поддержания его латентного состояния. Данный комплекс не может связываться с рецептором TGF- β и поэтому не активен биологически. $\alpha_v\beta_6$ -Интегрин может связываться непосредственно с RGD-мотивом, содержащимся внутри LAP, что приводит к высвобождению LAP и активации TGF- β . Поскольку связывание $\alpha_v\beta_6$ с LAP может иметь значение при переходе TGF- β в его активное состояние, блокирование данного связывания может приводить к ингибированию $\alpha_v\beta_6$ -опосредованной активации TGF- β и ассоциированной фиброзной патологии.

Сущность изобретения

Данное изобретение основывается на открытии и характеристике высокоаффинных антител против $\alpha_v\beta_6$, включая идентификацию и анализ ключевых аминокислотных остатков в областях, определяющих комплементарность (CDR) таких антител.

Данное изобретение относится моноклональному антителу, которое: (а) специфически связывается с $\alpha_v\beta_6$; (b) ингибирует связывание $\alpha_v\beta_6$ с его лигандом, таким как LAP, фибронектин, витронектин и тенасцин, со значением IC_{50} , меньшим, чем у антитела 10D5 (публикация заявки на выдачу международного патента WO 99/07405); (c) блокирует активацию TGF- β ; (d) содержит определенные аминокислотные последовательности в CDR (например, такие, как показано на фиг. 7A и 7B), которые обеспечивают специфичность связывания с $\alpha_v\beta_6$; (e) специфически связывается с субъединицей β_6 и/или (f) распознает $\alpha_v\beta_6$ в процедурах иммунного окрашивания, таких как иммунное окрашивание залитых в парафин тканей.

Было обнаружено, что антитела, которые связываются с $\alpha_v\beta_6$, могут быть разделены на биофизически различные классы и субклассы. Один из классов антител проявляет способность блокировать связывание лиганда (например, LAP) с $\alpha_v\beta_6$ (блокаторы). Данный класс антител может далее разделяться на субклассы катионзависимых блокаторов и катионнезависимых блокаторов. Некоторые из катионзависимых блокаторов содержат пептидную последовательность аргинин-глицин-аспартат (RGD), а катионнезависимые блокаторы не содержат RGD-последовательность. Другой класс антител проявляет способность связываться с $\alpha_v\beta_6$ и при этом не блокирует связывания $\alpha_v\beta_6$ с лигандом (неблокирующие антитела).

Соответственно, в некоторых осуществлениях данного изобретения некоторые антитела согласно изобретению являются катионзависимыми двухвалентными в плане связывания $\alpha_v\beta_6$, в то время как другие являются катионнезависимыми двухвалентными в плане связывания $\alpha_v\beta_6$. Типовыми катионами являются Ca^{2+} , Mg^{2+} и Mn^{2+} .

В некоторых осуществлениях антитело содержит те же полипептидные последовательности легких и тяжелых цепей, что и антитело, продуцируемое гибридомой 6.1A8, 6.3G9, 6.8G6, 6.2B1, 6.2B10, 6.2A1, 6.2E5, 7.1G10, 7.7G5 или 7.1C5.

В некоторых осуществлениях антитела содержат тяжелую цепь, области, определяющие комплементарность, (CDR) 1, 2 и 3 которой состоят, по существу (т.е., за исключением некоторых консервативных вариаций), из последовательностей SEQ ID NO: 1, 4 и 7, соответственно, и/или легкую цепь, CDR 1, 2 и 3 которой состоят, по существу, из последовательностей SEQ ID NO: 10, 13 и 15, соответственно.

В некоторых осуществлениях антитела содержат тяжелую цепь, CDR 1, 2 и 3 которой состоят, по существу, из последовательностей SEQ ID NO: 3, 5 и 8, соответственно, и/или легкую цепь, CDR 1, 2 и 3 которой состоят, по существу, из последовательностей SEQ ID NO: 11, 14 и 17, соответственно.

В некоторых осуществлениях антитела содержат тяжелую цепь, CDR 1, 2 и 3 которой состоят, по существу, из последовательностей SEQ ID NO: 3, 6 и 9, соответственно, и/или легкую цепь, CDR 1, 2 и 3 которой состоят, по существу, из последовательностей SEQ ID NO: 12, 14 и 18, соответственно.

В некоторых осуществлениях антитела содержат тяжелую цепь, CDR 1, 2 и 3 которой состоят, по существу, из последовательностей SEQ ID NO: 2, 46 и 47, соответственно, и/или легкую цепь, CDR 1, 2 и 3 которой состоят, по существу, из последовательностей SEQ ID NO: 48, 13 и 16, соответственно.

В некоторых осуществлениях антитела содержат тяжелую цепь, CDR 1, 2 и 3 которой состоят, по существу, из последовательностей SEQ ID NO: 49, 51 и 53, соответственно, и/или легкую цепь, CDR 1, 2 и 3 которой состоят, по существу, из последовательностей SEQ ID NO: 55, 57 и 59, соответственно.

В некоторых осуществлениях антитела содержат тяжелую цепь, CDR 1, 2 и 3 которой состоят, по существу, из последовательностей SEQ ID NO: 50, 52 и 54, соответственно, и/или легкую цепь, CDR 1, 2 и 3 которой состоят, по существу, из последовательностей SEQ ID NO: 56, 58 и 60, соответственно.

В некоторых осуществлениях антитела содержат последовательность варибельного домена тяжелой цепи, любую из SEQ ID NO: 19-36 и 61-62.

В некоторых осуществлениях антитела содержат последовательности варибельных доменов тяжелой и легкой цепей:

- (1) SEQ ID NO: 19 и 37;
- (2) SEQ ID NO: 20 или 21 и SEQ ID NO: 38;
- (3) SEQ ID NO: 22 и 43;
- (4) SEQ ID NO: 23 и 44;
- (5) SEQ ID NO: 24 и 45;
- (6) SEQ ID NO: 25 или 26 и SEQ ID NO: 42;
- (7) SEQ ID NO: 27, 28 или 29, и SEQ ID NO: 39;
- (8) SEQ ID NO: 34 или 35, и SEQ ID NO: 40;
- (9) SEQ ID NO: 36 и 41;
- (10) SEQ ID NO: 61 и 63; или
- (11) SEQ ID NO: 62 и 64, соответственно.

В некоторых осуществлениях антитела специфически связываются с $\alpha_v\beta_6$, но не ингибируют связывание с пептидом, ассоциированным с латентностью (LAP). По меньшей мере, некоторые из данных антител способны связываться с $\alpha_v\beta_6$ в залитых в парафин срезах тканей и поэтому могут использоваться для диагностических целей. Типовые антитела включают в себя 6.2A1 и 6.2E5.

Данное изобретение также относится к антителам, которые связываются с теми же эпитопами, что и любое из описанных выше антител.

Данное изобретение также относится к композициям, включающим в себя одно или несколько антител согласно изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых из данных композиций антитела конъюгируют с цитотоксическим агентом (т.е. с агентом, который ослабляет жизнеспособность и/или функции клетки), таким как токсин или радионуклид. Антитела в данных композициях могут быть катионзависимыми антителами. Композиции могут вводиться субъекту (например, млекопитающему, такому как человек), страдающему от заболевания, опосредованного $\alpha_v\beta_6$, или при риске такого заболевания, для лечения (например, облегчения, смягчения, снижения, предотвращения, отложения приступа) заболевания. Неограничивающие примеры таких заболеваний охватывают фиброз (например, склеродермию, рубцы, фиброз печени, фиброз легких и фиброз почек); псориаз; злокачественные опухоли (например, эпителиальный рак; рак ротовой полости, кожи, шейки матки, яичников, глотки, гортани, пищевода, легких, молочной железы, почки или колоректальный рак); синдром Альпорта; острые и хронические повреждения легкого, печени, почек и других внутренних органов и склероз легкого, печени, почек и других внутренних органов. Риски возникновения таких заболеваний могут быть результатом генетической предрасположенности; некоторых жизненных привычек, таких как курение и алкоголизм; воздействия загрязнителей окружающей среды, таких как асбест; физиологических состояний, таких как диабет, инфекция вирусным гепатитом (например, инфекция вирусным гепатитом C), аутоиммунные заболевания; и медицинских процедур, таких как радиационная терапия.

Данное изобретение также относится к способам детекции $\alpha_v\beta_6$ в образце ткани от млекопитающего (например, человека), охватывающим контактирование образца ткани с антителом по изобретению, таким как 6.2A1 и 6.2E5.

Данное изобретение также относится к клеткам гибридом 6.1A8, 6.2B10, 6.3G9, 6.8G6, 6.2B1, 6.2A1, 6.2E5, 7.1G10, 7.7G5 и 7.1C5; выделенным нуклеиновым кислотам, включающим в себя кодирующую последовательность, любую из SEQ ID NO: 19-45 и 61-64; выделенным полипептидам, включающим в себя аминокислотную последовательность, любую из SEQ ID NO: 19-45 и 61-64.

Антитело согласно изобретению относится к полноразмерному антителу, например антителу, включающему в себя две тяжелые цепи и две легкие цепи, или к антигенсвязывающему фрагменту полноразмерного антитела, такому как Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент или F(v)-фрагмент. Антитело согласно изобретению может быть мышинным антителом, или его гомологом, или полноразмерным человеческим антителом. Антитело согласно изобретению также может быть гуманизированным антителом, химерным антителом или одноцепочечным антителом. Антитело согласно изобретению может

относиться к любому изотипу и субтипу, например к IgA (например, IgA1 и IgA2), IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), IgE, IgD, IgM, где легкие цепи иммуноглобулина могут быть типа каппа или лямбда.

В некоторых осуществлениях антитело согласно изобретению может включать в себя мутацию (например, делецию, замену или добавление) в одной или нескольких (например, 2, 3, 4, 5 или 6) конкретных позициях в тяжелой цепи, так что эффекторная функция антитела (например, способность антитела связываться с Fc-рецептором или с фактором комплемента) изменена без влияния на антигенсвязывающую активность антитела. В других осуществлениях антитело согласно изобретению может содержать мутацию в аминокислотном остатке, который представляет собой участок гликозилирования, так что участок гликозилирования элиминируется. Такое антитело может обладать предпочтительным для клиники снижением эффекторных функций или других нежелательных функций при сохранении его антигенсвязывающей активности.

Мутация участка гликозилирования также может быть благоприятной для разработки способа (например, экспрессии и очистки белка). В других осуществлениях тяжелые или легкие цепи могут содержать мутации, которые повышают родство или эффективность.

Некоторые из гибридом слияния #6 и слияния #7 поместили на хранение в American Type Culture Collection ("ATCC"; P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, США) по Будапештскому соглашению. Гибридомные клоны 6.1A8, 6.2B10, 6.3G9, 6.8G6 и 6.2B1 поместили на хранение 16 августа 2001г., и они имеют инвентарные номера ATCC PTA-3647, -3648, -3649, -3645 и -3646, соответственно. Гибридомные клоны 6.2A1, 6.2E5, 7.1G10, 7.7G5 и 7.1C5 поместили на хранение 5 декабря 2001г., и они имеют инвентарные номера ATCC PTA-3896, -3897, -3898, -3899 и -3900, соответственно. См. табл. 1 ниже.

Антитела согласно изобретению могут использоваться для лечения любого нежелательного для клиники состояния или заболевания (обсуждающегося в данном описании), которое опосредовано связыванием $\alpha_v\beta_6$ с его лигандом, таким как LAP и фибронектин. Данные антитела могут быть более эффективными за счет более высокого родства или авидности и зависимости или независимости связывания лиганда от катионов по сравнению с ранее известными антителами против $\alpha_v\beta_6$.

В дополнение к терапевтическим применениям антител согласно изобретению, особенно блокаторов, класс неблокирующих антител может использоваться для диагностических целей, таких как анализы связывания антител, иммуноферментные сорбционные анализы (ELISA), иммуногистохимия и т.п.

Другие свойства или преимущества изобретения будут ясны из дальнейшего подробного описания, фигур и формулы изобретения.

Краткое описание фигур

Фиг. 1A и 1B представляют собой гистограммы, на которых показаны результаты анализа по захвату клеток, в котором определяли способность различных моноклональных антител ("mAb") против $\alpha_v\beta_6$ связывать трансфицированные β_6 клетки FDC-P1 (в качестве контроля - нетрансфицированные клетки).

Фиг. 2A представляет собой график, на котором показаны результаты анализов ELISA, в которых определяли способность различных очищенных моноклональных антител против $\alpha_v\beta_6$ "слияния 6" связывать растворимый рекомбинантный $\alpha_v\beta_6$ человека ("hs $\alpha_v\beta_6$ "). Данные антитела получали путем иммунизации мышей β_6 -/- растворимым укороченным человеческим $\alpha_v\beta_6$. Числа в подписи к фигуре, справа, указывают на номера клонов. Соответствующие названия клонов см. в табл. 2.

Фиг. 2B представляет собой график, на котором показаны результаты анализов ELISA, в которых определяли способность различных очищенных моноклональных антител против $\alpha_v\beta_6$ "слияния 7" связывать растворимый рекомбинантный hs $\alpha_v\beta_6$. Данные антитела получали путем иммунизации мышей $\alpha_v\beta_6$ -/- трансфицированными β_6 клетками NIH 3T3 (слияния #7).

Фиг. 3A-F представляют собой графики, на которых показана дифференциальная зависимость от катионов связывания различных моноклональных антител против $\alpha_v\beta_6$ с hs $\alpha_v\beta_6$.

Фиг. 4A и 4B представляют собой графики, на которых показано, что моноклональные антитела слияния #6 и слияния #7, соответственно, ингибируют связывание биотин-hs $\alpha_v\beta_6$ с LAP.

Фиг. 5A-E представляют собой графики, на которых показано, что моноклональные антитела согласно изобретению ингибируют связывание трансфицированных β_6 клеток FDC-P1 с LAP. На фиг. 5A и 5B показаны результаты, полученные с антителами слияния #6. На фиг. 5C-E показаны результаты, полученные с антителами слияния #7.

Фиг. 6A и 6B представляют собой графики, на которых показано, что антитела слияния #6 и слияния #7, соответственно, ингибируют опосредованную $\alpha_v\beta_6$ активацию TGF- β , с использованием анализа с использованием гена-репортера PAI-1-люциферазы для мониторинга активации TGF- β .

Фиг. 7A отображает аминокислотные последовательности переменных доменов тяжелых цепей моноклональных антител против $\alpha_v\beta_6$ 6.1A8, 6.8G6 (субклоны A и B), 7.7G5, 6.2B1, 6.3G9, 6.2B10 (субклоны A и B), 6.2G2, 6.2A1, 6.4B4 (субклоны A, B и C), 7.10H2, 7.9H5, 7.4A3 (субклоны A и B), 7.1C5 (субклоны A и B) и 7.1G10. Антитела 6.1A8, 6.8G6 и 7.7G5 являются катионзависимыми в плане связывания с $\alpha_v\beta_6$, в то время как антитела 6.2B1, 6.2A1, 6.3G9, 6.2B10, 6.4B4, 7.1C5 и 7.1G10 являются катионнезависимыми (см. ниже). Номера сносок означают позиции аминокислотных остатков. CDR находятся в больших прямоугольниках, в то время как малые прямоугольники содержат показанные курсивом

аминокислоты, характеризующиеся полиморфизмом в различных клонах конкретного антитела.

На фиг. 7В отобраны аминокислотные последовательности вариабельных доменов легких цепей моноклональных антител против $\alpha_v\beta_6$ 6.1A8, 6.8G6, 6.4B4, 6.2A1, 7.1C5, 7.1G10, 6.2B10, 7.7G5, 6.2B1 и 6.3G9.

Фиг. 8 представляет собой график рассеяния, на котором показана экспрессия $\alpha_v\beta_6$ в срезах ткани рака молочной железы человека и плоскоклеточной карциномы человека. Нормальные ткани человека характеризуются лишь незначительными уровнями экспрессии $\alpha_v\beta_6$.

Фиг. 9А и 9В представляют собой графики кривых второго порядка, изображающие связывающие активности в растворе двух антител против $\alpha_v\beta_6$ 6.8G6 и 6.3G9, соответственно, в отношении растворимого $\alpha_v\beta_6$.

Фиг. 10А и 10В представляют собой гистограммы, на которых демонстрируется способность очищенных моноклональных антител конкурировать с биотинилированным 6.3G9 и биотинилированным 6.8G6, соответственно, за связывание с $\alpha_v\beta_6$.

Фиг. 11 представляет собой диаграмму, на которой показан процент окрашивания гладкомышечного актина в почках от животных UUO, подвергшихся лечению mAb против $\alpha_v\beta_6$.

На фиг. 12 показаны экспрессия $\alpha_v\beta_6$ в опухолевых клеточных линиях путем FACS-анализа (правая сторона фигуры) и ингибирование связывания лиганда LAP опухолевыми клеточными линиями за счет mAb 6.3G9 и 6.4B4 (левая сторона фигуры).

Фиг. 13 представляет собой диаграмму, на которой демонстрируется ингибирование связывания тремя опухолевыми клеточными линиями лиганда LAP за счет mAb против $\alpha_v\beta_6$ 6.3G9, 6.8G6 и 6.4B4. Связывание mAb сравнивали с общим связыванием без добавления тестовых mAb (TB) и неспецифическим связыванием лишь с контролем BSA (NSB).

Фиг. 14А и 14В представляют собой графики, на которых показаны эффекты mAb против $\alpha_v\beta_6$ 6.3G9 и 6.4B4, соответственно, после периода исследования длительностью 33 суток в отношении опухолей, возникших вследствие имплантированных подкожно клеток Detroit 562.

Фиг. 15А-С представляют собой графики, на которых показаны эффекты mAb против $\alpha_v\beta_6$ при индуцированном блеомицином фиброзе легких. (А) Обработка антителами с использованием mAb 6.3G9 начиналась на сутки 0 с момента введения блеомицина, и за ней следили в течение периода 30 суток; (В) обработка антителами с использованием mAb 6.3G9 начиналась на сутки 15 после обработки блеомицином, и за ней следили в течение периода 30 суток; (С) обработка антителами с использованием mAb 6.3G9, 6.8G6 и 6.4B4 начиналась на сутки 15 после обработки блеомицином, и за ней следили в течение продленного периода 60 суток. На фиг. 15А и 15В диаграммы слева представляют собой мкг гидроксипролина/легкое, в то время как диаграммы справа показывают процентное повышение по гидроксипролину по сравнению с обработанными солевым раствором мышами (без блеомицина). На фиг. 15С на графике показано содержание гидроксипролина на легкое.

Подробное описание изобретения

Данное изобретение относится к классам и субклассам антител, которые специфичны в отношении интегрина $\alpha_v\beta_6$. Антитела по меньшей мере одного класса (блокаторы) способны блокировать связывание $\alpha_v\beta_6$ с LAP или предотвращать активацию TGF- β .

Далее описаны различные способы получения антител согласно изобретению. Способы, известные в данной области, но не описанные конкретно в данном описании, также входят в объем данного изобретения. Например, антитела согласно изобретению могут также идентифицироваться с использованием библиотек антител на основе фагового дисплея, таких как описанные Smith, Science 228: 1315-7 (1985); в патентах США 5565332, 5733743, 6291650 и 6303313. Дополнительные антитела согласно изобретению могут быть получены путем связывания идентифицированных в данном описании тяжелых цепей с неродственной легкой цепью, например с легкой цепью, идентифицированной по технологии фагового дисплея.

Антитела не относящихся к человеку гибридом

Моноклональные антитела согласно изобретению могут генерироваться путем хорошо известной гибридомной технологии. Для ее осуществления β_6 -/- животных (например, мышей, крыс или кроликов) иммунизируют очищенными или неочищенными препаратами $\alpha_v\beta_6$, клетками, трансфицированными конструкциями кДНК, кодирующими α_v , β_6 или оба антигена, клетками, которые конститутивно экспрессируют $\alpha_v\beta_6$, и т.п. Антиген может доставляться в виде очищенного белка, белка, экспрессированного на клетках, фрагментов белка или его пептидов или в виде голой ДНК или вирусных векторов, кодирующих белок, фрагмент белка или пептид. Сыворотки иммунизированных животных затем тестируют на наличие антител против $\alpha_v\beta_6$. Из тест-позитивных животных выделяют В-клетки и гибридомы получают с использованием данных В-клеток.

Антитела, секретируемые гибридомами, подвергают скринингу на их способность специфически связываться $\alpha_v\beta_6$ (например, связываться с трансфицированными β_6 клетками и не связываться с не-трансфицированными исходными клетками) и на любые другие требуемые свойства, например на наличие требуемых консенсусных последовательностей CDR, на ингибирование (или отсутствие ингибиро-

ния в случае неблокирующих антител) связывания LAP и $\alpha_v\beta_6$ со значением IC_{50} ниже такового у известного антитела против $\alpha_v\beta_6$ 10D5 или на ингибирование активации TGF- β .

Гибридомные клетки, тест-позитивные в анализах по скринингу, культивируют в питательной среде в условиях, которые обеспечивают секрецию клетками моноклональных антител в культуральную среду. Затем приведенную к должным условиям культуральную надосадочную жидкость собирают и очищают содержащиеся в надосадочной жидкости антитела. Альтернативно, требуемое антитело может продуцироваться путем инъекции гибридомных клеток в брюшную полость неиммунизированного животного (например, мыши). Гибридомные клетки пролиферируют в брюшной полости, секретируя антитело, которое накапливается в виде асцитной жидкости. Затем антитело может быть собрано путем отбора шприцом асцитной жидкости из брюшной полости.

Моноклональные антитела также могут генерироваться путем выделения кодирующих антитела кДНК из требуемых гибридом, трансфекции клеток хозяина-млекопитающего (например, клеток CHO или NSO) данными кДНК, культивирования трансфицированных клеток хозяина и получения антитела из культуральной среды.

Химерные антитела

Моноклональные антитела согласно изобретению также могут генерироваться путем конструирования родственного гибридомного (например, мышиного, крысиного или кроличьего) антитела.

Например, родственное антитело может быть изменено путем технологии рекомбинантной ДНК, так что целые области шарнира и/или константные области тяжелых и легких цепей или их части замещают соответствующими компонентами антитела из другого вида (например, человека). В общем, переменные домены сконструированного антитела остаются идентичными или, по существу, идентичными в отношении переменных доменов родственного антитела. Такое сконструированное антитело называют химерным антителом, и оно менее антигенно, чем родственное антитело при введении субъекту вида, из которого происходят области шарнира и/или константные области (например, человека). Способы получения химерных антител хорошо известны в данной области.

Химерные антитела, относящиеся к настоящему изобретению, могут содержать переменный домен тяжелой цепи, имеющий последовательность, идентичную (или, по существу, идентичную) любой из SEQ ID NO: 19-36, и/или переменный домен тяжелой цепи, имеющий последовательность, идентичную (или, по существу, идентичную) любой из SEQ ID NO: 37-45.

Предпочтительные константные области человека включают в себя те, что происходят от IgG1 и IgG4.

Полностью человеческие антитела

Моноклональные антитела согласно изобретению также включают в себя полностью человеческие антитела. Они могут быть получены с использованием примированных *in vitro* человеческих спленоцитов, как описано Boerner et al., J. Immunol. 147: 86-95 (1991), или с использованием библиотек антител фагового дисплея, как описано, например, в патенте США 6300064.

В некоторые другие способы получения полностью человеческих антител вовлечено применение не относящихся к человеку животных, которые содержат инактивированные эндогенные локусы Ig и являются трансгенными по перестроенным генам тяжелых цепей и легких цепей человеческих антител. Таких трансгенных животных можно иммунизировать $\alpha_v\beta_6$, и затем из происходящих оттуда В-клеток получают гибридомы. Данные способы описаны, например, в различных публикациях/патентах GenPharm/Medarex (Palo Alto, Калифорния), касающихся трансгенных мышей, содержащих мини-локусы Ig человека (например, Lonberg, патент США 5789650); в различных публикациях/патентах Abgenix (Fremont, Калифорния) в отношении XENOMICE (например, Kucherlapati, патенты США 6075181, 6150584 и 6162963; Green et al., Nature Genetics 7: 13-21 (1994); и Mendez et al., 15 (2): 146-56 (1997)); в различных публикациях/патентах Kirin (Япония), касающихся "трансгенных" мышей (например, EP 843961 и Tomizuka et al., Nature Genetics 16: 133-144 (1997)).

Гуманизированные антитела

Моноклональные антитела согласно изобретению также включают в себя гуманизированные версии родственных антител против $\alpha_v\beta_6$, происходящие из других видов. Гуманизированное антитело представляет собой антитело, продуцируемое по технологии рекомбинантной ДНК, где некоторые или все аминокислоты тяжелой или легкой цепи человеческого иммуноглобулина, которые не требуются для связывания антитела (например, константные области и каркасные области переменных доменов), используют для замещения соответствующих аминокислот из легкой или тяжелой цепи родственного, не относящегося к человеку антитела. Например, гуманизированная версия мышиного антитела к данному антигену имеет в обеих его тяжелых и легких цепях: (1) константные области человеческого антитела; (2) каркасные области из переменных доменов человеческого антитела и (3) CDR из мышиного антитела. При необходимости один или несколько остатков в каркасных областях человека могут заменяться остатками из соответствующих позиций мышиного антитела, так что сохраняется сродство связывания гуманизированного антитела с антигеном. Данное изменение иногда называют "обратная мутация". Гуманизированные антитела обычно реже вызывают иммунный ответ у людей по сравнению с химерными человеческими антителами, поскольку первые содержат заметно меньше не относящихся к человеку компонентов.

Способы получения гуманизированных антител описаны, например, в Winter, EP 239400; Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332: 323-327 (1988); Verhoeven et al., Science 239: 1534-1536 (1988); Queen et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86: 10029 (1989); в патенте 6180370; и Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3833 (1989). В общем, трансплантация мышинных (или других, не относящихся к человеку) CDR на антитело человека достигается следующим образом. κДНК, кодирующие переменные домены легких и тяжелых цепей, выделяют из гибридомы. Последовательности ДНК переменных доменов, включая CDR, определяют путем секвенирования. ДНК, кодирующие CDR, переносят в соответствующие области кодирующей последовательности переменных доменов легких и тяжелых цепей человеческого антитела путем сайт-специфического мутагенеза. Затем добавляют сегменты генов человеческих константных областей требуемого изотипа (например, γ1 для CH и κ для CL). Гуманизированные тяжелые и легкие цепи совместно экспрессируют в клетках хозяина-млекопитающего (например, клетках CHO или NSO) для получения растворимого гуманизированного антитела. Для облегчения крупномасштабной продукции антител часто требуется продуцировать такие гуманизированные антитела в биореакторах, содержащих экспрессирующие антитела клетки, или получать трансгенных млекопитающих (например, коз, коров или овец), которые экспрессируют данное антитело в молоке (см., например, патент США 5827690).

Иногда прямой перенос CDR в каркас антител человека приводит к потере сродства связывания антигена полученного в результате антитела. Это происходит потому, что в некоторых родственных антителах некоторые аминокислоты в каркасных областях взаимодействуют с CDR и так влияют на общее сродство связывания антителом. В таких случаях критичным является введение "обратных мутаций" (см. выше) в каркасные области акцепторного антитела для сохранения антигенсвязывающей активности родственного антитела.

Общий подход к получению обратных мутаций известен в данной области. Например, у Queen et al. (выше), Co et al., в Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88: 2869-2873 (1991), и в WO 90/07861 (Protein Design Labs Inc.) описан подход, в который вовлечены две ключевые стадии. Во-первых, каркасные V-области человека выбирают путем компьютерного анализа для оптимальной гомологии белковой последовательности в отношении каркаса V-области родственного мышинного антитела. Затем на компьютере моделируют третичную структуру мышинной V-области для визуализации аминокислотных остатков каркаса, которые, вероятно, взаимодействуют с мышинными CDR, и данные мышинные аминокислотные остатки затем накладывают на гомологичный каркас человека.

По данному двухстадийному подходу имеется несколько критериев для конструирования гуманизированных антител. Первым критерием является применение в качестве человеческой акцепторной части каркаса конкретного человеческого иммуноглобулина, который обычно гомологичен не относящемуся к человеку донорному иммуноглобулину, или применение консенсусного каркаса из многих человеческих антител. Вторым критерием является применение донорной аминокислоты вместо акцепторной, если человеческий акцепторный остаток не является обычным, а донорный остаток является типичным для последовательностей человека в положении конкретного остатка каркаса. Третьим критерием является применение донорного аминокислотного остатка каркаса, а не акцепторного, в положениях, непосредственно прилегающих к CDR.

Также можно использовать другой подход, описанный, например, Tempest, Biotechnology 9: 266-271 (1991). По данному подходу каркасы V-области, происходящие из тяжелых и легких цепей NEWM и REI, соответственно, используются для трансплантации CDR без радикального введения мышинных остатков. Преимущество применения данного подхода состоит в том, что трехмерные структуры переменных областей NEWM и REI известны из данных рентгеновской кристаллографии и, таким образом, могут легко моделироваться конкретные взаимодействия между CDR и остатками каркаса V-области.

Другие фрагменты

Моноклональные антитела согласно изобретению могут далее включать в себя другие фрагменты для выполнения требуемых функций. Например, антитела могут включать в себя фрагмент токсина (например, столбнячного токсина или рицина) или радионуклида (например, ¹¹¹In или ⁹⁰Y) для уничтожения клеток, пораженных данными антителами (см., например, патент США 6307026). Антитела могут включать в себя фрагмент (например, биотин, флуоресцентные фрагменты, радиоактивные фрагменты, гистициновую метку или другие пептидные метки) для простого выделения или детекции. Антитела могут также включать в себя фрагмент, который может продлевать их период полужизни в сыворотке, например фрагмент полиэтиленгликоля (PEG).

Состояния заболевания и модели животных

Антитела согласно изобретению могут использоваться при лечении, включая профилактику, опосредованных α_vβ₆ заболеваний. Например, данные антитела могут использоваться для лечения фиброза (например, фиброза легких, острого повреждения легких, фиброза почек, фиброза печени, синдрома Альпорта и склеродермии) путем блокирования активации TGF-β или блокирования связывания α_vβ₆ с любыми другими лигандами, такими как фибронектин, витронектин и тенасцин. Новизна данного подхода включает в себя следующее: (1) при нем блокируется активация TGF-β, а не связывание TGF-β с его

рецептором, (2) при нем может ингибироваться TGF- β местно (т.е. в участках положительной регуляции $\alpha_v\beta_6$), а не системно, и (3) при нем ингибируется связывание $\alpha_v\beta_6$ с лигандом. Кроме заболеваний или состояний фиброза, антитела согласно изобретению могут использоваться при лечении злокачественных опухолей или метастазов злокачественных опухолей (включая рост и инвазию опухоли), особенно эпителиальных раков. Подмножество эпителиальных раков включает в себя плоскоклеточную карциному, например рак головы и шеи, ротовой полости, молочной железы, легких, предстательной железы, шейки матки, глотки, толстой кишки, поджелудочной железы и яичников. Исследования авторов изобретения с использованием новых моноклональных антител против $\alpha_v\beta_6$ продемонстрировали, что $\alpha_v\beta_6$ высокоэкспрессирован во многих эпителиальных раках, особенно в наиболее выраженном участке опухолей. Новые антитела также могут использоваться в отношении многих других заболеваний, опосредованных $\alpha_v\beta_6$, включая псориаз.

Способы лечения согласно данному изобретению эффективны в отношении субъектов, являющихся людьми и животными, пораженных данными состояниями. Субъекты-животные, к которым может применяться данное изобретение, охватывают как домашних животных, так и скот, который держат в качестве любимцев или для коммерческих целей. Примерами являются собаки, кошки, крупный рогатый скот, лошади, овцы, свиньи и козы.

Эффективность антител согласно изобретению может тестироваться на различных экспериментальных животных. Модели фиброза легких на мышах включают в себя индуцированный блеомицином (Pittet et al., J. Clin. Invest. 107 (12): 1537-1544 (2001); and Munger et al., выше) и облучением фиброз легких (Franko et al., Rad. Res. 140: 347-355 (1994)). У обработанных блеомицином мышей экспрессия $\alpha_v\beta_6$ повышается в эпителиальных альвеолярных клетках легких. Но β_6 -нокаут-мыши защищены от индуцированного блеомицином повреждения и фиброза.

Модели фиброза почек на мышах включают в себя COL4A3-/- мышей (см., например, Cosgrove et al., Amer. J. Path. 157: 1649-1659 (2000), мышей с индуцированным адриамицином повреждением (Wang et al., Kidney International 58: 1797-1804 (2000); Deman et al., Nephrol. Dial. Transplant. 16: 147-150 (2001)), мышей db/db (Ziyadeh et al., PNAS USA 97: 8015-8020 (2000)) и мышей с односторонней закупоркой мочеточника (Fogo et al., Lab. Investigation 81: 189A (2001); и Fogo et al., Journal of the American Society of Nephrology 12: 819A (2001)). Во всех этих моделях у мышей развиваются повреждение и фиброз почек, что может прогрессировать в почечную недостаточность. $\alpha_v\beta_6$ положительно регулируется в эпителиальной выкладке восходящих и нисходящих трубочек почек COL4A3-/- мышей, обработанных адриамицином мышей и мышей, которые претерпевают одностороннюю закупорку мочеточника. Вероятно, что экспрессия $\alpha_v\beta_6$ также возрастает при различных моделях повреждения почек.

Моноклональные антитела против $\alpha_v\beta_6$ также могут тестироваться на предмет их способности ингибировать рост, прогрессирование и метастазирование опухоли в таких моделях на животных, как стандартные модели опухолевого роста in vivo и модели метастазирования. См., например, Rockwell et al., J. Natl. Cancer Inst. 49: 735 (1972); Guy et al., Mol. Cell Biol. 12: 954 (1992); Wyckoff et al., Cancer Res. 60: 2504 (2000); и Oft et al., Curr. Biol. 8: 1243 (1998). Значимые лиганды $\alpha_v\beta_6$ при раке могут включать в себя TGF- β , который участвует в метастазировании (для обзора см. Akhurst et al., Trends in Cell Biology 11: S44-S51 (2001)), фибронектин и витронектин.

Эффективность способов лечения согласно изобретению можно измерять некоторым количеством доступных диагностических инструментов, включая физическую оценку, тесты крови, измерения протеинурии, уровня креатинина и клиренса креатинина, тесты функции легких, уровни азота плазмы крови и мочи (BUN), наблюдение и подсчет рубцов или фиброзных очагов повреждения, отложение внеклеточного матрикса, такого как коллаген, гладкомышечный актин и фибронектин, тесты функции почек, ультразвуковое исследование, магнитно-резонансные снимки (MRI) и КТ-сканирование.

Фармацевтические композиции

Фармацевтические композиции согласно изобретению включают в себя одно или несколько антител согласно настоящему изобретению или их фармацевтически приемлемые производные, необязательно с любым фармацевтически приемлемым носителем. Используемый в данном описании термин "носитель" включает в себя известные приемлемые адъюванты и носители.

Согласно изобретению фармацевтические композиции могут быть в виде стерильных препаратов для инъекций, например стерильной водной или масляной суспензии для инъекций. Данная суспензия может состояться по способам, известным в данной области, с использованием подходящих диспергирующих, увлажняющих и суспендирующих средств.

Фармацевтические композиции согласно изобретению могут вводиться путем перорального, местного, внутривенного, подкожного, внутрибрюшинного, внутримышечного, интрамедуллярного, внутрисуставного, интрасиновиального, внутригрудного, интратекального, внутрипеченочного или внутричерепного введения, в зависимости от требований, или непосредственно местно в участках воспаления или опухолевого роста. Фармацевтические композиции согласно изобретению могут также вводиться путем ингаляции, например посредством применения распылителя, ингалятора сухого порошка или ингалятора с отмеряемой дозой.

Дозировка и мощность дозы антител согласно изобретению, эффективные для продукции требуемых эффектов, зависят от различных факторов, таких как природа подлежащего лечению заболевания, размер субъекта, цель лечения, конкретная используемая фармацевтическая композиция и решение лечащего врача. Уровни дозировки составляют примерно от 0,001 до 100 мг/кг массы тела в сутки, например примерно от 0,1 до 50 мг/кг массы тела в сутки подлежащего использованию соединения активного ингредиента. Например, антитело согласно изобретению вводят в дозе, изменяющейся от примерно 0,01 до примерно 20 мг/кг массы тела/сутки, например изменяющейся от примерно 0,1 до примерно 10 мг/кг массы тела/сутки, и с интервалами от 1 до 14 суток. В другом осуществлении антитело вводят в дозе от примерно 0,3 до примерно 1 мг/кг массы тела при внутрибрюшинном введении. Еще в одном осуществлении антитело вводят в дозе от примерно 5 до примерно 12,5 мг/кг массы тела при внутривенном введении. В одном из осуществлений композицию антитела вводят в количестве, эффективном для обеспечения уровня антитела в плазме, равного по меньшей мере 1 мг/мл.

Способы диагностики

Антитела согласно изобретению могут использоваться для диагностики состояний заболевания, ассоциированных с измененными уровнями экспрессии $\alpha\beta_6$. Образец ткани из субъекта, такой как биопсия ткани, образец жидкости организма или лаваж (например, альвеолярный лаваж), может тестироваться в анализе захвата антигена, ELISA, иммуногистохимическом анализе и т.п. с использованием антител. Образец ткани из нормального субъекта используют в качестве контроля.

При воплощении настоящего изобретения будут использоваться, кроме указанных иначе случаев, общепринятые способы клеточной биологии, культуры клеток, молекулярной биологии, микробиологии, рекомбинантной ДНК, белковой химии и иммунологии, которые относятся к данной профессиональной области. Такие способы описаны в литературе. См., например, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition (Sambrook et al., Eds.), 1989; *Oligonucleotide Synthesis*, (M.J. Gait, Ed.), 1984; патент США 4683195, выданный Mullis et al.; *Nucleic Acid Hybridization*, (B.D. Hames and S.J. Higgins), 1984; *Transcription and Translation*, (B.D. Hames and S.J. Higgins), 1984; *Culture of Animal Cells* (R.I. Freshney, Ed.), 1987; *Immobilized Cells and Enzymes*, IRL Press, 1986; *A Practical Guide to Molecular Cloning* (B. Perbal), 1984; *Methods in Enzymology*, Volumes 154 and 155 (Wu et al., Eds.), Academic Press, New York; *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.H. Miller and M.P. Calos, Eds.), 1987; *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Mayer and Walker, Eds.), 1987; *Handbook of Experiment Immunology*, Volumes I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, Eds.), 1986; *Manipulating the Mouse Embryo*, 1986.

Кроме случаев, где оговорено иначе, все используемые в данном описании технические и научные термины имеют значения, сходные с теми, которые понимаются обычным специалистом в данной области, к которой относится данное изобретение. Типовые способы и материалы описаны ниже, хотя способы и материалы, сходные или эквивалентные описанным в данном описании, также могут использоваться при воплощении настоящего изобретения. Все публикации или другие ссылки, приведенные в данном описании, включены во всей своей полноте в качестве ссылки. В случае конфликта для контроля будет служить следующая спецификация, включающая в себя определения. Материалы, способы и примеры являются лишь иллюстративными и не подразумеваются как ограничивающие. В пределах данного описания слово "включать в себя" или такие его варианты, как "включает в себя" или "включающий в себя", как это понимается, подразумевает включение установленного объекта и группы объектов, но не исключение любого другого объекта или группы объектов.

Примеры

Следующие примеры предназначены для иллюстрации способов и материалов настоящего изобретения. Подходящие модификации и адаптации описанных условий и параметров, обычно встречающихся в области применения антител, которые очевидны специалистам в данной области, находятся в пределах существа и объема настоящего изобретения.

В следующих примерах получают β_6 -/- мышей, как это описано у Huang et al., в *J. Cell Biol.* 133: 921 (1996). Рекомбинантный LAP человека приобретали у R & D Systems (Minneapolis, Миннесота). Антитело 10D5 приобретали у Chemicon (Temecula, Калифорния). Гибридому L230 приобретали в ATCC и секретируемое антитело очищали из надосадочной жидкости насыщенных культур путем аффинной хроматографии на иммобилизованном белке А. Определение изотипа антител проводили с использованием набора ISOSTRIP (Roche Diagnostics) в соответствии с инструкциями производителя. Трансфицированную β_6 клеточную линию SW480 получали, как описано у Weinacker et al., в *J. Biol. Chem.* 269: 6940-6948 (1994).

Пример 1. Получение трансфицированных β_6 стабильных клеточных линий.

Трансфицированные β_6 клетки NIH 3T3 и FDC-P1 получали путем электропорации родительских клеточных линий ДНК-конструкциями, содержащими полноразмерную мышиную кДНК β_6 и селективный маркер неомицин. Стабильно трансфицированные клетки отбирали путем пассирования клеток в культуральной среде, содержащей G418, в течение 14 суток с последующей сортировкой активированных флуоресценцией клеток (FACS) для выделения клеток, экспрессирующих наивысший уровень поверхностного β_6 . Трансфицированные клетки FDC-P1 культивировали в DMEM, дополненной 4 mM L-глутамина, доведенной до содержания 1,5 г/л бикарбоната натрия, 4,5 г/л глюкозы и 1,0 mM пирувата

натрия, 10% FBS, 2,5% добавки для культуры мышиноного IL-3 и 1,5 мг/мл активного G418. Трансфицированные клетки NIH 3T3 культивировали в DMEM, дополненной 10% FBS, 2 mM L-глутамин, пенициллином/стрептомицином и 1 мг/мл активного G418.

Пример 2. Очистка растворимого $\alpha_v\beta_6$.

Белок $\alpha_v\beta_6$ очищали, по существу, как описано выше Weinacker, выше. Культивировали клеточную линию CHO, экспрессирующую h $\alpha_v\beta_6$, и полученную в результате надосадочную жидкость собирали центрифугированием. Интегрин очищали путем аффинной хроматографии с использованием антитела против α_v L230. Очищенное L230 перекрестно связывали с активированной CNBr сефарозой 4B (Sigma) в отношении 4,8 мг антитела/мл смолы. Надосадочную жидкость $\alpha_v\beta_6$ загружали в отношении 0,5 мг антитела/мл смолы на аффинную колонку с L230 и колонку промывали 10 объемами колонки с использованием каждый раз: (1) 50 mM Tris-Cl, pH 7,5, 1M NaCl, 1 mM MgCl₂; (2) 50 mM Tris-Cl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl₂; и (3) 10 mM Na₃PO₄, pH 7,0. H $\alpha_v\beta_6$ элюировали 100 mM глицина, pH 2,5 в 1:10 объема 1M Na₃PO₄, pH 8,0. Белок диализовали против нескольких смен забуференного фосфатом солевого раствора (PBS) и хранили при -20°C.

Пример 3. Иммунизация β_6 -/- мышей.

β_6 -/- мышей иммунизировали путем внутрибрюшинной инъекции (IP) 25 мкг очищенного рекомбинантного человеческого $\alpha_v\beta_6$, эмульгированного в полном адьюванте Фрейнда (CFA) при объемном соотношении 1:1 в общем объеме 200 мкл. Альтернативно, β_6 -/- мышей иммунизировали путем внутрибрюшинной инъекции с 4×10^6 трансфицированными β_6 клетками NIH 3T3, ресуспендированными в 100 мкл PBS, дополненного 1 мг/мл CaCl₂ и 1 мг/мл MgCl₂, и тем же мышам делали инъекции в прилегающий участок 100 мкл CFA. Через 2 и 4 недели после первой иммунизации мышей сходным образом стимулировали теми же реагентами, за исключением того, что, вместо CFA, использовали неполный адьювант Фрейнда. Мышей забивали через 7 суток после окончательной стимуляции и определяли титры против β_6 путем связывания сыворотки с очищенным рекомбинантным человеческим $\alpha_v\beta_6$ или с трансфицированными β_6 клетками. В случае иммунизации мышей очищенным рекомбинантным человеческим $\alpha_v\beta_6$ мышей оставляли в покое на 3 месяца и повторно иммунизировали тем же антигеном, смешанным с ImmunEasy (Qiagen). За 3 суток до выделения селезенок для слияния гибридом мышей иммунизировали 12,5 мкг очищенного рекомбинантного белка $\alpha_v\beta_6$ человека путем внутрибрюшинной и внутривенной инъекций. В сутки слияния животных фиксировали, извлекали их селезенки и гомогенизировали их в суспензию единичных клеток. Спленоциты иммортализовали путем слияния с подлежащим селекцией лекарственным средством клеточным партнером по слиянию.

Пример 4. Скрининг гибридом.

Две группы антител генерировали путем иммунизации β_6 -/- мышей. Один набор антител генерировали путем иммунизации растворимым человеческим укороченным $\alpha_v\beta_6$ (слияние #6). Другой набор антител генерировали путем иммунизации мышинными трансфицированными β_6 клетками NIH 3T3 (слияние #7). Скрининг антител против $\alpha_v\beta_6$ проводили с использованием как основанных на клетках, так и бесклеточных анализов связывания и функциональных анализов, как это описано ниже. Начальная селекция позитивных клонов основывалась на связывании очищенного h $\alpha_v\beta_6$ и трансфицированных β_6 человеческих и мышинных клеток (нетрансфицированные клетки в качестве контроля). Выбранные клоны размножали и конечные культуры повторно оценивали на предмет связывания с трансфицированными β_6 и с нетрансфицированными клетками в анализе захвата клеток (пример 5b, см. ниже) (репрезентативные примеры показаны на фиг. 1A и 1B, где приставки "6." или "7." названий mAb, которые обозначают слияние 6 и слияние 7, соответственно, пропущены; см. также табл. 2 ниже). Некоторые антитела связываются преимущественно с трансфицированными β_6 клетками, в то время как другие связываются с трансфицированными и с нетрансфицированными клетками, и это указывает на то, что лишь подмножество антител имеет предпочтение в отношении β_6 (фиг. 1A и 1B). Дальнейший отбор основывался на способности антител блокировать связывание биотинилированного h $\alpha_v\beta_6$ и трансфицированных β_6 мышинных клеток с LAP. Выбранные клоны субклонировали с использованием FACS и хранили замороженными до использования.

Моноклональные антитела подвергали скринингу на специфичность связывания с $\alpha_v\beta_6$, основываясь на их способности связывать трансфицированные β_6 клетки и отсутствию связывания ими нетрансфицированных исходных клеток. Далее подтверждали, что моноклональные антитела представляют собой средства специфического связывания $\alpha_v\beta_6$ и не связываются с другими α_v -интегринами и неспецифическими интегринными (т.е. не относящимися к α_v интегринными, которые связываются с содержащими RGD лигандами), основываясь на их неспособности связываться с клеточными линиями, экспрессирующими $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_8$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$ или $\alpha_5\beta_1$. Они включали в себя стабильные трансфицированные клетки, а также нетрансфицированные клеточные линии JY, K562, SW480, NIH3T3 и FDCP1.

Некоторые из антител, которые были депонированы в ATCC, перечислены ниже в табл. 1.

Таблица 1

Депонированные гибридомы

Клоны гибридомы	№ АТСС	Дата депонирования
6.1A8	РТА-3647	16 августа 2001 г.
6.2B10	РТА-3648	16 августа 2001 г.
6.3G9	РТА-3649	16 августа 2001 г.
6.8G6	РТА-3645	16 августа 2001 г.
6.2B1	РТА-3646	16 августа 2001 г.
6.2A1	РТА-3896	5 декабря 2001 г.
6.2E5	РТА-3897	5 декабря 2001 г.
7.1G10	РТА-3898	5 декабря 2001 г.
7.7G5	РТА-3899	5 декабря 2001 г.
7.1C5	РТА-3900	5 декабря 2001 г.

Пример 5. Анализы по скринингу и характеристике.

а. ELISA $\alpha_v\beta_6$.

96-луночный планшет для микротитрования (Corning COSTAR EASY-WASH) покрывали 50 мкл/лунка 5 мкг/мл $hs\alpha_v\beta_6$ при 4°C в течение ночи. Планшет промывали буфером для промывки (0,1% TWEEN-20 в PBS) 4 раза в автоматическом устройстве для промывки планшетов. Затем добавляли 180 мкл/лунка 3% BSA в TBS и инкубировали в течение 1 ч при 25°C для блокирования неспецифического связывания. Планшет промывали, как описано выше, и добавляли разведения гибридомной надосадочной жидкости (для анализов по скринингу) или очищенного антитела (для характеристики) в TBS, содержащем 1 мг/мл BSA, 1 mM $CaCl_2$ и 1 mM $MgCl_2$ (50 мкл/лунка). Планшет инкубировали в течение 1 ч при 25°C, промывали и затем инкубировали в течение 1 ч с 50 мкл/лунка конъюгированного с пероксидазой антитела козы против мышиных IgG+A+M (Cappel). Связанное антитело детектировали с использованием 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (TMB). Связывание выявляли по поглощению, измеряемому при 450 нм.

б. Анализ захвата клеток.

96-луночный планшет для микротитрования покрывали 50 мкл/лунка раствора вторичного антитела (антитело ослы против IgG мыши (Jackson Immunoresearch); 5 мкг/мл, растворенного в 50 mM бикарбонате натрия, pH 9,2) при 4°C в течение ночи. Планшеты промывали дважды 100 мкл/лунка буфера для анализа (RPMI+2% BSA) и затем блокировали 100 мкл/лунка буфера для анализа при 37°C в течение 1 ч. Для клеток FDC-P1 и трансфицированных β_6 клеток FDC-P1 планшеты блокировали антителами против мышиных Ig (Jackson ImmunoResearch; 20 мкг/мл) в течение 10 мин при комнатной температуре для снижения неспецифического связывания вторичным антителом Fc-рецепторов (пропускается для других клеточных типов). В то время, как планшеты блокировали, клетки метили 2 мкМ флуоресцентной меткой (Calcein-AM, Molecular Probes) в буфере для анализа при концентрации 5×10^6 клеток/мл. Клетки инкубировали с меткой в буфере для анализа при осторожном смешивании на водяной бане при 37°C в течение 15 мин, собирали центрифугированием и ресуспендировали в буфере для анализа до 5×10^6 клеток/мл. После стадии блокирования буфер отбрасывали путем встряхивания планшета и в планшет добавляли 25 мкл/лунка надосадочной жидкости или очищенного антитела. После 15 мин инкубации при 37°C добавляли 25 мкл/лунка меченых клеток и планшет инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Планшет промывали 3-5 раз буфером для анализа (100 мкл/лунка) и фиксировали флуоресценцию, испускаемую захваченными клетками на планшете. Процент связывания определяли путем сравнения флуоресценции перед конечной стадией промывки (т.е. общего числа добавленных клеток) с таковой после промывки (т.е. связанных клеток).

с. FACS.

Клетки собирали путем трипсинизации, 1 раз отмывали PBS и затем ресуспендировали в буфере для FACS (1X PBS, 2% FBS, 0,1% NaN_3 , 1 mM $CaCl_2$ и 1 mM $MgCl_2$). Затем $0,2 \times 10^5$ клеток инкубировали на льду в течение 1 ч в буфере FACS, содержащем гибридомную надосадочную жидкость в общем объеме 100 мкл. После инкубации клетки отмывали 2 раза ледяным буфером для FACS, ресуспендировали в 100 мкл буфера для FACS, содержащего 5 мкг/мл антитела ослы против мышиных IgG PE (Jackson ImmunoResearch) и инкубировали на льду в течение 30 мин. Клетки затем дважды промывали ледяным буфером для FACS и ресуспендировали в 200 мкл буфера для FACS. За связыванием меченного PE вторичного антитела следили путем проточной цитометрии.

д. Связывание биотин- $hs\alpha_v\beta_6$ с LAP.

96-луночные планшеты для микротитрования (Corning COSTAR EASY-WASH) покрывали 0,3 мкг/мл

рекомбинантного человеческого LAP (R & D Systems, кат. номер 246-LP), разведенного в PBS (50 мкл/лунка) при 4°C в течение ночи. После того, как раствор для покрытия был удален, планшеты блокировали 180 мкл/лунка 3% BSA/TBS при 25°C в течение 1 ч. В отдельном 96-луночном круглодонном планшете 60 мкл/лунка 2× маточного раствора (0,5 мкг/мл (1,25 нМ) биотинин- $\alpha_v\beta_6$, 2 mM CaCl_2 и 2 mM MgCl_2 в TBS, содержащем 1 мг/мл BSA) совмещали с 60 мкл/лунка 2× маточного раствора гибридной надосадочной жидкости (для скрининга) или очищенного антитела (также в TBS, содержащем 1 мг/мл BSA) и инкубировали при 25°C в течение 1 ч. После 4-кратной промывки покрытого LAP планшета буфером для промывки (0,1% TWEEN-20 в PBS) в автоматическом устройстве для промывки планшетов 100 мкл смеси антитело- $\alpha_v\beta_6$ переносили в планшет и инкубировали в течение 1 ч при 25°C. Планшет промывали, как указано выше, и инкубировали с 50 мкл/лунка разведения 1:1000 конъюгата экстравидин-пероксидаза хрена (Sigma) в TBS (1 мг/мл BSA) в течение 1 ч при 25°C. Связанный белок детектировали с использованием субстрата TMB.

е. Адгезия клеток β_6 -FDC-P1 к LAP.

96-луночный планшет для микротитрования покрывали 50 мкл/лунка 0,5 мкг/мл рекомбинантного человеческого LAP (R & D Systems), разведенного в 50 mM бикарбоната натрия, pH 9,2, при 4°C в течение ночи. Планшет дважды промывали PBS (100 мкл/лунка) и блокировали 1% BSA в PBS (100 мкл/лунка) в течение 1 ч при 25°C. Планшет промывали дважды 100 мкл/лунка буфера для анализа (полный TBS плюс 1 mM CaCl_2 и 1 mM MgCl_2). Далее к отдельным лункам планшета добавляли 25 мкл гибридной надосадочной жидкости (или очищенного антитела) и 25 мкл клеток β_6 -FDC-P1 (5×10^6 клеток/мл, помеченных Calcein AM, как описано выше). Планшет инкубировали при 25°C в течение 1 ч и затем промывали 4-6 раз буфером для анализа (100 мкл/лунка). Фиксировали флуоресценцию, испускаемую клетками, захваченными на планшет. Процент связывания определяли путем сравнения сигнала флуоресценции перед конечной стадией промывки (т.е. общего числа добавленных клеток) с таковым после промывки (т.е. связанных клеток).

ф. Биоанализ TGF- β .

Используемый в данном описании биоанализ TGF- β представлял собой вариант анализа в совместной культуре с эпителиальными клетками легких норки (MLEC) с PAI-1-люциферазой, описанный Abe et al., в Anal. Biochem. 216: 276-284 (1994), где трансфицированные β_6 клетки совместно культивировали с репортерными клетками для мониторинга активации TGF- β за счет $\alpha_v\beta_6$ (Munger, выше). Это количественный биоанализ TGF- β , основанный на его способности индуцировать экспрессию ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1). В данном анализе клетки MLEC стабильно трансфицированы экспрессирующей конструкцией, содержащей укороченный промотор PAI-1, слитый с геном-репортером люциферазы светлячка. Воздействие трансфицированных клеток MLEC на активный TGF- β (от 0,2 до >30 пМ) приводит к зависимому от дозы повышению люциферазной активности в клеточных лизатах.

Для проведения данного анализа клетки TMLC (линия эпителиальных клеток легких норки Mv 1 Lu) трансфицировали конструкцией PAI-1-люцифераза. Трансфицированные клетки выращивали в DMEM+10% FBS с L-Gln, пен./стреп. и 200 мкг/мл G418. Клетки SW480, трансфицированные конструкцией интегрин β_6 (клетки " β_6 -SW480" или "SW480 β_6 "), выращивали в DMEM+10% FBS с L-Gln и пен./стреп. Клетки поднимали с флаконов посредством PBS+5 mM EDTA, промывали в PBS+0,5% BSA, подсчитывали в гемоцитометре и помещали в 96-луночные планшеты. Клетки SW480- β_6 помещали в количестве 4×10^4 клеток/лунка в буфере для промывки. Моноклональные антитела разбавляли DMEM (бессывороточной), добавляли к клеткам SW480- β_6 и предварительно инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем добавляли клетки TMLC в количестве 2×10^4 клеток/лунка до конечного объема 100 мкл. Планшеты инкубировали в течение 20 ч в увлажненной, обогащенной CO_2 атмосфере инкубатора. Надосадочную жидкость с планшетов отбрасывали и заменяли 100 мкл PBS+1 mM Ca^{2+} и 1 mM Mg^{2+} . Клетки в планшетах затем лизировали и уровень люциферазной активности детектировали посредством набора Packard LUCITE для реакций светового типа (#6016911) и люциметра для микропланшетов TROPIX.

Пример 6. Очистка антител.

8 гибридных клонов из слияния #6 (обозначенных приставкой "6") и 14 гибридных клонов из слияния #7 (обозначенных приставкой "7") выбирали для дальнейшего размножения и характеристики (табл. 2).

Получали культуру малого масштаба (150 мл) каждой гибридомы и надосадочную жидкость собирали путем центрифугирования. Антитела очищали из данных образцов надосадочной жидкости с использованием аффинной хроматографии белком А. Для антител изотипа IgG_{2a} надосадочную жидкость загружали непосредственно на Protein A Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech, AB, Упсала, Швеция) (1 мл осаденного объема). Колонку промывали PBS и фракцию IgG элюировали с использованием 25 mM фосфорной кислоты, 100 mM NaCl, pH 2,8, в 1:20 объема 0,5M Na_3PO_4 , pH 8,6. Для мышиных антител IgG1 надосадочную жидкость доводили перед загрузкой до pH 8,9, используя 1,5M глицин, 3M NaCl, и колонку промывали 25 mM Na_3PO_4 , 3M NaCl, pH 8,6, перед элюированием. Данные препараты использовали для описанной в данном описании биохимической характеристики in vitro.

Таблица 2

Характеристика гибридных клонов

Название клона	№ клона	Изотип	Блокатор*
6.1A8	2	IgG2a	Y
6.2B10	10	IgG2a	Y
6.3G9	25	IgG1	Y
6.4B4	30	IgG1	N
6.6B5	46	IgG1	N
6.8B4	55	IgG1	N
6.8G6	56	IgG1	Y
6.2B1	85	IgG1	Y
7.1C5	2	IgG2a	Y
7.1G10	5	IgG2a	Y
7.2A1	6	IgG2a	Y
7.2F5	11	IgG2a	Y
7.2H2	12	IgG2a	Y
7.4A3	17	IgG2a	Y
7.7G5	32	IgG1	Y
7.8H12	39	IgG2a	Y
7.9D4	40	IgG2a	N
7.9G8	41	IgG2a	Y
7.9H5	43	IgG2a	Y
7.10D7	44	IgG2a	Y
7.10H2	46	IgG2a	Y

*Блокатор определяется как антитело, которое блокирует связывание $\alpha_v\beta_6$ с LAP, что определено путем блокирования связывания лиганда $hs\alpha_v\beta_6$ или экспрессирующих β_6 клеток.

Для применения в экспериментальных животных гибридные клоны постепенно размножали до 2 л среды и выращивали в течение 4 недель в Lifecell Culture Bags-PL732 (Nexell, кат. № R4R2113). Антитела из гибридом сначала очищали путем аффинной хроматографии белком А, как описано выше, с последующей стадией ионообменной хроматографии на сефарозе Q (Amersham Pharmacia). Элюат хроматографической стадии с белком А доводили до значения pH 8,6 с использованием 2М основания Tris, разведенного в 10 раз водой, и загружали на колонку с сефарозой Q (20 мг белка/мл смолы), которую уравнивали 10 mM Na_3PO_4 , 25 mM NaCl, pH 8,6. Колонку промывали 5 объемами колонки буфера для уравнивания и связанный белок элюировали с использованием 25 mM Na_3PO_4 , 150 mM NaCl, pH 7,2. Элюированные белки стерильно фильтровали (0,45 мкм) и хранили при -70°C до использования.

Пример 7. Характеристика очищенных антител.

Очищенные антитела (табл. 2, см. выше) подвергали количественной характеристике в отношении их способности: (1) связывать $hs\alpha_v\beta_6$, (2) связывать трансфицированные β_6 клетки SW480 и FDC-P1, (3) ингибировать связывание биотин- $\alpha_v\beta_6$ с LAP, (4) ингибировать связывание трансфицированных β_6 клеток FDC-P1 с LAP и (5) блокировать опосредованную $\alpha_v\beta_6$ активацию TGF- β в анализе MLEC (выше). Относительную действенность по каждому из данных анализов сравнивали с таковой известного антитела против $\alpha_v\beta_6$ 10D5 (Huang et al, J. Cell Sci. 111: 2189 (1998)) и, в некоторых случаях, с антителом против α_v L230. Для характеристики антител слияния #7 в качестве положительного контроля также использовали антитело 6.8G6 слияния #6.

Эксперимент по первоначальному связыванию (пример 5а, выше), проведенный в присутствии 1 mM Ca^{2+} и 1 mM Mg^{2+} , показал, что большинство очищенных антител связывали $hs\alpha_v\beta_6$ (фиг. 2А и 2В). Однако неожиданно не наблюдалось связывание 10D5 и клонов 7.2F5 и 7.10D7. В последующем эксперименте установлено, что связывание 10D5 (фиг. 3Е), 7.2F5 и 7.10D7 лишь слабо поддерживалось Ca^{2+}/Mg^{2+} , но более сильно 1 mM $MnCl_2$. Среди новых клонов три (6.1A8 (фиг. 3А), 7.7G5 и 6.8G6 (фиг. 3С)) характеризовались требованием в отношении двухвалентных катионов, хотя не наблюдалось различия между со-

стоянием $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ и состоянием связывания Mn^{2+} .

Оставшиеся клоны не характеризовались требованием к двухвалентным катионам, т.е. могли связывать антиген в присутствии 10 mM EDTA (фиг. 3B, 3D и 3F). FACS-анализ связывания антител с трансфицированным β_6 клетками NIH 3T3 или клетками SW480 выявил сходный профиль, за исключением того, что 10D5 в данном контексте связывался эквивалентно в состояниях $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ и Mn^{2+} . Требования для связывания с растворимым $\alpha_v\beta_6$ могут отличаться от таковых для экспрессированного на клеточной поверхности $\alpha_v\beta_6$ вследствие отличия в конформации белка или эффектов avidности.

Данные результаты указывают на то, что в данной группе имеется по меньшей мере 3 различных класса блокирующих β_6 антител. Один из данных классов (10D5) отличает условия $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ и Mn^{2+} . Другой класс (включающий в себя 6.1A8, 7.7G5 и 6.8G6) требует наличия катионов, но не различает $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ и Mn^{2+} . Последний класс (включающий в себя антитело против α_v L230, 6.2B10, 6.3G9 (фиг. 3B) и 6.2B1 (фиг. 3D), 7.1C5 и 7.1G10) является катионнезависимым.

Затем очищенные антитела оценивали на их способность ингибировать взаимодействие $\alpha_v\beta_6$ -LAP. В бесклеточном анализе по примеру 5d, см. выше, антитела 6.1A8, 6.2B1, 6.3G9 и 6.8G6 характеризовались значениями IC_{50} , меньшими, чем таковое для 10D5 (фиг. 4A; табл. 3). 6.2B10 характеризовалось более высоким IC_{50} , но при этом давало полное ингибирование (фиг. 4A). 6.4B4 характеризовалось только частичным ингибированием, в то время как 6.6B5 и 6.8B4 не характеризовались ингибированием (фиг. 4A). С использованием той же системы для анализа антитела 7.1C5, 7.1G10, 7.2A1, 7.4A3, 7.7G5, 7.9G8, 7.9H5 и 7.10H2 характеризовались значениями IC_{50} , меньшими, чем таковое для 10D5 (фиг. 4B; табл. 3). Антитела 7.2F5, 7.2H2 и 7.8H12 характеризовались почти идентичными или более высокими значениями IC_{50} и еще давали полное ингибирование (фиг. 4B).

В клеточном анализе, описанном в примере 5e выше, наблюдали сходную тенденцию, за исключением 6.1A8, 6.2B10 и 7.9D4, которые были менее действенными на клетках, чем очищенный белок (фиг. 5A-E; табл. 3).

Все вместе, данные результаты указывают на то, что авторами изобретения успешно получены антитела, которые специфично ингибируют взаимодействие человеческого и мышиного $\alpha_v\beta_6$ с LAP. Некоторые из данных антител связывались с $\alpha_v\beta_6$ с высоким сродством (обнаруженные $K_d \geq 0,3$ нМ, что определено путем проточной цитометрии), ингибировали связывание трансфицированных β_6 клеток с LAP с $\text{IC}_{50} \geq 0,05$ нМ (8 нг/мл) и предотвращали опосредованную $\alpha_v\beta_6$ активацию TGF- β 1 с $\text{IC}_{50} \geq 0,58$ нМ (87 нг/мл).

Наконец, очищенные антитела оценивали на их способность блокировать опосредованную $\alpha_v\beta_6$ активацию TGF- β в анализе гена репортера PAI-1/люцифераза (пример 5f, выше). Снова 6.3G9, 6.8G6, 6.2B1, 7.1G10 и 7.7G5 были способны ингибировать опосредованную $\alpha_v\beta_6$ активацию TGF- β со значениями IC_{50} , меньшими 10D5, в то время как оставшиеся антитела, как оказалось, были значительно менее действенными в данном анализе (фиг. 6A и 6B; табл. 3). Таким образом, способность блокировать взаимодействие $\alpha_v\beta_6$ с LAP коррелирует со способностью ингибировать активацию TGF- β in vitro.

Таблица 3

Характеристика гибридомных клонов

Название клона	№ клона	EC_{50} ELISA связывания $\alpha_v\beta_6$ (нг/мл)	IC_{50} блокирования $\alpha_v\beta_6$ -LAP (нг/мл)	IC_{50} блокирования FDSP1-LAP (нг/мл)	IC_{50} PAI- 1- люциферазы (нг/мл)
6.2B1	85	34,7	225	8	87
6.3G9	25	76,7	271	17	375
6.8G6	56	17,5	169	23	312
10D5	-	-	605	50	2070
6.1A8	2	3,7	179	2520	~40000
6.2B10	10	78,9	1950	>30000	>40000
6.4B4	30	25,4	>50000	>30000	>40000
6.6B5	46	17,1	>50000	>30000	>40000
6.8B4	55	94,4	>50000	>30000	>40000
L230	-	27,1	229	n.t.**	n.t.
7.1G10	5	4,2	113	30	250
7.7G5	32	13,0	155	51	700
7.1C5	32	2,5*	80*	83	n.t.

7.2A1	6	5*	300*	101	n.t.
10D5	-	43*	377	n.t.	2000
7.4A3	17	5,7	204	67	3500
7.10H2	46	6,6	254	63	3500
7.2H2	12	9,3	370	106	5500
7.9H5	43	7,3	230	55	7000
7.9G8	41	6,2	264	284	>20000
7.8H12	39	46.0	1140	969	>20000
7.2F5	11	>5000	529	1490	>20000
7.9D4	40	1,7	Неполное	>10000	>20000
7.10D7	44	>5000	3000*	1120	n.t.

*Данные получены из разных экспериментов.

**Не тестировали.

***Все эксперименты, суммированные в табл. 3, проводили в присутствии 1 mM Ca^{2+} и 1 mM Mg^{2+} .

****Антитела, выделенные полужирным шрифтом, представляют собой антитела 10D5 и L230, известные ранее в данной области, и новые антитела с особо высокой ингибиторной силой в отношении $\alpha_v\beta_6$.

Затем значения сродства 6.3G9 и 6.8G6 в отношении растворимого $\alpha_v\beta_6$ определяли путем использования анализа кинетического исключения (KinExA). Серию разведений растворимого интегрин (от 1×10^{-8} до $2,4 \times 10^{-10}$ M) инкубировали с 1×10^{-10} M антитела в течение 3 ч. Данные образцы затем пропускали через гранулы полиметилметакрилата, покрытые интегрином, с использованием инструмента KinExA (Sapidyne Instruments, Inc., Boise, Айдахо). В случае 6.8G6 в буферы для инкубации и анализа включали 1 mM CaCl_2 и 1 mM MgCl_2 . Количество связанного и свободного антитела определяли с использованием меченного Cy5 вторичного антитела против мышиных антител. Подгонку к кривой второго порядка проводили с использованием программного обеспечения KinExA с получением константы диссоциации (Kd) для каждого взаимодействия. Kd, определенные с использованием данного способа, составляли 15,6 pM для 6.3G9 и 22,8 pM для 6.8G6 (фиг. 9A и 9B). Таким образом, оба данных антитела характеризовались очень высокими значениями сродства в отношении $\alpha_v\beta_6$.

Далее авторы изобретения идентифицировали классы антител против $\alpha_v\beta_6$, которые распознавали "активированные" состояния интегрин. Имеется два потенциальных активированных состояния $\alpha_v\beta_6$. В первом состоянии активированный интегрин определяется как имеющий более высокое сродство в отношении своего лиганда. Антитела, специфичные в отношении данного активированного состояния, характеризовались повышенным связыванием с данным интегрином в присутствии активирующих катионов, таких как 1 mM MnCl_2 . Сравнение степени связывания в 1 mM MnCl_2 и 1 mM MgCl_2 (неактивирующий катион) путем проточной цитометрии показало, что некоторые из описываемых в данном описании антител против $\alpha_v\beta_6$, включая 6.1A8 и 6.6B5, характеризовались значительно повышенным связыванием в присутствии MnCl_2 .

Во втором активированном состоянии $\alpha_v\beta_6$ интегрин может активировать латентный TGF- β , как описано выше. Получали клеточную линию, экспрессирующую укороченный $\alpha_v\beta_6$ (SW480(β_6 -770T)). Данная клеточная линия была способна связывать LAP, но не могла активировать TGF- β в анализе TMLC-люциферазы (Munger et al., выше). Антитела, которые связываются с трансфицированными полноразмерным β_6 клетками SW480, но не с трансфицированными укороченным белком клетками 770T, таким образом, были специфичны к форме $\alpha_v\beta_6$, которая способна активировать TGF- β . Антитела 7.8B3 и 7.8C9 удовлетворяли данным критериям.

Пример 8. Картирование эпитопов путем конкуренции антител.

Очищенные моноклональные антитела также тестировали на их способность конкурировать с 6.8G6 за связывание с биотинилированным $\alpha_v\beta_6$ в формате ELISA. В данном анализе 6.8G6 покрывали планшет для ELISA и смесь конкурирующего антитела и биотинилированного $\alpha_v\beta_6$ добавляли в буфер, содержащий Ca^{2+} и Mg^{2+} , по 1 mM каждого. Связанный интегрин детектировали с использованием конъюгата экстравидин-HRP и конкурирующие антитела отмечали по их способности блокировать связывание. Все консенсусные блокаторы (табл. 2), кроме 6.2B10 (слабый блокатор), как было показано, конкурируют в различной степени с 6.8G6 (табл. 4). Эти данные подтверждают, что эти консенсусные блокаторы связываются с одним и тем же эпитопом, что и 6.8G6, или с перекрывающимся с ним эпитопом.

Таблица 4

Картирование эпитопов путем конкуренции антител

Клон	Консенсусный блокатор?	Конкуренция с 6.8G6
6.2A1	N	-
6.4B4	N	-
6.6B5	N	-
6.8B4	N	-
7.9D4	Y/N	-
10D5	Y	++
L230	Y	++
6.1A8	Y	++
6.2B10	Y (слабое)	-
6.3G9	Y	+
6.8G6	Y	++
6.2B1	Y	++
7.1C5	Y	+++
7.1G10	Y	+++
7.2A1	Y	++
7.2F5	Y	++
7.2H2	Y	++
7.4A3	Y	++
7.7G5	Y	++
7.8H12	Y	++
7.9G8	Y	++
7.9H5	Y	++
7.10D7	Y	+
7.10H2	Y	++

Очищенные моноклональные антитела тестировали на их способность конкурировать с биотинилированным 6.3G9 или биотинилированным 6.8G6 за связывание с $\alpha_v\beta_6$ в ELISA. В данном анализе немеченым $\alpha_v\beta_6$ покрывали планшет для ELISA и смесь конкурирующего антитела и биотинилированного антитела добавляли в буфер, содержащий Ca^{2+} и Mg^{2+} , по 1 mM каждого. Связанное биотинилированное антитело детектировали с использованием конъюгата нейтравидин-HRP. Эти данные показали, что наиболее действенные блокирующие антитела (например, 6.2B1, 7.1C5 и 7.1G10) конкурировали как с 6.3G9, так и с 6.8G6 за связывание с $\alpha_v\beta_6$ (табл. 4.1 и фиг. 10A и 10B). Антитела 6.1A8 и 7.7G5 характеризовались меньшей конкуренцией, возможно, вследствие более низкой аффинности в отношении $\alpha_v\beta_6$. Ни одно из неблокирующих антител, как и антитело против α_v L230, не показало в данном анализе какой-либо конкуренции с 6.3G9 или 6.8G6. Эти результаты указывают на то, что специфичные в отношении $\alpha_v\beta_6$ блокирующие антитела связываются на $\alpha_v\beta_6$ с одним и тем же или перекрывающимися эпитопами.

Таблица 4.1

Картирование эпитопов путем конкуренции антител

Клон	Консенсусный блокатор?	Конкуренция с биотинилированным 6.8G6	Конкуренция с биотинилированным 6.3G9
6.3G9	Y	+++	+++
6.2B1	Y	+++	+++
6.8G6	Y	+++	++
7.1C5	Y	+++	+++
7.1G10	Y	+++	+++
7.7G5	Y	++	+
6.1A8	Y	++	+
6.2A1	N	-	-
6.2E5	N	-	-
6.2G2	N	-	-
6.4B4	N	-	-
7.8B3	N	-	-
7.8C9	N	-	-
L230	Y	-	-

Пример 9. Последовательности CDR.

Выделяли кДНК некоторых из очищенных моноклональных антител и определяли их последовательность с использованием стандартных способов, описанных в Coligan et al. (eds), Current Protocols in Immunology, Wiley, Media, PA (2001). Предсказанные аминокислотные последовательности показаны на фиг. 7А и 7В.

Аминокислотные последовательности CDR тяжелых цепей антител с высоким сродством связывания 6.8G6, 6.1A8, 6.2B1, 6.3G9 и 6.2A1 и неблокирующего антитела 6.2G2 сравнивают следующим образом (тире означают пропуски).

	<u>CDR1</u>
6.8G6	SYTFTDYAMH (SEQ ID NO: 1)
6.1A8	SYTFTDYTMH (SEQ ID NO: 2)
6.2B1	GFTFSRYVMS (SEQ ID NO: 3)
6.3G9	GFTFSRYVMS (SEQ ID NO: 3)
6.2A1	GYDFNNDLIE (SEQ ID NO: 49)
6.2G2	GYAFTNYLIE (SEQ ID NO: 50)
	<u>CDR2</u>
6.8G6	VISTYYGNTNYNQKFKG (SEQ ID NO: 4)
6.1A8	VIDTYYGKTNYNQKFEG (SEQ ID NO: 46)
6.2B1	SISSG-GSTYYPDSVKG (SEQ ID NO: 5)
6.3G9	SISSG-GRMYYPDTVKG (SEQ ID NO: 6)
6.2A1	VINPGSGRTNYNEKFKG (SEQ ID NO: 51)
6.2G2	VISPGSGIINYNEKFKG (SEQ ID NO: 52)
	<u>CDR3</u>
6.8G6	GGLRRGDRPSLRYAMDY (SEQ ID NO: 7)
6.1A8	GGFRRGDRPSLRYAMDS (SEQ ID NO: 47)
6.2B1	GAIYDG-----YYVFAY (SEQ ID NO: 8)
6.3G9	GSIIYDG-----YYVFPY (SEQ ID NO: 9)
6.2A1	IYYGPH-----SYAMDY (SEQ ID NO: 53)
6.2G2	ID-YSG-----PYAVDD (SEQ ID NO: 54)

В SEQ ID NO: 7 "R" полужирным шрифтом (двенадцатый остаток) указывает на то, что данный остаток является предметом полиморфизма и может представлять собой, например, Q.

Аминокислотные последовательности CDR легких цепей данных четырех антител с высоким сродством связывания и неблокирующего антитела 6.2G2 сравнивают следующим образом.

	<u>CDR1</u>
6.8G6	RASQSVSTSS-YSYMY (SEQ ID NO: 10)
6.1A8	RASQSVSIST-YSYIH (SEQ ID NO: 48)
6.2B1	SASSSVSSS-----YLY (SEQ ID NO: 11)
6.3G9	SANSSVSSS-----YLY (SEQ ID NO: 12)
6.2A1	KASLDVRTAVA (SEQ ID NO: 55)
6.2G2	KASQAVNTAVA (SEQ ID NO: 56)
	<u>CDR2</u>
6.8G6	YASNLES (SEQ ID NO: 13)
6.1A8	YASNLES (SEQ ID NO: 13)
6.2B1	STSNLAS (SEQ ID NO: 14)
6.3G9	STSNLAS (SEQ ID NO: 14)
6.2A1	SASYRYT (SEQ ID NO: 57)
6.2G2	SASYQYT (SEQ ID NO: 58)
	<u>CDR3</u>
6.8G6	QHNWEIPFT (SEQ ID NO: 15)
6.1A8	QHSWEIPYT (SEQ ID NO: 16)
6.2B1	HQWSSYPPT (SEQ ID NO: 17)
6.3G9	HQWSTYPPT (SEQ ID NO: 18)
6.2A1	QQHYGIPWT (SEQ ID NO: 59)
6.2G2	QHHYGVFWT (SEQ ID NO: 60)

Как показано на фиг. 7A и 7B, mAb, которые входят в состав класса двухвалентных катионзависимых антител (например, 6.1A8 и 6.8G6), как кажется, содержат очень сходные аминокислотные последовательности внутри CDR, в то время как двухвалентные катионнезависимые mAb (например, 6.2B1 и 6.3G9) содержат другой набор мотивов в своих CDR.

Действенность и специфичность моноклональных антител против $\alpha_v\beta_6$ может тонко управляться различными аминокислотными остатками. В случае 6.1A8 и 6.8G6 аминокислотные последовательности переменных доменов очень сходны и содержат 10 различий аминокислот в тяжелой цепи, три из которых консервативны, и 11 различий аминокислот в легкой цепи. При этом данные антитела характеризуются тем, что имеют примерно 100-кратное различие в активности при анализах *in vitro*. Различия аминокислот распределены по переменным доменам полипептидной цепи, и данные остатки могут действовать поодиночке или синергически с остатками той же цепи или партнерской цепи, воздействуя на действенность антител. В тяжелой цепи 7 остатков расположены так, что они, вероятно, находятся в близком соседстве к $\alpha_v\beta_6$ или играют активную роль в его связывании.

RGD-Мотив был обнаружен в некотором количестве связывающих интегрины белков (лигандов). Данный мотив, как было показано, опосредовал их взаимодействие с интегринными путями непосредственного контакта со связывающим карманом на интегрене. Поскольку RGD сам по себе довольно обычен в связывающих интегрины белках, фланкирующие остатки по сторонам от данного мотива должны играть роль в придании взаимодействию интегрин-лиганд специфичности связывания. В 6.1A8 и 6.8G6 один такой фланкирующий остаток находится в положении 101 в тяжелой цепи внутри CDR3. Данный аминокислотный остаток фланкирует RGD-мотив и может располагаться в участке распознавания антигена, что вносит вклад в действенность и специфичность связывания.

Другие различающиеся остатки в пределах одних и тех же CDR тяжелой цепи 6.1A8 и 6.8G6 включают в себя те, что находятся в положении 33 (CDR1); в положениях 52, 57 и 65 (CDR2) и в положении 115 (CDR3). Другое различие в тяжелой цепи находится в положении 4 в каркасном участке 1, который близок к N-концу. Данный остаток, как предсказано путем кристаллографических моделей, находится вследствие фолдинга вблизи CDR антитела и может играть важную роль в связывании $\alpha_v\beta_6$. Три оставшихся различия между 6.1A8 и 6.8G6 представляют собой консервативные различия в положениях 20 (каркасный участок 1), 44 (каркасный участок 2) и 82 (каркасный участок 3).

Аминокислотные последовательности катионнезависимых антител также высоко гомологичны. Они могут подразделяться на два класса: те, что конкурируют с RGD-содержащим антителом 6.8G6 (т.е. 6.2B1, 6.3G9, 7.10H2, 7.9H5, 7.1C5, 7.1G10 и 7.4A3); и те, что не конкурируют с ним (т.е. 6.2A1, 6.2B10 и 6.4B4). Класс конкурирующих с 6.8G6 антител содержит мотив FXY в CDR3 тяжелой цепи, тогда как класс не конкурирующих антител не содержит его. Это различие указывает на то, что мотив FXY важен для опосредования катионнезависимого связывания $\alpha_v\beta_6$. Кроме того, содержащий FXY класс антител, возможно, связывается с эпитопом на $\alpha_v\beta_6$, который перекрывается с RGD-связывающим карманом, хотя и отличается от него. Антитела 6.2B10 и 6.4B4 не содержат мотив FXY и являются слабыми блокаторами $\alpha_v\beta_6$. Они, как было показано, связываются с частью $\alpha_v\beta_6$, подобной I-домену, и определяют еще один эпитоп, с которым связываются антитела против $\alpha_v\beta_6$. Интересно, что моноклональное антитело 6.2A1 принадлежит к катионнезависимому классу, но не содержит RGD-последовательности, как другие катионнезависимые mAb.

Моноклональное антитело 7.7G5 относится к катионзависимому классу. Однако последовательность легкой цепи 7.7G5 высоко гомологична катионнезависимому, связывающему I-домен антителу 6.2B10. Тяжелая цепь 7.7G5 также сходна с катионнезависимыми антителами в CDR1. При этом его CDR2 и CDR3 ближе к таковым катионзависимого класса. Данное наблюдение указывает на то, что конкретные CDR наделяют антитело специфичностью. Это особенно верно для CDR3 тяжелой цепи, по-видимому, вследствие высокой степени изменчивости в пределах данной части антитела. Фактически, 2 из 3 катионзависимых и 7 из 9 катионнезависимых антител содержат последовательности CDR3 тяжелой цепи, которые, вероятно, играют важную роль в распознавании $\alpha_v\beta_6$. Примечательно, что 7.7G5 не содержит мотива RGD, но содержит мотив XGD в CDR2 его тяжелой цепи. Данный мотив XGD может функционировать сходным с RGD образом и обеспечивать сродство/специфичность связывания 7.7G5.

Указанные выше наблюдения последовательностей и сделанные из них выводы обеспечивают основу для рационального конструирования конкретных аминокислотных последовательностей переменных областей, которые приносят конкретные свойства связывания.

Пример 10. Диагностические антитела.

Антитела, которые могут детектировать экспрессию $\alpha_v\beta_6$ в залитых в парафин срезах тканей или других образцах тканей, могут использоваться в качестве диагностических средств. Данные диагностические средства могут использоваться, например, для детекции положительной регуляции $\alpha_v\beta_6$ в срезах тканей при таких заболеваниях, как злокачественная опухоль или фиброз.

Для идентификации антител, которые детектируют $\alpha_v\beta_6$ в залитых в парафин тканях, авторы изобретения сначала подвергали панель антител скринингу на связывание очищенной путем ВЭЖХ субъединицы β_6 . Антитела, которые связывают данную субъединицу, вероятно, распознают линейные пептидные

эпитопы, и поэтому ожидалось, что они имеют высокую вероятность успеха связывания в залитых в парафин тканях. Связывание с очищенной субъединицей β_6 проводили с использованием формата ELISA, идентичного тому, который был описан для измерения связывания $\alpha_v\beta_6$ (выше), за исключением применения очищенного интегрин β_6 , иммобилизованного на планшете, а не белка $\alpha_v\beta_6$. С использованием данного способа идентифицировали некоторое число антител слияния 6, способных связывать как очищенный белок $\alpha_v\beta_6$, так и очищенную субъединицу β_6 . См. ниже табл. 5, где приставка "6" в названии клона пропущена.

Таблица 5
Связывание антител с очищенным $\alpha_v\beta_6$ или очищенной субъединицей β_6

Название клона	Связывание с $\alpha_v\beta_6$	Связывание с очищенной путем ВЭЖХ субъединицей β_6
1A1	+	6
1A8	+	-
1A11	+	+
1E1	+	+
1E6	+	+
1H10	+/-	-
2A1	+	+
2A10	-	-
2B8	-	-
2B10	+	-
2C4	+	+
2C7	+	+
2E5	+	+
2G3	+	-
3A6	+	-
3B1	+	-
3B2	+	+
3B11	+	+
3C2	+	+
3D5	+	-
3D10	+	+
3F1	+	-
3G3	-	-
3G5	+	-
3G9	+	-
3H2	+	-
3H11	+	-
4A4	+/-	+
4B2	+	-
4B4	+	-
4B10	+	-
4D2	+	-
4E4	+	+
4G3	+	-
4G4	+	+
4H4	+	+
4H12	+	-
5A2	+	-
5B6	+	+
5D6	+	+
5D8	-	-
5G9	+	+
5G10	+	+
5H3	+	+
6B1	+	+
6B5	+	+

6C4	+	-
6D12	+	+
6E6	+	-
6E10	+	-
6G3	+/-	-
7C7	+	+
7E5	+	-
7F8	+	-
8B4	+	+
8G6	+	-
9B5	+	+
9B7	+	+
9B9	+	-
9B10	+	-
9D11	+	+
9E12	+	+
9F5	+	+
9F7	-	-
9G1	+	-
9H11	+	-
10A2	+	-
10A3	+/-	-
10A4	+	-
10A8	+	-
10A9	+	-
10B10	+	-
10D3	+	-
10D11	+	-
10E4	+	+
10F1	+	-
10F12	+	-
10G1	+	-
10G2	-	-
10H11	+	+
1A7	+	-
1D6	+	-
1D9	+	-
1F6	+	-
2B1	+	-
2D9	+	+
2G2	+	+
3D9	+	+
3E5	+	-
4C12	+	-
4E6	+	+
4G5	+	-
5A3	+	-
5B3	+	-
5B8	+	+
5B9	+	-
5F7	+	-
6C10	+	+
6D8	+	-
6F4	+	-
6G9	+	-
6H8	+	+
6H9	+	-
7A5	+	+
7A11	+	-
7E6	+	+
7G9	-	+
7H3	+	-
9A2	-	-
9A3	+	+
9A4	-	-
9A9	+	-
9D2	-	-
9D3	-	-
9E4	-	-
9F1	+	-

9F12	-	-
9G11	-	-
10B5	+	-
10B7	+	-
10B9	+/-	-
10C5	+/-	-
10C7	+/-	-
10D6	+/-	-
10E12	+/-	-
10F7	-	-

Как показано выше, некоторые антитела связывались с очищенной субъединицей β . Они с высокой вероятностью будут связывать денатурированный $\alpha\beta_6$ и, таким образом, могут использоваться при детекции $\alpha\beta_6$ в залитых в парафин срезах тканей. Оба типа антител использовали для окрашивания денатурированных, залитых в парафин трансфицированных в трансфицированных β_6 клеток SW480 и не-трансфицированных исходных клеток, и данные показаны в табл. 6.

Для окрашивания залитых в парафин тканей или клеток предметные стекла с тканью вначале депарфинизировали путем инкубации в следующих растворах: (1) ксилол, 5 мин, дважды; (2) 100% этанол, 2 мин, дважды; (3) 95% этанол, 2 мин, дважды; (4) 50% этанол, 2 мин, единожды; и (5) дистиллированная вода, 2 мин, 1 раз. Затем предметные стекла инкубировали в растворе, состоящем из 200 мл метанола и 3 мл 30%-ной H_2O_2 , в течение 15 мин для блокирования эндогенной пероксидазы. Предметные стекла ополаскивали дважды в PBS в течение 2 мин каждый раз. Срезы парафина на предметных стеклах затем демаскировали посредством пепсина (Zymed 00-3009) в течение 5 мин при 37°C. Предметные стекла опять дважды ополаскивали в PBS в течение 2 мин каждый раз. Затем ткань на предметных стеклах блокировали авидином и затем биотином (Vector SP-2001; Vector Laboratories, Burlingame, Калифорния), по 10 мин каждым при комнатной температуре с описанной выше промывкой между всеми инкубациями. После испарения блокирующего раствора с предметных стекол первичное антитело (культуральная надосадочная жидкость гибридомы), разведенное в PBS/0,1% BSA, наносили на предметные стекла и инкубировали в течение ночи при 4°C.

На следующий день предметные стекла ополаскивали в PBS, как описано выше. В это время получали раствор комплекса авидин-биотин-пероксидаза хрена (реагент ABC) следующим образом: 1 мл PBS смешивали с 20 мкл раствора А (1:50) и 20 мкл раствора В (1:50) из набора Vector PK-6102 и смесь инкубировали перед использованием в течение 30 мин при комнатной температуре. В течение этого времени предметные стекла инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре с биотинилированным антителом против мышиных антител (1:200) из набора Vector с 15 мкл/мл нормальной сыворотки. Предметные стекла ополаскивали 2 раза в PBS, 2 мин каждый раз. Затем описанный выше реагент ABC наносили на предметные стекла и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Предметные стекла ополаскивали опять, как описано выше. Затем субстрат (Vector SK-4100), 100 мкл DAB (3,3'-диаминобензидин), наносили на предметные стекла и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. DAB получали следующим образом: к 5 мл H_2O добавляли 2 капли маточного раствора буфера (Buffer Stock Solution), хорошо смешивали; затем добавляли 4 капли маточного раствора DAB, хорошо перемешивали и затем добавляли 2 капли раствора H_2O_2 , хорошо смешивали. Затем предметные стекла ополаскивали водой в течение 2 мин. После чего сигнал DAB усиливали для всех предметных стекол с тканью следующим образом: промывали парафиновые срезы в 0,05М бикарбоната натрия, pH 9,6, в течение 10 мин; удаляли избыток буфера; наносили усиливающий раствор для DAB на 15 с и затем быстро ополаскивали водой в течение 1 мин для остановки реакции. Затем предметные стекла окрашивали в гематоксилине Майера (обратное окрашивание ядра) в течение 1 мин. Предметные стекла ополаскивали в текущей воде в течение 1 мин и затем погружали в PBS на 1 мин, так что гематоксин становился голубым. Затем предметные стекла опять ополаскивали в текущей воде в течение 1 мин, обезвоживали и очищали следующим образом: погружали в (1) 95% этанол на 1 мин, дважды; (2) в 100% этанол на 1 мин, дважды; и (3) в ксилол на 2 мин, дважды. Затем на предметные стекла помещали покровные стекла с использованием Permount.

Результаты указывали на то, что антитела слияния 61A1, 2C4, 3B2, 3B11, 5D6, 5G9, 5H3, 6D12, 7C7, 9B5, 9B7, 9D11, 9F5, 10E4, 10H11, 6H8, 7A5, 7G9, 9A3, 2A1, 2E5, 4E4, 4H4, 8B4, 2G2 и 4E6, из которых все могли связываться с очищенной субъединицей β_6 (табл. 5), действительно, сильно окрашивали погруженные в парафин трансфицированные β_6 клетки SW480, в то время как не окрашивали нетрансфицированные исходные клетки (табл. 6).

Таблица 6

Связывание антител с погруженными в парафин клетками SW480

ID#	Название клона	Связывание с SW480/ β_6	Связывание с SW480
1	1A1	+++	-
2	1A8	+	+
3	1A11	++	-
4	1E1	+	-
5	1E6	++	+
7	2A1	+++	-
10	2B10	-	-
11	2C4	+++	-
12	2C7	-	-
13	2E5	+++	-
17	3B2	+++	-
18	3B11	++	-
25	3G9	-	-
30	4B4	+	+
33	4E4	+++	-
35	4G4	-	-
36	4H4	+++	-
39	5B6	+	-
40	5D6	+++	-
42	5G9	+++	-
43	5G10	-	-
44	5H3	+++	-
46	6B5	-	-
48	6D12	+++	-
52	7C7	++	-
54	7F8	-	-
55	8B4	+++	-
56	8G6	-	-
57	9B5	++	-
58	9B7	++	-
61	9D11	++	-
62	9E12	+	-
63	9F5	++	-
68	10A3	-	-
75	10E4	+++	-
80	10H11	++	-
85	2B1	+	+
87	2G2	+++	-
91	4E6	+++	-
95	5B8	-	-
98	6C10	+	-
102	6H8	++	-
104	7A5	+++	-
107	7G9	+++	-
110	9A3	+++	-

Пример 11. Диагностика злокачественной опухоли.

$\alpha_v\beta_6$ обычно экспрессирован в здоровых тканях взрослых на незаметных или низких уровнях. Однако экспрессия $\alpha_v\beta_6$ положительно регулируется при повреждении, фиброзе или злокачественной опухоли (см., например, Thomas et al. *J. Invest. Dermatology* 117: 67-73 (2001); Brunton et al., *Neoplasia* 3: 215-226 (2001); Agrez et al., *Int. J. Cancer* 81: 90-97 (1999); Breuss, *J. Cell Science* 108: 2241-2251 (1995)). Таким образом, антитела, которые специфически связываются с $\alpha_v\beta_6$, экспрессированным в залитых в парафин тканях, могут использоваться в стандартных способах иммуногистохимии для детекции экспрессии $\alpha_v\beta_6$ для диагностики фиброза, злокачественной опухоли и любых других заболеваний, в которых $\alpha_v\beta_6$ положительно регулируется.

Как описано выше, некоторые антитела согласно настоящему изобретению связываются с очищенным ВЭЖХ интегрином β_6 и залитыми в парафин и фиксированными трансфицированными β_6 клетками. Данные антитела, как было показано, также связываются с репрезентативными тканями плоскоклеточного рака и рака молочной железы при иммунном окрашивании. См., например, фиг. 8, где моноклональное антитело 6.2A1 использовали для того, чтобы показать относительное окрашивание залитых парафином тканей карциномы молочной железы и плоскоклеточной карциномы. Таким образом, данные новые антитела могут использоваться в качестве диагностических инструментов.

Пример 12. Эффекты блокирующих mAb против $\alpha_v\beta_6$ у мышей Альпорта.

Мыши с нокаутом коллагена 4A3 (COL4A3) (Альпорт) были установлены в качестве модели *in vivo* фиброза почек, и их использовали для тестирования терапевтических эффектов фармакологических средств (выше). Авторы изобретения тестировали mAb 6.8G6 (катионзависимое) и 6.3G9 (катионнезависимое) у мышей Альпорта для определения того, будут ли они ингибировать фиброз, обычно наблюдаемый у мышей Альпорт в возрасте 7 недель. Как показано выше, эти два антитела, как обнаружено, ингибируют связывание $\alpha_v\beta_6$ с LAP и ингибируют активацию TGF- β в биоанализе. Антитело 1E6 применяли в качестве отрицательного контроля.

Мышам Альпорт в возрасте 3 недели вводили 3 раза в неделю внутривбрюшинные инъекции с одним из следующих антител: (1) 6.8G6, 4 мг/кг (7 мышей); (2) 6.3G9, 4 мг/кг (4 мыши) и (3) 1E6, 1 мг/кг (6 мышей). Инъекции продолжали в течение 4 недель. Затем мышей забивали и извлекали их почки.

Залитые в парафин срезы почек получали, как описано выше, и затем окрашивали с целью детекции гладкомышечного актина, маркера миобластов и отложения матрикса при фиброзе почек.

Авторы изобретения обнаружили значимое снижение окрашивания гладкомышечного актина в интерстициальных и гломерулярных областях почек из мышей Альпорта, обработанных mAb 6.8G6 или 6.3G9, по сравнению с мышами, обработанными 1E6.

На фиг. 11A и 11B показана точечная диаграмма окрашивания гладкомышечного актина в гломерулярных и интерстициальных областях почки Альпорта. Имело место значимо сниженное окрашивание гладкомышечного актина в почках мышей Альпорта, обработанных 6.8G6 и 6.3G9, по сравнению с мышами отрицательного контроля, обработанными 1E6.

Пример 13. Эффективность mAb против $\alpha_v\beta_6$ при профилактике нефросклероза, индуцированного односторонней закупоркой мочеточника.

Авторы изобретения применяли другую модель прогрессии фиброза почек на мышах для тестирования противифиброзной эффективности 6.8G6 и 6.3G9. В данной модели на мышах мочеточник животного лигируют, что приводит к односторонней закупорке мочеточника (UUO). UUO вызывает прогрессирующий нефросклероз без быстрого развития почечной недостаточности у мышей, поскольку незакупоренная почка может относительно нормально поддерживать функцию почек. В то время как закупоренная почка претерпевает быстрый общий фиброз, незакупоренная почка претерпевает адаптивную гипертрофию.

Данное исследование подвергает морфометрическому количественному анализу воздействие обработки антителами против $\alpha_v\beta_6$ на индуцированный UUO фиброз почек. Использовали мышей-самцов C57BL в возрасте 8-12 недель, без вирусных антигенов, массой $25,5 \pm 0,2$ г (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Мэн). Перед началом исследования мышам давали возможность акклиматизироваться в течение 7 суток. Мыши имели свободный доступ к рассеянному стандартному мышинному корму и стерильной воде во время периода акклиматизации и эксперимента. Периодически измеряли массу тела как часть мониторинга здоровья животных. Результаты показывали, что соответствующие по возрасту неоперированные мыши прибавляли примерно 10% массы тела в течение периода двухнедельного исследования. Мыши UUO теряли примерно 9% массы тела на сутки 2, но постепенно компенсировали потерю массы на сутки 14. Данный профиль изменения массы, как оказалось, не зависел от терапевтической обработки.

Для индукции фиброза почек левый мочеточник асептически выделяли путем лапаротомии левее срединной линии под анестезией кетамин:ксилазином (100:10 мг/кг подкожно). Две плотные, закупоривающие лигатуры шелка 6-0 налагали на мочеточник на уровне нижнего края почки и мочеточник пересекали между лигатурами. Брюшную стенку закрывали швом Vicryl 4-0, а кожу закрывали нейлоном 4-0. Животным давали возможность восстановиться на электрогрелке и давали подкожно 0,05 мг/кг бупренорфина 2 раза в сутки на сутки 0 и 1. Процедура была адаптирована по Ma et al., *Kidney Int.* 53 (4): 937-944 (1998).

Затем мышей подразделяли на следующие исследуемые группы.

Группа	Обработка	Доза (мг/кг, в. /б.)	n*
1	6.8G6 (катион-зависимое mAb против $\alpha_v\beta_6$)	4	9
2	6.3G9 (катион-независимое mAb против $\alpha_v\beta_6$)	4	8
3	1E6 (mAb отрицательного контроля)	4	10
4	PBS – контрольный носитель	(100мкл)	8
5	Неоперированный, необработанный контроль	--	8

*Число животных.

Все животные, кроме группы 5, получали дозу 2 раза в неделю, начиная с суток до хирургического вмешательства.

Затем животных подвергали эвтаназии диоксидом углерода на 10 сутки после лигирования и подвергали диссекции. У мышей UUO почечная лоханка и мочеточник были заметно вздуты и полны жидкостью над закупоривающей лигатурой. Степень вздутия и степень оставшейся массы почечной ткани варьировали в группах обработки. Группа 2 характеризовалась вздутием, примерно в половину большим по сравнению с группами отрицательного контроля. Лигированные почки были бледного цвета.

Противоположные почки были ярко-красными и увеличенными примерно на треть.

Далее, обе почки (левая лигированная, правая нелигированная) животных удаляли и рассекали поперечно через центр почечной лоханки. Половину каждой почки помещали в 10% нейтрально забуференный формалин для окрашивания фиксированной ткани. Другую половину каждой почки помещали в 15% сахарозу, затем в 30% сахарозу для иммуногистохимического окрашивания.

Фиксированные формалином срезы почки подвергали иммунному окрашиванию на выявление миофибробластов (гладкомышечного актина), маркеров фиброза. Снимки делали с использованием стандартизованных условий освещения и настроек экспозиции цифровой камеры, откорректированных для фона, и с калибровкой удаленными стандартами. Снимки протяженных полей, покрывающих срез целой почки, получали от каждого животного для количественного анализа.

Гладкомышечный актин выражали как процент от общей площади ткани в пределах измеренных полей. Они включали в себя всю корковую и медуллярную ткань из среза, за исключением почечного сосочка.

В итоге, мыши, обработанные 6.3G9 и 6.8G6, характеризовались существенным снижением фиброза.

Пример 14. Эффективность блокирования mAb против $\alpha_v\beta_6$ индуцированного блеомицином фиброза легких у мышей.

Индукцированный блеомицином фиброз легких у мышей принимали в качестве модели фиброза легких *in vivo* и применяли для тестирования терапевтических эффектов фармакологических средств. Воспаление обычно видно через 5-15 суток после обработки блеомицином. У мышей линии 129 степень фиброза легких прогрессивно возрастает в течение периода не более 60 суток после обработки блеомицином. Накопление матрикса обычно становится выявляемым примерно на 15 сутки. В данном примере mAb 6.3G9 вводили внутрибрюшинной инъекцией в концентрации 4 мг/кг/доза мышам с индуцируемым блеомицином фиброзом легких, начиная с суток 0 или с суток 15, по 3 раза в неделю. Фиброз легких индуцировали на сутки 0 путем введения единственной внутритрахеальной дозы блеомицина в концентрации 0,03 ед./кг в 50 мкл стерильного солевого раствора. Животных забивали на сутки 30 и оценивали степень фиброза легких. Антитело 1E6 использовали в качестве отрицательного контроля.

От каждого животного забирали легкие и измеряли содержание гидроксипролина в качестве индекса отложения коллагена в легких, как описано в Munger et al., выше. Как показано на фиг. 15A, обработка 6.3G9, начавшаяся на сутки 0, значимо ингибировала индуцированное блеомицином повышение содержание гидроксипролина в легких. Важно то, что обработка 6.3G9 была, по меньшей мере, столь же эффективной, когда начиналась через 15 суток после введения блеомицина, в момент, когда уже началось отложение коллагена.

Авторы изобретения оценивали эффекты 6.3G9, катионзависимого 6.8G6 и неблокирующего антитела 6.4B4 по ингибированию более существенных степеней фиброза легких в продленном протоколе индуцированного блеомицином фиброза (длится 60 суток). Для этого авторы изобретения начинали обработку антителами через 15 суток после введения блеомицина (сутки 15). Затем легкие отбирали на сутки 60 для определения содержания гидроксипролина. Как показано на фиг. 15C, обработка 6.8G6 значимо ингибировала индуцируемый блеомицином фиброз (более 70% снижения в содержании гидроксипролина).

пролина по сравнению с животными, обработанными блеомицином и солевым раствором). Обработка 6.3G9 также показала тенденцию к защитному эффекту, но данные результаты не достигали статистической значимости (фиг. 15C).

В итоге, как катионзависимые, так и катионнезависимые антитела, блокирующие $\alpha_v\beta_6$, снижали фиброз легких у мышей, обработанных блеомицином. Более того, данное вмешательство было эффективным, даже когда обработка антителами не начиналась после первоначального приступа фиброза.

Пример 15. Положительная регуляция $\alpha_v\beta_6$ в псориазных очагах повреждения у человека.

Для определения того, вовлечен ли $\alpha_v\beta_6$ в псориаз, оценивали экспрессию $\alpha_v\beta_6$ в биопсиях кожи с очагами повреждения и без них от 5 пациентов с псориазом и 4 нормальных субъектов. С использованием иммунного окрашивания mAb 6.2A1 авторы изобретения обнаружили значимое повышение экспрессии $\alpha_v\beta_6$ в псориазных очагах повреждения по сравнению с неповрежденной кожей пациентов с псориазом и нормальными контрольными субъектами. Таким образом, положительная регуляция $\alpha_v\beta_6$ в псориазных очагах повреждения указывает на диагностическое и терапевтическое приложения использования антител против $\alpha_v\beta_6$.

Пример 16. Положительная регуляция $\alpha_v\beta_6$ у мыши и человека с заболеванием желчного протока.

Как описывалось ранее, экспрессия $\alpha_v\beta_6$ имела отношение к повреждению ткани. В данном исследовании экспрессию $\alpha_v\beta_6$ исследовали в печени мыши и человека, поврежденной заболеванием желчного протока.

Повреждение печени у мышей индуцировали путем лигирования желчного протока. См., например, George et al., PNAS 96: 12719-24 (1999); George et al., Am J Pathol 156: 115-24 (2000). С использованием mAb 6.2G2 авторы изобретения обнаружили, что экспрессия $\alpha_v\beta_6$ значительно повышалась на сутки 9, 14 и 16 после лигирования желчного протока.

Сходным образом, срезы печени человека от пациентов с заболеванием желчного протока характеризовались положительной регуляцией экспрессии $\alpha_v\beta_6$, что определено путем иммуногистохимии с использованием mAb 6.2G2. Повышенную экспрессию $\alpha_v\beta_6$ наблюдали, например, в образцах печени от мужчины в возрасте 44 лет с острым холестазом, мужчины в возрасте 59 лет после пересадки, с острой закупоркой желчного протока, мужчины в возрасте 22 лет с атрезией желчного протока и мужчины в возрасте 24 лет с хронической закупоркой желчного протока.

В итоге, новые антитела против $\alpha_v\beta_6$ являются полезными в качестве средства диагностики и терапии заболеваний печени.

Пример 17. Положительная регуляция $\alpha_v\beta_6$ при различных злокачественных опухолях человека.

Интегрин $\alpha_v\beta_6$ обычно экспрессируется в тканях здоровых взрослых людей на уровнях от незначительных до низких. Различные опухолевые ткани человека оценивали на предмет экспрессии $\alpha_v\beta_6$ с использованием антитела 6.2A1 и способов, в основном, описанных в данном описании. Результаты показывали, что экспрессия интегрина $\alpha_v\beta_6$ значимо повышена регулировалась при некоторых эпителиальных раках человека. Примечательно, что иммуногистология выявила особо выраженную экспрессию $\alpha_v\beta_6$ на краях опухолевых островков при многих эпителиальных раках. Для дальнейшего исследования экспрессии $\alpha_v\beta_6$ в эпителиальных раковых клетках клетки Детройт 562 (карцинома глотки) и клетки SCC-14 (плоскоклеточная карцинома языка), а также клетки SW480 β_6 (см. выше) окрашивали 6.3G9 и 6.4B4 и анализировали путем проточной цитометрии.

На правой стороне фиг. 12 показана экспрессия $\alpha_v\beta_6$ в разных опухолевых клеточных линиях, на что указывает связывание 6.3G9 при сортировке активированных флуоресценцией клеток (FACS). Закрашенный пик представляет собой связывание 6.3G9, в то время как незакрашенный пик представляет собой фоновое связывание одного вторичного mAb. График линии на левой стороне фиг. 12 показывает ингибирование связывания опухолевых клеточных линий с лигандом LAP за счет выходящих концентраций 6.3G9 или 6.4B4. 6.4B4 был существенно менее мощным ингибитором связывания $\alpha_v\beta_6$ с LAP по сравнению с 6.3G9 (>10 -кратного IC_{50} для Детройт 562, >30 -кратного IC_{50} для SW480 β_6 и >100 -кратного IC_{50} для SCC-14). Это согласуется с предыдущими результатами, полученными *in vitro*, которые указывают на то, что 6.3G9 представляет собой мощное блокирующее mAb, а 6.4B4 представляет собой слабое блокирующее mAb. Эти данные также согласуются с малозначительной ингибирующей активностью 6.4B4 в детройтской модели ксенотрансплантата (фиг. 14B). На фиг. 13 далее показано относительное ингибирование связывания опухолевых клеточных линий с LAP различными mAb против $\alpha_v\beta_6$. Как 6.3G9, так и 6.8G6 характеризовались эквивалентной ингибирующей активностью (в соответствии со всеми предыдущими данными), в то время как 6.4B4 было существенно менее мощным ингибитором связывания $\alpha_v\beta_6$ с LAP.

Пример 18. Эффекты блокирующих mAb против $\alpha_v\beta_6$ на модели ксенотрансплантата опухоли человека.

Животные с иммунодефицитом (например, голые мыши и SCID-мыши), которым пересаживали ксенотрансплантат опухоли человека, были приняты в качестве подходящей модельной системы *in vivo* для тестирования терапевтических эффектов противораковых средств (см., например, van Weerden et al., Prostate 43 (4): 263-71 (2000); Bankert et al., Front. Biosci. 7: с. 44-62 (2002)). Таким образом, блокирующие

моноклональные антитела против $\alpha_v\beta_6$ по настоящему изобретению могут тестироваться *in vivo* на модели ксенотрансплантата на их способность ингибировать опухолевый рост. В данном эксперименте авторы изобретения тестировали способность некоторых из новых антител против $\alpha_v\beta_6$ ингибировать опухолевый рост у бестимусных голых самок мышей, которым пересаживали ксенотрансплант рака глотки человека (клеточная линия Детройт 562).

Для этого клетки Детройт 562 (ATCC) пассировали *in vitro* в минимально необходимой среде (Eagle) с 2 mM L-глутамином и BSS Эрла, доведенной до содержания 1,5 г/л бикарбоната натрия, 0,1 mM заменимых аминокислот и 1,0 mM пирувата натрия, и 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота, без антибиотиков. Примерно 5×10^6 клеток/0,2 мл среды (без сыворотки) имплантировали подкожно голым мышам в правый бок. Через 3-4 суток начались измерения размера опухоли и продолжались до достижения опухолью размеров примерно 5 мм (в длину) на 5 мм (в ширину). Мышей разделяли случайным образом и подвергали внутрибрюшинной инъекции тестируемыми антителами или контрольными растворами на сутки 1, с последующими 3 инъекциями еженедельно в течение периода 33 суток. Тестируемые антитела и контрольные растворы представляли собой: (1) 6.3G9, 1 мг/кг, 10 мышей; (2) 6.3G9, 4 мг/кг, 10 мышей; (3) 6.3G9, 10 мг/кг, 10 мышей; (4) 6.4B4, 1 мг/кг, 10 мышей; (5) 6.4B4, 4 мг/кг, 10 мышей; (6) 6.4B4, 10 мг/кг, 10 мышей; и (7) раствор носителя (PBS), 0,2 мл/на мышшь, 30 мышей. Кроме того, 10 мышам подкожно вводили цис-платину в дозе 2 мг/кг в качестве химиотерапевтического контроля. Инъекции цис-платиной проводили на сутки 1 и затем каждые 2 суток, в общем, за 6 введений. В конце периода 33 суток измеряли массы животных и размеры опухолей, оценивали экспрессию $\alpha_v\beta_6$ путем иммуногистологии и измеряли уровни антител против $\alpha_v\beta_6$ в сыворотке.

Иммуногистологическое окрашивание показало, что имплантированные опухолевые клетки сильно экспрессировали $\alpha_v\beta_6$ *in vivo*. Данные по массе опухоли далее показали, что блокирующее mAb 6.3G9 эффективно ингибировало опухолевый рост во всех трех тестируемых концентрациях (фиг. 14A). Слабо блокирующее mAb 6.4B4, наоборот, не ингибировало опухолевый рост (фиг. 14B).

В сумме блокирующие антитела ингибировали опухолевый рост у обработанных мышей на 40-50%. Слабо блокирующее антитело против $\alpha_v\beta_6$, наоборот, не ингибировало опухолевый рост.

Пример 19. Интернализация антител против $\alpha_v\beta_6$.

Антитела, которые интернализуются клетками, имеют преимущество для некоторых клинических приложений, таких как злокачественные опухоли, поскольку данные антитела могут затем конъюгироваться с токсинами, радиоактивными соединениями или другими противораковыми средствами для селективного нацеливания и ингибирования роста раковых клеток. Способность антител против $\alpha_v\beta_6$ интернализироваться исследовали в клетках SW480 β_6 (см. выше) и SCC-14.

Клетки разделяли 1:5 и высевали на 4-камерные стеклянные предметные стекла для инкубации в течение ночи при 37°C, 5% CO₂. На следующие сутки mAb 6.8G6, 6.1A8, 6.3G9, 7.1C5, 6.4B4, 10D5 и 8B3 разбавляли до конечной концентрации 20 мкг/мл. mAb или только среду добавляли в подходящие лунки. Временной курс интернализации длился от 0 до 48 ч. Включенные в исследование временные отрезки составляли 0, 5, 10 и 30 мин и 1, 4, 24 и 48 ч. Вторичное антитело (антитело против мышинных антител Alexa 594) добавляли в качестве отрицательного контроля.

Интернализацию останавливали после каждого временного отрезка путем удаления антитела и промывки слоя клеток буфером. Агглютинин зародыша пшеницы Alexa-488 добавляли в течение 20 мин при 18°C для окрашивания внешней границы клеток зеленой флуоресценцией. После промывки клеток добавляли раствор Cytofix/Cytoperm на 20 мин при 18°C для фиксации и обеспечения проницаемости клеток. Клетки опять промывали и добавляли вторичное антитело против мышинных антител Alexa 594 (красная флуоресценция) на 20 мин при 18°C для мечения связанного или интернализованного мышино-го антитела против $\alpha_v\beta_6$. Клетки затем промывали и фиксировали путем добавления 2% параформальдегида и оценивали путем конфокальной микроскопии. Затем снимали изображения путем объектива Leitz Plan-Apochromatic 63× (1,32 числовая апертура, масляная иммерсия) (Leica) с цифровым увеличением 2×. Каждая рамка представляла собой один оптический срез от среднего среза клеток, которые наблюдали на предмет интернализации при всех условиях. В ядре окрашивания не наблюдалось.

Интернализацию наблюдали для катионзависимых mAb (содержащих RGD миметиков лиганда), таких как 6.8G6 и 6.1A8. Для катионнезависимых mAb, таких как 6.3G9, 7.1C5 и 6.4B4, интернализации не наблюдалось.

Список последовательностей

<110> BIOGEN, INC.
 THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA

<120> АНТИТЕЛА ПРОТИВ АЛЬФА-V БЕТА-6

<130> A136PCT

<140> PCT/US03/08048
 <141> 2003-03-13

<150> 60/364,991
 <151> 2002-03-13

<150> 60/426,286
 <151> 2002-11-13

<160> 64

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 1
 Ser Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ala Met His
 1 5 10

<210> 2
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Ser Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Thr Met His
 1 5 10

<210> 3
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Val Met Ser
 1 5 10

<210> 4
 <211> 17
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Val	Ile	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys
1					5				10					15	

Gly

<210> 5

<211> 16

<212> Бeлoк

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

<210> 6

<211> 16

<212> Бeлoк

<213> Homo sapiens

<400> 6

Ser	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Arg	Met	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Thr	Val	Lys	Gly
1				5					10					15	

<210> 7

<211> 17

<212> Бeлoк

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)

<223> Arg or Gln

<400> 7

Gly	Gly	Leu	Arg	Arg	Gly	Asp	Arg	Pro	Ser	Leu	Xaa	Tyr	Ala	Met	Asp
1				5				10						15	

Tyr

<210> 8

<211> 12

<212> Бeлoк

<213> Homo sapiens

<400> 8

Gly	Ala	Ile	Tyr	Asp	Gly	Tyr	Tyr	Val	Phe	Ala	Tyr
1				5				10			

<210> 9

<211> 12

<212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 Gly Ser Ile Tyr Asp Gly Tyr Tyr Val Phe Pro Tyr
 1 5 10

<210> 10
 <211> 15
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Tyr Met Tyr
 1 5 10 15

<210> 11
 <211> 12
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Tyr
 1 5 10

<210> 12
 <211> 12
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Ser Ala Asn Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Tyr
 1 5 10

<210> 13
 <211> 7
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5

<210> 14
 <211> 7
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

<210> 15
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 Gln His Asn Trp Glu Ile Pro Phe Thr
 1 5

<210> 16
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Gln His Ser Trp Glu Ile Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 17
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr
 1 5

<210> 18
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 His Gln Trp Ser Thr Tyr Pro Pro Thr
 1 5

<210> 19
 <211> 126
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 Gln Val Gln Phe Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val
 1 5 10 15

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

Thr Met His Trp Val Lys Leu Ser His Ala Lys Thr Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gly Gly Phe Arg Arg Gly Asp Arg Pro Ser Leu Arg Tyr Ala
100 105 110

Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 20

<211> 126

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 20

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

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

Ala Met His Trp Val Lys Leu Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Leu Arg Arg Gly Asp Arg Pro Ser Leu Arg Tyr Ala
100 105 110

Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 21

<211> 126

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 21

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

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

Ala Met His Trp Val Lys Leu Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Leu Arg Arg Gly Asp Arg Pro Ser Leu Gln Tyr Ala
 100 105 110

Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 22

<211> 119

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 22

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

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

Phe Met Asn Trp Val Met Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Arg Ile Lys Pro Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Met Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val His
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Arg Tyr Gly Thr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 23

<211> 120

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 23

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

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

<210> 24
 <211> 120
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Val Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Arg Met Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gly Ser Ile Tyr Asp Gly Tyr Tyr Val Phe Pro Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 25
 <211> 121
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 25

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
 1 5 10 15

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

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Met Ile His Pro Ser Ile Ser Glu Thr Arg Leu Asn Pro Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Tyr Leu Gly Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Gly Ser Asp Cys Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 26

<211> 121

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 26

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Gly Pro Gly Thr
 1 5 10 15

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

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Met Ile His Pro Ser Ile Ser Glu Thr Arg Leu Asn Pro Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Tyr Leu Gly Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Gly Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 27
 <211> 119
 <212> Бeлoк
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Val Leu Met Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Asp Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Asn Leu Pro Gly Thr Arg Asn Asn Tyr Asn Glu Asn Phe Lys
 50 55 60
 Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Pro Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Ile
 65 70 75 80
 Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Glu Ala Leu Gly Gly Asp Tyr Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 28
 <211> 119
 <212> Бeлoк
 <213> Homo sapiens

<400> 28
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Val Leu Met Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Asp Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Asn Leu Pro Gly Thr Arg Asn Asn Tyr Asn Glu Asn Phe Lys
 50 55 60
 Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Pro Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Ile
 65 70 75 80
 Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Glu Ala Leu Gly Gly Asp Tyr Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 29
<211> 119
<212> Бeлoк
<213> Homo sapiens

<400> 29
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Val Leu Met Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
20 25 30
Trp Met Asp Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Asn Leu Pro Gly Thr Arg Asn Asn Tyr Asn Glu Asn Phe Lys
50 55 60
Gly Arg Ala Thr Phe Thr Ala Asp Pro Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Ile
65 70 75 80
Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Glu Ala Leu Gly Gly Asp Tyr Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 30
<211> 118
<212> Бeлoк
<213> Homo sapiens

<400> 30
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

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

Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 31
 <211> 118
 <212> Бeлoк
 <213> Homo sapiens

<400> 31
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 32
 <211> 118
 <212> Бeлoк
 <213> Homo sapiens

<400> 32
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Arg Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 33

<211> 118

<212> Бeлoк

<213> Homo sapiens

<400> 33

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 34

<211> 118

<212> Бeлoк

<213> Homo sapiens

<400> 34

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

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

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

Trp Ile Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Leu Asn Thr Lys Tyr Asn Glu
 50 55 60
 Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr
 65 70 75 80
 Val Tyr Met Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg His Glu Leu Asn Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 35
 <211> 118
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

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

<210> 36
 <211> 118
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 36
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

<210> 37
 <211> 111
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 37
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ile Ser
 20 25 30
 Thr Tyr Ser Tyr Ile His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
 85 90 95
 Glu Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 38
 <211> 111
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 38
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

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

<210> 39
 <211> 112
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 39
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Arg Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Met Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Lys His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Phe Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 40
 <211> 107
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 40

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

Glu Arg Val Asn Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 41

<211> 107

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 41

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

Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 42

<211> 106

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 42

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

<210> 43

<211> 106

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 43

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

<210> 44

<211> 108

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 44

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

Glu Lys Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
 65 70 75 80

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

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

<210> 45

<211> 108

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 45

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

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

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
 65 70 75 80

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

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

<210> 46

<211> 17

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 46

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

Gly

<210> 47

<211> 17

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 47

Gly	Gly	Phe	Arg	Arg	Gly	Asp	Arg	Pro	Ser	Leu	Arg	Tyr	Ala	Met	Asp
1				5					10					15	

Ser

<210> 48

<211> 15

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 48

Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ile	Ser	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Ile	His
1				5					10					15

<210> 49

<211> 10

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 49

Gly	Tyr	Asp	Phe	Asn	Asn	Asp	Leu	Ile	Glu
1				5					10

<210> 50

<211> 10

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 50

Gly	Tyr	Ala	Phe	Thr	Asn	Tyr	Leu	Ile	Glu
1				5					10

<210> 51

<211> 17

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 51

Val	Ile	Asn	Pro	Gly	Ser	Gly	Arg	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 52

<211> 17

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 52

Val	Ile	Ser	Pro	Gly	Ser	Gly	Ile	Ile	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 53

<211> 12

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 53

Ile	Tyr	Tyr	Gly	Pro	His	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr
1				5					10		

<210> 54

<211> 11

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 54

Ile	Asp	Tyr	Ser	Gly	Pro	Tyr	Ala	Val	Asp	Asp
1				5					10	

<210> 55

<211> 11

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 55

Lys	Ala	Ser	Leu	Asp	Val	Arg	Thr	Ala	Val	Ala
1				5					10	

<210> 56

<211> 11

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 56

Lys Ala Ser Gln Ala Val Asn Thr Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 57

<211> 7

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 57

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
 1 5

<210> 58

<211> 7

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 58

Ser Ala Ser Tyr Gln Tyr Thr
 1 5

<210> 59

<211> 9

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 59

Gln Gln His Tyr Gly Ile Pro Trp Thr
 1 5

<210> 60

<211> 9

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 60

Gln His His Tyr Gly Val Pro Trp Thr
 1 5

<210> 61

<211> 120

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 61

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

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

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

<210> 62
 <211> 121
 <212> Блок
 <213> Homo sapiens

<400> 62
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Asn Asn Asp
 20 25 30
 Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Ala Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Met Ile Tyr Tyr Gly Pro His Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 63
 <211> 107
 <212> Блок
 <213> Homo sapiens

<400> 63
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Val Val Gly
 1 5 10 15

```

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

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

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

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

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Gly Ile Pro Trp
      85              90              95

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

```

<210> 64

<211> 107

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 64

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
  1              5              10              15

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

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

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

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

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Val Pro Trp
      85              90              95

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

```

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Моноклональное антитело, которое (а) специфически связывается с $\alpha_v\beta_6$ и (б) ингибирует связывание $\alpha_v\beta_6$ с ассоциированным с латентностью пептидом (LAP) при значении IC_{50} , меньшем, чем таковое у антитела 10D5, причем указанное моноклональное антитело содержит те же самые определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи и легкой цепи, что и антитело, продуцируемое гибридомой, выбранной из группы, состоящей из гибридомы 6.1A8, ATCC PTA-3647, гибридомы 6.3G9, ATCC PTA-3649, гибридомы 6.8G6, ATCC PTA-3645, гибридомы 6.2B1, ATCC PTA-3646, 7.1G10, ATCC PTA-3898, 7.7G5, ATCC PTA-3899 и 7.1G5, ATCC PTA-3900.

2. Моноклональное антитело по п.1, содержащее те же самые определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи и легкой цепи, что и антитело, продуцируемое гибридомой 6.1A8, ATCC PTA-3647.

3. Моноклональное антитело по п.1, содержащее те же самые определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи и легкой цепи, что и антитело, продуцируемое гибридомой 6.3G9, ATCC PTA-3649.

4. Моноклональное антитело по п.1, содержащее те же самые определяющие комплементарность

области (CDR) тяжелой цепи и легкой цепи, что и антитело, продуцируемое гибридомой 6.8G6, ATCC PTA-3645.

5. Моноклональное антитело по п.1, содержащее те же самые определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи и легкой цепи, что и антитело, продуцируемое гибридомой 6.2B1, ATCC PTA-3646.

6. Моноклональное антитело по п.1, содержащее те же самые определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи и легкой цепи, что и антитело, продуцируемое гибридомой 7.1G10, ATCC PTA-3898.

7. Моноклональное антитело по п.1, содержащее те же самые определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи и легкой цепи, что и антитело, продуцируемое гибридомой 7.7G5, ATCC PTA-3899.

8. Моноклональное антитело по п.1, содержащее те же самые определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи и легкой цепи, что и антитело, продуцируемое гибридомой 7.1G5, ATCC PTA-3900.

9. Антитело по п.1, где связывание между антителом и $\alpha\beta_6$ зависит от двухвалентного катиона.

10. Антитело по п.9, где двухвалентный катион представляет собой Ca^{2+} , Mg^{2+} или Mn^{2+} .

11. Антитело по п.1, где его связывание с $\alpha\beta_6$ не зависит от двухвалентного катиона.

12. Антитело по п.1, в котором определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи имеют, по существу, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, 4 и 7, соответственно.

13. Антитело по п.1, в котором определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи имеют, по существу, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3, 5 и 8, соответственно.

14. Антитело по п.1, в котором определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи имеют, по существу, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3, 6 и 9, соответственно.

15. Антитело по п.1, в котором определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи имеют, по существу, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2, 46 и 47, соответственно.

16. Антитело по п.1, в котором определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи имеют, по существу, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 49, 51 и 53, соответственно.

17. Антитело по п.1, в котором определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи имеют, по существу, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 50, 52 и 54, соответственно.

18. Антитело по п.1, содержащее последовательность варибельного домена тяжелой цепи, представляющую собой любую из последовательностей SEQ ID NO: 19-36 и 61, 62.

19. Антитело по п.18, содержащее последовательность варибельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 19 и последовательность варибельного домена легкой цепи SEQ ID NO: 37.

20. Антитело по п.18, содержащее последовательность варибельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 20 или 21 и последовательность варибельного домена легкой цепи SEQ ID NO: 38.

21. Антитело по п.18, содержащее последовательность варибельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 22 и последовательность варибельного домена легкой цепи SEQ ID NO: 43.

22. Антитело по п.18, содержащее последовательность варибельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 23 и последовательность варибельного домена легкой цепи SEQ ID NO: 44.

23. Антитело по п.18, содержащее последовательность варибельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 24 и последовательность варибельного домена легкой цепи SEQ ID NO: 45.

24. Антитело по п.18, содержащее последовательность варибельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 25 или 26 и последовательность варибельного домена легкой цепи SEQ ID NO: 42.

25. Антитело по п.18, содержащее последовательность варибельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 27, 28 или 29 и последовательность варибельного домена легкой цепи SEQ ID NO: 39.

26. Антитело по п.18, содержащее последовательность варибельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 34 или 35 и последовательность варибельного домена легкой цепи SEQ ID NO: 40.

27. Антитело по п.18, содержащее последовательность варибельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 36 и последовательность варибельного домена легкой цепи SEQ ID NO: 41.

28. Антитело по п.18, содержащее последовательность варибельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 61 и последовательность варибельного домена легкой цепи SEQ ID NO: 63.

29. Антитело по п.18, содержащее последовательность варибельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 62 и последовательность варибельного домена легкой цепи SEQ ID NO: 64.

30. Моноклональное антитело, которое специфически связывается с $\alpha\beta_6$, но не ингибирует связывание $\alpha\beta_6$ с ассоциированным с латентностью пептидом (LAP), причем указанное моноклональное антитело содержит те же самые определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи и легкой цепи, что и антитело, продуцируемое гибридомой, выбранной из группы, состоящей из гибридомы 6.2A1, ATCC PTA-3896 и гибридомы 6.2E5, ATCC PTA-3897.

31. Антитело по п.30, содержащее те же самые определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи и легкой цепи, что и антитело, продуцируемое гибридомой 6.2A1, ATCC PTA-3896.

32. Антитело по п.30, содержащее те же самые определяющие комплементарность области (CDR)

тяжелой цепи и легкой цепи, что и антитело, продуцируемое гибридомой 6.2E5, ATCC PTA-3897.

33. Композиция для профилактики или лечения у млекопитающего заболевания, опосредованного $\alpha_v\beta_6$, содержащая антитело по любому из пп. 1-32 и фармацевтически приемлемый носитель.

34. Композиция по п.33, в которой антитело конъюгировано с цитотоксическим средством.

35. Композиция по п.33, в которой антитело представляет собой катионзависимое антитело.

36. Способ лечения субъекта, характеризующегося наличием заболевания или риском наличия заболевания, опосредованного $\alpha_v\beta_6$, предусматривающий введение указанному субъекту композиции по п.33, причем указанный способ облегчает течение заболевания или отсрочивает его начало.

37. Способ по п.36, где субъектом является человек.

38. Способ по п.36, где заболевание представляет собой фиброз.

39. Способ по п.38, где фиброз представляет собой склеродермию, рубцы, фиброз печени, фиброз почек или фиброз легких.

40. Способ по п.36, где заболевание представляет собой псориаз.

41. Способ по п.36, где заболевание представляет собой рак.

42. Способ по п.41, где рак представляет собой эпителиальный рак.

43. Способ по п.41, где рак представляет собой рак ротовой полости, кожи, шейки матки, яичников, глотки, гортани, пищевода, легких, молочной железы, почек или колоректальный рак.

44. Способ по п.36, где заболевание представляет собой синдром Альпорта или атрезию желчного протока.

45. Способ по п.36, где заболевание представляет собой острое повреждение легкого.

46. Способ детекции $\alpha_v\beta_6$ в образце ткани млекопитающего, предусматривающий обеспечение контакта образца ткани с антителом по п.1 или 30, при этом наличие $\alpha_v\beta_6$ в образце детектируется в том случае, если указанное антитело связывается с указанным образцом ткани.

47. Способ по п.46, где антитело выбрано из группы, состоящей из антитела 6.2A1, ATCC PTA-3896 и 6.2E5, ATCC PTA-3897.

48. Гибридома 6.1A8, ATCC PTA-3647, продуцирующая моноклональное антитело по п.1.

49. Гибридома 6.2B10, ATCC PTA-3648, продуцирующая моноклональное антитело по п.1.

50. Гибридома 6.3G9, ATCC PTA-3649, продуцирующая моноклональное антитело по п.1.

51. Гибридома 6.8G6, ATCC PTA-3645, продуцирующая моноклональное антитело по п.1.

52. Гибридома 6.2B1, ATCC PTA-3646, продуцирующая моноклональное антитело по п.1.

53. Гибридома 6.2A1, ATCC PTA-3896, продуцирующая моноклональное антитело по п.1.

54. Гибридома 6.2E5, ATCC PTA-3897, продуцирующая моноклональное антитело по п.1.

55. Гибридома 7.1G10, ATCC PTA-3898, продуцирующая моноклональное антитело по п.1.

56. Гибридома 7.7G5, ATCC PTA-3899, продуцирующая моноклональное антитело по п.1.

57. Гибридома 7.1C5, ATCC PTA-3900, продуцирующая моноклональное антитело по п.1.

58. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая последовательности SEQ ID NO: 19-45 и 61-64 переменных доменов легкой и тяжелой цепей антитела по п.1.

59. Моноклональное антитело, которое: (а) специфически связывается с $\alpha_v\beta_6$ и (б) ингибирует связывание $\alpha_v\beta_6$ с ассоциированным с латентностью пептидом (LAP) при значении IC_{50} , большем, чем такое у антитела 10D5, причем указанное моноклональное антитело содержит те же самые определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи и легкой цепи, что и антитело, продуцируемое гибридомой 6.2B10, ATCC PTA-3648, или области CDR имеют аминокислотную мутацию, такую, что участок гликозилирования элиминирован.

60. Применение композиции по п.33 для получения лекарственного средства для лечения заболевания, опосредованного $\alpha_v\beta_6$, где указанное средство облегчает течение заболевания или отсрочивает его начало.

61. Применение по п.60, где субъектом является человек.

62. Применение композиции по п.60, где заболевание представляет собой фиброз.

63. Применение композиции по п.62, где фиброз представляет собой склеродермию, рубцы, фиброз печени, фиброз почек или фиброз легких.

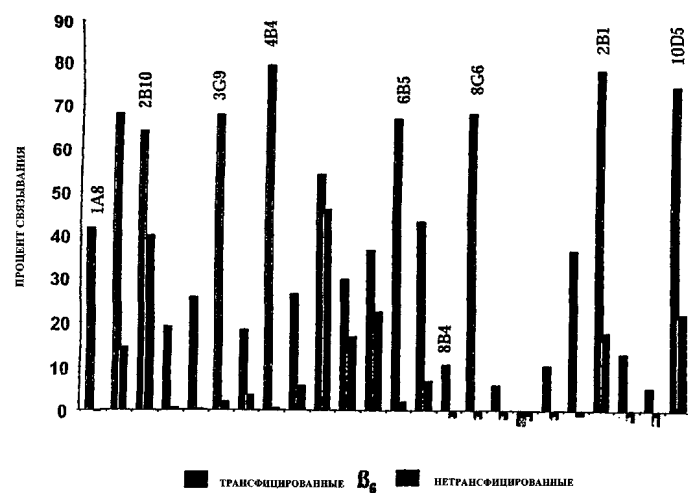
64. Применение по п.60, где заболевание представляет собой псориаз.

65. Применение по п.60, где заболевание представляет собой рак.

66. Применение по п.65, где рак представляет собой рак ротовой полости, кожи, шейки матки, яичников, глотки, гортани, пищевода, легких, молочной железы, почек или колоректальный рак.

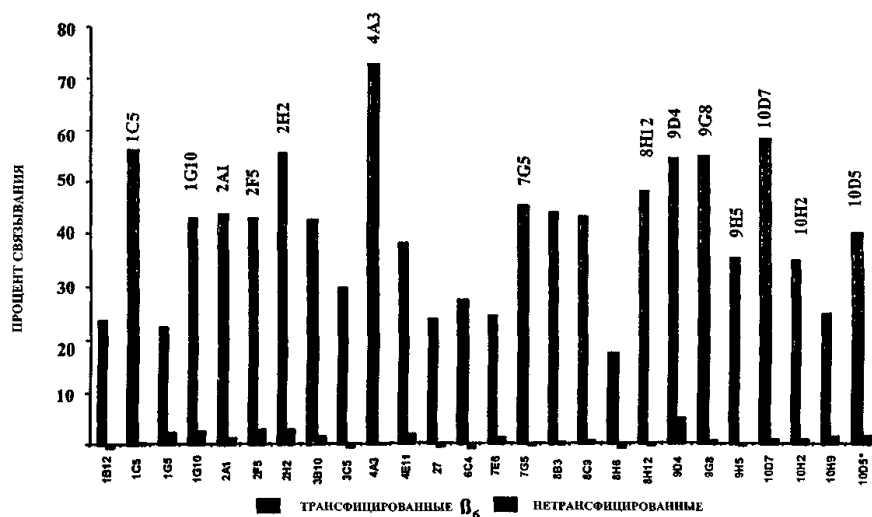
67. Применение по п.60, где заболевание представляет собой синдром Альпорта или атрезию желчного протока.

68. Применение по п.60, где заболевание представляет собой острое повреждение легкого.



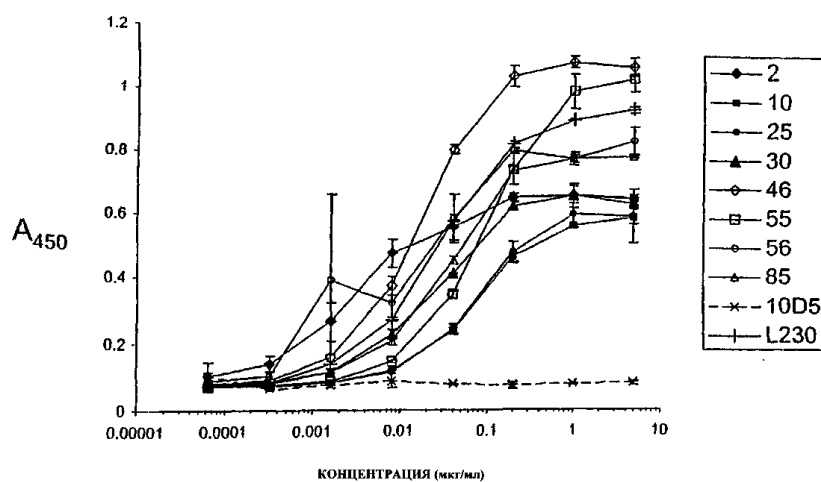
Фиг. 1А

СЛИЯНИЕ
СВЯЗЫВАНИЕ mAb С КЛЕТКАМИ

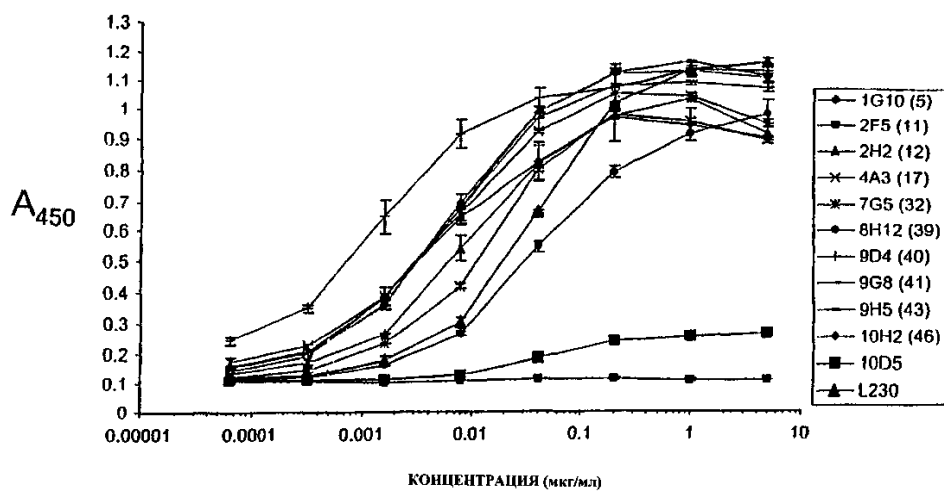
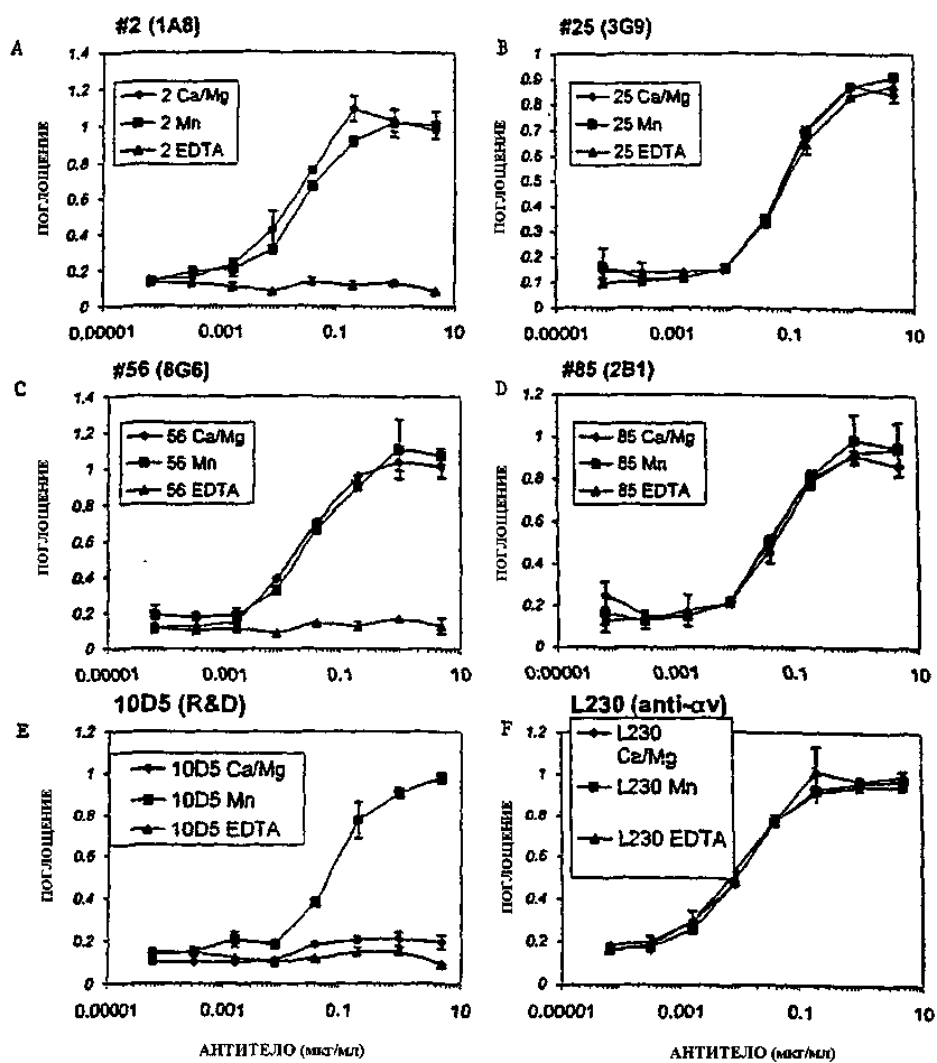


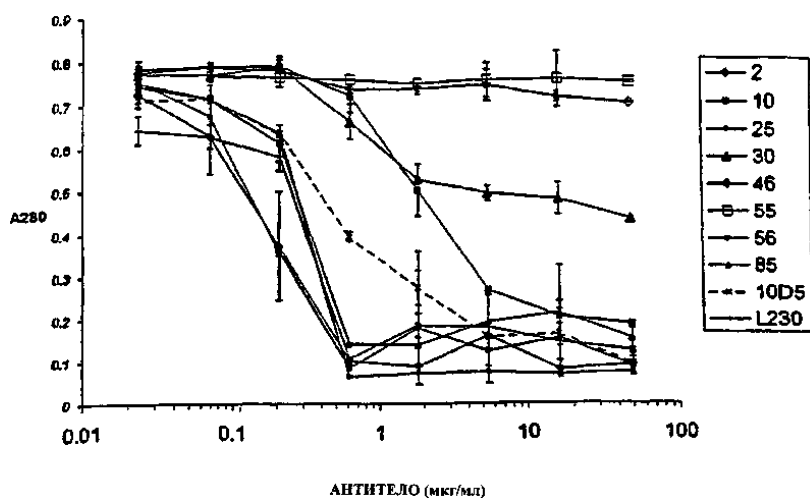
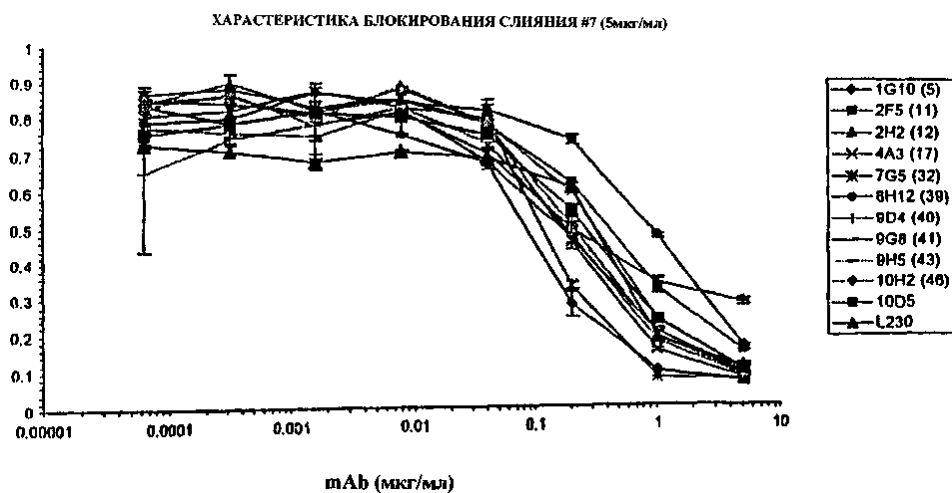
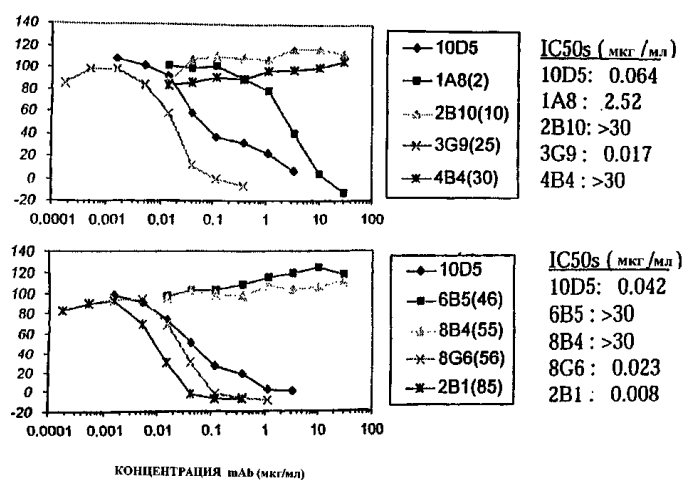
Фиг. 1В

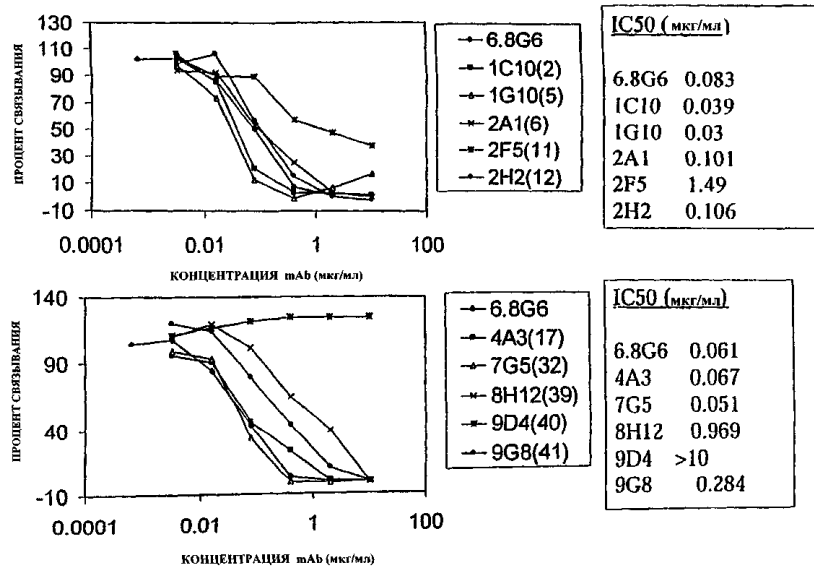
СРОДСТВО СВЯЗЫВАНИЯ С $\alpha\nu\beta 6$ (ELISA) mAb СЛИЯНИЯ #6



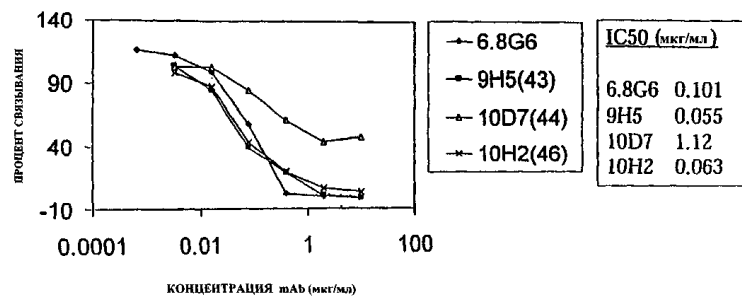
Фиг. 2А

СРОДСТВО СВЯЗЫВАНИЯ С $\alpha\nu\beta 6$ (ELISA) mAb СЛИЯНИЯ #7ЗАВИСИМОСТЬ СВЯЗЫВАНИЯ С РАСТВОРИМЫМ $\alpha\nu\beta 6$ ОТ КАТИОНОВ

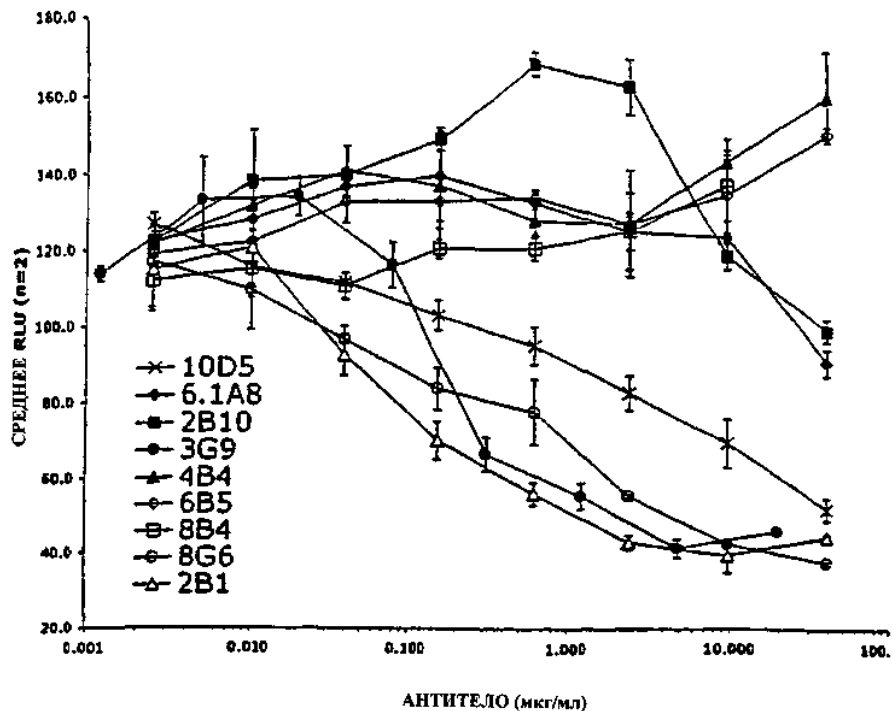
ИНГИБИРОВАНИЕ БИОТИН- $\alpha v \beta 6$ /LAP- mAb СЛИЯНИЕ #7АДГЕЗИЯ $\beta 6$ (FDC - P1) к LAP - mAb СЛИЯНИЯ #6

АДГЕЗИЯ $\beta 6$ (FDC - P1) к LAP - mAb СЛИЯНИЯ #7

Фиг. 5C-D

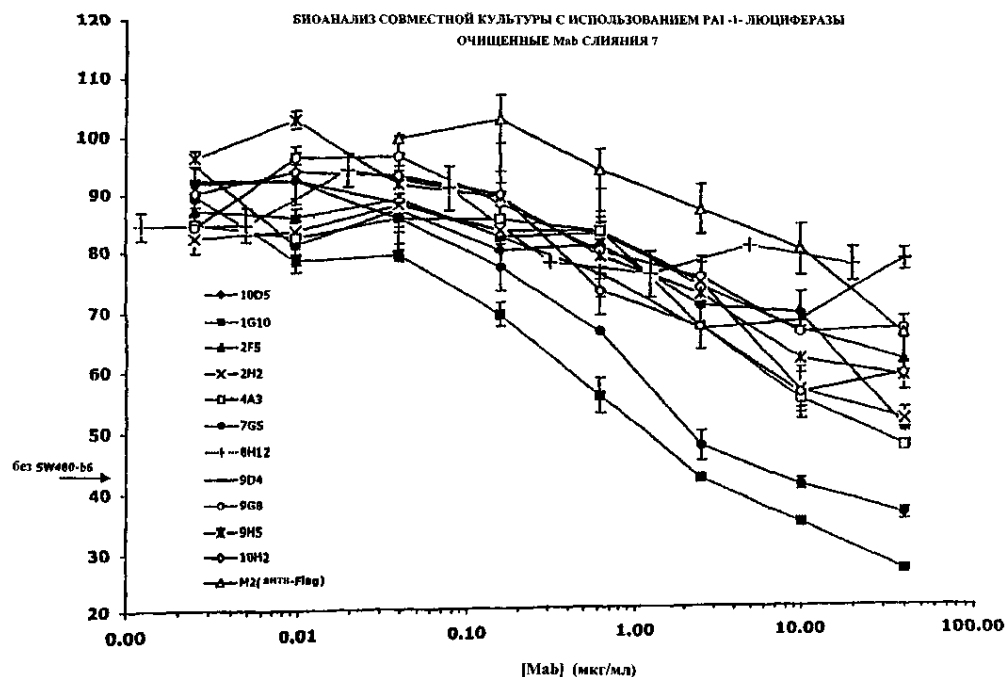
АДГЕЗИЯ $\beta 6$ (FDC - P1) к LAP - mAb СЛИЯНИЯ #7

Фиг. 5E



Фиг. 6A

ИНГИБИРОВАННОЕ АКТИВАЦИИ TGFβ ЗА СЧЕТ αvβ6 - mAb СЛИЯНИЯ #7 (АНАЛИЗ
СОВМЕСТНОЙ КУЛЬТУРЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РА1 - 1 ЛЮЦИФЕРАЗЫ)



6.1A8 (1) QVQLQQSGPELV R P G V S V K L S C K G S Y T F T D Y T M H W K L S H A K S L E W I G V I D T Y Y G K T N Y N Q K F K G K A T M T V D K S S T A Y M D L A R L T S E D S A V
6.8G6-A (1) QVQLQQSGPELV R P G V S V K L S C K G S Y T F T D Y A M H W K L S H A K S L E W I G V I S T Y Y G N T N Y N Q K F K G K A T M T V D K S S T A Y M E L A R L T S E D S A V
6.8G6-B (1) QVQLQQSGPELV R P G V S V K L S C K G S Y T F T D Y A M H W K L S H A K S L E W I G V I S T Y Y G N T N Y N Q K F K G K A T M T V D K S S T A Y M E L A R L T S E D S A V
7.7G5 (1) EVQLQQSGPELV K P G A S V K I S C K A S G Y S F T G Y F M N W V M Q S H G K S L E W I G R I K P Y N G D N F Y N Q K F M G K A T L T V D K S S T V H M E L R S L A S E D S A V
6.2B1 (1) EVKLVEGGGLV K P G G S L K L S C A A S G F T F S R Y V M S W V R Q T P E K R L E W A S I S S G - G S T Y Y P D S V K G R F T I S R D S A R N I L Y L Q M S S L R S E D T A M
6.3G9 (1) EVMLVESGGGLV K P G G S L K L S C A A S G F T F S R Y V M S W V R Q T P E K R L E W A S I S S O - G R M Y Y P D T V K G R F T I S R D S A R N I L Y L Q M S S L R S E D T A M
6.2B10-A (1) QVQLQQSGPELV R P G T S V K L S C K A S G Y S F T S Y W M N W V K Q R P G Q G L E W I G M I H P S I S E T R L N P K F K D K A T L T V D T S S T V Y M Q L S S P T S E D S A V
6.2B10-B (1) QVQLQQSGPELV R P G T S V K L S C K A S G Y S F T S Y W M N W V K Q R P G Q G L E W I G M I H P S I S E T R L N P K F K D K A T L T V D T S S T V Y M Q L S S P T S E D S A V
6.2G2 (1) QVQLQQSGPELV R P G T S V K L S C K A S G Y S F T S Y W M N W V K Q R P G Q G L E W I G M I H P S I S E T R L N P K F K D K A T L T V D T S S T V Y M Q L S S P T S E D S A V
6.2A1 (1) QVQLQQSGPELV R P G T S V K L S C K A S G Y S F T S Y W M N W V K Q R P G Q G L E W I G M I H P S I S E T R L N P K F K D K A T L T V D T S S T V Y M Q L S S P T S E D S A V
6.4B4-A (1) QVQLQQSGPELV K P G A S V K I S C K A T G Y S F T N Y W I D W I K Q R P G H G L E W I G E N L P G - T R N N Y N E N F K G K A T F T A D P S S N T A Y I Q L N S L T S D D S A V
6.4B4-B (1) QVQLQQSGPELV K P G A S V K I S C K A T G Y S F T N Y W I D W I K Q R P G H G L E W I G E N L P G - T R N N Y N E N F K G K A T F T A D P S S N T A Y I Q L N S L T S D D S A V
6.4B4-C (1) QVQLQQSGPELV K P G A S V K I S C K A T G Y S F T N Y W I D W I K Q R P G H G L E W I G E N L P G - T R N N Y N E N F K G K A T F T A D P S S N T A Y I Q L N S L T S D D S A V
7.10H2 (1) QVQLQQSGPELV K P G A S V R I S C K A S G Y I F T S Y Y I H W V K Q R P G Q G L E W I G W I Y P G N V N T K Y N E K F K D K A T L T A D K S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V
7.9H5 (1) QVQLQQSGPELV K P G A S V R I S C K A S G Y I F T S Y Y I H W V K Q R P G Q G L E W I G W I Y P G N V N T K Y N E K F K D K A T L T A D K S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V
7.4A3-A (1) QVQLQQSGPELV K P G A S V R I S C K A S G Y I F T S Y Y I H W V K Q R P G Q G L E W I G W I Y P G N V N T K Y N E K F K D K A T L T A D K S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V
7.4A3-B (1) QVQLQQSGPELV K P G A S V R I S C K A S G Y I F T S Y Y I H W V K Q R P G Q G L E W I G W I Y P G N V N T K Y N E K F K D K A T L T A D K S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V
7.1C5-A (1) QVQLQQSGPELV K P G A S L R I S C K A S G Y T F K S Y Y I H W V K Q R P G Q G L E W I G W I Y P G N V N T K Y N E K F K D K A T L T A D K S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V
7.1C5-B (1) QVQLQQSGPELV K P G A S L R I S C K A S G Y T F K S Y Y I H W V K Q R P G Q G L E W I G W I Y P G N V N T K Y N E K F K D K A T L T A D K S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V
7.1G10 (1) QVQLQQSGPELV K P G A S V R I S C K A S G Y T F T S Y Y I H W V K Q R P G Q G L E W I G W I Y P G K I N T R Y N E K F K G K A T L T A D K S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V

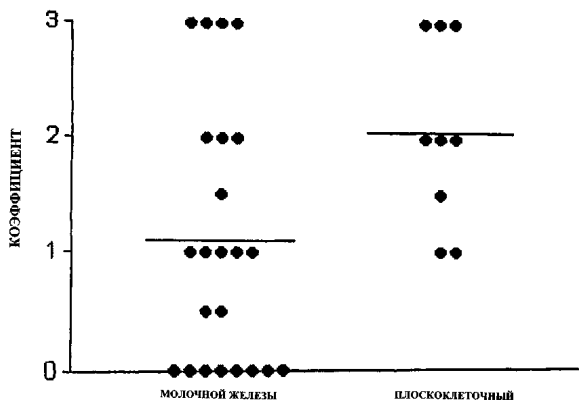
6.1A8 (94) Y Y C A R G G F R R G D R P S L R Y A M D S W G Q G T S V T V S S SEQ ID NO: 19
6.8G6-A (94) Y Y C A R G G L R R G D R P S L R Y A M D Y W G Q G T S V T V S S SEQ ID NO: 20
6.8G6-B (94) Y Y C A R G G L R R G D R P S L R Y A M D Y W G Q G T S V T V S S SEQ ID NO: 21
7.7G5 (94) Y Y C A R D R Y G - - - - - T - Y G M D Y W G Q G T S V T V S S SEQ ID NO: 22
6.2B1 (93) Y Y C A R G A I Y D G - - - - - Y Y V F A Y W G Q G T L V T V S A SEQ ID NO: 23
6.3G9 (93) Y Y C A R G S I Y D G - - - - - Y Y V F P Y W G Q G T L V T V S A SEQ ID NO: 24
6.2B10-A (94) Y Y C A R Y L G Y Y T Y - - - - - Y G D Y W G Q G T S V T V S S SEQ ID NO: 25
6.2B10-B (94) Y Y C A R Y L G Y Y T Y - - - - - Y G D Y W G Q G T S V T V S S SEQ ID NO: 26
6.2G2 (94) Y F C A A I D Y S G P - - - - - Y A V D D W G Q G T S V T V S S SEQ ID NO: 61
6.2A1 (94) Y F C A M I Y Y - G P H S - - - - - Y A M D Y W G Q G T S V T V S S SEQ ID NO: 62
6.4B4-A (93) Y Y C A R E A L G G D Y - - - - - G L D Y W G Q G T S L T V S S SEQ ID NO: 27
6.4B4-B (93) Y Y C A R E A L G G D Y - - - - - V L D Y W G Q G T S L T V S S SEQ ID NO: 28
6.4B4-C (93) Y Y C A R E A L G G D Y - - - - - G L D Y W G Q G T S L T V S S SEQ ID NO: 29
7.10H2 (94) Y F C A R H V L S G N - - - - - F D Y W G Q G T L T V S S SEQ ID NO: 30
7.9H5 (94) Y F C A R H V L S G N - - - - - F D Y W G Q G T L T V S S SEQ ID NO: 31
7.4A3-A (94) Y F C A R H V L S G N - - - - - F D Y W G Q G T L T V S S SEQ ID NO: 32
7.4A3-B (94) Y F C A R H V L S G N - - - - - F D Y W G Q G T L T V S S SEQ ID NO: 33
7.1C5-A (94) Y F C A R H E L N G N - - - - - F D Y W G Q G T L T V S S SEQ ID NO: 34
7.1C5-B (94) Y F C A R H E L N G N - - - - - F D Y W G Q G T L T V S S SEQ ID NO: 35
7.1G10 (94) Y F C A R H V L N G N - - - - - F D Y W G Q G T L T V S S SEQ ID NO: 36

Фиг. 7А

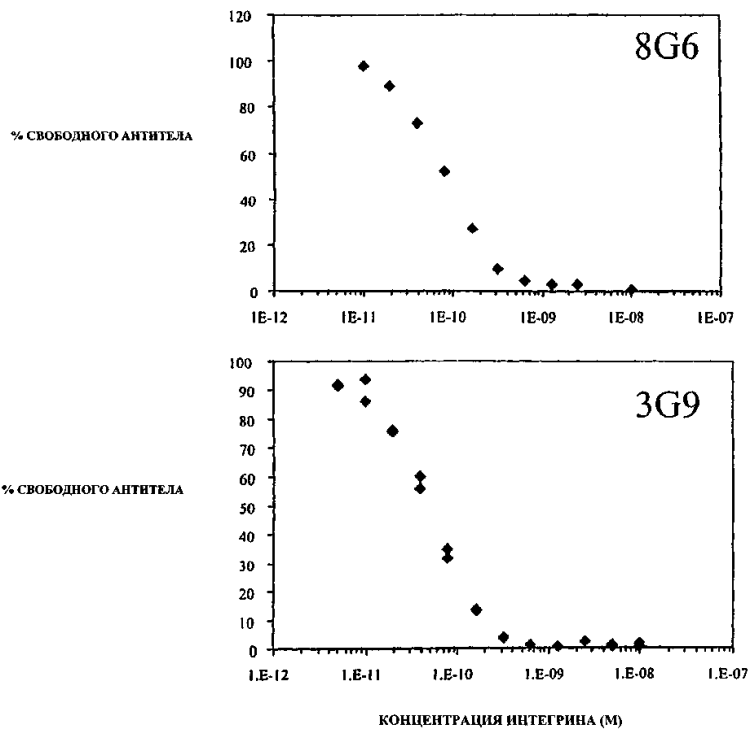
6.1A8	(1)	DIVLTQSPASLAVSLGQRATIS	CRASQSVSIST-YSY	IHWFKQKPGQPFLIKYASN	ESGVPARFSGSGSDTFLNIHPVEEDTAIYYC
6.8G6	(1)	DIVLTQSPASLAVSLGQRATIS	CRASQSVTSNS-YSY	MYHWYQKPGQSPFLIKYASN	ESGVPARFSGSGSDTFLNIHPVEEDTAIYYC
6.484	(1)	DVVMQTQPSRLPSVSLGQDASMS	CRSSQSLKSHNGDYL	IHWYLFQKPGQSPNLLIKVSN	FSGVDPRFTSGSGSDTEFTFKISRVDAEDLGVIYC
6.2A1	(1)	DIVMTQSHKFMSTVVGDRVSIT	CKASLDVR----	TAVAWYQKPGQSPKLLIYSASY	YTGVDPRFTSGSGSDTFTFNIRSVQAEIDLAVIYC
6.2G2	(1)	DIVMTQSHKFMSTVVGDRVSIT	CKASQAVN----	TAVAWYQKPGQSPKLLIYSASY	YTGVDPRFTSGSGSDTFTLTISSVQAEIDLAVIYC
7.1C5	(1)	DIQMTQSPSLASLGERVNLIT	RASQSEIG----	YLSWLQKPGDGTIRKLIIYAAT	DSGVPKRFSGSRGSDYSLTISLSESDPGDYIC
7.1G10	(1)	DIQMTQSPSLASLGERVNLIT	RASQSEIG----	YLSWLQKPGDGTIRKLIIYAAT	DSGVPKRFSGSRGSDYSLTISLSESDPGDYIC
6.2B10	(1)	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTIM	CSASSVS-----	YMHWWYQKSGTSPRRNIYDTSK	LASGVPRFRSGSGSGTSYSLTINSMEAVDAATYYC
7.7G5	(1)	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTIM	CSASSVS-----	YMHWWYQKSGTSPRRNIYDTSK	LASGVPRFRSGSGSGTSYSLTINSMEAVDAATYYC
6.2B1	(1)	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTIL	CSASSVSS-----	YLYWYQKPGQSPSPKLIYSTSN	LASRVPRFSGSGSGTSYSLTINSMEADAASYFC
6.309	(1)	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTIL	CSASSVSS-----	YLYWYQKSGQSPKLIYSTSN	LASGVPRFRSGSGSGTSYSLTINSMEADAASYFC

6.1A8	(93)	QHSWEIPYT	FGGGTKVEIK	SEQ ID NO:37
6.8G6	(93)	QHNWEIPTT	FGGGTKLEIK	SEQ ID NO:38
6.4B4	(94)	SGSTHVPTV	FGGGTRLEIK	SEQ ID NO:39
6.2A1	(89)	QQHYGIPWT	FGGGTKLEIK	SEQ ID NO:63
6.2G2	(89)	QHYYGVPWT	FGGGTKLEIK	SEQ ID NO:64
7.1C5	(89)	LQYASYPTT	FGGGAKLEIK	SEQ ID NO:40
7.1O10	(89)	LQYATPYPT	FGGGTKLEIK	SEQ ID NO:41
6.2B10	(88)	QQWTSNFFT	FGSGTKLGK	SEQ ID NO:42
7.7G5	(88)	QQWSSHPPT	FGAGTKLEIK	SEQ ID NO:43
6.2B1	(90)	HOWSSYPPT	FGGGTKLEIK	SEQ ID NO:44
6.3G9	(90)	HMWSTYPTT	FGGGTKLEIK	SEQ ID NO:45

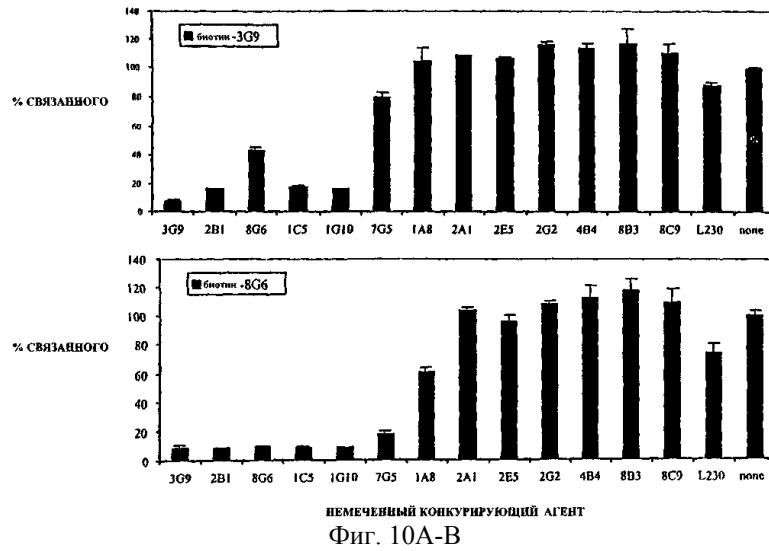
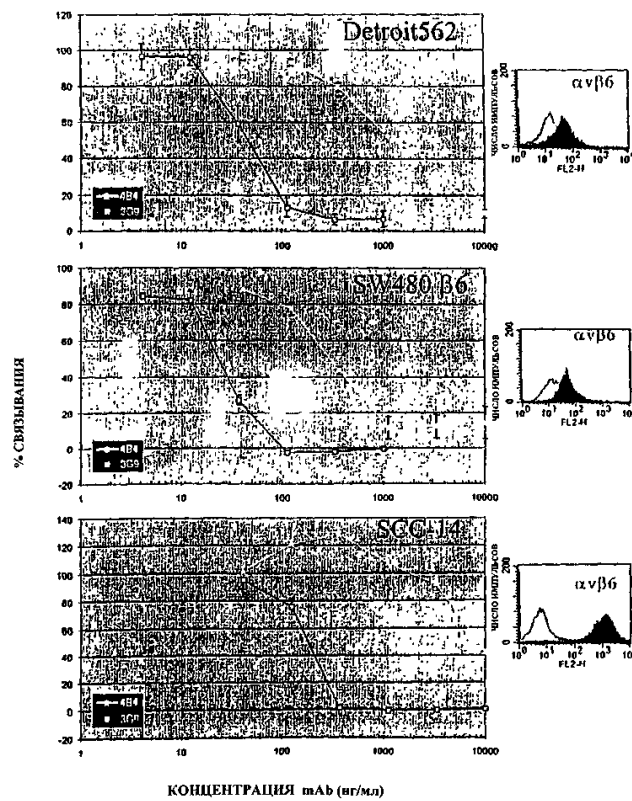
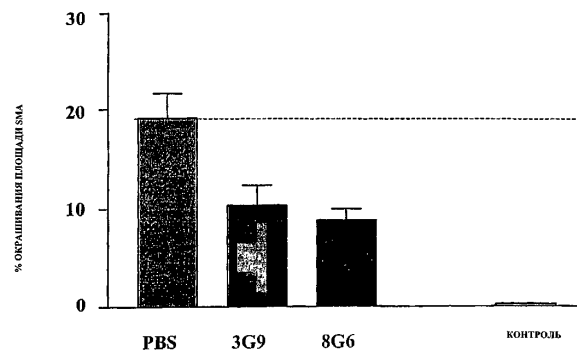
Фиг. 7В

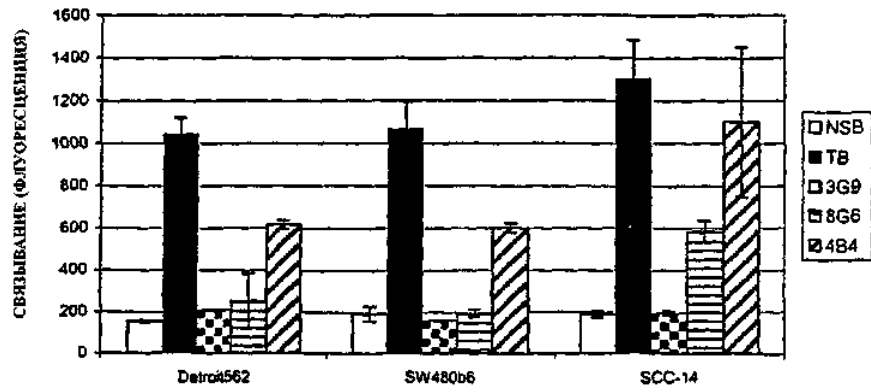
ЭКСПРЕССИЯ $\alpha V\beta 6$ ПРИ РАКЕ

КАРЦИНОМА
ФИГ. 8



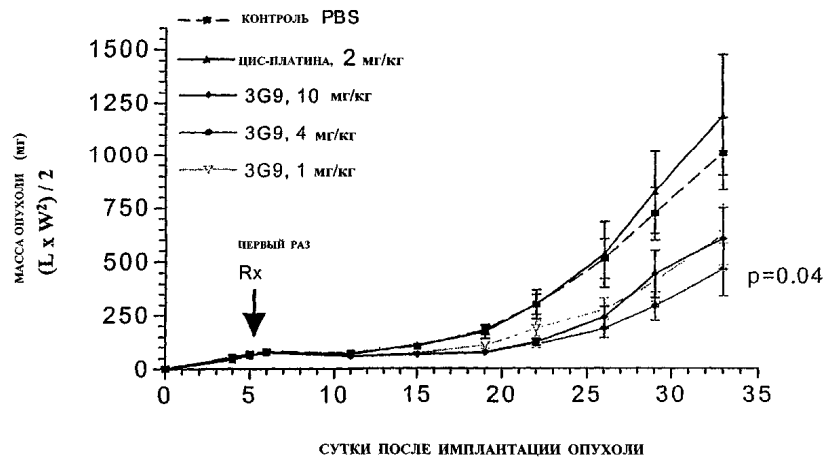
ФИГ. 9А-В

ЭФФЕКТ mAb ПРОТИВ $\alpha_v\beta_6$ НА ОКРАШИВАНИЕ ГЛАДКОМЫШЕЧНОГО АКТИНА ПРИ UO



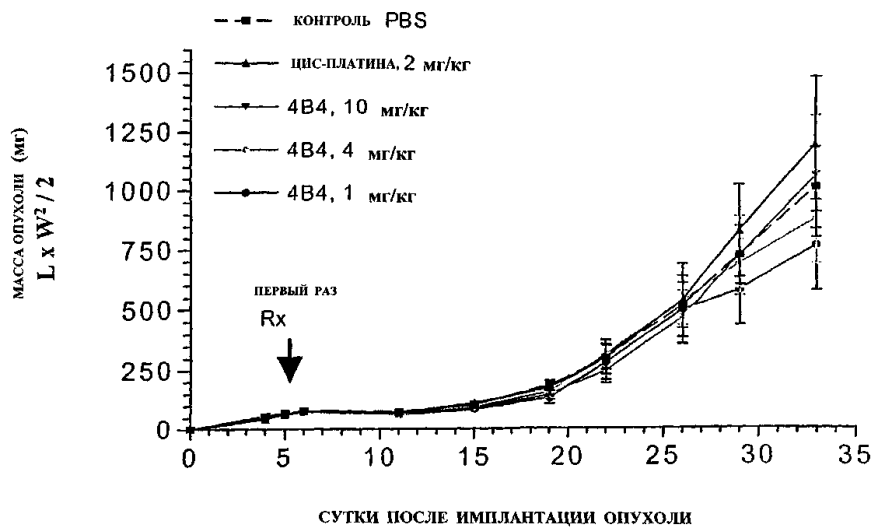
Фиг. 13

ОТВЕТ ИМПЛАНТИРОВАННЫХ ПОДКОЖНО КЛЕТОК ЛИНИИ ДЕТРОЙТ 562 КАРЦИНОМЫ
ГЛОТКИ ЧЕЛОВЕКА НА ЛЕЧЕНИЕ mAb 3G9 ПРОТИВ $\alpha v\beta 6$



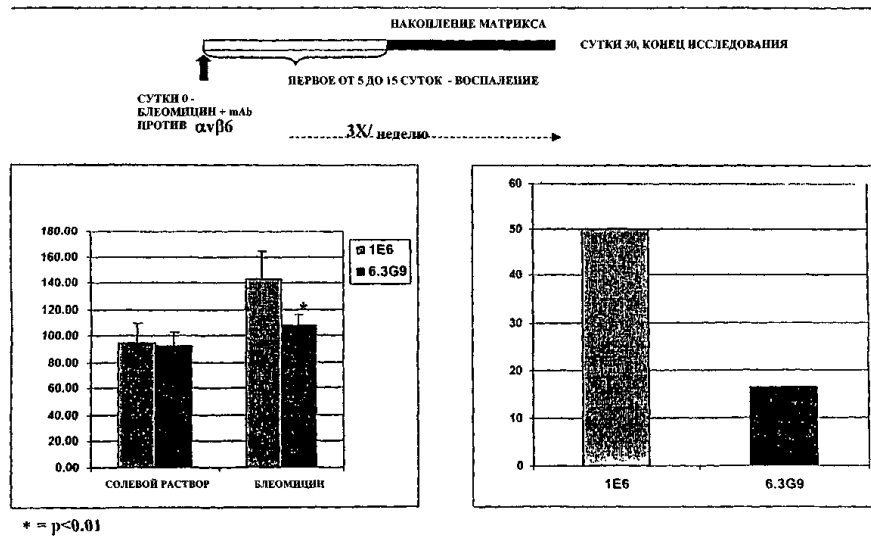
Фиг. 14А

ОТВЕТ ИМПЛАНТИРОВАННЫХ ПОДКОЖНО КЛЕТОК ЛИНИИ ДЕТРОЙТ 562 КАРЦИНОМЫ
ГЛОТКИ ЧЕЛОВЕКА НА ЛЕЧЕНИЕ mAb 4B4 ПРОТИВ $\alpha v\beta 6$



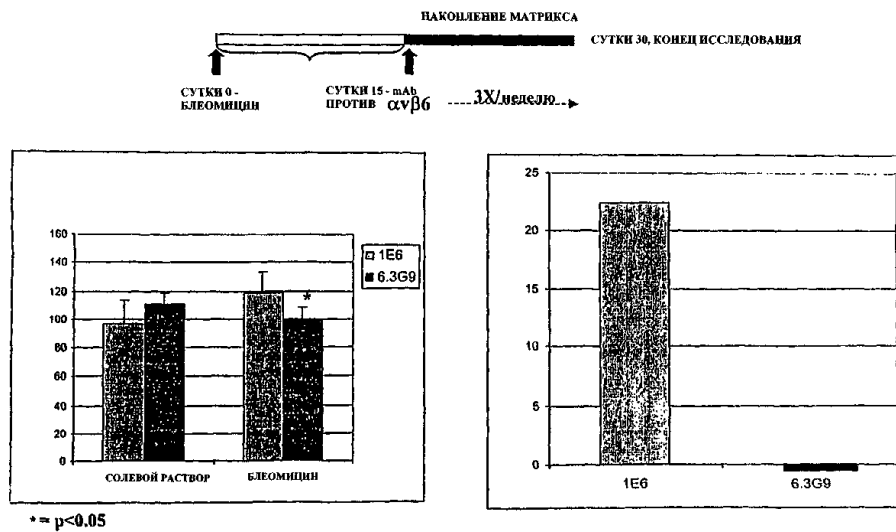
Фиг. 14В

ЭКСПЕРИМЕНТ ПО ИНДУЦИРОВАННОМУ
БЛЕОМИЦИННОМУ ФИБРОЗУ ЛЕГКИХ



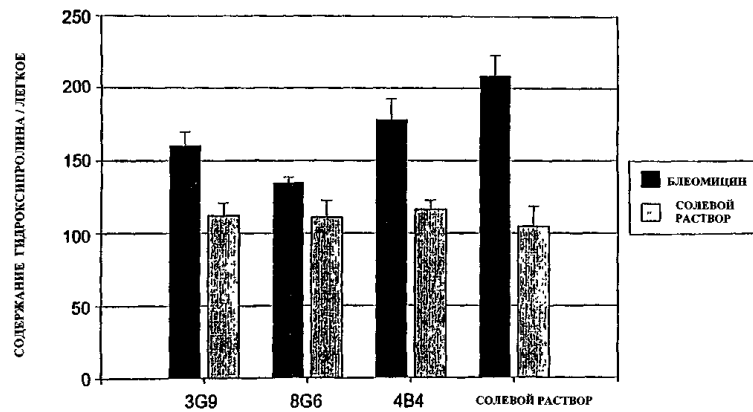
Фиг. 15А

ЭКСПЕРИМЕНТ ПО ИНДУЦИРОВАННОМУ
БЛЕОМИЦИННОМУ ФИБРОЗУ ЛЕГКИХ



Фиг. 15В

ЭФФЕКТЫ АБ ПРОТИВ БЕТА - 6 НА УРОВЕНЬ ГИДРОКСИПРОЛИНА



Фиг. 15С



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2