(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 035135 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.04.30

(21) Номер заявки
201270465

(22) Дата подачи заявки
2010.09.25

(51) Int. Cl. ***A61K 39/395*** (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
C07K 16/26 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛО, СВЯЗЫВАЮЩЕЕСЯ С РЕЦЕПТОРОМ ИНСУЛИНА ИЛИ КОМПЛЕКСОМ, ВКЛЮЧАЮЩИМ ИНСУЛИН И РЕЦЕПТОР ИНСУЛИНА, И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **61/246,067; 61/306,321; 61/358,749**
(32) **2009.09.25; 2010.02.19; 2010.06.25**
(33) **US**
(43) **2013.03.29**
(86) **PCT/US2010/050313**
(87) **WO 2011/038302 2011.03.31**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КСОМА (ЮЭС) ЭЛЭЛСИ (US)

(72) Изобретатель:
Корбин Джон, Уайт Марк Лесли, Уотсон Сьюзан Р., Бхаскар Винай (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) BLACKARD W.G. ET AL.: "Effect of Anti-Insulin Receptor Antibody on Insulin Dissociation from IM-9 lymphocytes", HORMONE AND METABOLIC RESEARCH, THIEME-STRATTON, STUTTGART, DE, vol. 13, no. 9, 1 September 1981 (1981-09-01), pages 480-483, XP008130135, ISSN: 0018-5043, figures 1-3

GU J.-L. ET AL.: "Reversal of insulin-induced negative cooperativity by monoclonal antibodies that stabilize the slowly dissociating ("Ksuper") state of the insulin receptor", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 150, no. 2, 29 January 1988 (1988-01-29), pages 694-701, XP024841921, ISSN: 0006-291X, DOI: DOI:10.1016/0006-291X(88)90447-0 [retrieved on 1988-01-29], figures 1-3

O'BRIEN R.M. ET AL.: "MONOCLONAL ANTIBODIES FOR THE HUMAN INSULIN RECEPTOR STIMULATE INTRINSIC RECEPTOR-KINASE ACTIVITY", BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, PORTLAND PRESS LTD, GB, vol. 14, 1 January 1986 (1986-01-01), pages 1021-1023, XP002940663, ISSN: 0300-5127, page 1022, left-hand column, paragraph 2; figure 1

BRUNETTI A. ET AL.: "Monoclonal antibodies to the human insulin receptor mimic a spectrum of biological effects in transfected 3T3HIR fibroblasts without activating receptor kinase", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 165, no. 1, 30 November 1989 (1989-11-30), pages 212-218, XP024841983, ISSN: 0006-291X, DOI: DOI:10.1016/0006-291X(89)91056-5 [retrieved on 1989-11-30], figures 1-4

HAWLEY D.M. ET AL.: "INSULIN RECEPTOR MONOCLONAL ANTIBODIES THAT MIMIC INSULIN ACTION WITHOUT ACTIVATING TYROSINE KINASE", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 264, no. 5, 1989, pages 2438-2444, XP007916417, ISSN: 0021-9258, figures 1-7

ROTH R.A. ET AL.: "Monoclonal antibodies to the insulin receptor", PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, ELSEVIER, GB, vol. 28, no. 1, 1 January 1985 (1985-01-01), pages 1-16, XP023858309, ISSN: 0163-7258, DOI: DOI:10.1016/0163-7258(85)90079-8 [retrieved on 1985-01-01], table 1

GOODMAN DAVID W. ET AL.: "Antibody binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor alters receptor affinity", JOURNAL OF RECEPTOR RESEARCH, NEW YORK, NY, US, vol. 14, no. 6-8, 1 January 1994 (1994-01-01), pages 381-398, XP008134485, ISSN: 0197-5110, DOI: DOI:10.3109/10799899409101511, figures 1-4

GILLES PONZIO ET AL.: "Insulin and rabbit anti-insulin receptor antibodies stimulate additively the intrinsic receptor kinase activity", EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 6, no. 2, 1 January 1987 (1987-01-01), pages 333-340, XP007917713, ISSN: 0261-4189, figures 1-6; tables I-III

JACOBS S. ET AL.: "Antibodies to Purified Insulin Receptor Have Insulin-Like Activity", SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, WASHINGTON, DC; US, vol. 200, 16 June 1978 (1978-06-16), pages 1283-1284, XP007917679, ISSN: 0036-8075, the whole document

ROTH R.A. ET AL.: "MONO CLONAL ANTIBODIES TO THE HUMAN INSULIN RECEPTOR BLOCK INSULIN BINDING AND INHIBIT INSULIN ACTION", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 79, no. 23, 1982, pages 7312-7316, XP007918025, ISSN: 0027-8424, figures 1-5

MARIA A SOOS ET AL.: "Monoclonal antibodies reacting with multiple epitopes on the human insulin receptor", BIOCHEMICAL JOURNAL, THE BIOCHEMICAL SOCIETY, LONDON, GB, vol. 235, no. 244, 1 January 1986 (1986-01-01), pages 199-208, XP007917677, ISSN: 0264-6021, figure 1; table I

BRINDLE N.P.J. ET AL.: "ANTI-INSULIN RECEPTOR MONOCLONAL ANTIBODY-STIMULATED TYROSINE PHOSPHORYLATION IN CELLS TRANSFECTED WITH HUMAN INSULIN RECEPTOR COMPLEMENTARY DNA",

035135 B1

035135 B1

BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 268, no. 3, 1990, pages 615-620, XP007916415, ISSN: 0264-6021, figures 1-6

STEELE-PERKINS G. ET AL.: "INSULIN-MIMETIC ANTI-INSULIN RECEPTOR MONOCLONAL ANTIBODIES STIMULATE RECEPTOR KINASE ACTIVITY IN INTACT CELLS", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 265, no. 16, 1990, pages 9458-9463, XP007916416, ISSN: 0021-9258, figures 1-7; table 1

MCKERN N.M. ET AL.: "Structure of the insulin receptor ectodomain reveals a folded-over conformation", NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, GB, vol. 443, no. 7108, 14 September 2006 (2006-09-14), pages 218-221, XP008102956, ISSN: 0028-0836, DOI: DOI:10.1038/NATURE05106 [retrieved on 2006-09-06], the whole document

US-A1-2003236190

US-A1-2004101904

LOU M. ET AL.: "The first three domains of the insulin receptor differ structurally from the insulin-like growth factor-1 receptor in the regions governing ligand specificity", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES (PNAS), NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, US, vol. 103, no. 33, 15 August 2006 (2006-08-15), pages 12429-12434, XP008102973, ISSN: 0027-8424, DOI: DOI:10.1073/PNAS.0605395103 [retrieved on 2006-08-07], the whole document

DE MEYTS PIERRE ET AL.: "Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design", NATURE REVIEWS. DRUG DISCOVERY, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 1, no. 10, 1 October 2002 (2002-10-01), pages 769-783, XP002541649, ISSN: 1474-1776, DOI: DOI:10.1038/NRD917, the whole document

TULLOCH P.A. ET AL.: "SINGLE-MOLECULE IMAGING OF HUMAN INSULIN RECEPTOR ECTODOMAIN AND ITS FAB COMPLEXES", JOURNAL OF STRUCTURAL BIOLOGY, ORLANDO, US, vol. 125, 1 March 1999 (1999-03-01), pages 11-18, XP000965557, ISSN: 1047-8477, DOI: DOI:10.1006/JSBI.1998.4066, the whole document

JOHN R. FORSAYETH ET AL.: "Effect of Monoclonal Antibodies on Human Insulin Receptor Autophosphorylation, Negative Cooperativity, and Down-regulatio", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, INC, US, vol. 262, no. 9, 25 March 1967 (1967-03-25), pages 4134-4140, XP007917676, ISSN: 0021-9258, the whole document

(57) Изобретение относится к антителу, связывающемуся с рецептором инсулина и/или комплексом, включающим инсулин и рецептор инсулина, с равновесной константой диссоциации K_D 10^{-5} М или менее, при этом антитело способно ослаблять аффинность связывания между инсулином и рецептором инсулина по меньшей мере примерно в 3 раза. Изобретение также относится к применению указанного антитела и к фармацевтической композиции для лечения или профилактики болезненных состояний, характеризующихся аномальной выработкой и/или использованием инсулина, включающей указанное антитело.

035135 B1

035135 B1

Перекрестная ссылка на родственную заявку на изобретение

Заявка на данный патент истребует приоритет предварительной заявки на патент США № 61/246067 от 25 сентября 2009 г., предварительной заявки на патент США № 61/306321 от 19 февраля 2010 г. и предварительной заявки на патент США № 61/358749 от 25 июня 2010 г., каждая из которых включена в данный документ во всей своей полноте посредством ссылки.

Область техники

Данное изобретение описывает новейшие модуляторы и/или агонисты сигнального комплекса инсулин/рецептор инсулина, а также способы скрининга таких модуляторов и/или агонистов. Такие модуляторы и/или агонисты могут, например, использоваться для лечения субъектов млекопитающих, страдающих от диабета 2 типа, ожирения, гипергликемии, гиперинсулинемии, передозировки инсулина, хронического заболевания почек, диабета 1 типа, резистентности к инсулину и других болезненных состояний и условий, характеризующихся резистентностью к инсулину, или для профилактики подобных состояний у субъекта, характеризующегося риском возникновения таких состояний.

Уровень техники

Данное изобретение описывает новейшие модуляторы и/или агонисты сигнального комплекса инсулин/рецептор инсулина, способы скрининга таких модуляторов и/или агонистов и применение таких модуляторов и/или агонистов в лечении или профилактике болезненных состояний и условий, характеризующихся аномальной выработкой и/или использованием инсулина.

Пептидный гормон инсулин является основным регулятором гомеостаза глюкозы и роста клеток. Первый этап действия инсулина состоит в связывании гормона с рецептором инсулина (INSR), встроенным гликопротеином мембраны, обозначаемым также CD220 или HHF5. INSR принадлежит к суперсемейству рецепторов факторов роста тирозинкиназы и состоит из двух внеклеточных α-единиц, связывающих инсулин, и двух трансмембранных β-субъединиц с присущей им тирозинкиназной активностью. Аминокислотная последовательность INSR описана в патенте США 4761371 и в виде эталонной последовательности NCBI NP_000199.2. INSR экспрессируется в двух изоформах - INSR-A и INSR-B. Трехмерная структура интактного гомодимерного фрагмента эктодомена INSR человека была изучена с использованием рентгеновской кристаллографии (WO 07/147213). Изоформы INSR также образуют гетеродимеры INSR-A/INSR-B и гибридные рецепторы INSR/IGF-1R, чья роль в физиологии и заболевании еще до конца не выяснена (Belfiore et al., Endocrine Rev., 30(6):586-623, 2009).

При связывании инсулина с INSR, рецептор активируется аутофосфорилированием тирозина, и тирозинкиназа INSR фосфорилирует различные эффекторные молекулы, включая субстрат инсулинового рецептора-1 (IRS-1), что приводит гормон к действию (Ullrich et al., Nature 313: 756-761, 1985; Goldfine et al., Endocrine Reviews 8: 235-255, 1987; White and Kahn, Journal Biol. Chem. 269: 1-4, 1994). Связывание IRS-1 и фосфорилирование, в конце концов, приводит к повышению количества молекул высокоаффинного переносчика глюкозы (Glut4) на внешней мембране реагирующих на инсулин тканей, включая мышечные клетки и жировую ткань, и, следовательно, к повышению усвоения глюкозы из крови в этих тканях. Glut4 переносится из клеточных везикул к поверхности клетки, где он может опосредовать транспорт глюкозы в клетку. Снижение передачи сигнала INSR приводит к снижению усвоения глюкозы клетками, гипергликемии (повышении количества циркулирующей глюкозы) и всем остальным последствиям.

Снижение в поглощении глюкозы может привести к резистентности к инсулину, что описывается состоянием, при котором физиологических количеств инсулина недостаточно для выработки нормального ответа на инсулин клетками или тканями. Тяжелая степень резистентности к инсулину ассоциируется с диабетом, в то время как менее тяжелая степень резистентности к инсулину также ассоциируется с целым рядом болезненных состояний и условий, присутствующих примерно у 30-40% лиц, не страдающих диабетом (проанализировано в Woods et al., End, Metab & Immune Disorders - Drug Targets 9: 187-198, 2009).

Имеющиеся на данный момент способы лечения диабета и резистентности к инсулину направлены на улучшение секреции инсулина, снижение выработки глюкозы и повышение действия инсулина.

В настоящее время существуют различные фармакологические способы лечения диабета 2 типа (Scheen et al., Diabetes Care, 22(9):1568-1577, 1999; Zangeneh et al., Mayo Clin. Proc. 78: 471-479, 2003; Mohler et al., Med Res Rev 29(1): 125-195, 2009). Они действуют посредством различных механизмов действия:

1) сульфонилмочевина (например, глимепирид, глисентид, сульфонилмочевина, AY31637) существенно стимулирует секрецию инсулина;

2) бигуаниды (например, метформин) действуют путем способствования утилизации глюкозы, снижая выработку глюкозы в печени и уменьшая выход глюкозы из кишечника;

3) ингибиторы альфа-глюкозидазы (например, акарбоза, миглитол) замедляют расщепление углеводов и последующую абсорбцию из желудка и снижают постпрандиальную гипергликемию;

4) тиазол-идинедионы (например, троглитазон, пиоглитазон, розиглитазон, глипизид, балаглитазон, ривоглитазон, нетоглитазон, троглитазон, энглитазон, AD 5075, T 174, YM 268, R 102380, NC 2100, NIP 223, NIP 221, MK 0767, циглитазон, адаглитазон, CLX 0921, дарглитазон, CP 92768, BM 152054) повы-

шают действие инсулина, способствуя, таким образом, утилизации глюкозы в периферических тканях;

5) глюкагон-подобные пептиды и агонисты (например, эксендин) или их стабилизаторы (например, ингибиторы DPP4, такие как ситаглиптин) усиливают стимулированную глюкозой секрецию инсулина; и

6) инсулин или его аналоги (например, LANTUS®) стимулируют утилизацию глюкозы в тканях и ингибируют выработку глюкозы в печени.

Представленные выше фармакологические способы могут использоваться индивидуально или в виде комбинированной терапии. Однако каждый способ имеет свои ограничения и нежелательные эффекты. С течением времени снижается ответ на такие агенты у большого процентного показателя субъектов с диабетом 2 типа. У 63% пациентов с диабетом 2 типа отмечается невозможность достижения глобальных уровней HbA_{1c} <7% по представлению Американской диабетической ассоциации, и такие пациенты имеют высокий риск развития осложнений. Более того, практически всегда у пациентов отмечают прогрессирование через стадии снижения функции поджелудочной железы. Лечение инсулином обычно начинают после того, как применение диеты, упражнений и пероральных препаратов было безуспешным в соответствующем контроле уровня глюкозы в крови. Недостатками лечения инсулином являются необходимость во введении препарата, потенциальное возникновение гипогликемии и увеличение веса. Вследствие этого, все еще существует настоятельная потребность в новейших противодиабетических препаратах.

Антитела, связывающиеся с INSR человека, были описаны в следующих источниках: Soos et al., Biochem. J. 235: 199-208, 1986; Taylor et al., Biochem. J. 242: 123-129, 1987; Prigent et al., J. Biol. Chem. 265(17):9970-9977, 1990; Brindle et al., Biochem. J. 268: 615-620, 1990; Steele-Perkins and Roth, J. Biol. Chem. 265(16): 9458-9463, 1990; McKern et al., Nature 443(14): 218-221; Boado et al., Biotech and BioEng. 96(2): 381-391; WO04/050016; Roth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 7312-7316, 1982; Morgan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 328-332, 1986; Lebrun et al., J. Bl. Chem. 268(15): 11272-11277, 1993; Forsayeth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3448-3451, 1987; Forsayeth et al., J. Biol. Chem. 262(9): 4134-4140, Goodman et al., J. Receptor Res. 14(6-8), 381-398, 1994; Ganderton et al., Biochem J. 288: 195-205, 1992; Spasov et al., Bull, of Exp. Biol. and Med. 144(1): 46-48, 2007; EP 2036574 A1.

Сущность изобретения

Данное изобретение описывает полипептидные связующиеся агенты, например, антитела или их фрагменты, которые модулируют и/или агонизируют сигнальный комплекс инсулин/INSR путем связывания с внеклеточными участками INSR, неучаствующих в комплексе с инсулином, с INSR, участвующих в комплексе с инсулином, или обоими INSR. INSR является связанным с мембраной поверхностным рецептором клеток.

В одном аспекте изобретение относится к к антителу, связывающемуся с (i) рецептором инсулина или (ii) комплексом, включающим инсулин и рецептор инсулина, или связывающемуся с (i) и (ii), с равновесной константой диссоциации K_D 10^{-5} М или менее; при этом антитело способно ослаблять аффинность связывания между инсулином и рецептором инсулина по меньшей мере примерно в 3 раза, где антитело включает (a) все шесть CDR Ab081 (SEQ ID NO: 279, 139) или (b) вариабельный участок тяжелой цепи SEQ ID NO: 279 и вариабельный участок легкой цепи SEQ ID NO: 139.

В другом аспекте изобретение относится к антителу, связывающемуся с (i) рецептором инсулина или (ii) комплексом, включающим инсулин и рецептор инсулина, или связывающемуся с (i) и (ii), с равновесной константой диссоциации K_D 10^{-5} М или менее; при этом антитело способно ослаблять аффинность связывания между инсулином и рецептором инсулина по меньшей мере примерно в 3 раза, где антитело включает (a) все шесть CDR Ab061 (SEQ ID NO: 241, 103) или (b) вариабельный участок тяжелой цепи SEQ ID NO: 241 и вариабельный участок легкой цепи SEQ ID NO: 103.

В еще одном аспекте изобретение относится к антителу, связывающемуся с (i) рецептором инсулина или (ii) комплексом, включающим инсулин и рецептор инсулина, или связывающемуся с (i) и (ii), с равновесной константой диссоциации K_D 10^{-5} М или менее; при этом антитело способно ослаблять аффинность связывания между инсулином и рецептором инсулина по меньшей мере примерно в 3 раза, где антитело включает (a) все шесть CDR Ab070 (SEQ ID NO: 258, 119) или (b) вариабельный участок тяжелой цепи SEQ ID NO: 258 и вариабельный участок легкой цепи SEQ ID NO: 119.

В одном из вариантов осуществления антитело по изобретению способно ослаблять аффинность связывания между указанным инсулином и рецептором инсулина примерно от 3 до 500 раз.

В другом варианте осуществления антитело по изобретению повышает EC_{50} сигнальной активности инсулина примерно от 2 до 1000 раз в pAKT анализе.

В следующем варианте осуществления антитело по изобретению включает константный участок IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека.

В еще одном варианте осуществления константный участок включает Fc участок с измененной эффекторной функцией.

В следующем варианте осуществления антитело по изобретению является моноклональным антителом, при этом моноклональное антитело, в частности, является человеческим, гуманизированным, химерным или одноцепочечным (scFv) антителом, или конъюгированным с гидрофобной молекулой.

В следующем аспекте изобретение относится к стерильной фармацевтической композиции для ле-

чения или профилактики болезненных состояний, характеризующихся аномальной выработкой и/или использованием инсулина, включающей антитело по изобретению и стерильный фармацевтически приемлемый разбавитель.

В еще одном аспекте изобретение относится к применению антитела по изобретению при получении лекарственного средства для лечения состояния, ассоциированного с гиперинсулинемией или избыточной инсулиновой сигнализацией, инсулиномы, передозировки инсулином, гипогликемии, незидиобластоза (диффузного заболевания КАТР-Н1, фокального заболевания КАТР-Н1 или "PHHI"), GDH-H1 (синдрома гиперинсулинизма/гипераммониемии (HI/HA), лейцин-чувствительной гипогликемии или диазоксид-чувствительной гипогликемии), синдрома дисрегуляции островковых клеток, идиопатической гипогликемии у младенцев, персистирующей гиперинсулинемической гипогликемии младенцев (PHHI), врожденного гиперинсулинизма, гипогликемии, вызванной почечной недостаточностью (острой или хронической), и гипогликемии, вызванной хроническим заболеванием почек.

Известно, что каждый параметр или вариант воплощения изобретения, или комбинация, описанные в тексте данного изобретения, являются неограничивающим, иллюстративным примером любого из аспектов изобретения и, вследствие этого, могут быть скомбинированы с любым другим параметром или вариантом воплощения изобретения, или комбинацией, описанными в тексте данного изобретения. Например, если параметры описаны с использованием таких значений, как "один вариант воплощения изобретения", "некоторые варианты воплощения изобретения", "дополнительный вариант воплощения изобретения", "специфические типичные варианты воплощения изобретения" и/или "другой вариант воплощения изобретения", каждый из таких типов вариантов воплощения изобретения является неограничивающим примером параметра, который может быть скомбинирован с любым другим параметром или комбинацией параметров, описанных в тексте данного изобретения без перечисления каждой возможной комбинации. Такие параметры или комбинации параметров применимы к любым аспектам изобретения. Подобным образом, если способ описывает идентификацию связующих агентов полипептидов, таких как антитела, характеризующиеся определенными параметрами, связующие полипептиды агенты характеризуются параметрами, которые также предусмотрены изобретением. Если представлены примеры со значениями, включенными в описанные диапазоны, предусматривается любой из таких примеров с возможными конечными точками диапазона, предусматриваются все числовые значения между такими конечными точками, а также предусматриваются любые и все комбинации верхних и нижних конечных точек.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 отображает репрезентативные результаты для рецептора INSR, показывающие связывание исследуемых антител с клетками IM-9, экспрессирующими INSR, в присутствии и отсутствии инсулина.

Фиг. 2 отображает репрезентативные результаты биотинилированного лиганда, отображающие влияние исследуемых антител на связывание инсулина с рецептором инсулина.

Фиг. 3 отображает результаты анализа, измеряющего способность исследуемых антител модулировать инсулинозависимое фосфорилирование pIRS-1.

Фиг. 4 отображает результаты анализа активности pIRS-1, отображающие связывание репрезентативных антител с INSR из различных функциональных классов: A) Положительные модуляторы; B) Положительные модуляторы со значительным агонизмом; C) Немодуляторы; D) Агонистические антитела; E) Отрицательные модуляторы.

Фиг. 5 представляет таблицу, показывающую значения EC_{50} инсулина для репрезентативных антител из анализа pIRS-1, ранжированных в соответствии с соотношением EC_{50} +AT/-AT.

Фиг. 6 отображает результаты анализа pAKT для репрезентативных антител: A) Положительный модулятор с очень низким агонизмом; B) Положительный модулятор с агонизмом; C) Агонистические антитела; D) 83-7; E) Инсулиновый и иммунный ответ в отсутствии антитела.

Фиг. 7 представляет таблицу, показывающую агонизм и перекрестную реакционную способность у мыши репрезентативных исследуемых антител (но=не определено).

Фиг. 8 отображает результаты анализа pAKT, представляющие изменения в чувствительности (EC_{50}, кратные изменения в EC_{50}) и кооперативный эффект (уклон Хилла) ответа на дозу инсулина под воздействием положительного модулирующего антитела к INSR при четырех различных концентрациях. Фиг. 8A отображает результаты графически, в то время как фиг. 8B отображает результаты в табличной форме.

Фиг. 9 иллюстрирует улучшения инсулинозависимого усвоения глюкозы под действием положительного модулирующего антитела. Усвоение ^{3}H-2-дезоксиглюкозы в клетках 3T3-L1 было индуцировано 0,8 нМ инсулином в присутствии 10 мкг/мл исследуемого антитела Ab001 или контрольного изотипа антитела к KLH.

Фиг. 10 отображает уровни глюкозы в крови мышей линии DIO в возрасте 20 недель, находящихся на диете с высоким содержанием жиров и подвергнутых лечению частичными агонистическими антителами к INSR: A. Линейный график уровней глюкозы; B. Столбчатая диаграмма уровней глюкозы, отображающая статистически значимое снижение уровня глюкозы после введения частичного агонистического антитела к INSR.

Фиг. 11 отображает доказательство того, что введение частичного агонистического антитела к INSR

повышает гликемический контроль у мышей линии DIO: A. Динамика результатов пробы на переносимость глюкозы; B. Уровни глюкозы в крови натощак; C. Проба на переносимость глюкозы; площадь под кривой (AUC).

Фиг. 12 отображает доказательство того, что положительное модулирующее антитело к INSR повышает чувствительность к инсулину у мышей линии DIO: A. Динамика результатов пробы на переносимость инсулина; B. Уровни глюкозы в крови натощак; C. Проба на переносимость инсулина; площадь под кривой (AUC).

Фиг. 13 отображает доказательство того, что положительное модулирующее антитело к INSR улучшает гликемический контроль у мышей линии DIO: A. Динамика результатов пробы на переносимость глюкозы; B. Уровни глюкозы в крови натощак; C. Проба на переносимость глюкозы; площадь под кривой (AUC).

Фиг. 14 показывает, что положительные модулирующие и частичные агонистические антитела к INSR улучшают уровни триглицеридов и холестерина у мышей линии DIO. Уровни триглицеридов и холестерина в плазме были измерены у мышей линии DIO в возрасте 30 недель, которым интраперитонеально (и/п) вводили Ab001, Ab037 или контрольный изотип (10 мг/кг; *p<0,05 относительно контрольного изотипа/HFD): A. Уровни триглицеридов в плазме; B. Уровни холестерина в плазме.

Фиг. 15 отображает улучшение гликемического контроля у мышей линии DIO после введения положительных модулирующих и частичных агонистических антител к INSR. Измерение гликемического контроля проводили у мышей линии DIO, которым интраперитонеально (и/п) вводили Ab001, Ab037, Ab083, Ab085 или контрольный изотип (10 мг/кг; *p<0,05 относительно контрольного изотипа/HFD): A. Динамика результатов пробы на переносимость глюкозы; B. Проба на переносимость глюкозы; площадь под кривой (AUC); C. Уровни глюкозы в крови натощак.

Фиг. 16 отображает положительные модулирующие и частичные агонистические антитела к INSR, которые улучшают гликемические параметры, резистентность к инсулину и/или дислипидемию у мышей линии DIO в возрасте 18 недель, подвергнутых лечению MAT в течение 4 недель. Был проведен анализ плазмы мышей линии DIO, которым интраперитонеально (и/п) вводили Ab001, Ab037, Ab083, Ab085 или контрольный изотип в течение 4 недель (10 мг/кг; *p<0,05 относительно контрольного изотипа/HFD): A. Уровни глюкозы в плазме; B. Уровни инсулина в плазме; C. HOMA-IR; D. Уровни триглицеридов в плазме; E. Уровни неэтерифицированного холестерина в плазме; F. Уровни общего холестерина в плазме; G. Уровни холестеринов ЛПНП в плазме; H. Соотношение ЛПНП/ЛПВП холестерина в плазме.

Фиг. 17 отображает доказательство того, что положительные модулирующие и частичные агонистические антитела к INSR снижают набор веса у мышей линии DIO, что оценивали по измерению массы тела у мышей линии DIO в возрасте 18 недель, которым интраперитонеально (и/п) вводили Ab001, Ab037, Ab083, Ab085 или контрольный изотип в течение 3 недель (10 мг/кг; *p<0,05 относительно контрольного изотипа/HFD): A. Процентное изменение в массе тела относительно массы тела до введения дозы; B. Процентное изменение в массе тела относительно массы тела до введения дозы: Площадь под кривой.

Фиг. 18 отображает нормализацию набора веса у мышей линии db/db под воздействием положительных модулирующих и частичных агонистических антител к INSR, что было оценено путем измерения массы тела у мышей линии db/db в возрасте 5 недель, которым интраперитонеально (и/п) вводили Ab001 (1 мг/кг или 10 мг/кг), Ab037 (10 мг/кг) или контрольный изотип (1 мг/кг или 10 мг/кг) в течение 14 недель (*p<0,05 относительно контрольного изотипа): A. Процентное изменение в массе тела относительно массы тела до введения дозы до 35 дня исследования; B. Процентное изменение в массе тела относительно массы тела на 35 день исследования; C. Процентное изменение в массе тела относительно массы тела до введения дозы до 35 дня исследования: Площадь под кривой; D. Процентное изменение в массе тела относительно массы тела на 35 день исследования: Площадь под кривой.

Фиг. 19 отображает доказательство того, что положительное модулирующее антитело снижает уровень глюкозы в крови натощак и HbA1c у мышей линии db/db, что было оценено с использованием измерения гликемического контроля у мышей линии db/db в возрасте 5 недель, которым интраперитонеально (и/п) вводили Ab001 (1 мг/кг или 10 мг/кг), Ab037 (10 мг/кг) или контрольный изотип (1 мг/кг или 10 мг/кг) в течение 14 недель (*p<0,05 относительно контрольного изотипа при одинаковой дозе): A. Уровни глюкозы в крови натощак; B. % уровни HbA1c.

Фиг. 20 отображает тот факт, что введение положительного модулирующего антитела улучшает дислипидемию у мышей линии db/db. Был проведен анализ плазмы, взятой у мышей линии db/db в возрасте 5 недель, которым интраперитонеально (и/п) вводили Ab001 (1 мг/кг или 10 мг/кг), Ab037 (10 мг/кг) или контрольный изотип (1 мг/кг или 10 мг/кг) в течение 14 недель (*p<0,05 относительно контрольного изотипа при одинаковой дозе): A. Уровни инсулина в плазме; B. Уровни триглицеридов в плазме; C. Уровни неэтерифицированного холестерина в плазме; D. Уровни общего холестерина в плазме; E. Уровни холестерина ЛПНП в плазме; F. Соотношение холестерина ЛПНП/ЛПВП в плазме.

Фиг. 21 отображает тот факт, что введение положительного модулирующего антитела снижает уровень глюкозы в крови натощак у мышей линии db/db. Еженедельно была проведена оценка уровня глюкозы натощак у мышей линии db/db в возрасте 5 недель, которым интраперитонеально (и/п) вводили

Ab001 (1 мг/кг или 10 мг/кг), Ab037 (10 мг/кг) или контрольный изотип (1 мг/кг или 10 мг/кг) в течение 14 недель (*p<0,05 для Ab085 относительно контрольного изотипа при одинаковой дозе).

Фиг. 22 иллюстрирует тот факт, что положительные модулирующие антитела повышают резистентность к инсулину у мышей линии db/db, что было оценено путем анализа плазмы, взятой у мышей линии db/db в возрасте 5 недель, которым интраперитонеально (и/п) вводили Ab001, Ab037, Ab083, Ab085 или контрольный изотип в течение 4 недель (10 мг/кг; *p<0,05 относительно контрольного изотипа при одинаковой дозе), и также отображает гомеостатическую модель оценки резистентности к инсулину (HOMA-IR) после 4 недель введения дозы.

Фиг. 23 отображает тот факт, что положительные модулирующие и частично агонистические антитела к INSR улучшают гликемический контроль у мышей линии MLDS/HFD. Измерение гликемического контроля проводили у мышей линии MLDS/HFD в возрасте 10 недель, которым интраперитонеально (и/п) вводили Ab001, Ab037 или контрольный изотип (10 мг/кг; *p<0,05 относительно контрольного изотипа): A. Динамика результатов пробы на переносимость глюкозы; B. Проба на переносимость глюкозы; площадь под кривой (AUC); C. Уровни глюкозы в крови натощак.

Фиг. 24 отображает тот факт, что введение частичного агонистического антитела снижает уровни глюкозы в крови на полный желудок и HbA1c у мышей линии MLDS/HFD. Измерение гликемического контроля проводили у мышей линии MLDS/HFD в возрасте 10 недель, которым интраперитонеально (и/п) вводили Ab001, Ab037 или контрольный изотип в течение 6 недель (10 мг/кг; *p<0,05 относительно контрольного изотипа): A. Уровни глюкозы в крови на полный желудок; B. % уровни HbA1c.

Фиг. 25 отображает тот факт, что положительные модулирующие и/или частичные агонистические антитела к INSR частично корректируют уровни инсулина, лептина и холестерина ЛПНП/ЛПВП у мышей линии MLDS/HFD. Измерение уровней холестерина, инсулина и лептина проводили у мышей линии MLDS/HFD в возрасте 10 недель, которым интраперитонеально (и/п) вводили Ab001, Ab037 или контрольный изотип в течение 6 недель (10 мг/кг; *p<0,05 относительно контрольного изотипа): A. Соотношение холестерина ЛПНП/ЛПВП в плазме; B. Уровни инсулина в плазме; C. Уровни лептина в плазме.

Фиг. 26 отображает тот факт, что положительные модулирующие и частично агонистические антитела к INSR не влияют на массу тела у мышей линии MLDS/HFD. Измерение массы тела проводили у мышей линии MLDS/HFD в возрасте 10 недель, которым интраперитонеально (и/п) вводили Ab001, Ab037 или контрольный изотип в течение 6 недель (10 мг/кг), и результаты выражены в виде процентного изменения массы тела относительно массы тела до введения дозы.

Фиг. 27 отображает тот факт, что положительные модулирующие и частично агонистические антитела к INSR улучшают гликемический контроль у мышей линии MLDS/HFD. Пробу на переносимость глюкозы (ППГ) проводили у мышей линии MLDS/HFD в возрасте 10 недель, которым интраперитонеально (и/п) вводили Ab001, Ab037 или контрольный изотип в течение 3 недель (10 мг/кг; *p<0,05 относительно контрольного изотипа:. A. Динамика результатов пробы на переносимость глюкозы; B. Проба на переносимость глюкозы; площадь под кривой (AUC).

Фиг. 28 отображает тот факт, что положительные модулирующие и частичные агонистические антитела к INSR улучшают гликемический контроль у мышей линии MLDS/HFD, что было определено путем еженедельной оценки уровня глюкозы в крови натощак у мышей линии MLDS/HFD в возрасте 10 недель, которым интраперитонеально (и/п) вводили Ab001, Ab083, Ab085, Ab037 или контрольный изотип в течение 6 недель (10 мг/кг; *p<0,05 для Ab083 и Ab037 относительно контрольного изотипа).

Фиг. 29 отображает тот факт, что положительные модулирующие и частично агонистические антитела к INSR улучшают дислипидемию у мышей линии MLDS/HFD. Был проведен анализ плазмы, взятой у мышей линии MLDS/HFD в возрасте 10 недель, которым интраперитонеально (и/п) вводили Ab001, Ab083, Ab085, Ab037 или контрольный изотип в течение 6 недель (10 мг/кг; *p<0,05 относительно контрольного изотипа): A. Уровни триглицеридов в плазме; B. Уровни свободных жирных кислот в плазме; C. Уровни неэтерифицированного холестерина в плазме; D. Уровни общего холестерина в плазме; E. Уровни холестерина ЛПНП в плазме; F. Соотношение холестерина ЛПНП/ЛПВП в плазме.

Фиг. 30 отображает тот факт, что положительные модулирующие и частичные агонистические антитела к INSR улучшают гликемический контроль (HbA1c) у мышей линии MLDS/HFD, что было определено путем еженедельной оценки HbA1c у мышей линии MLDS/HFD в возрасте 10 недель, которым интраперитонеально (и/п) вводили Ab001, Ab083, Ab085, Ab037 или контрольный изотип в течение 6 недель (10 мг/кг; *p<0,05 для Ab083 и Ab037 относительно контрольного изотипа).

Фиг. 31 отображает тот факт, что положительные модулирующие и частичные агонистические антитела к INSR, как правило, не влияют на массу тела у мышей линии MLDS/HFD, что определено с использованием измерений у мышей линии MLDS/HFD в возрасте 10 недель, которым интраперитонеально (и/п) вводили Ab001, Ab083, Ab085, Ab037 или контрольный изотип в течение 6 недель (10 мг/кг).

Фиг. 32 отображает тот факт, что положительные модулирующие и частичные агонистические антитела к INSR повышают инсулиновую сигнализацию in vivo. Шести самцам мышей линии C56BL в возрасте 10 недель вводили Ab083, Ab085, Ab037 или контрольный изотип (10 мг/кг) в течение 24 ч, и влияние на печень (A) и мышцы (B) тирозинового фосфорилирования INSR было определено путем ИФА после болюсного введения инсулина.

Фиг. 33 представляет таблицу, указывающую характеристики связывания INSR-специфических антител, преобразованных с использованием константного участка IgG2.

Фиг. 34 иллюстрирует ответ на дозу частичного аллостерического агонистического антитела к INSR относительно ответа на дозу эндогенного лиганда (A) или активирующего лиганда (B) в присутствии или отсутствии аллостерического агонистического антитела.

Фиг. 35 отображает ответ на дозу положительного модулирующего антитела в сравнении с ответом на дозу эндогенного лиганда (A) или ответом на дозу эндогенного лиганда в присутствии или отсутствии положительного модулирующего антитела (B).

Фиг. 36 иллюстрирует активирующие параметры для ряда частичных аллостерических агонистов в сравнении с эндогенным лигандом инсулина. Данные получены в ходе измерений процентного фосфорилирования Akt при Ser473.

Фиг. 37 иллюстрирует активационные свойства инсулина в присутствии 10 мкг/мл частичных аллостерических агонистических антител в сравнении с максимальным ответом на эндогенный лиганд в присутствии отрицательного контрольного антитела. Данные получены в ходе измерений процентного фосфорилирования Akt при Ser473.

Фиг. 38-40 отображают активацию pAkt антителами в отсутствии инсулина или в присутствии субмаксимальной концентрации инсулина для материнских клеток CHO-K1, клеток CHO-K1, экспрессирующих рецептор инсулина человека, и клеток CHO-K1, экспрессирующих рецептор инсулина мыши. Фиг. 38A-C отображают влияние сенсибилизирующих антител (Ab077, Ab078, Ab085) с незначительной или отсутствующей агонистической активностью pAkt (<10% pAkt активирование в отсутствии инсулина с антителом 50 мкг/мл). Фиг. 39A-C отображают влияние сенсибилизирующих антител (Ab001, Ab079, Ab083) со слабой или умеренной агонистической активностью pAkt (10-20% pAkt активирование в отсутствии инсулина с антителом 50 мкг/мл). Фиг. 40 отображает влияние сенсибилизирующего антитела (Ab080) с умеренной агонистической активностью pAkt (>20% pAkt активирование в отсутствии инсулина с антителом 50 мкг/мл).

Фиг. 41 отображает инсулинозависимую активацию pAkt в клетках CHO, экспрессирующих INSR человека (A и C) или мыши (B) в присутствии фиксированных концентраций сенсибилизирующих антител к INSR.

Фиг. 42 отображает активацию pAkt в клетках CHO, экспрессирующих INSR человека (A) или мыши (B), частичными аллостерическими агонистическими антителами в присутствии инсулина в сравнении с только инсулином.

Фиг. 43 отображает результаты инсулинозависимой активации pAkt в клетках CHO, экспрессирующих INSR человека, в присутствии фиксированных концентраций частичных аллостерических агонистических антител.

Фиг. 44 отображает результаты анализа pAKT для антитела 83-7 и Ab001 на клетках CHOK1, экспрессирующих: INSR человека (A) или INSR мыши (B).

Фиг. 45 отображает процентный показатель несвязанного инсулина относительно определенной концентрации рецептора инсулина. Уровень инсулина был зафиксирован на значении 50 пМ, и концентрация антитела составила 10 мкг/мл (67 нМ) для всех клонов, за исключением Ab078, которое было тестировано при концентрации 25 мкг/мл (167 нМ). Представленные кривые являются нелинейным регрессионным выравниванием в Prism, используемым для вычисления EC_{50}.

Фиг. 46 отображает процентный показатель несвязанного инсулина относительно определенной концентрации рецептора инсулина. Уровень инсулина был зафиксирован на значении 50 пМ, и концентрация антитела составила 10 мкг/мл (67 нМ) для всех клонов. Представленные кривые являются нелинейным регрессионным выравниванием в Prism, используемым для вычисления EC_{50}.

Фиг. 47 отображает тот факт, что ФНО-α индуцирует десенсибилизацию инсулин-опосредованного усвоения жирных кислот в адипоцитах 3T3-L1 в присутствии антитела к INSR Ab085.

Фиг. 48 и 49 отображают эффекты очищенных положительных модулирующих антител к INSR Ab001, Ab037, Ab077, Ab079, AB080, Ab083 на INSR человека (фиг. 48) и INSR мыши (фиг. 49), как это было измерено в ходе анализа pAKT.

Фиг. 50 и 51 отображают относительный показатель % pAKT очищенных агонистических антител Ab037, Ab030, Ab053 и Ab062 на INSR человека (фиг. 50) и INSR мыши (фиг. 51).

Фиг. 52 отображает тот факт, что очищенные антитела к INSR Ab030, Ab037, Ab053, Ab001, Ab079, AB080 и Ab083 способны индуцировать фосфорилирование AKT (относительно % AKT) после активации INSR обезьяны.

Фиг. 53 отображает относительный % pAKT отрицательных модулирующих антител Ab061, Ab070 и Ab081, измеренный в клетках CHOK1, экспрессирующих INSR человека.

Фиг. 54 представляет таблицу со значениями перекрестной реакционной способности антител к рецептору инсулина, а также отображает, что определенные антитела, связывающиеся с рецептором инсулина человека, также связываются с рецептором инсулина кролика и яванского макака, и такое связывание было модулировано присутствием инсулина.

Детальное описание

Изобретение описывает антитела, специфичные к рецептору инсулина (INSR) или комплексу рецептор инсулина/инсулин, и использование таких антител в лечении нарушений, связанных с нарушением уровней глюкозы, например, гипергликемии или гипогликемии, аберрантными уровнями инсулина или аберрантной чувствительностью к инсулину, например, нарушений резистентности к инсулину или нарушений чувствительности к инсулину. Такие антитела могут индуцировать положительный или отрицательный эффект на клеточный ответ в INSR путем изменения кинетических констант скорости для образования и диссоциации компонентов сигнального комплекса INSR-INS или путем использования других механизмов, включая изменения структурного состояния сигнального комплекса, например, путем связывания во временное состояние и ускорения активации сигнализации.

Модулирование сигнального комплекса может привести к повышению или понижению чувствительности к входящему сигналу и сопутственному повышению или понижению передачи сигнала. Введение модулирующих антител повышает или понижает чувствительность клеточного пути и/или абсолютные уровни клеточного ответа. Модуляторы по изобретению, в зависимости от их свойств, могут функционировать в качестве модулятора, усилителя, регулятора, эффектора или сенсибилизатора.

Большое количество препаратов антител действуют путем блокирования сигнальных путей в результате связывания рецептора на поверхности клетки или его когнатного лиганда и элиминации способности лиганда связываться и активировать рецептор. Такие блокирующие препараты опосредуют свой эффект стехиометрическим образом путем предотвращения образования комплекса лиганд/рецептор.

Успешное лечение некоторых заболеваний может потребовать скорее ослабления, чем полного ингибирования сигнальных путей для восстановления нормального физиологического состояния с приемлемыми профилями побочных явлений. Предполагается, что антитела по изобретению будут предоставлять такие преимущества.

Другие лекарственные препараты влияют на клеточную сигнализацию путем связывания с рецептором на поверхности клетки и изменения активности рецептора. Такие непосредственные агонистические препараты могут опосредовать свои эффекты путем имитации естественной активности лиганда и, следовательно, обладают свойственной им активностью, т.е. они не требуют присутствия лиганда для опосредования своих эффектов. Другие лекарственные препараты влияют на клеточную сигнализацию путем связывания с лигандом. Такие агонистические препараты с непрямым действием могут опосредовать свое действие путем изменения стабильности лиганда или его валентности.

Биологические процессы обычно регулируются скорее непрерывным, чем бинарным образом, что, следовательно, в большинстве случаев модуляции пути передачи сигнала может быть более подходящей терапевтической стратегией, чем полная блокада пути или стимуляция. Проведение функциональных и основанных на клетках экспериментов для модуляции активности пути, в отличие от полной блокады пути или стимуляции, трудоемко и не всегда может быть легко проведено с получением значащих результатов, поскольку такие эксперименты обычно требуют наличия известной концентрации исследуемого соединения и могут быть чувствительны к любым примесям в препарате исследуемого соединения. В частности, способность проведения высокорезультативных функциональных и основанных на клетках экспериментов для модуляции активности пути ограничена для непроходящих в клетку молекул, которые не способны войти во внутриклеточную среду, и особенно для рекомбинантных биологических молекул, которые могут иметь разные уровни экспрессии, степени чистоты и стабильности в используемой для получения системе. Кроме того, некоторые связующие взаимодействия могут не характеризоваться параметрами исходящего сигнала для измерения в функциональном эксперименте (например, в случае рецепторов-приманок, субстратов-приманок или инактивных форм мишени), что затрудняет идентификацию агентов для нарушения таких взаимодействий.

Данное изобретение преодолевает такие недостатки и обеспечивает способ для идентификации положительных и отрицательных модуляторов активности INSR и необходимой силы препарата с высокой производительностью. Данное изобретение также описывает положительные и отрицательные модуляторы активности INSR с необходимым диапазоном модуляции активности, а также представляет данные, показывающие, что такие модуляторы обладают желаемым биологическим эффектом изменения усвоения глюкозы.

Определения.

Термин "соединение" относится к любому химическому соединению, органическому или неорганическому, эндогенному или экзогенному, включая, без ограничений, полипептиды, белки, пептиды, небольшие молекулы, нуклеиновые кислоты (например, ДНК и РНК), углеводы, липиды, жирные кислоты, стероиды, пурины, пиримидины, пептидомиметики, поликетиды и их производные, структурные аналоги или комбинации. "Эндогенный" обозначает, что такое соединение встречается в естественном виде у млекопитающих, в то время как "экзогенный" обозначает, что такое соединение не встречается в естественном виде у млекопитающих, например, введенное инородное соединение.

Термин "полипептидный связующий агент" относится к полипептиду, способному специфически связываться с антигеном, например, мишенью или ее сигнальным партнером, или способному связывать-

ся с антигеном с измеряемой аффинностью связывания. Примеры полипептидных связующих агентов включают антитела, пептитела, полипептиды и пептиды, которые в некоторых случаях конъюгированы с другими пептидными молекулами или непептидными молекулами. Антигены, с которыми может связываться полипептидный связующий агент, включают любую белковую и небелковую молекулу, которая способна вызвать ответ на антитело или способна связываться с полипептидным связующим агентом с определяемой аффинностью связывания более чем неспецифического связывания. Антиген, с которым может связываться модулирующий полипептидный связующий агент, может включать мишень, сигнального партнера мишени и/или комплекс, включающий мишень и ее сигнального партнера.

Термин "антитело" используется в самом широком своем смысле и включает полные собранные антитела, тетрамерные антитела, моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), фрагменты антител, которые могут связываться с антигеном (например, Fab', $F'(ab)_2$, Fv, одноцепочечные антитела, диатела), и рекомбинантные пептиды, включающие все вышеприведенное и обладающие необходимой биологической активностью. Термин "иммуноглобулин" или "тетрамерное антитело" описывает тетрамерный гликопротеин, состоящий из двух тяжелых цепей и двух легких цепей, каждая из которых включает вариабельный участок и константный участок. Антигенсвязывающие участки могут быть получены с использованием рекомбинантных способов ДНК или путем ферментативного или химического расщепления интактных антител. Фрагменты антител или антигенсвязывающие участки включают, помимо всего прочего, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, доменное антитело (dAb), фрагменты гипервариабельных участков (CDR), CDR-привитые антитела, одноцепочечные антитела (scFv), фрагменты одноцепочечных антител, химерные антитела, диатела, триатела, тетратела, мини-тело, линейное антитело; хелатное рекомбинантное антитело, трител или бител, интратело, нанотело, небольшой модулярный иммунофармацевтический препарат (SMIP), белок слияния иммуноглобулин с антигенсвязывающим доменом, антитело верблюдовых, антитело, содержащее VHH, или вариант, или производные антител, а также полипептиды, содержащие, по меньшей мере, участок иммуноглобулина, которого достаточно для проведения специфического связывания антигена с полипептидом, такого как одна, две, три, четыре, пять или шесть последовательностей CDR, при этом антитело обладает необходимой биологической активностью.

Термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции, по существу, однородных антител, т.е. отдельных антител, составляющих популяцию и являющихся идентичными, за исключением возможных и возникающих естественным образом мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах.

В контексте данного изобретения термин "вариант антитела" относится к полипептидной последовательности антитела, которая содержит по меньшей мере одну замену, делецию или вставку аминокислоты в вариабельном участке естественных доменов вариабельного участка антитела. Варианты могут быть, по существу, гомологичными или, по существу, идентичными немодифицированному антителу.

В контексте данного изобретения термин "химерное антитело" обозначает антитело, содержащее последовательность, полученную из двух различных антител (см., например, патент США № 4816567), которые, как правило, имеют происхождение от двух различных видов. Как правило, химерные антитела включают фрагменты антитела человека и грызуна, обычно константные участки человека и вариабельные участки мыши.

"Нейтрализующее антитело" обозначает молекулу антитела, которое способно элиминировать или существенно снижать биологическую функцию антигена, с которым оно связывается. В соответствии с этим "нейтрализующее" антитело способно элиминировать или существенно снижать биологическую функцию, такую как ферментативную активность, связывание лиганда или внутриклеточную передачу сигнала.

"Изолированное антитело" представлено антителом, которое было идентифицировано, выделено и восстановлено из компонента в естественной среде. Загрязняющие (примесные) компоненты в естественной среде представляют собой материалы, которые могут помешать диагностическому или терапевтическому использованию антитела, и такие материалы могут включать ферменты, гормоны и другие белковые и небелковые растворенные вещества. В предпочтительных вариантах воплощения изобретения антитело будет очищаться (1) до значения более 95% по весу антитела, как это определено по способу Фолина-Чикальтеу, и наиболее преимущественно более чем 99% по весу; (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности путем использования секвенатора с вращающимся стаканом; или (3) до достижения однородности, определяемой способом электрофореза в полиакриламидном геле в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях с использованием Кумасси синего или серебрянки. Изолированное антитело включает антитело in situ в рекомбинантных клетках, при этом по меньшей мере один компонент естественной среды антитела будет отсутствовать. Как правило, изолированное антитело будут получать по меньшей мере с одним этапом очистки.

В контексте данного изобретения термин "вариабельный участок тяжелой цепи" относится к участку молекулы антитела, включающему по меньшей мере один гипервариабельный участок (CDR) вариабельного домена тяжелой цепи указанного антитела. Вариабельный участок тяжелой цепи может содер-

жать один, два или три CDR указанной тяжелой цепи антитела.

В контексте данного изобретения термин "вариабельный участок легкой цепи" относится к участку молекулы антитела, включающему по меньшей мере один гипервариабельный участок (CDR) вариабельного домена легкой цепи указанного антитела. Вариабельный участок легкой цепи может содержать один, два или три CDR указанной легкой цепи антитела, которая может быть представлена каппа- или лямбда легкой цепью, в зависимости от антитела.

В контексте данного изобретения антитело, которое "специфически связывается", является "антигенспецифическим", "специфичным относительно" антигена-мишени или "иммунореактивным" с антигеном, и такое антитело относится к антителу или полипептидному связующему агенту по изобретению, которые связываются с антигеном с большей аффинностью, чем другие антигены подобной последовательности. В одном аспекте изобретения полипептидные связующие агенты по изобретению, или их фрагменты, варианты или производные будут связываться с большей аффинностью с антигеном человека в сравнении со своей аффинностью связывания с подобными антигенами других видов, например, животных, при этом полипептидные связующие агенты, распознающие и связывающие ортологи мишени, включены в данное изобретение.

Например, полипептидный связующий агент, представленный антителом или его фрагментом и "специфичный относительно" своего когнатного антигена, обозначает, что вариабельные участки антител распознают и связывают требуемый антиген с определяемым преимуществом (например, если требуемый антиген представлен полипептидом, вариабельные участки антител способны распознавать полипептид-антиген среди других полипептидов этого же семейства посредством измеряемых различий в аффинности связывания, несмотря на возможное существование локализованной идентичности последовательности, гомологии или подобия между членами семейства). Необходимо понимать, что специфические антитела также могут взаимодействовать с другими белками (например, белком A S. aureus или другими антителами в ходе ИФА) посредством взаимодействия с последовательностями за пределами вариабельного участка антител, и, в частности, в константном участке молекулы. Анализы путем скрининга для определения специфичности связывания полипептидного связующего агента, например, антитела, для использования в способах по изобретению, широко известны и применимы в науке. Обширное обсуждение таких анализов представлено в Harlow et al. (Eds), Antibodies A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY (1988), Chapter 6. Антитела для использования в изобретении могут быть получены с использованием любого известного в науке способа.

Термин "антигенная детерминанта" относится к участку любой молекулы, которая способна распознаваться и связываться с избирательным связующим агентом в одном или нескольких антигенсвязующих участках. Антигенные детерминанты обычно состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как боковые цепи аминокислот или углеводов, и обычно обладают тремя специфическими пространственными структурными характеристиками, а также специфическими характеристиками заряда. Антигенные детерминанты в контексте данного изобретения могут быть прерывистыми и непрерывными.

Термин "производное", при использовании в связи с полипептидными связующими агентами и полипептидами по изобретению, относится к полипептидам, химически модифицированным такими способами, как убихитинилирование, конъюгация с терапевтическими или диагностическими агентами, мечение (например, радионуклидами или различными ферментами), ковалентное присоединение полимера, такое как пегилирование (дериватизация с полиэтиленгликолем) и вставка или замещение аминокислот путем химического синтеза, таких как орнитин, которые в естественном виде не встречаются в белках человека. Производные сохраняют связующие свойства недериватизированных молекул по изобретению.

"Определяемая молекула" или "метка" относится к композиции, определяемой спектроскопическими, фотохимическими, биохимическими, иммунохимическими или химическими способами. Например, используемые метки включают 32P, 35S, флуоресцирующие красители, электронно-плотные реагенты, ферменты (например, обычно используемые в ИФА), биотин-стрептавидин, диоксигенин, гаптены и белки, для которых имеются антисыворотка или моноклональные антитела, или молекулы нуклеиновых кислот с последовательностью, комплементарной другой меченой молекуле нуклеиновой кислоты. Определяемая молекула часто генерирует определяемый сигнал, такой как радиоактивный, хромогенный или флуоресцентный, который может использоваться для количественного определения связанной определяемой молекулы в образце.

"Пептиды" или "олигопептиды" являются короткими последовательностями аминокислот, обычно от 3 до 100 аминокислотных остатков в длину, включают встречающиеся в природе аминокислотные остатки и не встречающиеся в природе аналоги остатков, которые могут использоваться отдельно или в комбинации со встречающимися в природе аминокислотными остатками для придания пептиду отдельной конформационной специфичности или отдельной биологической активности, такой как устойчивость к протеолизу. Пептиды включают повторы пептидных последовательностей и могут включать 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более копий аминокислотной последовательности, расположенной голова к хвосту или голова к голове. Пептиды могут быть конъюгированы с непептидными молекулами, например, могут расширяться. Пептиды включают димеры, тримеры или мультимеры высшего порядка, например, обра-

зованные посредством конъюгации с другими полимерными или неполимерными молекулами, такими как ПЭГ.

"Полипептиды" являются длинными последовательностями аминокислот, обычно от 100 и более аминокислотных остатков в длину, включают встречающиеся в природе аминокислотные остатки и не встречающиеся в природе аналоги остатков, которые могут использоваться отдельно или в комбинации со встречающимися в природе аминокислотными остатками для придания полипептиду отдельной конформационной специфичности или отдельной биологической активности, такой как устойчивость к протеолизу.

В контексте данного изобретения термин "пептидное антитело" обозначает полипептид слияния, включающий один или несколько пептидов, слитых со всем или фрагментом константного участка иммуноглобулина (Ig). (См., например, патент США № 6660843.) Пептид может быть представлен любым встречающимся в природе или полученным в ходе рекомбинации и химически синтезированным пептидом, связывающимся с антигеном. Пептид может включать повторы и может включать 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более копий аминокислотной последовательности, расположенной голова к хвосту или голова к голове. Участок константного участка Ig может включать по меньшей мере один домен константного участка (например, CH1, CH2, CH3 и/или CH4), множественные домены (например, CH2 с CH3), множественные копии доменов (например, CH2-CH2), любой фрагмент константного домена, обладающего необходимой активностью, например, антигенную детерминанту рецептора утилизации, ответственную за продолжительность времени полужизни циркулирующих в крови иммуноглобулинов, или любую их комбинацию.

Термин "небольшая" молекула или "небольшая" органическая молекула обозначает неполимерное органическое химическое соединение с молекулярным весом примерно 1000 Дальтон или менее.

В контексте данного изобретения термин "сигнальный комплекс" обозначает комплекс белков и/или экзогенных или эндогенных соединений, которые опосредуют передачу клеточного сигнала. Примеры сигнального комплекса включают, но не ограничиваются, лиганд, связанный с мембранным рецептором, фермент, связанный с субстратом или любой клеточной молекулой для проведения биохимических реакций, включенных в каскад передачи сигнала. Сигнальные комплексы также могут включать корецепторы, ко-факторы, каркасные белки, аллостерические модуляторы и множество других типов белков и молекул, которые задействованы в передаче сигнала в клетке. Сигнальные комплексы могут быть образованы временно или на продолжительный срок. Молекулярные составляющие или компоненты сигнального комплекса могут варьировать с течением времени и могут зависеть от состояния активации каждого компонента и клеточной среды. Сигнальные комплексы могут подвергаться химической модификации и регуляции, которая может индуцировать спектр эффектов на комплекс, включая незаметные перемены в активности передачи сигнала, полную инактивацию и конститутивную активацию, или положительную и отрицательную модуляцию.

Термин "терапевтически эффективное количество" в контексте данного изобретения обозначает количество мишень-специфической композиции по изобретению, которое эффективно для улучшения или уменьшения симптомов или признаков заболевания, ассоциированного с аномальной сигнализацией (например, аномально высокой или аномально низкой) сигнального комплекса.

В контексте данного изобретения термин "связывание" обозначает физическую ассоциацию между двумя или более различными молекулами в результате специфической цепи нековалентных взаимодействий, состоящих из одного или нескольких слабых взаимодействий, включая водородные связи, ванн-дер-ваальсовы связи, ион-дипольные и гидрофобные взаимодействия и сильные ионные связи. Степень или уровень связывания могут быть измерены в параметрах аффинности. Аффинность является мерой силы связывания между двумя или более различными молекулами, которая может быть определена по равновесной константе связывания или кинетическим параметрам скорости связывания. Примеры подходящих констант или параметров и их единиц измерения широко известны в науке и включают, не ограничиваясь, равновесную константу ассоциации (K_A), например, примерно 10^5 M^{-1} или выше, примерно 10^6 M^{-1} или выше, примерно 10^7 M^{-1} или выше, примерно 10^8 M^{-1} или выше, примерно 10^9 M^{-1} или выше, примерно 10^{10} M^{-1} или выше, примерно 10^{11} M^{-1} или выше, примерно 10^{12} M^{-1} или выше; равновесную константу диссоциации (K_D), например, примерно 10^{-5} М или менее примерно 10^{-6} М или менее, примерно 10^{-7} М или менее, примерно 10^{-8} М или менее, примерно 10^{-9} М или менее, примерно 10^{-10} М или менее, примерно 10^{-11} М или менее, примерно 10^{-12} М или менее; скорость ассоциации (например, c^{-1}, моль$^{-1}$) и скорость диссоциации (например, c^{-1}). В случае K_A, большие значения обозначают "более сильную" или "усиленную" аффинность связывания, в то время как для K_D более низкие значения обозначают "более сильную" или "усиленную" аффинность связывания. В контексте данного изобретения "усиленный" параметр скорости связывания обозначает повышенное время пребывания, более сильную связь или более слабую диссоциацию. В контексте данного изобретения "ослабленный" параметр скорости связывания обозначает пониженное время пребывания, более слабую связь или более сильную диссоциацию. В случае скорости ассоциации, более высокие значения обозначают более быструю или более частую ассоциацию и, следовательно, обычно приводят к повышенной аффинности связывания. В случае скорости диссоциации, более низкие значения обычно обозначают более медленную диссоциацию и,

следовательно, обычно приводят к усиленной аффинности связывания. Однако существует соотношение скорости ассоциации к скорости диссоциации, которое указывает на аффинность связывания, как это более подробно объяснено ниже.

Аффинность между двумя соединениями, например, между антителом и антигеном, или между первыми и вторым компонентами сигнального комплекса может быть измерена прямым или косвенным образом. Косвенное (непрямое) измерение аффинности может проводиться с использованием суррогатных свойств, являющихся характерными и/или пропорциональными аффинности. Такие суррогатные свойства включают следующие: количество или уровень связывания первого компонента со вторым компонентом сигнального комплекса, или биофизическая характеристика первого компонента или второго компонента, которая является прогнозируемой или коррелирует с фактической аффинностью связывания первого компонента со вторым компонентом. Специфические примеры включают измерение уровня или степени связывания первого компонента со вторым компонентом при субнасыщающей концентрации первого или второго компонента. Другие биофизические характеристики, которые могут быть измерены, включают, но не ограничиваются, чистый молекулярный заряд, активность вращения, скорость диффузии, температуру плавления, электростатическую направленность или конформацию одного или обоих первого и второго компонентов. Дополнительные биофизические характеристики, которые могут быть измерены, включают определение стабильности взаимодействия при связывании относительно влияния различной температуры, pH или ионной силы.

Измеренная аффинность зависит от точных условий, используемых для проведения измерений, включая, помимо многих других факторов, концентрацию связующихся компонентов, параметры анализа, валентность связующихся компонентов, состав буфера, pH, ионную силу и температуру, а также дополнительные компоненты, добавленные к реакции связывания, такие как аллостерические модуляторы и регуляторы. Способы количественного и качественного анализа могут использоваться для измерения абсолютной и относительной силы взаимодействий при связывании.

Фактическая аффинность является мерой силы связующего взаимодействия между двумя или более различными молекулами в условиях, когда аффинность изменена условиями или компонентами в реакции связывания, такими как аллостерические модуляторы, ингибиторы, валентность связующегося компонента и т.д.

В контексте данного изобретения термин "субнасыщающая концентрация" обозначает концентрацию одного или нескольких компонентов в реакции связывания, которая существенно ниже аффинности связывания K_D, и/или концентрацию одного компонента в реакции связывания, которая меньше концентрации, необходимой для занятия всех сайтов связывания другого компонента(ов). При субнасыщающих условиях существенный процентный показатель одного из компонентов связывания в реакции связывания содержит необходимые сайты связывания.

В контексте данного изобретения термин "биофизический анализ" обозначает любой способ, измеряющий, в абсолютных или относительных значениях, связывание, ассоциацию, диссоциацию, аффинность связывания, уровень связывания или параметры скорости связывания между по меньшей мере двумя соединениями. Биофизические анализы обычно проводятся in vitro и могут осуществляться с использованием очищенных связующихся компонентов, неочищенных компонентов, связанных с клеткой компонентов, а также комбинации очищенных и связанных с клеткой компонентов.

Термин "агонист" используют для описания типа лиганда или препарата, который связывается и активирует сигнализацию рецептора. Способность изменять активность рецептора, также известная как эффективность агониста, является свойством, которое отличает его от антагонистов, типа лиганда рецептора, который также связывается с рецептором, но который не активирует сигнализацию рецептора. Эффективность агониста может быть положительной, вызывая повышение активности рецептора, или отрицательной, вызывая снижение активности рецептора. Полные агонисты связывают и активируют рецептор, отображая полную эффективность для данного рецептора. Частичные агонисты также связывают и активируют отдельный рецептор, однако обладают только частичной эффективностью для рецептора в сравнении с полным агонистом. Обратный агонист представляет собой агент, который связывается с тем же самым сайтом связывания рецептора, что и агонист для данного рецептора, и изменяет конститутивную активность рецепторов. Обратные агонисты производят обратный фармакологический эффект агониста рецептора. Ко-агонист взаимодействует с другими ко-агонистами для получения требуемого совокупного эффекта.

Конкурентные, или ортостерические, агонисты обратимым образом связываются с рецепторами в том же самом сайте связывания (активном сайте), что и лиганд, конкурируя, тем самым, с лигандом за один и тот же сайт связывания рецептора.

В другом аспекте изобретения описанные здесь антитела действуют в качестве аллостерических агонистов. Они связываются с участком INSR, отличающимся от активного центра связывания инсулина, и не изменяют значимым образом аффинность связывания инсулина и INSR более чем в 2 раза. Они также не влияют значимым образом на EC_{50} инсулина при активации INSR, например, изменяют EC_{50} менее чем в 2 раза. Такие антитела конститутивно активируют INSR и вызывают максимальный ответ на агонист, составляющий 80% или менее максимального ответа на агонист инсулина, например, 15-80, 20-60,

20-40 или 15-30%. В определенных вариантах воплощения изобретения антитела конститутивно активируют INSR с максимальным агонистическим ответом, составляющим по меньшей мере примерно 15, 20, 25, 30, 35, 40 и до 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80% максимального агонистического ответа инсулина. Принимают, что любая комбинация любых конечных точек указанных диапазонов предусмотрена без перечисления каждой возможной комбинации. В некоторых вариантах воплощения изобретения максимальный ответ на агонист измеряют в ходе анализа Akt. В дополнительных вариантах воплощения изобретение описывает аллостерическое агонистическое антитело, связывающееся с рецептором инсулина с аффинностью 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}, 10^{-11} М или менее. Не ограничиваясь теорией изобретения, слабая агонистическая активность аллостерических агонистов служит для имитации эффекта естественных базальных уровней секреции инсулина, позволяя вводить экзогенный инсулин для нормального эффекта снижения уровня глюкозы. В определенных вариантах воплощения изобретения аллостерический агонист представлен частичным аллостерическим агонистом. Антагонист блокирует рецептор при активации агонистами. Избирательный агонист является селективным для одного типа рецептора. Он может быть дополнительно представлен одним из указанных выше типов.

Сила агониста обычно определяется по обратимости его значения EC_{50}. Она может быть рассчитана для отдельного агониста путем определения концентрации агониста, необходимой для вызова половины максимального биологического ответа на агонист. Чем ниже EC_{50}, тем больше сила агониста.

"Антагонист" рецептора является типом лиганда рецептора или препарата, который не вызывает биологический ответ сам по себе при связывании с рецептором, но блокирует или гасит опосредованный агонистом ответ. Антагонисты могут обладать аффинностью, но не обладают эффективностью относительно их когнатных рецепторов, и связывание разорвет взаимодействие и ингибирует функцию агониста или обратного агониста на рецепторах. Антагонисты опосредуют свои эффекты путем связывания с активным центром или аллостерическими центрами рецепторов, или они могут взаимодействовать на уникальных центрах связывания, не задействованных обычным образом в биологической регуляции активности рецептора. Активность антагониста может быть обратимой или необратимой, в зависимости от продолжительности существования комплекса антагонист-рецептор, что, в свою очередь, зависит от природы связывания рецептора с антагонистом. Большинство антагонистов достигают своей силы путем конкурирования с эндогенными лигандами или субстратами при определяемых структурно центрах связывания на рецепторах.

Антагонисты не обладают эффективностью относительно активации рецепторов, с которыми они связываются. При связывании антагонисты могут ингибировать функцию агонистов, обратных агонистов и частичных агонистов. В ходе функциональных анализов антагонистов, кривая доза-ответ измеряет эффект способности целого диапазона концентраций антагонистов обращать активность агониста. Сила антагониста обычно определяется по его значению IC_{50}. Оно может быть рассчитано для отдельного антагониста путем определения концентрации антагониста, необходимой для вызова половины максимального биологического ответа на агонист. Чем ниже IC_{50}, тем больше сила антагониста.

Конкурентные, или ортостерические, антагонисты обратимым образом связываются с рецепторами в том же самом сайте связывания (активном сайте), что и лиганд или агонист, но без активации рецептора, конкурируя, тем самым, с агонистом за один и тот же сайт связывания рецептора. Неконкурирующие, или аллостерические, антагонисты связываются с отдельным сайтом связывания агониста, осуществляя свое действие на данный рецептор через такой отдельный сайт связывания. Таким образом, они не конкурируют с агонистами за связывание. Неконкурирующие антагонисты отличаются от неконкурентных антагонистов тем, что им необходима активация рецептора агонистом перед тем, как они свяжутся с отдельным аллостерическим сайтом связывания.

Термин "резистентность к инсулину" описывает состояние, при котором физиологические количества инсулина не соответствуют для выработки нормального ответа на инсулин в клетках и тканях.

Термин "сенсибилизатор инсулина" обозначает соединение или препарат, повышающий клеточную или тканевую сенсибилизацию, что приводит к повышенным уровням усвоения глюкозы для отдельной субнасыщающей концентрации инсулина.

Преимущества.

Данное изобретение относится к открытию того, что возможно разработать терапевтические препараты, обуславливающие сигнальный комплекс инсулин/INSR путем связывания с внеклеточными участками INSR. Новейшие способы селекции и скрининга используются для идентификации, например, сенсибилизаторов инсулина, которые направлены на внеклеточные участки INSR и усиливают действие инсулина. В частности, некоторые указанные здесь антитела являются неагонистическими антителами, связывающимися с внеклеточными участками INSR и положительно или отрицательно модулирующими сигнальный комплекс инсулин/INSR.

Данное изобретение описывает модуляторы сигнального комплекса инсулин/INSR, которые представляют уникальные преимущества в сравнении с существующими способами лечения. Они действуют на уровне INSR, что позволит индуцировать целый спектр действий инсулина, сведя в то же самое время к минимуму нежелательные побочные эффекты. Избежание агонизма INSR позволит снизить риск функциональной гипогликемии. Кроме того, может быть достигнут более точный контроль уровней глюкозы.

Таким образом, при повышении уровней глюкозы в крови, что приводит к повышению уровней инсулина, такой модулятор будет иметь больший эффект. Направленность на внеклеточный участок INSR позволяет использовать биологические молекулы в качестве модуляторов сигнального комплекса инсулин/INSR, которые модулируют эффект эндогенного или экзогенного инсулина, аналогов инсулина или миметиков инсулина; они могут обладать такими преимуществами, как повышенное время полужизни, пониженная принимаемая доза или частота приема дозы, пониженная токсичность и повышенная легкость производства. Данное изобретение описывает модуляторы сигнального комплекса инсулин/INSR, которые, как ожидается, снизят периферическую резистентность к инсулину и повысят гликемический контроль. Сенсибилизирующий эффект модуляторов позволит улучшить уровни усвоения глюкозы в периферических тканях у пациентов, уровни инсулина у которых не достаточно высокие для стимуляции адекватного усвоения глюкозы в отсутствии терапии экзогенным инсулином. Таким образом, введение антител по изобретению может использоваться на ранних стадиях резистентности к инсулину вместо других препаратов или в качестве адъюнктивной терапии к другим антидиабетическим препаратам. При введении в качестве адъюнктивной терапии с другими антидиабетическими агентами, антитела по изобретению могут снизить общее суточное количество антидиабетического агента, необходимое для поддержания уровня глюкозы в крови в норме, или могут снизить частоту приема доз антидиабетического агента, или помогут достигнуть улучшения гликемического контроля с использованием такой же самой дозы и/или частоты приема дозы, например, при нескольких эпизодах гипергликемии и пониженном уровне максимальной гипергликемии (наблюдается снижение в максимальном аберрантном уровне глюкозы).

Рецептор инсулина (INSR) INSR представляет собой рецептор с тирозинкиназной активностью, обнаруженный в таких низших организмах, как книдарии и насекомые. У высших организмов он важен для поддержания гомеостаза глюкозы. Исследования на нокаутных мышах показали, что INSR играет важную роль в адипогенезе, неоваскуляризации, регуляции синтеза глюкозы в печени и секреции инсулина в поджелудочной железе, индукцированной глюкозой (Kitamura et al., Ann. Rev. Physiol., 65: 313-332, 2003). Сигнализация INSR также важна в мозге, где он задействован в регуляции приема пищи, периферическом отложении жиров и действии репродуктивных эндокринных желез, а также для обучения и запоминания (Wada et al., J. Pharmacol. Sci. 99: 128-143, 2005). Дисфункция сигнализации INSR была выявлена при заболеваниях, включая диабет I и II типов, слабоумие и рак.

Домены близкородственного рецептора инсулиноподобного фактора роста (IGFR-1) обладают высокой (47-67%) аминокислотной идентичностью в сравнении с INSR. Обладая похожей структурой, IGF-IR и INSR выполняют различные физиологические функции. IGF-IR экспрессируется, по существу, во всех здоровых зрелых тканях, за исключением печени, которая, сама по себе, является основным местом выработки IGF-IR. INSR преимущественно задействован в метаболических функциях, в то время как IGF-IR опосредует рост и дифференцировку (Adams et al., Cell. Mol. Life Sci. 57: 1050-1093, 2000).

INSR существует в виде двух сплайс-вариантов изоформ, INSR-A и INSR-B, которые, соответственно, содержат или не содержат 12 аминокислот, кодируемых экзоном 11. Более длинный вариант INSR-B представляет собой изоформу, ответственную за сигнальную метаболическую реакцию. В отличие от этого, INSR-A сигнализирует, преимущественно, митогенные ответы, является, преимущественно, экспрессируемой изоформой при некоторых видах рака (Denley et al., Horm. Metab. Res. 35: 778-785, 2003) и способен связывать инсулин-подобный фактор роста 2 (IGF-II) с высокой аффинностью (Denley et al., Mol. Endocrinol. 18: 2502-2512, 2004).

Зрелый INSR человека является гомодимером, включающим две α субъединицы и две β субъединицы (цепи).α и β цепи кодируются одним геном и образуются в результате пост-трансляционного расщепления предшественника из 1370 аминокислот в сайте расщепления фурина, расположенного в остатках 720-723. α-цепь и 194 остатка β-цепи составляют внеклеточный участок INSR. Существует единая трансмембранная последовательность и цитоплазматический домен из 403 остатков, содержащий тирозинкиназу. N-терминальная половина каждого мономера эктодомена состоит из двух гомологичных повторяющихся и содержащих лейцин доменов (L1 и L2) с примерно 150 аминокислотами, разделенных обогащенным цистеином участком (CR), который также содержит примерно 150 аминокислот. С-терминальный участок каждого мономера эктодомена (примерно 460 остатков) состоит из трех доменов фибронектина типа III (FnIII-1, FnIII-2 и FnIII-3). Домен FnIII-2 содержит вставочный домен (ID) с примерно 120 остатками, в рамках которого находится сайт расщепления фурином, приводящий к образованию α и β цепей зрелого рецептора. На внутриклеточном уровне каждый мономер содержит каталитический домен с тирозинкиназной активностью, фланкированный двумя регуляторными участками (околомембранный участок и С-конец), которые содержат сайты связывания фосфотирозина для сигнальных молекул (Ward et al., Acta Physiol. 192: 3-9, 2008).

Используемые в настоящее время модели связывания инсулина предполагают, что в исходном состоянии гомодимер INSR содержит две идентичные пары центров связывания (указываемых как сайт 1 и сайт 2) на каждом мономере (De Meyts, Bioessays, 26: 1351-1362, 2004). Происходит связывание инсулина с сайтом с низкой аффинностью (сайт 1) на одной α-субъединице, после чего наблюдается второе явление связывания между связанным инсулином и другим участком второй α-субъединицы INSR (сайт 2).

Лиганд-опосредованное связывание между двумя α-субъединицами приводит к образованию состояния высокой степени аффинности, что генерирует передачу сигнала. В отличие от этого, растворимый эктодомен INSR, который не привязан к С-концу, не может приводить к образованию комплекса рецептор/лиганд с высокой аффинностью. Он может связывать две молекулы инсулина одновременно на его двух сайтах 1, но только с низкой аффинностью (Adams et al., Cell. Mol. Life Sci. 57: 1050-1093, 2000). Считается, что сайт 1 состоит из элементов из центрального α-складчатого слоя домена L1 и последних 16 остатков α-цепи (обозначаются как пептид CT). Сайт 2, по всей вероятности, включает петли в месте сопряжения FnIII-1 и FnIII-2. Считается, что связывание инсулина приводит к структурным изменениям в инсулине и его рецепторе (Ward and Lawrence, BioEssays 31: 422-434, 2009).

Как только молекула инсулина присоединилась к рецептору и активировала его действие, она может быть высвобождена обратно во внеклеточную среду или может быть разрушена клеткой. Деградация обычно подразумевает эндоцитоз комплекса инсулин/INSR, вслед за чем свое действие проявляет разрушающий инсулин фермент. Большая часть молекул инсулина разрушается клетками печени. Было установлено, что типичная молекула инсулина окончательно разрушается спустя примерно 71 мин после своего первичного выхода в кровяное русло (Duckworth et al., Endocr. Rev. 19(5): 608-24, 1998).

Инсулиновая сигнализация.

Инсулин индуцирует сигнальную цепь молекул, неся информацию от INSR белкам-эффекторам, задействованным в росте и метаболизме. Связывание инсулина с INSR индуцирует конформационное изменение, которое способствует активации присущей ему тирозинкиназной активности, что приводит к аутофосфорилированию β-субъединицы INSR. Белки субстрата инсулинового рецептора (IRS) привлекаются к плазматической мембране посредством взаимодействия с фосфорилированным INSR, и такие белки также становятся фосфорилированными в остатках тирозина, что способствует привлечению дополнительных сигнальных белков к комплексу, приводя к передаче сигнала через два основных пути: (1) путь PI3 киназа/PDK1/PKB, который преимущественно регулирует метаболизм с незначительным влиянием на рост, и (2) митогенный путь Ras/ERK, который преимущественно регулирует рост клеток.

Сообщалось, что определенные представленные на рынке аналоги инсулина характеризуются IGF-1-подобной митогенной и антиапоптозной активностью в культивированных раковых клетках, что породило ряд вопросов об их безопасности при длительном применении у человека (Weinstein et al., Diabetes Metab Res Rev 25: 41-49, 2009). Таким образом, необходимо получить агонист INSR, который не изменяет баланс в метаболической в сравнении с митогенной передачей сигнала INSR, или способствует преимущественно метаболической сигнализации в сравнении с митогенной сигнализацией INSR.

Способы идентификации антител, являющихся модуляторами.

Изобретение описывает способы идентификации кандидатного полипептидного связующего агента, например, антитела, который опосредует связывание между первым и вторым компонентом сигнального комплекса, например, рецептора, такого как рецептор инсулина и лиганд/инсулин.

Без какой-либо привязки к теории изобретения, данная заявка на изобретение описывает кинетическое смещение взаимодействия между двумя компонентами (первым компонентом C1 и вторым компонентом C2) сигнального комплекса с модулятором (M), что математически может быть выражено следующим образом:

$$K'_{C1C2} = K_{C1C2} \quad \frac{(1 + M/K_{MC1})\,(1 + M/K_{MC2})}{(1 + M/K_{[C1C2]M})}$$

где изменение в равновесной константе связывания между компонентами (K'_{C1C2}) представлено функцией равновесной константы между компонентами (K_{C1C2}), концентрацией модулятора (M), аффинностью модулятора для комплекса ($K_{[C1C2]M}$) и аффинностью модулятора для первого компонента (K_{MC1}) или второго компонента (K_{MC2}).

В случаях, когда сигнальный комплекс представлен комплексом рецептор/лиганд, а модулятор представлен антителом, кинетическое смещение взаимодействия рецептор/лиганд с антителом математически может быть описано следующим образом:

$$K'_{RL} = K_{RL} \frac{\left(1+\frac{A}{K_{AR}}\right)\left(1+\frac{A}{K_{AL}}\right)}{\left(1+\frac{A}{K_{RLA}}\right)}$$

где изменение в равновесной константе связывания рецептор/лиганд (K'_{RL}) представляет собой функцию равновесной константы рецептор/лиганд (K_{RL}), концентрации антитела (A), аффинности антитела к комплексу ($K_{[RL]A}$) и аффинности антитела к рецептору (K_{AR}) или лиганду (K_{AL}).

Модулятор связывается с мишенью или ее сигнальным партнером, или комплексом мишени и сигнального партнера таким образом, что аффинность связывания или параметр скорости связывания мишени с сигнальным партнером ослабляется или усиливается. Например, если мишень представлена рецептором или лигандом, аффинность связывания или параметр скорости связывания лиганда со своим рецептором ослабляется или усиливается в присутствии модулятора. Модулятор с полной блокирующей

активностью в данном анализе представляет граничное условие, поскольку при, по существу, высоком значении $K_{[C1C2]M}$, K'_{C1C2} достигает бесконечности. Одно из условий данной модели состоит в том, что степень сигнальной модуляции не зависит от концентрации модулятора, когда концентрация модулятора ([M]) существенно выше равновесной константы диссоциации (K_D) для взаимодействия модулятор/антиген с целью насыщения связываемого лиганда. Таким образом, модуляция взаимодействия относится к соотношению аффинности комплекса и компонентов, при этом $[M]>K_D$ для модулятора и его антигена.

Данное изобретение описывает тот факт, что биофизические свойства взаимодействий модулятора с его мишенью и/или его сигнальным партнером могут быть изменены для прогнозирования функционального эффекта модулятора на путь передачи сигнала мишенью. Модуляторы, которые изменяют путь передачи сигнала, могут быть идентифицированы на основе их относительной аффинности относительно мишени (и/или ее сигнальных партнеров) в комплексной, в сравнении с безкомплексной, формой.

Изобретение предусматривает, что кинетическое смещение взаимодействия между двумя компонентами (первым компонентом C1 и вторым компонентом C2) сигнального комплекса с модулятором (M) может быть спрогнозировано следующим образом:

$K_{[C1C2]M}$ или $K_{[MC2]C1}$ либо $K_{[MC1]C2}<K_{MC2}$ или K_{MC1} приводит к положительной модуляции;

$K_{[C1C2]M}$ или $K_{[MC2]C1}$ либо $K_{[MC1]C2}=K_{MC2}$ или K_{MC1} приводит к отсутствию модуляции;

$K_{[C1C2]M}$ или $K_{[MC2]C1}$ либо $K_{[MC1]C2}>K_{MC2}$ или K_{MC1} приводит к отрицательной модуляции.

В случаях, когда сигнальный комплекс представлен комплексом рецептор (R)/лиганд (L), и кинетический модулятор представлен антителом (A), кинетическое смещение может быть спрогнозировано следующим образом:

$K_{[RL]A}$ или $K_{[AL]R}$ либо $K_{[AR]L}<K_{AL}$ или K_{AR} приводит к положительной кинетической модуляции;

$K_{[RL]A}$ или $K_{[AL]R}$ либо $K_{[AR]L}=K_{AL}$ или K_{AR} приводит к отсутствию кинетической модуляции;

$K_{[RL]A}$ или $K_{[AL]R}$ либо $K_{[AR]L}>K_{AL}$ или K_{AR} приводит к отрицательной кинетической модуляции.

В некоторых вариантах воплощения изобретения модулятор, такой как антитело (A), может быть идентифицирован по своей способности изменять взаимодействие при связывании, такое как взаимодействие рецептор(R)/лиганд(L), в любой заданной субнасыщающей концентрации первого или второго компонента (например, концентрации лиганда (L)). Антитело-модулятор или полипептид может эффективно смещать способность и соответствующий ответ на дозу при взаимодействии рецептора с лигандом от взаимодействия при 500 до 10 пМ (положительный модулятор) или 10 нМ (отрицательный модулятор). В некоторых вариантах воплощения изобретения модулятор приведет к более высокому уровню связывания R/L при заданной концентрации лиганда, смещая кривую анализа влево (положительная модуляция). В других вариантах воплощения изобретения модулятор приведет к более низкому уровню связывания R/L при заданной концентрации лиганда, смещая кривую анализа вправо (отрицательная модуляция). В некоторых вариантах воплощения изобретения смещение однородное. В других вариантах воплощения изобретения смещение неоднородное и отражает включение других факторов, например, акцессорных белков в комплексе, интернализацию рецептора и т.д.

Связующие свойства взаимодействия(й) между модулятором и мишенью, ее сигнальным партнером и/или комплексом, включающим мишень и ее сигнального партнера, обычно прогнозируемы относительно функционального эффекта кинетического модулятора на путь передачи сигнала мишенью. В зависимости от исследуемой мишени, необходимо учитывать и другие определенные факторы. Они включают следующее: (1) концентрация кинетического модулятора, концентрация мишени и/или концентрация ее сигнального партнера (например, прогнозирование оптимизировано, если концентрация модулятора ([M]) по существу выше K_D связывания между модулятором и его антигеном); (2) структурная форма используемого модулятора, например, моновалентная в сравнении с двухвалентной или бивалентной; (3) перекрестное связывание между/внутри мишени, что может ограничивать конформацию мишени и/или вызывать активацию мишени; (4) способность модулятора изменять сборку или стыковку, или изменять дополнительные компоненты сигнального комплекса с использованием стерических или аллостерических механизмов; (5) специфические свойства сигнального пути, такие как взаимодействия в сигнальном пути по причине заболевания, что приводит к образованию узкого участка; (6) отрицательная/положительная обратная регуляция сигнального пути; (7) изменение скорости клиренса/интернализации компонентов сигнального комплекса; (8) изменения в мишени, которые приводят к рассоединению или дифференциальному изменению связывания лиганда и активации, например, модулятор повышает связывание лиганда, но удерживает рецептор в десенсибилизированном состоянии, или модулятор уменьшает связывание лиганда, однако индуцирует конформационное изменение в своем рецепторе, являющемся активирующим.

В некоторых аспектах изобретение описывает способы измерения дифференциального связывания первого компонента сигнального комплекса со вторым компонентом сигнального комплекса в присутствии или отсутствии исследуемого полипептидного агента. В таких аспектах дифференциальное связывание преимущественно отмечается, когда присутствуют субнасыщающие концентрации первого или второго компонента. В преимущественных вариантах воплощения изобретения концентрация первого или второго компонента может быть снижена для обеспечения субнасыщающих условий.

В некоторых аспектах изобретение описывает способы измерения дифференциального связывания исследуемого полипептидного связующего агента, например, антитела, с мишенью и/или ее сигнальным партнером в комплексной и безкомплексной форме. В таких аспектах дифференциальное связывание преимущественно отмечается, когда присутствуют субнасыщающие концентрации исследуемого полипептидного связующего агента. В преимущественных вариантах воплощения изобретения концентрация исследуемого полипептидного связующего агента может быть снижена для обеспечения субнасыщающих условий.

В некоторых вариантах воплощения изобретения испытание в отсутствии исследуемого полипептидного агента проводят с использованием контрольного соединения, которое преимущественно представлено соединением, принадлежащим к подобному структурному классу, что и исследуемый полипептидный агент, но которое связывается с другим антигеном, не обладающим никаким эффектом на исследуемый сигнальный комплекс. Например, контроль для исследуемого антитела может быть представлен антителом с соответствующим изотипом, связывающимся с неродственным антигеном, например, гемоцианином фиссуреллы (KLH).

Для положительных модуляторов в заданной субнасыщающей концентрации C1 более высокая аффинность C1 будет отражаться в более высоком сигнале связывания C1 с C2 в присутствии положительного модулятора. Преимущественное связывание модулятора будет отражаться в более высоком сигнале комплекса, состоящего из C1 и C2, в сравнении с сигналом только для C1 или только C2. В некоторых аспектах изобретения может отмечаться связывание модулятора с комплексом C1 и C2, но не отмечаться какого-либо измеряемого связывания только с C1 или только с C2.

Для отрицательных модуляторов в заданной субнасыщающей концентрации C1 более низкая аффинность C1 будет отражаться в более низком сигнале связывания C1 с C2 в присутствии модулятора. Преимущественное связывание модулятора будет отражаться в более высоком сигнале связывания модулятора только с C1 или только с C2 в сравнении с сигналом связывания модулятора с комплексом C1 и C2.

Изобретение описывает способы идентификации кандидатного полипептидного связующего агента, например, антитела, который модулирует связывание между первым и вторым компонентами сигнального комплекса. В некоторых вариантах воплощения изобретения первый и второй компоненты являются полипептидами. В типичных специфических вариантах воплощения изобретения первый и второй компоненты являются эндогенными.

В одном аспекте изобретения способы идентификации кандидатного модулирующего антитела включают (а) измерение аффинности связывания или параметра скорости связывания указанного первого компонента с указанным вторым компонентом в присутствии исследуемого полипептидного связующего агента, например, антитела; (б) измерение аффинности связывания или параметра скорости связывания указанного первого компонента с указанным вторым компонентом в отсутствии исследуемого полипептидного связующего агента; и (в) идентификацию указанного исследуемого полипептидного связующего агента в качестве кандидатного модулирующего препарата при условии, что указанный исследуемый полипептидный связующий агент приводит по меньшей мере к 1,5-кратной разнице в аффинности связывания или параметре скорости связывания, измеренных на этапах (а) и (б). В некоторых вариантах воплощения изобретения разница в аффинности связывания или параметре скорости связывания варьирует от примерно 1,5 раза (т.е. 50%) до примерно 1000 раз, или от примерно 1,5 раза до примерно 100 раз, или от примерно 2 раз до примерно 25 раз, или от примерно 2 раз до примерно 50 раз, или от примерно 1,5 раз до примерно 25 раз, или от примерно 1,5 раз до примерно 50 раз.

В некоторых вариантах воплощения изобретения исследуемый полипептидный связующий агент идентифицируется в качестве кандидатного положительного модулятора, если исследуемый полипептидный агент усиливает аффинность связывания или параметр скорости связывания между указанным первым компонентом и указанным вторым компонентом. В других вариантах воплощения изобретения исследуемый полипептидный связующий агент идентифицируется в качестве кандидатного отрицательного модулятора, если исследуемый полипептидный агент ослабляет аффинность связывания или параметр скорости связывания между указанным первым компонентом и указанным вторым компонентом.

Изменение (повышение или понижение) отдельного значения аффинности связывания или параметра скорости связывания представляет собой "усиленную" (или повышенную) или "ослабленную" (пониженную) аффинность связывания или параметр скорости связывания, что зависит от значения параметра и его единиц, и хорошо известно в науке. Например, в случае с параметром K_A, более высокие значения обозначают "усиленную" аффинность связывания, т.е. K_A со значением примерно 10^6 M^{-1} сильнее, чем K_A со значением примерно 10^5 M^{-1}. В качестве другого примера: в случае с параметром K_D, более низкие значения обозначают "усиленную" аффинность связывания, т.е. K_D со значением примерно 10^{-6} М сильнее, чем K_D со значением примерно 10^{-5} М. И наоборот, в случае с K_A, более низкие значения обозначают "ослабленную" аффинность связывания, т.е. K_A со значением примерно 10^5 M^{-1} является более низкой аффинностью связывания в сравнении с K_A со значением примерно 10^6 M^{-1}. В качестве другого примера: в случае с K_D, более высокие значения обозначают "ослабленную" аффинность связывания, т.е. K_D со значением примерно 10^5 M^{-1} является более низкой аффинностью связывания в сравнении с K_D со

значением примерно 10^{-6} М.

В контексте данного изобретения "усиленный" параметр скорости связывания обозначает повышенное время пребывания, более сильную связь или более слабую диссоциацию. В контексте данного изобретения "ослабленный" параметр скорости связывания обозначает пониженное время пребывания, более слабую связь или более сильную диссоциацию.

Аффинность связывания также может быть определена с использованием соотношения параметров скорости ассоциации и скорости диссоциации. Как правило, для скорости ассоциации более высокие значения обозначают более быструю или сильную ассоциацию или повышенное время удерживания, и обычно приводит к более высокой аффинности связывания. И наоборот, более низкие значения скорости ассоциации обозначают более медленную или более слабую ассоциацию или сниженное время удерживания, и обычно приводит к более низкой аффинности связывания. Как правило, для скорости диссоциации более высокие значения обозначают более быструю диссоциацию или пониженное время удерживания, и обычно приводит к более низкой аффинности связывания. И наоборот, более низкие значения скорости диссоциации обозначают более медленную диссоциацию или повышенное время удерживания, и обычно приводит к более высокой аффинности связывания. Это объясняется тем, что соотношение скорости диссоциации к скорости ассоциации или скорости ассоциации к скорости диссоциации указывает на аффинность связывания, что может быть отображено представленными ниже уравнениями.

$$\text{Аффинность} \begin{cases} K_D = \dfrac{[A][L]}{[AL]} = \dfrac{\text{Скорость диссоциации}}{\text{Скорость ассоциации}} \\ K_A = \dfrac{[AL]}{[A][L]} = \dfrac{\text{Скорость диссоциации}}{\text{Скорость ассоциации}} \end{cases}$$

$$A + L \underset{K_{off}}{\overset{K_{on}}{\rightleftharpoons}} AL$$

Даже если аффинность связывания не изменена по существу или определяемым образом, изменение во времени удерживания, т.е. повышенное время удерживания посредством повышения скорости ассоциации или снижения скорости диссоциации, или пониженное время удерживания посредством пониженной скорости ассоциации или повышенной скорости диссоциации, может все еще приводить к дифференциальной активации сигнальных путей. Например, в некоторых случаях, когда рецептор может активировать два различных пути передачи сигнала, такие пути отличаются по степени активации рецептора, необходимого для полного эффекта. Один сигнальный путь может быть полностью активирован при низких уровнях активации рецептора или времени удерживания, в то время как полная активация второго пути требует более высоких уровней активации рецептора или времени удерживания.

Прогнозируемая корреляция между характеристиками связывания и функциональным эффектом представлена в таблице.

Характеристики связывания с мишенью			Соотношение KD	Функциональный эффект (смещение анализа pAKT)
R	L	R-L		
-	-	+	$K_{[RL]A}<K_R$, K_L	Положительная модуляция
-	+	+	$K_{[AL]R}<K_L$	Положительная модуляция
+	-	+	$K_{[AR]L}<K_R$	Положительная модуляция
-	+	+	$K_{[AL]R}>K_L$	Отрицательная модуляция
+	-	+	$K_{[AR]L}>K_R$	Отрицательная модуляция

Иллюстративные примеры данных, отображающих тот факт, что функциональные эффекты антител к INSR коррелируют с их характеристиками связывания, представлены в следующей таблице.

АТ	Характеристики связывания с мишенью			Соотношение KD	Функциональный эффект (анализ рАКТ, кратное снижение EC_{50} инсулина относительно контрольного изотипа Ab)#
	R	L	R-L		
Прогнозные	-	-	+	$K_{[RL]A}<K_R$, K_L	Положительная модуляция
Ab078	Вне диапазона*		3,4e-10		3,3
Ab085	Нет связывания		2e-10		8,9
Прогнозные	+	-	+	$K_{[AR]L}<K_R$	Положительная модуляция
Ab001	1,2e-8		1,16e-10	103,4	9,7
Ab079	9,6e-9		4,96e-10	19,4	6,7
Ab080	1,2e-8		6,8e-10	17,6	8,4
Ab083	7,6e-9		3,76e-10	20,2	8,5
Прогнозные	+	-	+	$K_{[AR]L}=K_R$	Не модуляторы
Ab037	1,08e-10		8e-11	1,4	Нет изменений
Ab053	1,48e-10		9,6e-11	1,5	Нет изменений
Ab062	1,24e-10		1,08e-10	1,1	Нет изменений

Таким образом, связующие свойства взаимодействия(й) между модулятором и мишенью, ее сигнальным партнером и/или комплексом, включающим мишень и ее сигнального партнера, обычно прогнозируемы относительно функционального эффекта полипептида-модулятора на путь передачи сигнала мишенью.

В другом аспекте изобретения способы идентификации кандидатного модулирующего антитела включают (а) (i) измерение аффинности связывания или параметра скорости связывания исследуемого полипептидного связующего агента, например, антитела, с указанным первым компонентом в присутствии указанного второго компонента, или (ii) измерение аффинности связывания или параметра скорости связывания указанного исследуемого полипептидного связующего агента с указанным вторым компонентом в присутствии указанного первого компонента; и (б) (i) измерение аффинности связывания или параметра скорости связывания указанного исследуемого полипептидного связующего агента с указанным вторым компонентом в отсутствии указанного первого компонента; и (в) идентификацию указанного исследуемого полипептидного связующего агента в качестве кандидатного кинетического модулирующего препарата, при этом указанный исследуемый полипептидный связующий агент характеризуется по меньшей мере 1,5-кратной (т.е. 50%) разницей в аффинности связывания или параметрах скорости связывания, измеренными на этапах (а) и (б).

В некоторых вариантах воплощения изобретения исследуемый полипептидный связующий агент идентифицируется в качестве кандидатного положительного модулятора, если аффинность связывания или параметр скорости связывания, измеренные на этапе (а) по меньшей мере в 1,5 раза (т.е. 50%) больше, что аффинность связывания или параметр скорости связывания, измеренный на этапе (б). В специфических вариантах воплощения изобретения аффинность связывания или параметр скорости связывания, измеренные на этапе (а) в сравнении со значениями, измеренными на этапе (б), составляют от примерно 1,5 раз (т.е. 50%) до примерно 1000 раз больше, чем для этапа (а) в сравнении с этапом (б), или от примерно 1,5 раз до примерно 100 раз, или от примерно 2 раз до примерно 25 раз, или от примерно 2 раз до примерно 50 раз, или от примерно 1,5 раза до примерно 25 раз, или от примерно 1,5 раз до примерно 50 раз, например по меньшей мере 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, или до 500, или до 200, или до 150, или до 100, или до 90, или до 80, или до 70, или до 60, или до 50, или до 40, до 30, до 20 или до 10 раз.

В других вариантах воплощения изобретения исследуемый полипептидный связующий агент идентифицируется в качестве кандидатного отрицательного модулятора, если аффинность связывания или параметр скорости связывания, измеренные на этапе (б) по меньшей мере в 1,5 раза (т.е. 50%) больше,

чем аффинность связывания или параметр скорости связывания, измеренный на этапе (а). В специфических вариантах воплощения изобретения аффинность связывания или параметр скорости связывания, измеренные на этапе (б) в сравнении со значениями, измеренными на этапе (а), составляют от примерно 1,5 раз (т.е. 50%) до примерно 1000 раз больше, чем для этапа (б) в сравнении с этапом (а), или от примерно 1,5 раз до примерно 100 раз, или от примерно 2 раз до примерно 25 раз, или от примерно 2 раз до примерно 50 раз, или от примерно 1,5 раза до примерно 25 раз, или от примерно 1,5 раз до примерно 50 раз, например по меньшей мере 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 раз или 20, или до 500, или до 200, или до 150, или до 100, или до 90, или до 80, или до 70, или до 60, или до 50, или до 40, до 30, до 20 или до 10 раз.

В некоторых вариантах воплощения изобретения измеряют только аффинность связывания или параметр скорости связывания исследуемого полипептидного связующего агента для первого компонента. В некоторых вариантах воплощения изобретения измеряют только аффинность связывания или параметр скорости связывания исследуемого полипептидного связующего агента для второго компонента.

В некоторых вариантах воплощения изобретения исследуемый полипептидный связующий агент идентифицируется в качестве кандидатного положительного модулятора, если один или несколько параметров аффинности связывания или скорости связывания, выбираемые из группы, включающей (А) аффинность связывания или параметр скорости связывания исследуемого полипептидного связующего агента для комплекса, включающего первый и второй компоненты, в некоторых случаях $K_{[C1C2]M}$; (В) аффинность связывания или параметр скорости связывания первого компонента с комплексом, включающим полипептидный связующий агент и второй компонент, в некоторых случаях $K_{[MC2]C1}$; или (С) аффинность связывания или параметр скорости связывания второго компонента с комплексом, включающим полипептидный связующий агент и первый компонент, в некоторых случаях $K_{[MC1]C2}$, по меньшей мере в 1,5 раза больше, чем одно или несколько значений аффинности связывания или параметра скорости связывания, выбираемых из группы, включающей (1) аффинность связывания или параметр скорости связывания исследуемого полипептидного связующего агента только со вторым компонентом, в некоторых случаях K_{CM2}; (2) аффинность связывания или параметр скорости связывания исследуемого полипептидного связующего агента только с первым компонентом, в некоторых случаях K_{CM1}. В некоторых вариантах воплощения изобретения специфическая аффинность связывания или параметр скорости связывания для любого одного или нескольких значений (А), (В) или (С) составляют от примерно 1,5 раз (т.е. 50%) до примерно 1000 раз больше, чем аффинность связывания или параметр скорости связывания для любого одного или нескольких значений (1) или (2); или, с другой стороны, от примерно 1,5 раз до примерно 100 раз больше, или от примерно 2 раз до примерно 25 раз, или от примерно 2 раз до примерно 50 раз, или от примерно 1,5 раза до примерно 25 раз, или от примерно 1,5 раз до примерно 50 раз, например по меньшей мере 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 11 раз, 12 раз, 13 раз, 14 раз, 15 раз, 16 раз, 17 раз, 18 раз, 19 раз или 20 раз, или до 500 раз, или до 200 раз, или до 150 раз, или до 100 раз, или до 90 раз, или до 80 раз, или до 70 раз, или до 60 раз, или до 50 раз, или до 40 раз, до 30 раз, до 20 раз или до 10 раз. Например, в некоторых вариантах воплощения изобретения аффинность связывания или параметр скорости связывания для любого одного или нескольких значений (А), (В) или (С) больше, чем аффинность связывания или параметр скорости связывания для (1) и (2). В некоторых вариантах воплощения изобретения аффинность связывания или параметр скорости связывания для (1) больше, чем аффинность связывания или параметр скорости связывания для (2). В других вариантах воплощения изобретения аффинность связывания или параметр скорости связывания для (2) больше, чем аффинность связывания или параметр скорости связывания для (1). В некоторых вариантах воплощения изобретения два или несколько значений аффинности связывания или параметра скорости связывания измеряют и сравнивают, например, скорость диссоциации и скорость ассоциации, или K_A и K_D, или любую их комбинацию.

В специфических вариантах воплощения изобретения измеренная аффинность связывания представляет собой равновесную константу диссоциации K_D, и любое значение $K_{[C1C2]M}$, $K_{[MC2]C1}$ или $K_{[MC1]C2}$ примерно в 1,5-1000 раз ниже, чем любое значение K_{MC2} или K_{MC1}. Подобным образом, если измеряемая аффинность представлена константой диссоциации, любое из значений константы диссоциации между (А) [С1С2] и М, или (В) [МС2] и С1, или (С) [МС1] и С2 примерно в 1,5-1000 раз ниже, чем любое значение константы диссоциации между (1) М и С2 или (2) М и С1. В типичном варианте воплощения изобретения $K_{[C1C2]M}$ примерно в 1,5-1000 раз ниже, чем K_{MC2}. В другом типичном варианте воплощения изобретения $K_{[MC2]C1}$ примерно в 1,5-1000 раз ниже, чем K_{MC2}. В другом типичном варианте воплощения изобретения $K_{[MC1]C2}$ примерно в 1,5-1000 раз ниже, чем K_{MC2}. В другом типичном варианте воплощения изобретения $K_{[C1C2]M}$ примерно в 1,5-1000 раз ниже, чем K_{MC1}. В другом типичном варианте воплощения изобретения $K_{[MC2]C1}$ примерно в 1,5-1000 раз ниже, чем K_{MC1}. В другом типичном варианте воплощения изобретения $K_{[MC1]C2}$ примерно в 1,5-1000 раз ниже, чем K_{MC1}. Подобные примеры могут предполагаться для каждого из значений константы диссоциации между (А) [С1С2] и М, или (В) [МС2] и С1, или (С) [МС1] и С2 в сравнении с каждым значением константы диссоциации между (1) М и С2 или (2) М и С1.

И наоборот, измеренная аффинность связывания представляет собой равновесную константу ассоциации K_A, и любое значение $K_{[C1C2]M}$, $K_{[MC2]C1}$ или $K_{[MC1]C2}$ примерно в 1,5-1000 раз выше, чем любое

значение K_{MC2} или K_{MC1}. Подобным образом, если измеряемая аффинность представлена константой ассоциации, любое из значений константы ассоциации между (A) [C1C2] и M, или (B) [MC2] и C1, или (C) [MC1] и C2 примерно в 1,5-1000 раз выше, чем любое значение константы ассоциации между (1) M и C2 или (2) M и C1. В типичном варианте воплощения изобретения $K_{[C1C2]M}$ примерно в 1,5-1000 раз выше, чем K_{MC2}. В другом типичном варианте воплощения изобретения $K_{[MC2]C1}$ примерно в 1,5-1000 раз выше, чем K_{MC2}. В другом типичном варианте воплощения изобретения $K_{[MC1]C2}$ примерно в 1,5-1000 раз выше, чем K_{MC2}. В другом типичном варианте воплощения изобретения $K_{[C1C2]M}$ примерно в 1,5-1000 раз выше, чем K_{MC1}. В другом типичном варианте воплощения изобретения $K_{[MC2]C1}$ примерно в 1,5-1000 раз выше, чем K_{MC1}. В другом типичном варианте воплощения изобретения $K_{[MC1]C2}$ примерно в 1,5-1000 раз выше, чем K_{MC1}. Подобные примеры могут предполагаться для каждого из значений константы ассоциации между (A) [C1C2] и M, или (B) [MC2] и C1, или (C) [MC1] и C2 в сравнении с каждым значением константы ассоциации между (1) M и C2 или (2) M и C1.

В некоторых вариантах воплощения изобретения исследуемый полипептидный связующий агент идентифицируется в качестве кандидатного отрицательного модулятора, если один или несколько параметров аффинности связывания или скорости связывания, выбираемые из группы, включающей (1) аффинность связывания или параметр скорости связывания исследуемого полипептидного связующего агента только со вторым компонентом, в некоторых случаях K_{MC2}; или (2) аффинность связывания или параметр скорости связывания исследуемого полипептидного связующего агента только с первым компонентом, в некоторых случаях K_{MC1}, по меньшей мере в 1,5 раза больше, чем одно или несколько значений аффинности связывания или параметра скорости связывания, выбираемых из группы, включающей (A) аффинность связывания или параметр скорости связывания исследуемого полипептидного связующего агента для комплекса, включающего первый и второй компоненты, в некоторых случаях $K_{[C1C2]M}$; (B) аффинность связывания или параметр скорости связывания первого компонента с комплексом, включающим полипептидный связующий агент и второй компонент, в некоторых случаях $K_{[MC2]C1}$; или (C) аффинность связывания или параметр скорости связывания второго компонента с комплексом, включающим полипептидный связующий агент и первый компонент, в некоторых случаях $K_{[MC1]C2}$. В некоторых вариантах воплощения изобретения специфическая аффинность связывания или параметр скорости связывания для любого одного или нескольких значений (1) или (2) составляют от примерно 1,5 раз (т.е. 50%) до примерно 1000 раз больше, чем аффинность связывания или параметр скорости связывания для любого одного или нескольких значений (A), (B) или (C); или, с другой стороны, от примерно 1,5 раз до примерно 100 раз больше, или от примерно 2 раз до примерно 25 раз, или от примерно 2 раз до примерно 50 раз, или от примерно 1,5 раза до примерно 25 раз, или от примерно 1,5 раз до примерно 50 раз, например по меньшей мере 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 11 раз, 12 раз, 13 раз, 14 раз, 15 раз, 16 раз, 17 раз, 18 раз, 19 раз или 20 раз, или до 500 раз, или до 200 раз, или до 150 раз, или до 100 раз, или до 90 раз, или до 80 раз, или до 70 раз, или до 60 раз, или до 50 раз, или до 40 раз, до 30 раз, до 20 раз или до 10 раз. В некоторых вариантах воплощения изобретения аффинность связывания или параметр скорости связывания для любого значения (1) или (2) больше, чем аффинность связывания или параметр скорости связывания для всех значений (A), (B) или (C). В некоторых вариантах воплощения изобретения аффинность связывания или параметр скорости связывания для (1) больше, чем аффинность связывания или параметр скорости связывания для (2). В других вариантах воплощения изобретения аффинность связывания или параметр скорости связывания для (2) больше, чем аффинность связывания или параметр скорости связывания для (1). В некоторых вариантах воплощения изобретения два или несколько значений аффинности связывания или параметра скорости связывания измеряют и сравнивают, например, скорость диссоциации и скорость ассоциации, или K_A и K_D, или любую их комбинацию.

В специфических вариантах воплощения изобретения измеренная аффинность связывания представляет собой равновесную константу диссоциации K_D, и любое значение K_{MC2} или K_{MC1} примерно в 1,5-1000 раз ниже, чем любое значение $K_{[C1C2]M}$, $K_{[MC2]C1}$ или $K_{[MC1]C2}$. Подобным образом, если измеряемая аффинность представлена константой диссоциации, любое из значений константы диссоциации между (1) M и C2 или (2) M и C1 примерно в 1,5-1000 раз ниже, чем любое значение константы диссоциации между (A) [C1C2] и M, или (B) [MC2] и C1, или (C) [MC1] и C2. В одном типичном варианте воплощения изобретения K_{MC2} примерно в 1,5-1000 раз ниже, чем $K_{[C1C2]M}$. В другом типичном варианте воплощения изобретения K_{MC2} примерно в 1,5-1000 раз ниже, чем $K_{[MC2]C1}$. В другом типичном варианте воплощения изобретения K_{MC2} примерно в 1,5-1000 раз ниже, чем $K_{[MC1]C2}$. В другом типичном варианте воплощения изобретения K_{MC1} примерно в 1,5-1000 раз ниже, чем $K_{[C1C2]M}$. В другом типичном варианте воплощения изобретения K_{MC1} примерно в 1,5-1000 раз ниже, чем $K_{[MC2]C1}$. В еще одном типичном варианте воплощения изобретения K_{MC1} примерно в 1,5-1000 раз ниже, чем $K_{[MC1]C2}$. Подобные примеры могут предполагаться для каждого из значений константы диссоциации между (1) M и C2 или (2) M и C1 в сравнении с каждым значением константы диссоциации между (A) [C1C2] и M, или (B) [MC2] и C1, или (C) [MC1] и C2.

И наоборот, измеренная аффинность связывания представляет собой равновесную константу ассоциации K_A, и любое значение K_{MC2} или K_{MC1} примерно в 1,5-1000 раз выше, чем любое значение $K_{[C1C2]M}$,

$K_{[MC2]C1}$ или $K_{[MC1]C2}$. Подобным образом, если измеряемая аффинность представлена константой ассоциации, любое из значений константы ассоциации между (1) M и C2 или (2) M и C1 примерно в 1,5-1000 раз выше, чем любое значение константы ассоциации между (A) [C1C2] и M, или (B) [MC2] и C1, или (C) [MC1] и C2. В одном типичном варианте воплощения изобретения K_{MC2} примерно в 1,5-1000 раз выше, чем $K_{[C1C2]M}$. В другом типичном варианте воплощения изобретения K_{MC2} примерно в 1,5-1000 раз выше, чем $K_{[MC2]C1}$. В другом типичном варианте воплощения изобретения K_{MC2} примерно в 1,5-1000 раз выше, чем $K_{[MC1]C2}$. В другом типичном варианте воплощения изобретения K_{MC1} примерно в 1,5-1000 раз выше, чем $K_{[C1C2]M}$. В другом типичном варианте воплощения изобретения K_{MC1} примерно в 1,5-1000 раз выше, чем $K_{[MC2]C1}$. В еще одном типичном варианте воплощения изобретения K_{MC1} примерно в 1,5-1000 раз выше, чем $K_{[MC1]C2}$. Подобные примеры могут предполагаться для каждого из значений константы ассоциации между (1) M и C2 или (2) M и C1 в сравнении с каждым значением константы ассоциации между (A) [C1C2] и M, или (B) [MC2] и C1, или (C) [MC1] и C2.

В определенных вариантах воплощения изобретения модулятор представлен антителом, и C1 и C2 выбирают из группы, состоящей из инсулина и рецептора к инсулину.

В любом из таких вариантов воплощения изобретения исследуемый полипептидный связующий агент и второй компонент могут контактировать с множественными различными концентрациями указанного первого компонента. В любом из таких вариантов воплощения изобретения исследуемый полипептидный связующий агент и первый компонент могут контактировать с множественными различными концентрациями указанного второго компонента. В любом из таких вариантов воплощения изобретения множественные различные концентрации исследуемого полипептидного связующего агента могут контактировать с указанным первым компонентом и указанным вторым компонентом.

Если определен эффект исследуемого полипептидного связующего агента на взаимодействие связывания между первым компонентом и вторым компонентом, в некоторых специфических вариантах воплощения изобретения, в которых исследуемый полипептидный связующий агент представлен первым компонентом, например, лигандом, исследуемый полипептидный связующий агент находится в насыщающей концентрации в сравнении с концентрацией первого компонента. С другой стороны, если антиген к исследуемому полипептидному связующему агенту представлен вторым компонентом, например, рецептором, исследуемый полипептидный связующий агент находится в насыщающей концентрации в сравнении с концентрацией второго компонента. В некоторых вариантах воплощения изобретения концентрация исследуемого полипептидного связующего агента больше или равна K_D исследуемого полипептидного связующего агента для комплекса, включающего первый компонент и второй компонент. В дополнительных вариантах воплощения изобретения концентрация второго компонента меньше K_D исследуемого полипептидного связующего агента для первого компонента, например, лиганда. В других дополнительных вариантах воплощения изобретения концентрация первого компонента, например, лиганда, является субнасыщающей для связывания первого компонента со вторым компонентом, например, рецептором. В некоторых вариантах воплощения изобретения концентрация первого компонента, например, лиганда, находится в диапазоне примерно от EC_{20} до EC_{80} для взаимодействия первого компонента со вторым компонентом. В некоторых вариантах воплощения изобретения исследуемый полипептидный связующий агент в одной или нескольких концентрациях контактирует со множественными различными концентрациями первого компонента, например, лиганда, в присутствии одной или нескольких концентраций второго компонента, например, рецептора. В некоторых вариантах воплощения изобретения исследуемый полипептидный связующий агент в одной или нескольких концентрациях контактирует с множественными различными концентрациями второго компонента, например, рецептора, в присутствии одной или нескольких концентраций первого компонента, например, лиганда.

Если для идентификации положительного модулятора определяют дифференциальное связывание исследуемого полипептидного связующего агента с включенной в комплекс в сравнении с не включенной в комплекс мишенью и/или сигнальным партнером, в некоторых вариантах воплощения изобретения исследуемый полипептидный связующий агент находится в насыщающей концентрации для комплекса, включающего первый компонент и второй компонент. В некоторых вариантах воплощения изобретения концентрация исследуемого полипептидного связующего агента больше или равна K_D исследуемого полипептидного связующего агента для комплекса, включающего первый компонент, например, лиганд, и второй компонент, например, рецептор. В дополнительных вариантах воплощения изобретения концентрация второго компонента, например, рецептора, больше K_D второго компонента, например, рецептора, для первого компонента, например, лиганда. В дополнительных вариантах воплощения изобретения концентрация первого компонента, например, лиганда, находится в насыщающей концентрации для второго компонента, например, рецептора. В еще других вариантах воплощения изобретения исследуемый полипептидный связующий агент находится в субнасыщающей концентрации для комплекса, включающего первый компонент и второй компонент. В некоторых вариантах воплощения изобретения концентрация полипептидного связующего агента находится в диапазоне примерно от EC_{20} до EC_{80} для взаимодействия первого компонента со вторым компонентом. В некоторых вариантах воплощения изобретения концентрация второго компонента, например, рецептора, больше K_D второго компонента, например, рецептора, для первого компонента, например, лиганда. В некоторых вариантах воплощения изобретения

концентрация первого компонента, например, лиганда, находится в насыщающей концентрации для второго компонента, например, рецептора.

Если для идентификации отрицательного модулятора определяют дифференциальное связывание исследуемого полипептидного связующего агента с включенной в комплекс в сравнении с не включенной в комплекс мишенью и/или сигнальным партнером, в некоторых вариантах воплощения изобретения, в которых антиген, с которым связывается исследуемый полипептидный связующий агент, представлен первым компонентом, например, лигандом, исследуемый полипептидный связующий агент находится в насыщающей концентрации для первого компонента. Если антиген, с которым связывается исследуемый полипептидный связующий агент, представлен вторым компонентом, например, рецептором, исследуемый полипептидный связующий агент находится в субнасыщающей концентрации для второго компонента. В дополнительных вариантах воплощения изобретения концентрация полипептидного связующего агента находится в диапазоне примерно от EC_{20} до EC_{80}. Для взаимодействия первого компонента со вторым компонентом. В дополнительных вариантах воплощения изобретения концентрация второго компонента, например, рецептора, больше K_D второго компонента, например, рецептора, для первого компонента, например, лиганда. В дополнительных вариантах воплощения изобретения концентрация первого компонента, например, лиганда, находится в насыщающей концентрации для второго компонента, например, рецептора.

В некоторых вариантах воплощения изобретения способы дополнительно включают анализ совокупности исследуемых полипептидных связующих агентов, например, антител, для определения аффинности связывания с любым одним (а) первым компонентом; (б) вторым компонентом; или (в) комплексом, включающим первый компонент и второй компонент. В некоторых специфических вариантах воплощения изобретения полипептидные связующие агенты обладают аффинностью связывания, характеризующейся, например, равновесной константой диссоциации K_D примерно 10^{-5} М или менее, или примерно 10^{-6} М или менее, или примерно 10^{-7} М или менее, или примерно 10^{-8} М или менее, при этом более низкое значение K_D обозначает большую аффинность связывания. В некоторых вариантах воплощения изобретения подвергнутая скринингу совокупность исследуемых полипептидных связующих агентов представлена вариантами исходного полипептидного связующего агента, полученными путем введения одной или нескольких мутаций в исходный полипептидный связующий агент.

В дополнительных вариантах воплощения изобретения полипептидные связующие агенты могут быть подвергнуты скринингу на избирательность эффекта для первого или второго компонента в сравнении с другим связующим партнером, таким как рецептор-ловушка, слущивающийся рецептор или альтернативный компонент сигнального пути. Такие способы могут включать идентификацию полипептидного связующего агента, который существенно не изменяет аффинность связывания или параметр скорости связывания первого или второго компонента с другим связующим партнером, таким как связующий партнер, который не является ни первым, ни вторым компонентом. В некоторых вариантах воплощения изобретения присутствие полипептидного связующего агента изменяет аффинность связывания или параметр скорости связывания первого или второго компонента с различным связующим партнером не более чем в 5 раз, или не более чем 10 раз, или не более чем в 20 раз, или не более чем в 30 раз, или не более чем в 40 раз, или не более чем в 50 раз.

Любой из описанных выше способов может дополнительно включать измерение уровня сигнализации, опосредованного сигнальным комплексом в присутствии и отсутствии исследуемого полипептидного связующего агента, а также определение того, является ли исследуемый полипептидный связующий агент дополнительно агонистом, частичным агонистом, антагонистом или частичным антагонистом. Антагонизм или агонизм может быть измерен в ходе любого in vitro или in vivo анализа, известного в науке, включая, но не ограничиваясь, сигнализацию в ходе анализа фосфорилирования, анализа потока ионов, анализа транспорта молекул или анализа экспрессии генов.

В некоторых вариантах воплощения изобретения исследуемый полипептидный связующий агент смещает (положительно или отрицательно) кривую доза-ответ взаимодействия первого компонента, например, лиганда, со вторым компонентом, например, рецептором. Смещение может проявляться в виде повышения или понижения EC_{50} по меньшей мере примерно в 1,5 раза, например, от примерно 1,5 раза до примерно 100 раз. В некоторых вариантах воплощения изобретения исследуемый полипептидный связующий агент существенно не изменяет максимальный агонистический ответ сигнала, образованного в ходе взаимодействия первого и второго компонентов сигнального комплекса. В других вариантах воплощения изобретения исследуемый полипептидный связующий агент сам по себе действует в качестве антагониста (например, снижает максимальный агонистический ответ сигнала, вызванного указанным сигнальным комплексом) или агониста (например, повышает максимальный агонистический ответ сигнала, вызванного указанным сигнальным комплексом).

Если исследуемый полипептидный связующий агент действует в качестве антагониста или частичного антагониста, максимальный агонистический ответ может быть снижен, например, от примерно 1,5 раза до примерно 100 раз, или от примерно 2 раз до примерно 25 раз, или от примерно 1,5 раза до примерно 50 раз, или снижен примерно на 10, 25, 50% (1,5 раза), 75%, 2 раза, 3 раза или в 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз. С другой стороны, если исследуемый полипептидный связующий агент действует в качестве аго-

ниста или частичного агониста, максимальный агонистический ответ может быть повышен, например по меньшей мере примерно на 10, 25, 50% (1,5 раза), 75%, 2 раза, 3 раза, или 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз. Более того, если исследуемый полипептидный связующий агент действует в качестве антагониста или частичного антагониста, IC_{50} может составлять 1×10^{-5} или менее. Исследуемый полипептидный связующий агент может обладать дополнительными желательными характеристиками, например, исследуемый полипептидный связующий агент по существу не снижает клиренс указанного первого компонента или указанного второго компонента, или указанного сигнального комплекса, включающего указанный первый и второй компоненты.

Способы идентификации модулирующих агентов, например, кинетических модулирующих агентов, описаны дополнительно в находящихся на рассмотрении заявке на патент США № 61/246079 от 25 сентября 2009 г., заявке на патент США № 61/306324 от 19 февраля 2010 г., и заявке на международный патент от 24 сентября 2010 г. (Docket No. 27129/41726).

Исследуемый полипептидный связующий агент может обладать дополнительными желательными характеристиками, например, исследуемый полипептидный связующий агент по существу не снижает клиренс указанного первого компонента или указанного второго компонента, или указанного сигнального комплекса, включающего указанный первый и второй компоненты.

В родственном аспекте изобретение описывает способы идентификации модуляторов сигнального комплекса инсулин/рецептор инсулина и антитела или другого модулятора, идентифицированного любым из описанных выше способов или в любом другом месте данного изобретения.

Типы и источники антител.

Данное изобретение описывает специфические антитела, которые связываются с инсулином, рецептором инсулина или комплексом инсулин/рецептор инсулина. В типичных вариантах воплощения изобретения специфическое антитело по изобретению может включать каппа (κ) или лямбда (λ) легкую цепь человека или последовательность аминокислот, полученную из таких легких цепей, или тяжелую цепь человека или полученную из нее последовательность, или обе легкую и тяжелую цепи вместе в одной цепи, димерной, тетрамерной или другой форме. В некоторых вариантах воплощения изобретения тяжелая цепь и легкая цепь специфического иммуноглобулина представлены различными аминокислотными молекулами. В других вариантах воплощения изобретения эта же аминокислотная молекула содержит вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи указанного специфического антитела.

Термин "антитело" используется в самом широком своем смысле и включает полные собранные антитела, тетрамерные антитела, моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), антитела человека и гуманизированные антитела, фрагменты антител, которые могут связываться с антигеном (например, Fab', $F'(ab)_2$, Fv, одноцепочечные антитела, диатела), и рекомбинантные пептиды, включающие все вышеприведенное и обладающие необходимой биологической активностью. Термин "иммуноглобулин" или "тетрамерное антитело" описывает тетрамерный гликопротеин, состоящий из двух тяжелых цепей и двух легких цепей, каждая из которых включает вариабельный участок и константный участок. Антигенсвязывающие участки могут быть получены с использованием рекомбинантных способов ДНК или путем ферментативного или химического расщепления интактных антител. Фрагменты антител или антигенсвязывающие участки включают, помимо всего прочего, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, доменное антитело (dAb), фрагменты гипервариабельных участков (CDR), одноцепочечные антитела (scFv), фрагменты одноцепочечных антител, химерные антитела, диатела, триатела, тетратела, мини-тело, линейное антитело; хелатное рекомбинантное антитело, трителo или битело, интратело, нанотело, небольшой модулярный иммунофармацевтический препарат (SMIP), белок слияния иммуноглобулин с антигенсвязывающим доменом, антитело верблюдовых, антитело, содержащее VHH, или вариант, или производные антител, а также полипептиды, содержащие, по меньшей мере, участок иммуноглобулина, которого достаточно для проведения специфического связывания антигена с полипептидом, при этом антитело обладает необходимой биологической активностью.

Во встречающемся в природе иммуноглобулине каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, каждая пара имеет одну "легкую" (примерно 25 кДа) и одну "тяжелую" (примерно 50-70 кДа) цепи. Аминотерминальный участок каждой цепи включает вариабельный участок с примерно 100-110 или более аминокислотами, которые преимущественно ответственны за распознавание антигена. Карбоксильный терминальный участок каждой цепи определяет константный участок, преимущественно ответственный за эффекторную функцию. Легкие цепи человека классифицируют как каппа (κ) и лямбда (λ) легкие цепи. Тяжелые цепи классифицируют как мю (μ), дельта (Δ), гамма (γ), альфа (α) и эпсилон (ε), и определяют изотип антитела, т.е. IgM, IgD, IgG, IgA и IgE соответственно. В легких и тяжелых цепях вариабельные и константные участки соединены "J" участком, содержащим примерно 12 или более аминокислот, при этом тяжелая цепь также включает "D" участок, включающий примерно 10 или более аминокислот. [См. Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (включено в данный документ во всей своей полноте посредством ссылки для любых целей)]. Вариабельные участки каждой пары легкая/тяжелая цепь образуют центр связывания антитела, таким образом, интактный иммуноглобулин имеет два центра связывания.

Каждая тяжелая цепь имеет вариабельный домен (V_H) на одном конце, следующий за рядом константных доменов. Каждая легкая цепь на одном конце имеет вариабельный домен (V_L) и константный домен на другом участке; константный домен легкой цепи сопряжен с первым константным доменом тяжелой цепи, и вариабельный домен легкой цепи сопряжен с вариабельным доменом тяжелой цепи. Считается, что отдельные аминокислотные остатки образуют интерфейс между вариабельными доменами легкой и тяжелой цепи (Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987).

Вариабельные домены иммуноглобулина обладают такой же самой общей структурой относительно консервативных каркасных участков (FR), соединенных тремя гипервариабельными участками, или CDR. От N-конца к С-концу как легкая, так и тяжелая цепь включают домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Обозначение аминокислот в каждом домене проводят в соответствии с определениями, представленными в Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)) или Chothia & Lesk, (J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987); Chothia et al. (Nature 342:878-883, 1989).

Гипервариабельный участок антитела относят к аминокислотным остаткам CDR антитела, который ответственен за связывание антигена. Гипервариабельный участок включает аминокислотные остатки CDR [т.е. остатки 24-34 (LI), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) вариабельного домена легкой цепи и остатки 31-35 (HI), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) вариабельного домена тяжелой цепи, как это описано в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)] и/или остатки гипервариабельной петли [т.е. остатки 26-32 (LI), 50-52 (L2) и 91-96 (L3) вариабельного домена легкой цепи и 26-32 (HI), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) вариабельного участка тяжелой цепи, как это описано в Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)]. Однако специалист в данной области должен понимать, что фактическое расположение остатков CDR может варьировать от указанных выше остатков при идентификации последовательности отдельного антитела.

Остатки каркасного участка или FR представлены остатками вариабельного домена, в отличие от остатков гипервариабельного участка.

В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелых цепей, иммуноглобулины могут быть отнесены к различным классам, таким как IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, которые могут дополнительно подразделяться на подклассы или изотипы, например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов широко известны. Различные изотипы обладают различными эффекторными функциями, например, изотипы IgG1 и IgG3 обладают активностью АЗКЦ. Если антитело по изобретению включает константный домен, такое антитело может принадлежать к любому из таких подклассов или изотипов.

В типичных вариантах воплощения изобретения антитело по изобретению может включать каппа (κ) или лямбда (λ) легкую цепь человека или последовательность аминокислот, полученную из таких легких цепей, или тяжелую цепь человека или полученную из нее последовательность, или обе легкую и тяжелую цепи вместе в одной цепи, димерной, тетрамерной или другой форме.

Моноклональное антитело представляет собой антитело, полученное из популяции, по существу, однородных антител. Моноклональные антитела обычно высокоспецифичны и могут быть направлены относительно одного сайта антигена, в отличие от препаратов стандартных (поликлональных) антител, которые обычно включают различные антитела, направленные относительно различных детерминант (эпитопов). Кроме своей специфичности, моноклональные антитела являются преимущественными, т.к. они синтезируются с использованием однородной культуры, не загрязненной другими иммуноглобулинами с другой специфичностью и характеристиками.

Моноклональные антитела для использования по данному изобретению могут быть получены с использованием способа гибридомы, впервые описанного Kohler et al. (Nature, 256:495-7, 1975), или путем процедур рекомбинации ДНК (см., например, патент США № 4816567). Моноклональные антитела также могут быть изолированы из фаговых библиотек с использованием способов, описанных, например, в Clackson et al. (Nature 352:624-628, 1991) и Marks et al. (J. Mol. Biol. 222:581-597, 1991).

В способе гибридомы производится иммунизация мыши или другого подходящего животного-хозяина, такого как хомяк или макака, с получением лимфоцитов, продуцирующих или способных продуцировать антитела, которые будут специфически связываться с белком, используемым для иммунизации (Harlow & Lane; Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York (1988).

Рекомбинантное получение антител.

Данное изобретение также описывает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующих антитела по изобретению. В некоторых вариантах воплощения изобретения различные молекулы нуклеиновых кислот содержат вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи антиген-специфического антитела. В других вариантах воплощения изобретения одна и та же молекула нуклеиновой кислоты содержит вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи антиген-специфического антитела.

ДНК, кодирующая моноклональное антитело по изобретению, может быть выделена и секвенирована из клеток гибридомы, секретирующих антитело, с использованием стандартных процедур (напри-

мер, путем использования олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи моноклональных антител). Определение последовательности обычно требует выделения, по меньшей мере, участка гена или интересующей кДНК. Как правило, это требует клонирования ДНК или, преимущественно, мРНК (т.е. кДНК), кодирующей моноклональные антитела. Клонирование проводится с использованием стандартных способов (см., например, Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Guide, Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Press (включено в данную заявку во всей своей полноте посредством ссылки)). Например, библиотека кДНК может быть построена путем обратной транскрипции полиА+мРНК, преимущественно связанной с мембраной мРНК, и скрининг библиотеки проводится с использованием зондов, специфических относительно полипептидных последовательностей генов иммуноглобулина человека. Реакции нуклеотидных зондов и другие реакции гибридизации нуклеотидов проводятся в условиях, позволяющих идентифицировать полинуклеотиды, которые гибридизируют друг в друга при указанных условиях. Условия гибридизации могут быть рассчитаны, как это описано в Sambrook, et al. (Eds.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York (1989), p. 9.47-9.51.

В преимущественном варианте воплощения изобретения для амплификации кДНК (или фрагментов кДНК полной длины), кодирующей интересующий сегмент гена иммуноглобулина (например, вариабельный сегмент легкой цепи), используют полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Амплифицированные последовательности могут быть с легкостью клонированы в любой подходящий вектор, например, векторы экспрессии, векторы мини-генов или векторы фаговых дисплеев. Предполагают, что использование какого-либо отдельного способа клонирования не является критическим, если он будет позволять определять последовательность определенного фрагмента интересующего полипептида иммуноглобулина. В контексте данного изобретения "изолированная" (выделенная) молекула нуклеиновой кислоты или "изолированная" (выделенная) последовательность нуклеиновой кислоты представлена молекулой нуклеиновой кислоты, которую (1) идентифицируют и отделяют от по меньшей мере одной примесной молекулы нуклеиновой кислоты, с которой нуклеиновая кислота обычно связана в естественных условиях: или (2) клонируют, амплифицируют, соединяют с тэгом или другим образом отличают от остальных нуклеиновых кислот; таким образом, можно определить последовательность интересующей нуклеиновой кислоты, которая считается изолированной (выделенной). Молекула изолированной нуклеиновой кислоты представлена в другой форме или условиях, в сравнении с формой и условиями, в которых она встречается в естественной среде. Таким образом, молекулы изолированной нуклеиновой кислоты отличаются от молекулы изолированной нуклеиновой кислоты, находящейся в естественных клетках. Однако молекула изолированной нуклеиновой кислоты включает молекулы изолированной нуклеиновой кислоты, которые содержатся в клетках, обычно экспрессирующих антитело, при этом, например, молекула нуклеиновой кислоты отличается от своего положения в хромосоме в сравнении с естественными клетками.

Одним из источников РНК, используемой для клонирования и секвенирования, является гибридома, образуемая путем получения В-клеток из трансгенных мышей и слияния В-клетки с иммортализированной клеткой. С другой стороны, РНК может быть выделена из В-клеток (или целой селезенки) иммунизированных мышей. При использовании других источников, кроме гибридомы, может оказаться желательным провести скрининг последовательностей, кодирующих иммуноглобулины или полипептиды иммуноглобулинов со специфическими характеристиками связывания. Одним из способов для такого скрининга является использование способа фаговых дисплеев. Фаговые дисплеи дополнительно описаны ниже в тексте данного изобретения и, кроме того, хорошо известны в науке. [См., например, WO 91/17271, McCafferty et al., WO 92/01047, и Caton and Koprowski, (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6450-54 (1990))] (включены в данный документ во всей своей полноте посредством ссылки). В одном варианте воплощения изобретения изолируют кДНК из иммунизированной трансгенной мыши (например, вся кДНК селезенки), затем используется полимеразная цепная реакция для амплификации последовательностей кДНК, кодирующих участок полипептида иммуноглобулина, например, участки CDR, и амплифицированные последовательности вставляют в фаговый вектор. кДНК, кодирующие интересующие пептиды, например, пептиды вариабельного участка с требуемыми характеристиками связывания, идентифицируют с использованием стандартного способа фаговых дисплеев, такого как пэннинг.

Затем определяют последовательность амплифицированной или клонированной нуклеиновой кислоты. Как правило, определяют последовательность, кодирующую весь вариабельный участок полипептида иммуноглобулина, однако, иногда адекватным будет определение последовательности только фрагмента вариабельного участка, например, фрагмента, кодирующего CDR. Как правило, секвенированный фрагмент будет иметь в длину по меньшей мере 30 оснований, наиболее часто секвенированию подлежат основания, кодирующие по меньшей мере примерно одну треть или по меньшей мере примерно половину длины вариабельного участка.

Секвенирование может проводиться на клонах, выделенных из библиотеки кДНК, или, если используют ПЦР, после субклонирования амплифицированной последовательности, или путем прямого ПЦР-секвенирования амплифицированного сегмента. Секвенирование проводится с использованием стандартных способов (см., например, Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Guide, Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Press, и Sanger, F. et al. (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467 (включено

в данную заявку во всей своей полноте посредством ссылки)). Путем сравнения последовательности клонированной нуклеиновой кислоты с опубликованными последовательностями генов иммуноглобулинов человека и кДНК специалист в данной области сможет легко определить, в зависимости от секвенированного участка, (i) использование сегмента зародышевой линии гибридомы для получения полипептида иммуноглобулина (включая изотип тяжелой цепи) и (ii) последовательность вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, включая последовательности, полученные добавлением N-участка и в ходе соматической мутации. Одним из источников информации о последовательностях генов иммуноглобулинов является National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Md.

После изоляции ДНК может быть включена в векторы экспрессии, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки E. Coli, клетки линии COS обезьяны, клетки линии 293 эмбриональной почки человека (например, клетки линии 293E), клетки яичников китайского хомячка (CHO) или клетки миеломы, которые в противном случае не вырабатывают белок иммуноглобулина, для организации синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. Рекомбинантное получение антител хорошо известно в науке.

Экспрессия контрольных последовательностей относится к ДНК последовательностям, необходимым для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в отдельном организме-хозяине. Контрольные последовательности, подходящие для прокариот, включают, например, промотор, в некоторых случаях последовательности оператора, а также место связывания рибосомы. Как известно, эукариотические клетки используют промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры.

В альтернативном варианте воплощения изобретения аминокислотная последовательность интересующего иммуноглобулина может быть определена путем непосредственного секвенирования белка. Подходящие кодирующие нуклеотидные последовательности могут быть разработаны в соответствии с универсальной таблицей кодонов.

Варианты аминокислотной последовательности требуемого антитела могут быть получены путем введения соответствующих нуклеотидных изменений в кодирующую ДНК или путем пептидного синтеза. Такие варианты включают, например, делеции и/или вставки, и/или замещения остатков в последовательностях аминокислот антител. Любая комбинация делеции, вставки и замещения осуществляется для получения окончательной структуры при условии, что такая окончательная структура обладает необходимыми характеристиками. Изменения в аминокислотах также могут изменять пост-трансляционные процессы в антителе, такие как изменение количества или положения участков гликозилирования.

Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие варианты аминокислотной последовательности антитела, получают с использованием целого ряда известных в науке способов. Такие способы включают, но не ограничиваются, следующие: выделение из природного источника (в случае вариантных последовательностей аминокислот, встречающихся в природе) или получение путем сайт-специфического (или опосредованного олигонуклеотидами) мутагенеза, ПЦР-мутагенеза и кассетного мутагенеза полученных ранее вариантной или невариантной версий антитела.

Изобретение также описывает выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую антитела по изобретению, которая в некоторых случаях функционально связана с контрольными последовательностями, распознаваемыми клеткой-хозяином, векторами и клетками-хозяевами, включающими нуклеиновые кислоты, и рекомбинантные способы для получения антител, которые могут включать культивацию клетки-хозяина, в результате чего экспрессируется нуклеиновая кислота и, в некоторых случаях, выделяют антитело из культуры клетки-хозяина или питательной среды. Различные системы и способы для получения антитела обобщены в Birch & Racher (Adv. Drug Deliv. Rev. 671-685 (2006)).

Для рекомбинантного получения антитела по изобретению, нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, выделяют и вставляют в реплицируемый вектор для дальнейшего клонирования (амплификации ДНК) или экспрессии. ДНК, кодирующая моноклональное антитело, может быть легко выделена и секвенирована с использованием стандартных процедур (например, путем использования олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антител). Представлен целый ряд векторов. Компоненты вектора обычно включают, но не ограничиваются, одну или несколько сигнальных последовательностей, точку начала репликации, один или более избирательных маркерных генов, энхансер, промотор и последовательность прекращения транскрипции.

Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии ДНК в векторах включают прокариоты, дрожжи или клетки высших эукариотов. Подходящие для такой цели прокариотические клетки включают eubacteria, такие как грамотрицательные или грамположительные организмы, например, Enterobacteriaceae, такие как Escherichia, например, E.coli, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, например, Salmonella typhimurium, Serratia, например, Serratia marcescans, и Shigella, а также Bacilli, такие как B. subtilis и B. licheniformis (например, B. licheniformis 41 P, описанный в DD 266,710, опубликованной 12 апреля 1989 г.), Pseudomonas, такие как P. aeruglnosa, и Streptomyce. Одним преимущественным хозяином для клонирования служит E.coli 294 (ATCC 31446), однако подходят и другие штаммы, такие как E. coll B, E.coli X1776 (ATCC 31537) и E.coli W3110 (ATCC 27325). Такие примеры являются

иллюстративными, а не ограничивающими.

Кроме прокариот, такие эукариотические микроорганизмы, как гифомицеты или дрожжи, подходят для клонирования или экспрессии хозяев для кодирующих антитела векторов. Saccharomyces cerevisiae, или обычные пекарские дрожжи, используют наиболее часто среди других низких эукариотических организмов-хозяев. Однако могут использоваться и доступен целый ряд других родов, видов и штаммов, таких как хозяева Schizosaccharomyces pombe; Kluyveromyces, такие как, например, K. lactis, K. fragilis (ATCC 12,424), K. bulgaricus (ATCC 16,045), K. wickeramii (ATCC 24,178), K. waltii (ATCC 56,500), K. drosophilarum (ATCC 36,906), K. thermotolerans и K. marxianus; yarrowia (EP 402,226); Pichia pastors (EP 183,070); Candida; Trichoderma reesia (EP 244,234); Neurospora crassa; Schwanniomyces, такие как Schwanniomyces occidentalism, а также гифомицеты, такие как, например, Neurospora, Penicillium, Tolypocladium, и хозяева Aspergillus, такие как A. nidulans и A. niger.

Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированного антитела получают из многоклеточных организмов. Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Были идентифицированы многочисленные штаммы бакуловируса, его варианты и соответствующие подходящие клетки-хозяева насекомых, таких как Spodoptera frugiperda (гусеница), Aedes aegypti (москит), Aedes albopictus (москит), Drosophila melanogaster (плодовая мушка) и Bombyx mori. Общедоступен целый ряд вирусных штаммов для трансфекции, например, вариант L-1 Autographa californica NPV и штамм Bm-5 Bombyx mori NPV, и такие вирусы могут использоваться в данном изобретении, в частности, для трансфекции клеток Spodoptera frugiperda.

В качестве хозяев могут использоваться культуры клеток таких растений, как хлопок, кукуруза, картофель, соя, петуния, томат, табак, лемна и других растений.

Примеры подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих представлены следующими: включая CHOK1 клетки (ATCC CCL61), DXB-H, DB-44 и клетки яичников китайского хомячка/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 11: 4216 (1980)); линия CV1 почки обезьяны, трансформированная SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линия эмбриональной почки человека (клетки 293 или 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре (Graham et al., J. Gen Virol. 36: 59, 1977)); почки детеныша хомяка (BHK, ATCC CCL 10); клетки Сертолли мыши (TM4, Mather, (Biol. Reprod. 23: 243-251, 1980); клетки почки обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки цервикальной карциномы человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крыс Буффало (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легкого человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки TRI (Mather et al., Annals N.Y Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); клетки MRC 5; клетки FS4; и клетки линии гепатомы человека (Hep G2).

Клетки-хозяева трансформируют или трансфицируют описанными здесь векторами экспрессии или клонирования для получения антител, и культивируют в подходящей питательной среде, модифицированной соответствующим образом для индуцирования промоторов, селекции трансформантов или амплификации генов, кодирующих требуемые последовательности. Кроме того, новейшие векторы и трансфицированные линии клеток с множественными копиями единиц транскрипции, разделенных селективным маркером, особенно подходят и преимущественны для экспрессии антител, связывающихся с требуемым антигеном.

Клетки-хозяева, содержащие нуклеотидные последовательности требуемых антител, могут быть культивированы в целом ряде сред. Для культивации клеток-хозяев подходят представленные на рынке среды, такие как Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), и модифицированная по способу Дульбекко среда Игла ((DMEM), Sigma). Кроме того, в качестве питательной среды для клеток-хозяев может использоваться любая среда, описанная в Ham et al. (Meth. Enz. 58: 44, 1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102: 255 (1980), патентах США № 4767704; 4657866; 4927762; 4560655; или 5122469; WO 90/103430; WO 87/00195; или патенте США Re. No. 30985. В любую из таких сред могут быть добавлены, при необходимости, гормоны и/или другие факторы роста (такие как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), соли (такие как натрия хлорид, кальций, магний и фосфат), буферы (такие как HEPES), нуклеотиды (такие как аденозин и тимидин), антибиотики (такие как ГЕНТАМИЦИН™), микроэлементы (определенные как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне) и глюкоза или эквивалентный источник энергии. Также могут быть внесены любые другие необходимые добавки в соответствующих концентрациях, которые должны быть известны специалисту в данной области. Условия культуры, такие как температура, pH и т.п., такие же, как и условия, используемые для клетки-хозяина, выбранной для экспрессии, и должны быть очевидны специалисту в данной области.

При использовании рекомбинантных способов, антитело может быть получено внутри клетки, периплазматическом пространстве или непосредственно в среде, включая культуры микроорганизмов. Если антитело получают внутри клетки, в качестве первого этапа удаляются частицы распада клеток-хозяев или лизированных фрагментов, например, путем центрифугирования или ультрафильтрации. Better et al. [Science 240:1041-43, 1988; ICSU Short Reports 10:105 (1990); и Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:457-461 (1993) описывают процедуру изоляции антител, которые секретируются в периплазматическом про-

странстве E.coli. (См. также Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992))].

Композиции антитела, полученные из клеток микроорганизмов или млекопитающих, могут быть очищены с использованием, например, хроматографии с гидроксиаппатитом, катион- или анионообменной хроматографии, аффинной хроматографии, причем аффинная хроматография является преимущественным способом очистки. Пригодность белка А в качестве аффинного лиганда зависит от видов и изотипа любого домена Fc иммуноглобулина, присутствующего в антителе. Белок А может использоваться для очистки антител, основанных на тяжелых цепях γ_1, γ_2 или γ_4 человека (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62: 1-13, 1983). Белок G рекомендуется для всех мышиных изотипов и для γ_3 человека (Guss et al., EMBO J. 5:15671575 (1986)). Матрица, к которой присоединяется аффинный лиганд, в большинстве случаев представлена агарозой, однако имеются и другие матрицы. Механически стабильные матрицы, такие как стекло с контролируемым размером пор или полистирендивинилбензол, позволяют ускорить скорости потока и сократить время процессинга в сравнении с использованием агарозы. Если антитело включает домен C_H3, для очистки можно использовать смолу Bakerbond ABX™ (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ). Также представлены другие способы очистки белка, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение в этаноле, обращенно-фазовая ВЭЖХ, хроматография на кремниевой колонке, хроматография на гепарине, хроматография на СЕФАРОЗЕ™ или анион- или катион-обменной смоле (например, колонка с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусировка, электрофорез в полиакриламидном геле и осаждение в присутствии сульфата аммония, в зависимости от восстанавливаемого антитела.

Антитела по изобретению.

Данное изобретение описывает определенные специфические антитела, которые связывают инсулин, рецептор инсулина и/или комплекс инсулин/рецептор инсулина, и преимущественно изменяют (например, повышают или понижают) сигнализацию рецептора инсулина и/или его влияние на уровни глюкозы и усвоение глюкозы. В типичных вариантах воплощения изобретения специфическое антитело по изобретению может включать каппа (κ) или лямбда (λ) легкую цепь человека или последовательность аминокислот, полученную из таких легких цепей, или тяжелую цепь человека или полученную из нее последовательность, или обе легкую и тяжелую цепи вместе в одной цепи, димерной, тетрамерной или другой форме. В некоторых вариантах воплощения изобретения тяжелая цепь и легкая цепь специфического иммуноглобулина представлены различными аминокислотными молекулами. В других вариантах воплощения изобретения эта же аминокислотная молекула содержит вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи указанного специфического антитела.

В некоторых вариантах воплощения изобретения аминокислотная последовательность антитела к мишени включает один или несколько CDR с аминокислотной последовательностью вариабельного участка зрелой легкой цепи (V_L) (т.е. отсутствующую сигнальную последовательность) антител в SEQ ID NO: 1-150 или их вариантов. В некоторых вариантах воплощения изобретения V_L включает аминокислотную последовательность от начала CDR1 до конца CDR3 легкой цепи любого из описанных выше антител.

В одном варианте воплощения изобретения отдельное специфическое антитело включает CDR1, CDR2 или CDR3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3) легкой цепи, каждый из которых выбирают независимым образом из участков CDR1, CDR2 и CDR3 антитела, имеющего вариабельный участок легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность участка V_L, входящую в SEQ ID NO: 1-150. В одном аспекте изобретения CDR1 легкой цепи находится в пределах остатков 24-36, CDR2 находится в пределах остатков 50-56 и CDR3 находится в пределах остатков 89-101 в соответствии с нумерацией по Chothia. Полипептид отдельного специфического антитела может включать участки CDR1, CDR2 и CDR3 антитела с аминокислотной последовательностью участка V_L, выбираемой из группы, включающей SEQ ID NO: 1-150.

В некоторых вариантах воплощения изобретения отдельное специфическое антитело включает один или несколько CDR аминокислотной последовательности вариабельного участка зрелой тяжелой цепи (V_H) (т.е. отсутствующую сигнальную последовательность) антител в SEQ ID NO: 151-303 или их вариантов. В некоторых вариантах воплощения изобретения V_H включает аминокислотную последовательность от начала CDR1 до конца CDR3 любой одной из тяжелых цепей любого из описанных выше антител.

В одном варианте воплощения изобретения отдельное специфическое антитело включает CDR1, CDR2 или CDR3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3) тяжелой цепи, каждый из которых выбирают независимым образом из участков CDR1, CDR2 и CDR3 антитела, имеющего вариабельный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность участка V_H, входящую в SEQ ID NO: 151-303. Дополнительно предусматривается, что отдельное специфическое антитело включает CDR1, CDR2 или CDR3 тяжелой цепи, каждый из которых выбирают независимым образом из участков CDR1, CDR2 и CDR3 антитела, имеющего вариабельный участок тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность участка V_H, входящую в SEQ ID NO: 151-303. В одном аспекте изобретения CDR тяжелой цепи находятся в следующих участках согласно нумерации по Chothia: CDR1 в пределах остатков 26-35, CDR2 в пределах остатков 50-58 и CDR3 в пределах остатков 95-111 или 97-118. Полипептид отдельного специфического антитела может включать участки CDR1, CDR2 и CDR3 антитела с аминокислотной

последовательностью участка V_H, выбираемой из группы, включающей SEQ ID NO: 151-303.

CDR в табл. 1 и 2 и SEQ ID NO: 1-303 были определены в соответствии с системой IMGT, LeFranc et al. IMGT, the INTERNATIONAL IMMUNOGENETICS INFORMATION SYSTEM®, Nucl. Ac. Res. 33 D593-597 (2005).

В другом варианте воплощения изобретения антитело включает вариабельный участок зрелой легкой цепи, как это описано выше, и вариабельный участок зрелой тяжелой цепи, как это описано выше, соединенных, как это указано в табл. 3. В другом варианте воплощения изобретение описывает очищенный препарат моноклонального антитела, включающего вариабельный участок легкой цепи и вариабельные участки тяжелой цепи с последовательностями SEQ ID NO: 1-303 и в комбинациях, как это указано в табл. 3.

В типичных вариантах воплощения изобретение предусматривает следующее:

моноклональное антитело, содержащее один, два, три, четыре, пять или шесть HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 или LCDR3 с любой из последовательностей SEQ ID NO: 151-303 и SEQ ID NO: 1-150 соответственно, в некоторых случаях включающее одну или две мутации в любом из таких CDR, например, замену консервативных или неконсервативных аминокислот, и в некоторых случаях комбинированное, как это указано в табл. 3;

моноклональное антитело, содержащее все HCDR1, HCDR2, HCDR3 или вариабельный участок тяжелой цепи с любой из последовательностей SEQ ID NO: 151-303, в некоторых случаях включающее одну или две мутации в таких CDR, в некоторых случаях дополнительно включающее любой подходящий константный участок тяжелой цепи, например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2 или IgE, последовательность человека или их гибрид, или консенсусную последовательность человека;

моноклональное антитело, содержащее все LCDR1, LCDR2, LCDR3 или вариабельный участок легкой цепи с любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-150, в некоторых случаях включающее одну или две мутации в таких CDR, в некоторых случаях дополнительно включающее любой подходящий константный участок легкой цепи, например, константный участок каппа- или лямбда легкой цепи, последовательность человека или их гибрид, или консенсусную последовательность человека;

моноклональное антитело, связывающееся с одной и той же линейной или трехмерной антигенной детерминантой INSR в качестве антитела, включающего вариабельные участки с последовательностью SEQ ID NO: 1-303, например, как это определено в ходе рентгеновской кристаллографии или с использованием других биофизических или биохимических способов, таких как масс-спектрометрия с дейтерообменом, сканирование аланином и ИФА пептидного фрагмента;

моноклональное антитело, конкурирующее с антителом, включающим вариабельные участки с последовательностью SEQ ID NO: 1-303, за связывание с INSR человека более чем примерно на 75%, более чем примерно на 80% или более чем примерно на 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 или 95%.

В некоторых вариантах воплощения изобретения антитело включает все три CDR легкой цепи, все три CDR тяжелой цепи или все шесть CDR легкой и тяжелой цепи, скомбинированные, как это указано в табл. 3. В некоторых типичных вариантах воплощения изобретения два CDR легкой цепи из антитела могут быть скомбинированы с третьим CDR легкой цепи из другого антитела. С другой стороны, LCDR1 из одного антитела может быть скомбинирован с LCDR2 из другого антитела и LCDR3 из третьего антитела, в частности, в случаях с высокой степенью гомологичности CDR. Подобным образом, два CDR тяжелой цепи из антитела могут быть скомбинированы с третьим CDR тяжелой цепи из другого антитела, или HCDR1 из одного антитела может быть скомбинирован с HCDR2 из другого антитела и HCDR3 из третьего антитела, в частности, в случаях с высокой степенью гомологичности CDR.

Также могут использоваться консенсусные CDR. Любой один консенсусный CDR может быть скомбинирован с двумя другими CDR из одной и той же самой цепи (например, тяжелой или легкой) любых антител, например, для образования подходящего вариабельного участка тяжелой или легкой цепи.

В некоторых вариантах воплощения изобретения описано антитело, включающее полипептид с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 65, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентична вариабельному участку тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 148-284 и/или аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 65, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентична вариабельному участку легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 1-150, и антитело дополнительно включает по меньшей мере один, два, три, четыре, пять или все CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 или CDRL3. В некоторых вариантах воплощения изобретения аминокислотная последовательность с процентным показателем идентичности относительно вариабельного участка легкой цепи может включать один, два или три CDR легкой цепи. В других вариантах воплощения изобретения аминокислотная последовательность с процентным показателем идентичности относительно вариабельного участка тяжелой цепи может включать один, два или три CDR тяжелой цепи.

Предусматривается, что антитела по изобретению могут иметь одну, две или более аминокислот-

ных замен в участках CDR антитела, например, замен неконсервативных или консервативных аминокислот.

В родственном варианте воплощения изобретения изменены остатки в каркасном участке. Каркасные участки тяжелой цепи, которые могут быть изменены, находятся в участках, обозначенных H-FR1, H-FR2, H-FR3 и H-FR4, которые могут окружать остатки CDR тяжелой цепи, и каркасные участки легкой цепи, которые могут быть изменены, находятся в участках, обозначенных L-FR1, L-FR2, L-FR3 и L-FR4, которые могут окружать остатки CDR легкой цепи. Аминокислота в каркасном участке может быть замещена, например, подходящей аминокислотой, идентифицированной в каркасном участке человека или консенсусном каркасном участке человека.

Дополнительно предусмотрено, что изобретение описывает очищенный полипептид, включающий любую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1-150, слитую с любой аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 151-303, в некоторых случаях комбинированную в виде вариабельных участков тяжелой/легкой цепи, как это указано в табл. 3, или его фрагменты, которые включают, по меньшей мере, участок SEQ ID NO: 1-150 и SEQ ID NO: 151-303, скомбинированный в некоторых случаях, как это указано в табл. 3, при этом полипептид связывает рецептор инсулина, инсулин или комплекс инсулин/рецептор инсулина.

В другом аспекте изобретение описывает очищенный полипептид, включающий по меньшей мере один CDR описанного здесь вариабельного участка легкой цепи, при этом вариабельный участок легкой цепи включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательностям LCDR, установленным в SEQ ID NO: 1-150. В одном варианте воплощения изобретения полипептид может быть на 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичен любому одному LCDR с последовательностью SEQ ID NO: 1-150. В дополнительном аспекте изобретение описывает очищенный полипептид, включающий по меньшей мере один CDR описанного здесь вариабельного участка тяжелой цепи, при этом вариабельный участок тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательностям HCDR, установленным в SEQ ID NO: 151-303. В одном варианте воплощения изобретения полипептид может быть на 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичен любому одному HCDR с последовательностью SEQ ID NO: 151-303.

Дополнительно предусматривается, что CDR тяжелой и легкой цепей антитела включает вариантные аминокислотные последовательности, которые могут улучшить аффинность связывания антитела, и получают, например, путем "созревания аффинности". В одном аспекте предусматривается, что антитело по изобретению включает последовательность HCDR2 тяжелой цепи, обладающую примерно 35%-й идентичностью относительно HCDR2 последовательности исходного антитела, установленной в SEQ ID NO: 151-303. В родственном аспекте предусматривается, что антитело по изобретению включает последовательность HCDR3 тяжелой цепи, обладающую примерно 50%-й идентичностью относительно HCDR3 последовательности исходного антитела, установленной в SEQ ID NO: 151-303.

В одном варианте воплощения изобретение описывает антигенсвязывающие соединения, включая функциональные фрагменты, содержащие вариабельную аминокислотную последовательность, установленную в любой последовательности SEQ ID NO: 1-150 и 151-303. В родственном варианте воплощения изобретения указанное выше антигенсвязывающее соединение выбирают из группы, состоящей из полного собранного тетрамерного антитела, поликлонального антитела, моноклонального антитела, включая антитело HUMAN ENGINEERED™; гуманизированное антитело; антитело человека; химерное антитело; мультиспецифическое антитело, фрагмент антитела, Fab, $F(ab')_2$, Fv; scFv или фрагмент одноцепочечного антитела; диатело; триатело, тетратело, мини-тело, линейное антитело; хелатное рекомбинантное антитело, трителo или битело, интратело, нанотело, небольшой модулярный иммунофармацевтический препарат (SMIP), белок слияния иммуноглобулин с антигенсвязывающим доменом, антитело верблюдовых, антитело, содержащее V_{HH}, или варианты, или производные любых из таких антител, которые включают один или несколько последовательностей CDR по изобретению и обладают требуемой биологической активностью. Антигенсвязывающие соединения по изобретению преимущественно сохраняют аффинность связывания, составляющую 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}, 10^{-11} М или менее, как это измерено путем поверхностного плазмонного резонанса.

В одном аспекте антитела по изобретению включают вариабельный участок тяжелой цепи или вариабельный участок легкой цепи с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 151-303 и SEQ ID NO: 1-150 соответственно, скомбинированными, как это указано в табл. 3. Дополнительно предусматривается, что антитела могут включать полные или частичные антитела, состоящие из представленных выше аминокислотных последовательностей. В одном варианте воплощения изобретения антитела включают по меньшей мере один CDR1, CDR2 или CDR3 тяжелой цепи с последовательностями SEQ ID NO: 151-303, или по меньшей мере один CDR1, CDR2 или CDR3 легкой цепи с последовательностями SEQ ID NO: 1-150, скомбинированные, как это указано в табл. 3.

В одном варианте воплощения изобретения тяжелая цепь включает аминокислотную последовательность, идентифицируемую как последовательность CDR3 тяжелой цепи. Такая "последовательность CDR3 тяжелой цепи" (HCDR3) включает аминокислотную последовательность, идентифицированную как последовательность CDR3 тяжелой цепи, установленной в табл. 2 и SEQ ID NO: 151-303. С другой

стороны, последовательность HCDR3 включает аминокислотную последовательность, которая содержит одно или несколько аминокислотных изменений в сравнении с любой аминокислотной последовательностью HCDR3, идентифицированной в табл. 2, т.е. замену, вставку или делецию. Преимущественные замещения включают замещение аминокислоты в соответствующем положении другим HCDR3, указанным в табл. 2. С другой стороны, последовательность HCDR3 может включать консенсусную аминокислотную последовательность HCDR3, описанную в тексте данного изобретения.

С другой стороны, тяжелая цепь, включающая последовательность HCDR3 по изобретению, описанную выше, может дополнительно включать "последовательность CDR2 тяжелой цепи" (HCDR2) по изобретению, которая включает аминокислотные последовательности, идентифицированные как HCDR2 в SEQ ID NO: 151-303 и табл. 2, аминокислотные последовательности, которые включают одно или несколько аминокислотных соединений в сравнении с любым HCDR2, идентифицированным в SEQ ID NO: 151-303 и табл. 2, преимущественно замещение аминокислоты в соответствующем положении в пределах другого HCDR2 из табл. 2, или описанную здесь консенсусную последовательность HCDR2.

Тяжелая цепь, включающая описанную выше последовательность CDR3 тяжелой цепи по изобретению, также может включать (а) последовательность CDR1 тяжелой цепи по изобретению, описанную выше; и (б) CDR2 последовательность тяжелой цепи по изобретению, описанную выше.

В одном аспекте изобретения описано антитело, которое связывается с антигеном-мишенью и включает тяжелую цепь, которая состоит из любой одной, двух и/или трех последовательностей CDR тяжелой цепи по изобретению, описанных выше.

Любая из описанных выше последовательностей CDR тяжелой цепи также может включать аминокислоты, добавленные к любому концу CDR. Далее подробно описано получение вариантов и производных антител и антигенсвязывающих соединений по изобретению, включая созревание аффинности, или получение вариантов или производных, включающих аминокислотные аналоги. Типичные варианты включают варианты, содержащие замены консервативных или неконсервативных соответствующих аминокислот в аминокислотной последовательности, или замену аминокислоты соответствующей аминокислотой в последовательности антитела человека.

Антитела, включающие любую одну из описанных выше тяжелых цепей, могут дополнительно включать легкую цепь, преимущественно, легкую цепь, связывающуюся с антигеном-мишенью, и, более преимущественно, легкую цепь, включающую последовательности CDR легкой цепи по изобретению, описанные ниже.

В другом аспекте изобретения описано антитело, которое связывается с антигеном-мишенью и включает легкую цепь, которая состоит из любой одной, двух и/или трех последовательностей CDR легкой цепи по изобретению, описанных ниже.

Преимущественно, легкая цепь включает аминокислотную последовательность, идентифицированную как последовательность CDR3 легкой цепи. Такая "последовательность CDR3 легкой цепи" (LCDR3) включает аминокислотную последовательность, идентифицированную как последовательность CDR3 легкой цепи, установленной в табл. 1 и SEQ ID NO: 1-150. С другой стороны, последовательность CDR3 легкой цепи включает аминокислотную последовательность, которая содержит одно или несколько аминокислотных изменений в сравнении с любой аминокислотной последовательностью CDR3 легкой цепи, идентифицированной в табл. 1, т.е. замену, вставку или делецию. Преимущественные замещения включают замещение аминокислоты в соответствующем положении другим CDR3 легкой цепи, указанным в табл. 1. С другой стороны, последовательность CDR3 легкой цепи может включать консенсусную аминокислотную последовательность CDR3 легкой цепи, как это указано в табл. 1.

Легкая цепь, включающая последовательность CDR3 по изобретению, описанную выше, может дополнительно включать "последовательность CDR2 легкой цепи" по изобретению, которая включает аминокислотные последовательности, идентифицированные как CDR1 легкой цепи в SEQ ID NO: 1-150 или табл. 1, аминокислотные последовательности, которые включают одно или несколько аминокислотных изменений в сравнении с любым CDR1 легкой цепи, идентифицированным в SEQ ID NO: 1-150 или табл. 1, преимущественно, замещение аминокислоты в соответствующем положении в пределах другого CDR1 легкой цепи из табл. 1, или описанную здесь консенсусную последовательность CDR1 легкой цепи.

С другой стороны, легкая цепь, включающая последовательность CDR3 по изобретению, описанную выше, может дополнительно включать "последовательность CDR2 легкой цепи" по изобретению, которая включает аминокислотные последовательности, идентифицированные как CDR2 легкой цепи в SEQ ID NO: 1-150 или табл. 1, аминокислотные последовательности, которые включают одно или несколько аминокислотных изменений в сравнении с любым CDR2 легкой цепи, идентифицированным в табл. 1, преимущественно, замещение аминокислоты в соответствующем положении в пределах другого CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 1-150 или табл. 1, или описанную здесь консенсусную последовательность CDR2 легкой цепи, указанную в табл. 1.

В родственном аспекте изобретение предусматривает очищенный полипептид, включающий по меньшей мере один HCDR с последовательностью SEQ ID NO: 151-303 или LCDR с последовательностью SEQ ID NO: 1-150, при этом каркасные участки вариабельного участка тяжелой цепи и каркасные участки вариабельного участка легкой цепи включают каркасные участки антитела человека. В другом

варианте воплощения изобретения каркасные участки вариабельного участка тяжелой цепи и каркасные участки вариабельного участка легкой цепи химически изменены путем замещения аминокислоты для придания большей гомологии последовательности антитела человека. Например, в каждом каркасном участке тяжелой цепи (H-FR1-4) предусмотрено, что по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять или по меньшей мере шесть нативных остатков каркасного участка вариабельного участка тяжелой цепи мыши были изменены замещением аминокислот, и при этом в пределах каждого каркасного участка легкой цепи (L-FR1-4) по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять или по меньшей мере шесть нативных остатков каркасного участка вариабельного участка легкой цепи мыши были изменены замещением аминокислот.

Тяжелая цепь, включающая описанную выше последовательность CDR3 легкой цепи по изобретению, также может включать (а) последовательность CDR1 легкой цепи по изобретению, описанную выше: и (б) CDR2 последовательность легкой цепи по изобретению, описанную выше.

Антитела, включающие любой один вариабельный участок легкой цепи, описанный выше, может дополнительно включать вариабельный участок тяжелой цепи, в некоторых случаях скомбинированный, как это описано в табл. 3, преимущественно, вариабельный участок тяжелой цепи, связывающийся с антигеном-мишенью, и, более преимущественно, вариабельный участок тяжелой цепи, включающий описанные выше последовательности CDR тяжелой цепи по изобретению.

В одном аспекте изобретения антитело связывается с рецептором инсулина или комплексом, включающим инсулин и рецептор инсулина, с равновесной константой диссоциации K_D 10^{-5} М или менее, при этом антитело способно усиливать аффинность связывания между инсулином и рецептором инсулина примерно от 5 до 200 раз. В одном варианте воплощения изобретения антитело представлено положительным модулирующим антителом, например, антителом, которое усиливает аффинность связывания между инсулином и рецептором инсулина. В некоторых вариантах воплощения изобретения положительное модулирующее антитело включает, не ограничиваясь, Ab006, Ab030, Ab004, Ab013, Ab009, Ab007, Ab011, Ab001, Ab012, Ab010, Ab003, Ab008, Ab002, Ab005, Ab076, Ab077, Ab079, Ab080, Ab083, Ab059, Ab078, Ab085 или любой полипептид, включающий один или несколько CDR в соответствии с любым одним из представленных выше антител, как это указано в табл. 1 и 2, или содержит вариабельный участок антитела с последовательностями SEQ ID NO: 76, 80, 101, 128, 132 и SEQ ID NO: 291, 196, 239, 267, 271.

В дополнительных вариантах воплощения изобретения положительное модулирующее антитело связывается с рецептором инсулина, комплексом инсулин/рецептор инсулина или связывается с рецептором инсулина и комплексом инсулин/рецептор инсулина. В родственном варианте воплощения изобретения положительное модулирующее антитело, связывающееся с рецептором инсулина или комплексом инсулин/рецептор инсулина, или обеими мишенями, включает, не ограничиваясь, Ab006, Ab030, Ab004, Ab013, Ab09, Ab007, Ab011, Ab001, Ab012, Ab010, Ab003, Ab08, Ab02, Ab05, Ab076, Ab077, Ab079, Ab080, Ab083 или любой полипептид, включающий один или несколько CDR в соответствии с любым одним из представленных выше антител, как это указано в табл. 1 и 2, или содержит вариабельный участок антитела с последовательностями SEQ ID NO: 76, 80, 101 и SEQ ID NO: 291, 196 и 239.

В дополнительном варианте воплощения изобретения положительное модулирующее антитело связывается с комплексом инсулин/рецептор инсулина, но не связывается определяемым образом с не включенным в комплекс рецептором инсулина. В родственном варианте воплощения изобретения положительное модулирующее антитело, связывающееся с рецептором инсулина или комплексом инсулин/рецептор инсулина, или обеими мишенями, включает, не ограничиваясь, Ab059, Ab078, Ab085 или любой полипептид, включающий один или несколько CDR в соответствии с любым одним из представленных выше антител, как это указано в табл. 1 и 2, или содержит вариабельный участок антитела с последовательностями SEQ ID NO: 128, 132 и SEQ ID NO: 267 и 271.

В родственном аспекте изобретения антитело является агонистом. В одном варианте воплощения изобретения антитело является агонистическим антителом, связывающимся с рецептором инсулина с аффинностью K_D 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}, 10^{-11} М или менее, в некоторых случаях с максимальной агонистической активностью, составляющей 20-100% от максимальной агонистической активности инсулина (измерено путем анализа pAKT). В дополнительном варианте воплощения изобретения антитело представлено аллостерическим антителом-агонистом, которое связывается с рецептором инсулина с аффинностью 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}, 10^{-11} М или менее и (а) обладает максимальной агонистической активностью, составляющей 20-80% от максимальной агонистической активности инсулина (измерено в ходе анализа pAKT); (б) при своем присутствии не изменяет EC_{50} инсулина для INSR более чем в 2 раза; и (в) при своем присутствии не изменяет K_D инсулина для INSR более чем в 2 раза.

В определенных вариантах воплощения изобретения агонистическое антитело включает, не ограничиваясь, Ab021, Ab029, Ab022, Ab017, Ab023, Ab024, Ab025, Ab026, Ab031, Ab035, Ab027, Ab036, Ab037, Ab028, Ab038, Ab039, Ab040, Ab041, Ab042, Ab032, Ab043, Ab044, Ab045, Ab046, Ab047, Ab018, AЬO33, Ab048, Ab014, Ab015, Ab049, Ab034, Ab051, Ab053, Ab054, Ab056, Ab058, Ab062, Ab064, Ab066, Ab067, Ab068, Ab086, Ab069, Ab071, Ab073, Ab075, Ab082, Ab084 или любой полипептид, включающий

один или несколько CDR в соответствии с любым одним из представленных выше антител, как это указано в табл. 1 и 2, или содержит вариабельный участок антитела с последовательностями SEQ ID NO: 7, 113, 114, 124, 126, 130 и SEQ ID NO: 164, 252, 253, 263, 265 и 269.

В дополнительном аспекте изобретение описывает антитело, связывающееся с рецептором инсулина или комплексом, включающим инсулин и рецептор инсулина, с равновесной константной диссоциации K_D 10^{-5} М или менее, при этом существует вероятность ослабления аффинности связывания или скорости связывания между инсулином и рецептором инсулина по меньшей мере от примерно 3 раз до примерно 1000 раз. В одном варианте воплощения изобретения антитело представлено отрицательным модулирующим антителом, например, антителом, которое ослабляет аффинность связывания между инсулином и рецептором инсулина. В родственном варианте воплощения изобретения отрицательное модулирующее антитело включает, не ограничиваясь, следующие антитела: Ab087, Ab019, Ab088, Ab089, Ab020, Ab050, Ab052, Ab055, Ab057, Ab061, Ab063, Ab065, Ab070, Ab072, Ab074 и Ab081.

В дополнительном аспекте изобретения антитело представлено антителом, конкурирующим с любыми описанными здесь антителами за связывание с рецептором инсулина или комплексом инсулин/рецептор инсулина. В определенных вариантах воплощения изобретения антитело обладает частичной конкурентной способностью. В родственном варианте воплощения изобретения частичная конкуренция представляет собой конкуренцию, составляющую от примерно 30% до примерно 70, от примерно 30% до примерно 80, или примерно 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80%. В некоторых вариантах воплощения антитело обладает полной конкурентной способностью. В одном варианте воплощения изобретения полная конкуренция представляет собой конкуренцию, которая составляет более чем 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100%. Типичные анализы для изменения конкурентной способности антитела включают, но не ограничиваются, анализы загрузки рецептора и анализы количественного измерения связывания антигенной детерминанты, как это описано в тексте данного изобретения и науке.

В одном варианте воплощения изобретения антитело характеризуется более чем или равным 70% конкурированием с любым одним, двумя, тремя или всеми антителами, выбираемыми из группы, включающей Ab079, Ab076, Ab083, Ab080, Ab062, Ab020, Ab019, Ab088 и Ab089, и в некоторых случаях характеризуется более чем или равным 30% конкурированием с любым одним, двумя, тремя или всеми антителами, выбираемыми из группы, включающей Ab086, Ab064, Ab01 и Ab018. В дополнительном варианте воплощения изобретения антитело в некоторых случаях не конкурирует с одним или несколькими Ab062 и Ab086. В определенных вариантах воплощения изобретения антитело связывает человеческий и мышиный рецептор инсулина или комплекс.

В дополнительном варианте воплощения изобретения антитело, конкурирующее с описанным здесь антителом, характеризуется более чем или равным 70% конкурированием с любым одним, двумя, тремя или всеми антителами, выбираемыми из группы, включающей Ab040, Ab062, Ab030, Ab01 и Ab018, и в некоторых случаях характеризуется более чем или равным 30% конкурированием с любым одним, двумя, тремя или всеми антителами, выбираемыми из группы, включающей Ab037, Ab078, Ab083, Ab080 и Ab085. В родственном варианте воплощения изобретения антитело не конкурирует с Ab053, Ab064, 83-7, Ab019, Ab088 и Ab089. В некоторых случаях антитело связывает человеческий и мышиный рецептор инсулина или комплекс.

В дополнительном варианте воплощения изобретения антитело, конкурирующее с описанным здесь антителом, характеризуется более чем или равным 70% конкурированием с любым одним, двумя, тремя или всеми антителами, выбираемыми из группы, включающей Ab030, Ab037, Ab053, Ab001, Ab018, Ab064, Ab040, и в некоторых случаях характеризуется более чем или равным 30% конкурированием с любым одним, двумя, тремя или всеми антителами, выбираемыми из группы, включающей Ab085 и Ab086. В некоторых случаях антитело не конкурирует с Ab079, Ab076 и Ab088, и в некоторых случаях связывается с человеческим и мышиным рецептором инсулина или комплексом.

В дополнительном варианте воплощения изобретения антитело, конкурирующее с описанным здесь антителом, характеризуется более чем или равным 70% конкурированием с любым одним, двумя, тремя или всеми антителами, выбираемыми из группы, включающей Ab064, Ab062, Ab085 и Ab078, и в некоторых случаях не конкурирует с такими антителами, как Ab077, Ab001, Ab018, Ab030, Ab037, Ab079, Ab076, Ab083, Ab019, Ab088, Ab089 и Ab040. В некоторых случаях антитело связывает человеческий и мышиный рецептор инсулина или комплекс.

В дополнительном варианте воплощения изобретения антитело, конкурирующее с описанным здесь антителом, характеризуется более чем или равным 70% конкурированием с любым одним, двумя, тремя или всеми антителами, выбираемыми из группы, включающей Ab079, Ab076, Ab083, Ab080, Ab062, Ab020, Ab019, Ab088, Ab089. В некоторых случаях антитело не конкурирует с Ab062, Ab086, Ab001, Ab018, Ab030, Ab037, Ab064; и в некоторых случаях антитело реагирует только с мишенями человека и не связывается с мышиным рецептором инсулина или комплексом.

В дополнительном варианте воплощения изобретения антитело характеризуется более чем или равным 30% конкурированием с любым антителом. В некоторых случаях антитело характеризуется большим или равным 30% конкурированием с Ab061, и в некоторых случаях менее чем 30% конкурированием с Ab019 и Ab074, в некоторых случаях не конкурирует с Ab088. В некоторых случаях антитело связы-

вает человеческий и мышиный рецептор или комплекс.

В еще одном варианте воплощения изобретения антитело включает вариабельный участок тяжелой цепи, выбранный из группы, включающей SEQ ID NO: 281, 278, 277, 209, 275, 223, 284, 276 и 236, и вариабельный участок легкой цепи, выбираемой из группы, включающей SEQ ID NO: 141, 138, 137, 35, 135, 57, 144, 136 и 98.

В еще одном варианте воплощения изобретения антитело включает вариабельный участок тяжелой цепи, выбранный из группы, включающей SEQ ID NO: 195, 220, 303, 197, 208, 243, 245 и 251, и вариабельный участок легкой цепи, выбираемой из группы, включающей SEQ ID NO: 77, 50, 90, 84, 34, 104, 106 и 112.

В еще одном варианте воплощения изобретения антитело включает вариабельный участок тяжелой цепи, выбранный из группы, включающей SEQ ID NO: 241, 279, 258, 155 и 228, и вариабельный участок легкой цепи, выбираемой из группы, включающей SEQ ID NO: 103, 139, 119, 8 и 89.

Нуклеиновые кислоты антитела по изобретению.

Данное изобретение также описывает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующих специфические указанные антитела, как это описано выше. В некоторых вариантах воплощения изобретения различные молекулы нуклеиновых кислот содержат вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи мишень-специфического антитела. В других вариантах воплощения изобретения одна и та же молекула нуклеиновой кислоты содержит вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи мишень-специфического антитела. В одном варианте воплощения изобретения нуклеиновая кислота кодирует мишень-специфическое антитело по изобретению.

В одном аспекте молекула нуклеиновой кислоты по изобретению включает последовательность нуклеотидов, кодирующую аминокислотную последовательность V_L, установленную в SEQ ID NO: 1-150, или ее участок. В родственном аспекте изобретения аминокислотная последовательность V_L представлена консенсусной последовательностью. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеиновая кислота кодирует аминокислотную последовательность CDR легкой цепи указанного антитела. В некоторых вариантах воплощения изобретения указанный участок представлен смежным участком, включающим CDR1-CDR3. В одном варианте воплощения изобретения указанный участок включает по меньшей мере один, два или три CDR1, CDR2 или CDR3 участка легкой цепи.

В некоторых вариантах воплощения изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует аминокислотную последовательность V_L, которая по меньшей мере на 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности V_L, установленной в SEQ ID NO: 1-150. Молекулы нуклеиновых кислот по изобретению включают нуклеиновые кислоты, которые гибридизируют при очень строгих условиях гибридизации.

Дополнительно предусматривается, что молекула нуклеиновой кислоты по изобретению включает нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность V_H любой последовательности SEQ ID NO: 151-303, или ее участок. В родственном аспекте изобретения аминокислотная последовательность V_H представлена консенсусной последовательностью. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеиновая кислота кодирует аминокислотную последовательность CDR тяжелой цепи указанного антитела. В некоторых вариантах воплощения изобретения указанный участок представлен смежным участком, включающим CDR1-CDR3 тяжелой цепи. В одном варианте воплощения изобретения указанный участок включает по меньшей мере один, два или три CDR1, CDR2 или CDR3 участка тяжелой цепи.

В некоторых вариантах воплощения изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует аминокислотную последовательность V_H, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности V_H, установленной в SEQ ID NO: 151-303. Молекулы нуклеиновых кислот по изобретению включают нуклеиновые кислоты, которые гибридизируют при очень строгих условиях гибридизации.

Дополнительно предусмотрено, что нуклеиновые кислоты по изобретению кодируют легкую цепь полной длины или тяжелую цепь полной длины антитела, включающего вариабельный участок тяжелой цепи или легкой цепи с последовательностями SEQ ID NO: 1-303 и, в некоторых случаях, комбинированные, как это описано в табл. 3, при этом легкая цепь полной длины или тяжелая цепь полной длины включает константный участок легкой цепи или константный участок тяжелой цепи соответственно.

Изобретение дополнительно предусматривает нуклеиновые кислоты, кодирующие варианты антитела и полипептиды, включающие антигенсвязывающие участки по изобретению, как это описано выше.

Способы получения и выделения полинуклеотида, кодирующего антитела по изобретению, хорошо известны специалисту в данной области. Полинуклеотид по изобретению может быть соединен с любой другой из целого ряда нуклеотидных последовательностей путем использования установленных способов рекомбинации ДНК (см. Sambrook et al. (2d Ed.; 1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Полезные нуклеотидные последовательности для соединения с полипептидами включают ряд векторов, например, плазмиды, космиды, производные фага лямбда, фагемиды и т.п., и хорошо известны в науке. В соответствии с этим изобретение также описывает вектор, включая полинуклеотид по изобретению, и клетку-хозяин, содержащую полинуклеотид. В

целом вектор содержит точку начала репликации, функционирующую по меньшей мере в одном организме, подходящие сайты для рестрикционных эндонуклеаз и избираемый маркер для клетки-хозяина. Векторы по изобретению включают векторы экспрессии, векторы репликации, векторы для получения зондов, векторы секвенирования и ретровирусные векторы. Клетка-хозяин по изобретению может быть представлена прокариотической или эукариотической клеткой, а также одноклеточным организмом или частью многоклеточного организма. Специалисту в данной области известно большое количество подходящих векторов и промоторов, которые представлены на рынке и используются для получения векторов рекомбинации по данному изобретению.

Для включения и экспрессии кодирующей последовательности может использоваться целый ряд систем векторов экспрессии/хозяина. Они включают, но не ограничиваются, микроорганизмы, такие как бактерии, трансформированные рекомбинантным бактериофагом, плазмидные, фагемидные или космидные векторы экспрессии ДНК; дрожжи, трансформированные векторами экспрессии дрожжей; клеточные системы млекопитающих, инфицированные вирусными векторами экспрессии (например, бакуловирусом); системы клеток растений, трансфицированные вирусными векторами экспрессии (например, вирусом мозаики цветной капусты, CaMV; вирусом табачной мозаики, TMV) или трансформированные бактериальными векторами экспрессии (например, Ti или плазмидой pBR322).; или даже системы клеток животных. Клетки млекопитающих, которые могут использоваться в ходе рекомбинантного получения белка, включают, но не ограничиваются, клетки VERO, клетки HeLa, клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки COS (такие как COS-7), WI38, BHK, HepG2, 3T3, RIN, MDCK, A549, PC12, K562 и клетки HEK293.

Полинуклеотидные варианты и фрагменты антитела могут быть легко получены специалистом в данной области для кодирования биологически активных фрагментов, вариантов или мутантов встречающейся в природе молекулы антитела, обладающей такой же самой или подобной биологической активностью в сравнении с встречающимся в природе антителом. Это может быть выполнено с использованием способов ПЦР, разрезания или расщепления ДНК, кодирующей участки тяжелой и легкой цепей антитела и т.п. Например, для идентификации важных аминокислотных остатков для отдельной активности антитела могут использоваться такие способы, как точечный мутагенез, ПЦР и другие хорошо известные в науке способы. Таким образом, специалист в данной области будет способен получить изменения в отдельных основаниях цепи ДНК, что приведет к изменению кодона и миссенс-мутации.

Фрагменты антител.

Фрагменты антитела включают участок интактного антитела полной длины, преимущественно антигенсвязывающий или вариабельный участок интактного антитела. Примеры фрагментов антитела включают Fab, Fab', $F(ab')_2$ и фрагменты Fv; диатела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител (например, scFv); молекулы мультиспецифических антител, такие как биспецифических, триспецифических и т.д. антител (например, диатела, триатела, тетратела); мини-тело; рекомбинантное антитело-хелатор; тритела или битела; интратела; нанотела; небольшой модулярный иммунофармацевтический препарат (SMIP), белок слияния - иммуноглобулин с антигенсвязывающим доменом, антитело верблюдовых, антитело, содержащее V_{HH}; и другие полипептиды, образованные из фрагментов антитела. [См., например, Holliger & Hudson (Nat. Biotech. 23(9) 1126-36 (2005))].

Расщепление антител папаином приводит к образованию двух идентичных антигенсвязывающих фрагментов, обозначаемых "Fab" фрагментами, моновалентных фрагментов, состоящих из доменов V_L, V_H, C_L и C_H, каждый из которых имеет один антигенсвязывающий сайт, и остаточного фрагмента "Fc", название которого отражает его способность легко кристаллизоваться. Обработка пепсином позволяет получить фрагмент $F(ab')_2$, бивалентный фрагмент, включающий два фрагмента Fab, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирном участке, и такой фрагмент имеет два "одноцепочечных фрагмента Fv" или фрагментов "scFv" антитела, включающих домены V_H и V_L антител, при этом такие домены присутствуют в одной полипептидной цепи. Преимущественно, полипептид Fv дополнительно включает полипептидный линкер между доменами V_H и V_L, что позволяет Fv образовывать необходимую структуру для связывания антигена, приводя к образованию одноцепочечного антитела (scFv), в котором участок V_L и V_H скомбинирован для образования моновалентной молекулы посредством синтетического линкера, что позволяет формировать одну цепь белка (Bird et al., Science 242:423-426, 1988, and Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988). Более подробное описание sFv см. в Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, p. 269-315 (1994). Фрагмент Fd состоит из доменов V_H и C_H1.

Дополнительные фрагменты антитела включают доменный фрагмент антитела (dAb) (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989), который состоит из домена V_H. Диатела представляют собой бивалентные антитела, в которых домены V_H и V_L экспрессируются на одной полипептидной цепи, однако использование слишком короткого линкера позволяет соединять два домена на одной цепи, что усиливает соединение доменов в пару с комплементарными доменами другой цепи и образование двух антигенсвязывающих сайтов (см., например, EP 404,097; WO 93/11161; Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, 1993, и Poljak et al., Structure 2:1121-1123, 1994). Диатела могут быть биспецифическими или моноспецифическими.

Функциональные антитела с тяжелыми цепями и лишенные легких цепей встречаются в природе у акул-нянек (Greenberg et al., Nature 374:168-73, 1995), ковровых акул (Nuttall et al., Mol. Immunol. 38:313-26, 2001) и семейства Camelidae (Hamers-Casterman et al., Nature 363: 446-8, 1993; Nguyen et al., J. Mol. Biol. 275: 413, 1998), таких как верблюды, одногорбые верблюды, альпаки и ламы. У таких животных антигенсвязывающий сайт уменьшен до одного домена, т.е. домена V_{HH}. Такие антитела образуют антигенсвязывающие участки с использованием только вариабельного домена тяжелой цепи, т.е. такие функциональные антитела являются гомодимерами тяжелых цепей, имея структуру только H_2L_2 (обозначается как "антитела с тяжелой цепью" или "HCAbs"). Как сообщается, V_{HH} верблюдовых рекомбинирует с константными участками IgG2 и IgG3, которые содержат шарнирный участок, домены CH2 и CH3 и не содержат домен CH1 (Hamers-Casterman et al., см. выше). Например, IgG1 ламы представляет собой стандартный изотип антитела (H_2L_2), в котором V_H рекомбинирует с константным участком, содержащим шарнирный участок, домены CH1, CH2 и CH3, в то время как IgG2 и IgG3 ламы представлены изотипами только с тяжелыми цепями, не содержащими домены CH1 и не содержащими легкие цепи. Было показано, что домены V_{HH} верблюдовых связываются с антигеном с высокой аффинностью (Desmyter et al., J. Biol. Chem. 276:26285-90, 2001) и обладают высокой устойчивостью в растворе (Ewert et al., Biochemistry 41:3628-36, 2002). Классические фрагменты, содержащие только V_H, трудно получить в растворимой форме, однако можно достичь улучшения в растворимости и специфическом связывании путем изменения каркасных участков для придания им большей схожести с V_{HH}. (См., например, Reichman, et al., J. Immunol Methods 1999, 231:25-38.) Способы получения антител, содержащих тяжелые цепи верблюдовых, описаны, например, в заявках на патент США № 20050136049 и 20050037421.

Вариабельный домен тяжелой цепи антитела с молекулярной массой 15 кДа обозначают как нанотело (Cortez-Retamozo et al., Cancer Research 64:2853-57, 2004). Библиотека нанотел может быть получена у иммунизированного двугорбого верблюда, как это описано в Conrath et al. (Antimicrob Agents Chemother 45: 2807-12, 2001), или путем использования рекомбинантных способов, как это описано в Revets et al., Expert Opin. Biol. Ther. 5(1): 111-24 (2005).

Получение биспецифического Fab-scFv ("битела") и триспецифического Fab-(scFv) (2) ("тритела") описано в Schoonjans et al. (J Immunol. 165:7050-57, 2000) и Willems et al. (J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 786:161-76, 2003). Для дител или трител молекулу scFv сливают с одной или обеими цепями VL-CL (L) и VH-CH1 (Fd), например, для получения трителa два scFv сливают с С-концом Fab, в то время как в дителе один scFv слит с С-концом Fab.

"Мини-тело", состоящее из scFv, слитого с CH3 посредством пептидного линкера (бесшарнирное) или посредством шарнира IgG, было описано в Olafsen et al., Protein Eng Des Sel. 2004 Apr; 17(4):315-23.

Интратела представляют собой одноцепочечные антитела, которые демонстрируют внутриклеточную экспрессию и управляют внутриклеточной функцией белков (Biocca et al., EMBO J. 9:101-108, 1990; Colby et al., Proc Natl Acad Sci USA. 101:17616-21, 2004). Интратела, включающие клеточные сигнальные последовательности, сохраняющие структуру антитела во внутриклеточных участках, могут быть получены, как это описано в Mhashilkar et al. (EMBO J 14:1542-51, 1995) and Wheeler et al. (FASEB J. 17:1733-5. 2003). Транстела представляют собой проникающие в клетки антитела, в которых домен белковой трансдукции (PTD) слит с одноцепочечным вариабельным фрагментом (scFv) антител, как это описано в Heng et al. (Med Hypotheses. 64:1105-8, 2005).

Дополнительно предусматриваются антитела, являющиеся SMIP или белком слияния - иммуноглобулином с антигенсвязывающим доменом, специфическими относительно антигена. Такие антитела представляют собой одноцепочечные полипептиды, включающие антигенсвязывающие домены, слитые с доменами иммуноглобулинов, необходимых для выполнения эффекторных функций антитела. (См., например, WO 03/041600, публикацию патента США 20030133939 и публикацию патента США 20030118592.)

В молекулу может быть введен один или несколько CDR ковалентным или нековалентным образом для преобразования ее в иммуноадгезин. Иммуноадгезин может включать CDR как часть большей полипептидной цепи, может ковалентно присоединять CDR к другой полипептидной цепи или может включать CDR нековалентным образом. CDR позволяют иммуноадгезину специфически связываться с отдельным интересующим антигеном.

В еще одном варианте воплощения изобретения антитело или антигенсвязывающее соединение включает константный участок и один или несколько каркасных участков вариабельного участка тяжелой и легкой цепи последовательности антитела человека. В родственном варианте воплощения изобретения антитело включает модифицированный или немодифицированный константный участок IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека.

С другой стороны, фрагменты антитела могут быть слиты с каркасным белком. Библиотеки каркасных белков включают, но не ограничиваются, аднектины, аффитела, антикалины, DARP-ины, рекомбинантные ингибиторы по типу Кунитца, тетранектины, А-доменные белки, липокалины, белки с повторами, такие как белки с анкириновым повтором, иммунные белки, α2p8 пептид, дефензин А насекомого, домены PDZ, харибдотоксины, PHD-пальцы, ТЕ M^{-1} β-лактамазу, домены фибронектина типа III, CTLA-4, Т-клеточные рецепторы, ноттинсы, неокарциностатин, углевод-связывающий модуль 4-2, зеленый

флуоресцирующий белок, тиоредоксин (Gebauer & Skerra, Curr. Opin. Chem. Biol. 13:245-55 (2009); Gill & Damle, Curr. Opin. Biotech 17: 653-58 (2006); Hosse et al., Protein Sci. 15:14-27 (2006); Skerra, Curr. Opin. Biotech 18: 295-3-4 (2007)).

Таким образом, с использованием известных в науке способов может использоваться целый ряд композиций, включающих один, два и/или три CDR вариабельного участка тяжелой цепи или вариабельного участка легкой цепи антитела.

Мультиспецифические антитела.

В некоторых вариантах воплощения изобретения может оказаться желательным получение мультиспецифических (например, биспецифических) антител по изобретению, обладающих специфичностью связывания по меньшей мере с двумя различными антигенными детерминантами одной и той же или разных молекул. Типичные биспецифические антитела могут связываться с двумя различными антигенными детерминантами антигена. С другой стороны, антигенспецифический участок антитела может быть скомбинирован с областью связывания с молекулой клеточной мембраны, такой как молекула рецептора Т-клетки (например, CD2 или CD3), или рецепторами Fc к IgG (FcλR), такими как FcλRI (CD64), FcλRH (CD32) и FcλRIH (CD16), т.о. сосредотачиваются и локализируются защитные клеточные механизмы против требуемого антигена. Биспецифические антитела также могут использоваться для локализации цитотоксических агентов в клетке, экспрессирующей или содержащей требуемый антиген. Такие антитела обладают антигенсвязующим участком и доменом, который связывается с цитотоксическим агентом (например, сапорином, анти-интерфероном-60, алкалоидом барвинка, цепью А рицина, метотрексатом или радиоактивным изотопом гаптеном).

Биспецифические антитела могут быть получены в виде антител с полной длиной или фрагментов антител (например, $F(ab')_2$ биспецифические антитела).

Согласно другому подходу, для получения биспецифических антител может быть сконструирован участок взаимодействия между парой молекул антител для получения максимально большего числа гетеродимеров, восстановленных из рекомбинантной клеточной культуры. Преимущественный участок взаимодействия состоит, по меньшей мере, из домена C_H3 константного участка антитела. В таком способе одна или несколько небольших аминокислотных цепей из участка взаимодействия молекулы первого антитела замещаются большими боковыми цепями (например, тирозином или триптофаном). В участке взаимодействия молекулы другого антитела создаются компенсирующие "пустоты" одинакового или разного размеров относительно большой боковой цепи(ей) путем замены больших боковых аминокислотных цепей меньшими цепями (например, аланином или треонином). Это обеспечивает механизм повышения выхода гетеродимера относительно других нежелательных конечных продуктов, таких как гомодимеры. (См. WO 96/27011, опубликованный 6 сентября 1996 г.)

Биспецифические антитела состоят из "гетероконъюгированных" антител или антител, присоединенных перекрестными связями. Например, одно антитело в гетероконъюгате может быть соединено с авидином, другое - с биотином. Гетероконъюгатные антитела могут быть получены с использованием любого подходящего способа образования перекрестных связей. Науке известны подходящие агенты для образования перекрестных связей, и такие агенты описаны также в патенте США № 4676980 вместе с целым рядом способов образования перекрестных связей.

Способы получения биспецифических антител из фрагментов антител также были описаны в литературе. Например, биспецифические антитела могут быть получены с образованием химической связи. Brennan et al. (Science 229:81-83, 1985) описывают процедуру, в которой интактные антитела подлежат протеолитическому расщеплению для получения фрагментов $F(ab')_2$. Такие фрагменты восстанавливают в присутствии дитиолового комплексообразователя (т.е. натрия арсенита) для стабилизации вицинальных дитиолов и предотвращения образования межмолекулярных дисульфидных связей. Полученные фрагменты Fab' затем преобразовывают в производные тионитробензоата (TNB). Затем одно из производных соединений Fab'-TNB переводят в Fab'-тиол путем восстановления с использованием меркаптоэтиламина и затем смешивают с эквимолярным количеством другого производного Fab'-TNB с образованием биспецифического антитела. Полученные биспецифические антитела могут использоваться в качестве агентов для избирательной иммобилизации ферментов. В еще одном дополнительном варианте воплощения изобретения фрагменты Fab'-SH восстанавливают непосредственным образом из E.coli и могут быть химически соединены in vitro с образованием биспецифических антител. (Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992)) Shalaby et al., J. Exp. Med. 175: 217-225 (1992) описали получение полностью гуманизированного биспецифического антитела $F(ab')_2$. Каждый фрагмент Fab' был секретирован отдельным образом из E.coli и подвергнут контролируемому химическому взаимодействию в условиях in vitro с образованием биспецифического антитела. Образованное таким образом биспецифическое антитело было способно связываться с клетками, избыточно экспрессирующими рецептор HER2, и здоровыми Т-клетками человека, а также служило в качестве триггера литической активности человеческих цитотоксических лимфоцитов относительно антигенов клеток опухолей молочной железы.

Также были описаны различные способы получения и изоляции фрагментов биспецифических антител непосредственно из культуры рекомбинантных клеток. Например, биспецифические антитела были получены с использованием лейциновых молний. (Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-1553, 1992).

Пептиды лейциновой молнии из белков Fos и Jun были соединены с участками Fab' двух различных антител путем слияния генов. Гомодимеры антител были восстановлены в области каркасного участка с образованием мономеров и затем повторно окислены с образованием гетеродимеров антител. Такой способ также может использоваться для получения гомодимеров антител. Способ "диатела", описанный Holliger et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48, 1993), предоставил альтернативный механизм получения фрагментов биспецифических антител.

Фрагменты включают вариабельный участок тяжелой цепи (V_H), присоединенный к вариабельному участку легкой цепи (V_L) с помощью линкера, который является достаточно коротким, чтобы обеспечить спаривание между двумя доменами одной и той же цепи. В соответствии с этим домены V_H и V_L одного фрагмента соединяются с комплементарными доменами V_H и V_L другого фрагмента, образуя тем самым два антигенсвязывающих участка. Также сообщалась и другая стратегия получения фрагментов биспецифических антител путем использования одноцепочечных димеров Fv (scFv). (См. Gruber et al., J. Immunol. 152: 5368 (1994).)

С другой стороны, биспецифическое антитело может быть представлено "линейным антителом", полученным, как это описано в Zapata et al. Protein Eng. 8:1057-62 (1995). Линейные антитела включают пару тандемных сегментов Fd (V_H-C_H1-V_H-C_H1), которые образуют пару антигенсвязывающих участков. Линейные антитела могут быть биспецифическими или моноспецифическими.

В дополнительном варианте воплощения изобретения биспецифическое антитело может быть хелатным рекомбинантным антителом (CRAb). Хелатное рекомбинантное антитело распознает прилегающие и не перекрывающиеся антигенные детерминанты антигена, и достаточно гибко для связывания с обеими антигенными детерминантами одновременно (Neri et al., J. Mol. Biol. 246:367-73, 1995).

Изобретение описывает также антитела с более чем двумя валентностями. Например, могут быть получены триспецифические антитела. (Tutt et al., J. Immunol. 147:60, 1991).

Химерные и гуманизированные антитела.

Принимая во внимание, что химерные или гуманизированные антитела менее иммуногенны у человека, чем исходные мышиные моноклональные антитела, они могут использоваться для лечения людей с намного меньшим риском развития анафилаксии.

Химерные моноклональные антитела, в которых вариабельные домены Ig мышиного моноклонального антитела слиты с константными доменами Ig человека, могут быть получены с использованием стандартных и известных в науке процедур (см. Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6841-6855 (1984); и Boulianne et al., Nature 312, 643-646, (1984)). Несмотря на то, что было доказано, что некоторые химерные моноклональные антитела менее иммуногенны у человека, вариабельные домены Ig мыши все еще могут привести к значительному ответу на антитело мыши у человека.

Гуманизированные антитела могут быть получены путем целого ряда способов, включая, например, следующие: (1) прививание гипервариабельных участков (CDR), не принадлежащих человеку, на каркасный и константный участок человека (в науке процесс обозначается как гуманизация посредством "CDR-прививания"); (2) трансплантация полных вариабельных доменов, не принадлежащих человеку, и "накрывание" их человекоподобной поверхностью путем замещения поверхностных остатков (в науке процесс обозначают как "обшивка"); или, например, (3) замещение аминокислот человека в положениях, которые, как это определено, маловероятно влияют на связывание антигена или скручивание белка, но, вероятно, снижают иммуногенность в среде человека (в науке процесс обозначают как HUMAN ENGINEERING™). В данном изобретении гуманизированные антитела будут включать "гуманизированные", "обшитые" и "HUMAN ENGINEERED™" антитела. Такие способы описаны, например, в Jones et al., Nature 321:522525 (1986); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 81:6851-6855 (1984); Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44:65-92 (1988); Verhoeyer et al., Science 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immunol. 31:169-217 (1994); Kettleborough et al., Protein Eng. 4:773-783 (1991); Studnicka et al. патенте США Patent No. 5766886; Studnicka et al. (Protein Eng 7: 805-814, 1994) (все включено в данный документ посредством ссылки).

Антитела человека, полученные из трансгенных животных Антитела человека к антигену также могут быть получены с использованием трансгенных животных, у которых отсутствует эндогенная выработка иммуноглобулинов и которые созданы рекомбинантным образом для содержания локусов иммуноглобулинов человека. Например, WO 98/24893 описывает трансгенных животных, имеющих локус Ig человека, при этом животные не вырабатывают функциональные эндогенные иммуноглобулины по причине инактивации локусов эндогенной тяжелой и легкой цепей. WO 91/00906 также описывает трансгенных млекопитающих-хозяев, не являющихся приматами, способных генерировать иммунный ответ на иммуноген, при этом антитела имеют константные и/или вариабельные участки приматов, и при этом эндогенный иммуноглобулин, кодирующий локусы, замещается или инактивируется. WO 96/30498 и патент США № 6091001 описывает использование системы Cre/Lox для модификации локуса иммуноглобулина у млекопитающего, например, замещение всего или части константного или вариабельного участка для образования модифицированной молекулы антитела. WO 94/02602 описывает млекопитающих-хозяев, не являющихся человеком, с инактивированными локусами эндогенного Ig и функциональными локусами Ig человека. Патент США № 5939598 описывает способы получения трансгенных мы-

шей, у которых отмечается отсутствие эндогенных тяжелых цепей, и такие мыши экспрессируют локус экзогенного иммуноглобулина, включающий один или несколько ксеногенных константных участков. (См. также патенты США № 6114598; 6657103 и 6833268.)

С использованием описанного выше трансгенного животного, иммунный ответ может быть сгенерирован на отдельный антиген, а вырабатывающие антитело клетки могут быть удалены из животного и использованы для получения гибридов, секретирующих человеческие моноклональные антитела. Протоколы иммунизации, адъюванты и другие известные в науке соединения используют в иммунизации, например, трансгенной мыши, как это описано в WO 96/33735. Данная публикация описывает моноклональные антитела к целому ряду антигенов, включая ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО-альфа, CD4 человека, L-селектин, gp39 и столбнячный токсин. Моноклональные антитела могут быть протестированы на предмет своей способности ингибировать или нейтрализовать биологическую активность или физиологический эффект соответствующего белка. WO 96/33735 описывает моноклональные антитела к ИЛ-8, полученные из иммунных клеток трансгенных мышей, иммунизированных ИЛ-8, и такие антитела блокируют функции нейтрофилов, индуцируемые ИЛ-8. Человеческие моноклональные антитела со специфичностью к антигену, используемые для иммунизации трансгенных животных, также описаны в WO 96/34096, заявке на патент США № 20030194404 и заявке на патент США № 20030031667.

Дополнительные трансгенные животные, которые могут использоваться для получения моноклональных антител, включают Medarex HuMAb-MOUSE®, описанный в патенте США № 5770429 и Fishwild et al. (Nat. Biotechnol. 14:845-851 (1996)), которые содержат последовательность генов из не подвергнутых перегруппировке генов антитела человека, кодирующих тяжелые и легкие цепи антител человека. Иммунизация HuMAb-MOUSE® позволяет получить полностью человеческие моноклональные антитела к антигену.

Кроме того, Ishida et al. (Cloning Stem Cells. 4:91-102 (2002)) описывают мышь TransChromo Mouse (TCMOUSE™), которая содержит мегабазные сегменты ДНК человека и включает полный локус иммуноглобулина человека (hIg). TCMOUSE™ имеет полный разнородный репертуар hIg, включая все подклассы IgG (IgG1-G4). Иммунизация TCMOUSE™ с различными антигенами человека приводит к появлению ответа на антитела, включая антитела человека.

См. также Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,. 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol., 7:33 (1993); и патент США № 5591669, патент США № 5589369, патент США № 5545807; и публикацию патента США № 20020199213. Публикация патента США № 20030092125 описывает способы вызова иммунного ответа у животного относительно требуемой антигенной детерминанты. Человеческие антитела также могут быть получены с помощью активированных in vitro В-клеток (см. патенты США No 5567610 и 5229275).

Антитела человека, полученные способом дисплея.

Разработка способов для получения репертуаров генов рекомбинантных антител человека и отображение фрагментов кодируемого антитела на поверхности нитевидного бактериофага стали доказанным способом получения антител человека. Антитела, полученные фаговым способом, получают в виде антигенсвязывающих фрагментов - обычно Fv или Fab фрагментов - у бактерий с отсутствием эффекторных функций. Эффекторные функции могут быть введены с использованием одной из двух стратегий. Фрагменты могут быть введены в полные антитела для экспрессии в клетках млекопитающих или во фрагменты биспецифического антитела, у которого второй связующий сайт способен запускать эффекторную функцию.

Изобретение предусматривает способ получения антигенспецифического антитела или его антигенсвязующего участка, включающий этапы синтеза библиотеки антител человека на фаге, скрининг библиотеки с антигеном или его участком, выделение фага, связывающего антиген, и получение антитела из фага. Например, один способ для получения библиотеки антител для использования в способе фаговых дисплеев включает этапы иммунизации животного, не являющегося человеком, содержащим локус иммуноглобулина человека с антигеном или его антигенным участком, для создания иммунного ответа, выделения клеток, вырабатывающих антитела, из иммунизированного животного; выделение РНК из выделенных клеток, обратная транскрипция РНК для получения кДНК, амплификация кДНК с использованием праймера и вставка кДНК в вектор фагового дисплея, т.о. антитела экспрессируются на фаге. Рекомбинантные антигенспецифические антитела по изобретению могут быть получены таким способом. В другом примере вырабатывающие антитела клетки могут быть выделены из неиммунизированных животных, РНК выделена из выделенных клеток и обратно транскрибирована для получения кДНК, которую амплифицируют с использованием праймера и вставляют в вектор фагового дисплея, т.о., антитела экспрессируются на фаге. Процессы фагового дисплея приводят к имитации иммунной селекции посредством отображения репертуара антител на поверхности нитчатого бактериофага и позволяют производить последующую селекцию фага по его связыванию с выбранным антигеном. Один такой способ описан в WO 99/10494, который описывает выделение высокоаффинных и функциональных агонистических антител для рецепторов MPL и msk с использованием такого способа. Антитела по изобретению могут быть выделены путем скрининга рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител, преимущественно, библиотеки фагового дисплея scFv, полученной с использованием кДНК V_L и V_H человека, получен-

ной из мРНК лимфоцитов человека. Способы получения и скрининга таких библиотек известны в науке. (См., например, патент США № 5969108.) Также на рынке представлены наборы для получения библиотек фаговых дисплеев (например, Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, номер по каталогу 27-9400-01; и Stratagene SurfZAP.TM. набор фаговых дисплеев, номер по каталогу 240612). Существуют также другие способы и реагенты, которые могут использоваться для получения и скрининга библиотек антител (см., например, Ladner et al. патент США № 5223409; Rang et al. публикация PCT No. WO 92/18619; Dower et al. публикация PCT No. WO 91/17271; Winter et al. публикация PCT No. WO 92/20791; Markland et al. публикация PCT No. WO 92/15679; Breitling et al. публикация PCT No. WO 93/01288; McCafferty et al. публикация PCT No. WO 92/01047; Garrard et al. публикация PCT No. WO 92/09690; Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay et al. (1992) Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85; Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281; McCafferty et al., Nature (1990) 348:552-554; Griffiths et al. (1993) EMBO J 12:725-734; Hawkins et al. (1992) J. Mol. Biol. 226:889-896; Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628; Gram et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3576-3580; Garrad et al. (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137; и Barbas et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982.)

В одном варианте воплощения изобретения для выделения человеческих антител, специфических к антигену, с необходимыми характеристиками связывания, библиотека V_H и V_L человека подвергается скринингу для выбора фрагментов антитела, обладающих требуемой специфичностью. Библиотеки антител, используемые в таком способе, представлены преимущественно библиотеками scFv, полученными и подвергнутыми скринингу, как это описано в тексте данного изобретения и в науке (McCafferty et al., публикация PCT No. WO 92/01047, McCafferty et al. (Nature 348:552-554 (1990); и Griffiths et al. (EMBO J 12:725-734 (1993)). Библиотеки антител scFv подвергаются скринингу, преимущественно, с использованием антигена.

С другой стороны, фрагмент Fd (V_H-C_H1) и легкую цепь (V_L-C_L) антител клонируют отдельным образом путем ПЦР и рекомбинируют случайным образом в комбинаторной библиотеке фаговых дисплеев, и могут быть впоследствии отобраны для связывания с отдельным антигеном. Фрагменты Fab экспрессируются на поверхности фага, т.е. физически присоединены к кодирующим их генам. Таким образом, селекция Fab путем связывания антигена позволяет сопутственно выбрать кодирующие Fab последовательности, которые могут быть в последующем амплифицированы. В ходе нескольких этапов связывания антигена и повторной амплификации - процедуры, названной пэннингом, получают определенное количество Fab, специфичного относительно антигена, который, в конце концов, выделяют.

В 1994 году был описан способ гуманизации антител, названный "направленная селекция". Направленная селекция использует мощь способа фаговых дисплеев для гуманизации мышиного моноклонального антитела (см. Jespers, L. S., et al., Bio/Technology 12, 899-903 (1994)). Для этого фрагмент Fd мышиного моноклонального антитела может отображаться в комбинации с библиотекой легких цепей человека, и полученную библиотеку гибридного Fab можно затем использовать в селекции с антигеном. Таким образом, мышиный фрагмент Fd обеспечивает шаблон для направления селекции. Впоследствии отобранные легкие цепи человека комбинируют с библиотекой фрагментов Fd человека. Селекция полученной библиотеки позволяет получить полностью человеческий Fab.

Был описан целый ряд процедур для получения антител человека из библиотек фаговых дисплеев (см., например, Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol, 222:581-597 (1991); патенты США № 5565332 и 5573905; Clackson, T., and Wells, J. A., TIBTECH 12, 173-184 (1994)). В частности, селекция in vitro и эволюция антител, полученных из библиотек фаговых дисплеев, стала мощным инструментом (см. Burton, D. R., and Barbas III, C. F., Adv. Immunol. 57, 191-280 (1994); Winter, G., et al., Annu. Rev. Immunol. 12, 433-455 (1994); публикация патента США № 20020004215 и WO 92/01047; публикация патента США № 20030190317; и патенты США № 6054287 и 5877293.)

Watkins, "Screening of Phage-Expressed Antibody Libraries by Capture Lift," Methods in Molecular Biology, Antibody Phage Display: Methods and Protocols 178:187-193 (2002), и публикация патента США № 20030044772 от 6 марта 2003 года описывают способы скрининга экспрессируемых фагом библиотек антител или других связующихся молекул путем захвата, и такой способ включает иммобилизацию кандидатных связующих молекул на твердом субстрате.

Фрагменты Fv отображаются на поверхности фага путем ассоциации одной цепи, экспрессируемой в качестве белка слияния фага (например, с M13 геном III), с комплементарной цепью, экспрессируемой в качестве растворимого фрагмента.

Предусматривается, что фаг может быть представлен нитчатым фагом, таким как один из следующих фагов класса I: fd, M13, f1, If1, lke, ZJ/Z, Ff; и один из следующих фагов класса II: Xf, Pf1 и Pf3. Фаг может быть представлен M13 или fd, или его производным.

Как только будут отобраны первичные сегменты V_L и V_H человека, для отбора преимущественных парных комбинаций V_L/V_H могут проводиться эксперименты "смешивания и соответствия", в ходе которых различные пары первично отобранных сегментов V_L и V_H подвергаются скринингу на предмет связывания антигена. Кроме того, для дополнительного улучшения качества антитела, сегменты V_L и V_H преимущественных пар V_L/V_H могут быть подвергнуты мутациям случайным образом, преимуществен-

но, в пределах любого участка CDR1, CDR2 или CDR3 V_H и/или V_L, в ходе процесса, аналогичного процессу соматической мутации, ответственным за созревание аффинности антител во время естественного иммунного ответа. Такое созревание аффинности in vitro может сопровождаться амплификацией участков V_L и V_H с использованием праймеров ПЦР, комплементарных V_H CDR1, CDR2 и CDR3 или V_L CDR1, CDR2 и CDR3 соответственно, при этом в такие праймеры была "добавлена" случайная смесь четырех нуклеотидных оснований в определенных положениях, таким образом, полученные продукты ПЦР кодируют сегменты V_L и V_H, в участки V_H и/или V_L CDR3 которых были введены случайные мутации. Такие подвергнутые случайной мутации сегменты V_L и V_H могут иметь ограниченное связывание с антигеном.

После скрининга и выделения антигенспецифического антитела из библиотеки рекомбинантных иммуноглобулиновых дисплеев, нуклеиновая кислота, кодирующая выбранное антитело, может быть восстановлена из дисплея (например, из генома фага) и субклонирована в другие векторы экспрессии с использованием стандартных способов рекомбинации ДНК. При необходимости нуклеиновая кислота может быть подвергнута дополнительным манипуляциям для создания других форм антитела по изобретению, как это описано ниже. Для экспрессии рекомбинантного антитела человека, выделенного путем скрининга комбинаторной библиотеки, ДНК, кодирующую антитела, клонируют в рекомбинантный вектор экспрессии и вводят в клетку-хозяин млекопитающего, как это описано в тексте данного изобретения.

Предполагается, что способ фаговых дисплеев может проводиться на мутантном штамме бактерии или клетки-хозяина. Мутантный штамм представляет собой клетку-хозяина, имеющую генетический дефект, который приводит к репликации ДНК в такой клетке с мутацией относительно исходной ДНК. Примером мутантных штаммов может служить NR9046mutD5 и NR9046 mut T1.

Также предусматривается, что способ фаговых дисплеев может проводиться с использованием фага-хелпера. Он является фагом, который используют для инфицирования клеток, содержащих дефективный фаговый геном, и в его функции входит дополнение дефекта. Дефективный фаговый геном может быть представлен фагемидом или фагом с удаленными последовательностями генов, кодирующих определенные функции. Примерами фагов-хелперов являются следующие: M13K07, M13K07 ген III no. 3, гиперфаг; а также фаг, отображающий или кодирующий связующуюся молекулу, слитую с капсидным белком.

Антитела также могут быть получены с использованием способов скрининга фаговых дисплеев и иерархического двойного комбинаторного способа, как это описано в WO 92/01047, в ходе которого для инфицирования всей библиотеки клонов, кодирующих другую цепь (L или H), используется отдельная колония, содержащая цепь H или L, и полученный двухцепочечный специфический связующийся член подвергают селекции в соответствии со способами фаговых дисплеев, например, описанных в тексте данного изобретения. Такой способ также описан в Marks et al. (Bio/Technology, 10:779-783 (1992)).

Способы отображения полипептидов на поверхности вирусов, дрожжей, клеток микроорганизмов и млекопитающих также использовали для идентификации антигенспецифических антител. (См., например, патенты США № 5348867; 5723287; 6699658; Wittrup, Curr Op. Biotech. 12:395-99 (2001); Lee et al., Trends in Biotech. 21(1) 45-52 (2003); Surgeeva et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 58: 1622-54 (2006)). Библиотеки антител могут быть присоединены к белкам дрожжей, таким как агглютинин, эффективно маскируя отображение антител на клеточной поверхности B-клетками иммунной системы.

Кроме способов фаговых дисплеев, антитела могут быть выделены с использованием in vitro способов отображения, включая рибосомальный дисплей и дисплей мРНК (Amstutz et al., Curr. Op. Biotech. 12: 400-05 (2001)). Селекция полипептида с использованием рибосомального дисплея описана в Hanes et al. (Proc. Natl Acad Sci USA, 94:4937-4942 (1997)) и патентах США № 5643768 и 5658754, выданных Kawasaki. Рибосомальный дисплей также может использоваться для быстрого и широкомасштабного анализа мутаций антител. Способ селективного мутагенеза также предоставляет способ получения антител с улучшенной активностью, которые могут быть отобраны с использованием способов рибосомального дисплея.

Изменение гликозилирования.

Также могут быть получены варианты антител с модифицированной схемой гликозилирования относительно исходного антитела, например, путем удаления одной или нескольких молекул углеводов из антитела и/или добавлением одного или нескольких участков гликозилирования, которые отсутствуют в антителе.

Гликозилирование антител обычно представлено N-гликозилированием или O-гликозилированием. N-гликозилирование относится к присоединению молекулы углевода к боковой цепи по остатку аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представлен аминокислотой, за исключением пролина, являются последовательностями распознавания для ферментативного присоединения молекулы углевода к аспарагину боковой цепи. Присутствие одной из таких трех трипептидных последовательностей создает потенциальный участок гликозилирования. Таким образом, N-присоединенные участки гликозирования могут быть добавлены к антителу путем изменения аминокислотной последовательности, таким образом, антитело будет содержать одну или несколько таких

трипептидных последовательностей. О-гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксиаминокислоте, наиболее часто представленной серином или треонином, однако могут использоваться 5-гидроксипролин или 5-гидроксилизин. О-присоединенные участки гликозилирования могут быть добавлены к антителу путем вставки или замещения одного или нескольких остатков серина или треонина в последовательности исходного антитела.

Гликаны Fc влияют на связывание IgG с рецепторами Fc и C1q и, следовательно, играют важную роль в эффекторных функциях IgG. Могут быть получены варианты антител с модифицированными гликанами Fc и измененной эффекторной функцией. Например, антитела с измененными терминальными сахарами, такими как сиаловые кислоты, коровая фукоза, разделенный пополам N-ацетилглюкозамин, а также остатки маннозы могут характеризоваться измененным связыванием с рецептором FcλRIIIa и измененной активностью АЗКЦ. В еще одном примере антитела с модифицированными терминальными остатками галактозы могут характеризоваться измененным связыванием с C1q и измененной КЗЦ активностью (Raju, Curr. Opin. Immunol. 20: 471-78 (2008).

Также предусмотрены молекулы антител с отсутствующим или пониженным фукозилированием, которые обладают улучшенной активностью АЗКЦ. Для достижения этой цели в науке известен целый ряд способов. Например, эффекторная активность АЗКЦ опосредуется путем связывания молекулы антитела с рецептором FcλRIII, что, как это было доказано, зависит от структуры углевода с N-присоединенным гликозилированием в положении Asn-297 домена CH2. Декозилированные антитела связываются с этим рецептором с повышенной аффинностью и запускают FcλRIII-опосредованные эффекторные функции более эффективно, чем нативные фукозилированные антитела. Например, рекомбинантное получение афукозилированного антитела в клетках CHO, в которых был отключен ген фермента альфа-1,6-фукозилтрансферазы, привело к получению антитела со 100-кратным увеличением активности АЗКЦ (Yamane-Ohnuki et al., Biotechnol Bioeng. 87:614-22 (2004)). Подобные эффекты могут сопровождаться снижением активности данного или других ферментов в ходе пути фукозилирования, например, посредством воздействия миРНК или антисмысловой РНК, получения рекомбинантных линий клеток с "выключенными" ферментами или культивацией с избирательными ингибиторами гликозилирования (Rothman et al., Mol. Immunol. 26:1113-23 (1989)). Некоторые штаммы клеток-хозяев, например, Lec13 или клетки гибридомы крысы YB2/0, естественным образом вырабатывают антитела с более низкими уровнями гликозилирования. (Shields et al., J. Biol Chem. 277:26733-40 (2002); Shinkawa et al., J. Biol Chem. 278:3466-73 (2003)). Также было определено, что повышение уровня разделенного пополам углевода, например, посредством полученных рекомбинантным образом антител в клетках с гиперэкспрессией фермента GnTIII, повышает активность АЗКЦ (Umana et al., Nat Biotechnol. 17:176-80 (1999)). Было предположено, что отсутствие только одного из двух остатков фукозы может быть достаточным для повышения активности АЗКЦ (Ferrara et al., Biotechnol Bioeng. 93:851-61 (2006)).

Варианты с измененной эффекторной функцией.

Предусмотрены и другие модификации антитела. В одном аспекте изобретения может оказаться желательным модифицировать антитело по изобретению относительно эффекторной функции, например, для повышения эффективности антитела в лечении рака (Natsume et al., Drug Design Dev' t & Ther. 3: 7-16 (2009)). Типичные эффекторные функции включают связывание C1q, связывание рецептора Fc, АЗКЦ, фагоцитоз, снижение экспрессии рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора B-клеток, BCR) и т.д. Один способ модификации эффекторной функции предусматривает, что в участок Fc могут быть введены остатки цистеина, что приводит к образованию дисульфидных мостиков между цепями в данном участке. Полученное таким образом гомодимерное антитело может обладать повышенной способностью к интернализации и/или повышенной способностью комплемент-опосредованной гибели клеток и/или антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ). [См. Caron et al. (J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992)) и Shopes, B. (J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992)).] Гомодимерные антитела с повышенной противоопухолевой активностью также могут быть получены с использованием гетеробифункциональных кросс-линкеров, как это описано Wolff et al., [Cancer Research 53: 2560-2565 (1993)). С другой стороны, антитело может быть получено в результате рекомбинации с наличием двойных участков Fc, что объясняет повышенный лизис комплемента и свойства АЗКЦ. [См. Stevenson et al. (Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989)).] Кроме того, было показано, что последовательности в пределах CDR могут привести к связыванию антитела с MHC класса II и запустить нежелательный ответ Т-хелперов. Замена консервативных аминокислот может позволить антителу сохранить активность связывания, но при потере его способности инициировать нежелательный ответ со стороны Т-клеток. Также см. Steplewski et al. (Proc Natl Acad Sci USA. 85:4852-56 (1998)), где описаны химерные антитела, при этом вариабельный участок мыши был соединен с константными участками гамма 1, гамма 2, гамма 3 и гамма 4 человека.

В определенных вариантах воплощения изобретения может быть необходимым использование фрагмента антитела, а не интактного антитела, для повышения, например, проникновения в опухоль. В таком случае может оказаться необходимым модифицировать фрагмент антитела для повышения его периода полужизни в сыворотке, например, путем добавления молекул, таких как ПЭГ или других водорастворимых полимеров, включая полимеры из полисахаридов, к фрагментам антитела для повышения периода полужизни. Это может быть достигнуто, например, путем введения спасительной и связываю-

щей рецептор антигенной детерминанты во фрагмент антитела (например, путем мутации соответствующего участка во фрагменте антитела или путем введения антигенной детерминанты в пептидный тэг, который затем сливают с фрагментом антитела на любом его конце или в середине, например, в ходе синтеза ДНК или пептидов) (см., например, WO 96/32478).

Спасительная и связывающая рецептор антигенная детерминанта составляет участок, в котором один или несколько остатков аминокислот из одной или двух петель домена Fc перенесены в аналогичное положение фрагмента антитела. Даже, более преимущественно, переносят три или более остатков из одной или двух петель домена Fc. Еще более преимущественно, антигенную детерминанту отбирают из домена CH2 участка Fc (например, IgG) и переносят в CH1, CH3 или участок VH, или более чем один такой участок антитела. С другой стороны, антигенную детерминанту отбирают из домена CH2 участка Fc и переносят к участку C_L или участку V_L, или обоим участкам фрагмента антитела. (См. также международные заявки на патенты WO 97/34631 и WO 96/32478, которые описывают варианты Fc и их взаимодействие со спасительным рецептором.)

Таким образом, антитела по изобретению могут включать участок Fc человека, консенсусный участок Fc человека, или их варианты, которые сохраняют способность взаимодействовать со спасительным рецептором Fc, включая варианты, в которых остатки цистеина, задействованные в дисульфидных связях, модифицированы или удалены, и/или в которых на N-конце добавлен метионин и/или удалена одна или несколько N-концевых аминокислот из 20 аминокислот, и/или участки, которые взаимодействуют с комплементом, такие как сайт связывания C1q, удалены, и/или удален сайт АЗКЦ [см., например, Sarmay et al., Molec. Immunol. 29:633-9 (1992)].

Проведенные ранее исследования раскрыли сайт связывания на IgG человека и мыши с FcR, преимущественно, в нижнем шарнирном участке, состоящем из остатков 233-239 IgG. Другие исследования предположили дополнительные широкие сегменты, например, Gly316-Lys338 для Fc рецептора I человека, Lys274-Arg301 и Tyr407-Arg416 для Fc рецептора III человека, или выявили несколько специфических остатков вне нижнего шарнирного участка, например, Asn297 и Glu318 для мышиного IgG2b, взаимодействующего с рецептором Fc II мыши. Отчет о кристаллической структуре 3.2-Å фрагмента IgG1 Fc человека с рецептором Fc IIIA человека позволил раскрыть остатки IgG1 Leu234-Ser239, Asp265-Glu269, Asn297-Thr299 и Ala327-Ile332, которые задействованы в связывании с рецептором Fc IIIA. Основываясь на кристаллической структуре, также было предположено, что, кроме остатков нижнего шарнирного участка (Leu234-Gly237), остатки в петлях FG домена IgG CH2 FG (остатки 326-330) и BC (остатки 265-271) могут играть роль в связывании с рецептором Fc IIA. [См. Shields et al. (J. Biol. Chem., 276:6591-604 (2001)) (включено в данный документ во всей своей полноте посредством ссылки).] Мутация остатков в сайтах связывания рецептора Fc может приводить к изменению эффекторной функции, например, измененной активности КЗЦ или АЗКЦ, или измененному периоду полужизни. Как это описано выше, потенциальные мутации включают вставку, делецию или замещение одного или нескольких остатков, включая замещение аланином, замещение консервативных аминокислот, замещение неконсервативных аминокислот или замещение соответствующего аминокислотного остатка в одинаковом положении различного подкласса IgG (например, замещение остатка IgG1 соответствующим остатком IgG2 в одинаковом положении).

Shields et al. сообщили, что остатки IgG1, задействованные в связывании со всеми рецепторами Fc человека, расположены на домене CH2 в проксимальном положении относительно шарнирного участка и относятся к следующим двум категориям: 1) положения, которые могут взаимодействовать прямым образом со всеми FcR, включают Leu234-Pro238, Ala327 и Pro329 (и, возможно, Asp265); 2) положения, которые влияют на природу углевода, или положение включает Asp265 и Asn297. Дополнительные остатки IgG1, которые влияют на связывание с рецептором Fc II, представлены следующими: (максимальный эффект) Arg255, Thr256, Glu258, Ser267, Asp270, Glu272, Asp280, Arg292, Ser298 и (меньший эффект) His268, Asn276, His285, Asn286, Lys290, Gln295, Arg301, Thr307, Leu309, Asn315, Lys322, Lys326, Pro331, Ser337, Ala339, Ala378 и Lys414. A327Q, A327S, P329A, D265A и D270A снижали связывание. Кроме остатков, указанных выше для всех FcR, дополнительные остатки IgG1, которые снижают связывание с рецептором Fc IIIA на 40% или более, представлены следующими: Ser239, Ser267 (только Gly), His268, Glu293, Gln295, Tyr296, Arg301, Val303, Lys338 и Asp376. Варианты, которые повышали связывание с FcRIIIA, включают T256A, K290A, S298A, E333A, K334A и A339T. Lys414 приводил к 40%-ному снижению в связывании с FcRIIA и FcRIIB, Arg416 приводил к 30%-ному снижению в связывании с FcRIIA и FcRIIIA, Gln419 приводил к 30%-ному снижению в связывании с FcRIIA и к 40%-ному снижению в связывании с FcRIIB, и Lys360 приводил к 23%-ному улучшению в связывании с FcRIIIA. (См. также Presta et al. (Biochem. Soc. Trans. 30:487-490, 2001) (включено в данный документ во всей своей полноте посредством ссылки)), в которой описано несколько положений в участке Fc IgG1, которые улучшали связывание только со специфическими гамма-рецепторами Fc (R) или одновременно повышали связывание с одним типом Fc гамма R и снижали связывание с рецептором другого типа. Выбранные варианты IgG1 с повышенным связыванием с Fc гамма RIIIa затем были тестированы в ходе анализа антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) in vitro, и было показано улучшение АЗКЦ при использовании мононуклеарных клеток периферической крови или клеток-естественных киллеров.

Например, патент США № 6194551, включенный сюда во всей своей полноте посредством ссылки, описывает варианты с измененной эффекторной функцией, содержащие мутации в участке IgG Fc человека в положении аминокислот 329, 331 или 322 (с использованием нумерации по Kabat), некоторые из которых характеризовались пониженным связыванием C1q или активностью КЗЦ. В качестве другого примера, патент США № 6737056, включенный сюда во всей своей полноте посредством ссылки, описывает варианты с измененной эффекторной функцией или связыванием с Fc-гамма рецептором, содержащие мутанты в участке IgG человека в положениях аминокислот 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 или 439 (с использованием нумерации по Kabat), некоторые из которых обладали рецепторсвязующими профилями, ассоциированными с пониженной активностью АЗКЦ или КЗЦ. Из них: мутация аминокислот в положениях 238, 265, 269, 270, 327 или 329 снижает связывание с FcRI; мутация аминокислот в положениях 238, 265, 269, 270, 292, 294, 295, 298, 303, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 373, 376, 414, 416, 419, 435, 438 или 439 снижает связывание с FcRII; и мутация аминокислот в положениях 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 293, 294, 295, 296, 301, 303, 322, 327, 329, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 416, 434, 435 или 437 снижает связывание с FcRIII.

Патент США № 5624821, включенный сюда во всей своей полноте посредством ссылки, сообщает, что активность связывания с C1q мышиного антитела может быть изменена путем мутации аминокислотных остатков 318, 320 или 322 тяжелой цепи, а также то, что замена остатка 297 (Asn) приводит к исчезновению литической активности.

Публикация патента США № 20040132101, включенная сюда во всей своей полноте посредством ссылки, описывает варианты с мутациями аминокислот в положениях 240, 244, 245, 247, 262, 263, 266, 299, 313, 325, 328 или 332 (с использованием нумерации по Kabat) или в положениях 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 327, 328, 329, 330 или 332 (с использованием нумерации по Kabat), из которых мутации в положениях 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 327, 328, 329, 330 или 332 могут снизить активность АЗКЦ или понизить связывание с рецептором Fc-гамма.

Chappel et al. (Proc Natl Acad Sci USA. 88:9036-40 (1991)) (включено сюда во всей своей полноте посредством ссылки) сообщают, что цитофильная активность IgG1 является присущим домену CH2 тяжелой цепи свойством. Одиночные точечные мутации в любом из аминокислотных остатков 234-237 IgG1 существенно снижали или упраздняли активность. Замещение во всех остатках 234-237 (LLGG) IgG1 в IgG2 и IgG4 были необходимы для восстановления полной активности связывания. Как отмечалось, антитело IgG2, включающее полную последовательность ELLGGP (остатки 233-238), было более активным, чем IgG1 дикого типа.

Isaacs et al. (J Immunol. 161:3862-9 (1998)) (включено сюда во всей своей полноте посредством ссылки) сообщают, что мутации в мотиве, критическом для связывания Fc гамма-R (глутамат 233 в пролин, лейцин/фенилаланин 234 в валин, и лейцин 235 в аланин) полностью предотвращают снижение количества клеток-мишеней. Мутация глутамата 318 в аланин элиминировала эффекторную функцию IgG2b и также приводила к снижению активности IgG4 человека.

Armour et al. (Mol. Immunol. 40:585-93 (2003)) (включено сюда во всей своей полноте посредством ссылки) идентифицировали варианты IgG1, которые реагируют с активирующим рецептором, Fc-гамма-RIIa, по меньшей мере в 10 раз менее эффективно, чем для IgG1 дикого типа, однако связывание с ингибирующим рецептором, Fc-гамма-RIIb, снижено только в четыре раза. Мутации были внесены в участок аминокислот 233-236 и/или аминокислот в положениях 327, 330 и 331. (См. также WO 99/58572, который включен сюда во всей своей полноте посредством ссылки.)

Xu et al. (J. Biol. Chem. 269:3469-74 (1994)) (включено сюда во всей своей полноте посредством ссылки) сообщают, что мутация IgG1 Pro331 в Ser значительно снизила связывание C1q и виртуально элиминировала литическую активность. В отличие от этого, замещение Pro на Ser331 в IgG4 придавало частичную литическую активность (40%) варианту IgG4 Pro331.

Schuurman et al. (Mol. Immunol. 38:1-8 (2001)) (включено сюда во всей своей полноте посредством ссылки) сообщают, что мутация одного из шарнирных цистеинов, участвующих в образовании связи между тяжелыми цепями, Cys226, в серин приводило к более устойчивому соединению между тяжелыми цепями. Мутация последовательности шарнирного участка Cys-Pro-Ser-Cys IgG4 в последовательность шарнирного участка Cys-Pro-Pro-Cys IgG1 также заметно стабилизирует ковалентное взаимодействие между тяжелыми цепями.

Angal et al. (Mol. Immunol. 30:105-8 (1993)) (включено сюда во всей своей полноте посредством ссылки) сообщают, что мутация серина в положении аминокислоты 241 IgG4 в пролин (находится в данном положении в IgG1 и IgG2) привела к получению однородного антитела, а также увеличенному периоду полужизни в сыворотке и улучшению распространения в ткани в сравнении с оригинальным химерным IgG4.

Ковалентные модификации.

Ковалентные модификации полипептидных связующих агентов по изобретению, например, антител, также включены в объем данного изобретения. Это может быть сделано путем химического синтеза или ферментативного или химического расщепления полипептидного связующего агента (в случае необходимости). Другие типы ковалентных модификаций полипептидного связующего агента вводятся в молекулу путем реагирования определенных аминокислотных остатков полипептидного связующего агента с органическими веществами, используемыми для получения органических производных, при этом такие вещества способны реагировать с выбранными боковыми цепями N- или C-концевыми остатками.

Остатки цистеинила наиболее часто реагируют с α-галогенацетатами (и соответствующими аминами), такими как хлоруксусная кислота или хлорацетамид, для получения производных карбоксиметила или карбоксиамидометила.

Цистеиниловые остатки также получают путем реакции с бромтрифторацетоном, альфа-бром-β-(5-имидозоил) пропионовой кислотой, хлорацетилфосфатом, N-алкилмалеимидами, 3-нитро-2-пиридилдисульфидом, метил 2-пиридилдисульфидом, p-хлорбензоатом ртути, 2-хлормеркури-4-нитрофенолом или хлор-7-нитробензо-2-окса-1,3-диазолом.

Остатки гистидила получают путем реакции с диэтилпирокарбоната при pH 5,5-7,0, т.е. данный агент относительно специфичен к боковой цепи гистидила. Кроме того, может использоваться парабромфенацилбромид; реакция преимущественно проводится при присутствии 0,1 М натрия какодилата при pH 6,0.

Остатки лизила и аминотерминальные остатки реагируют с сукциниловой или другой карбоновой кислотой (ангидридом). Дериватизация таких агентов обладает эффектом реверса заряда остатков лизинила. Другие подходящие агенты для дериватизации альфа-аминосодержащих остатков включают имидоэфиры, такие как метилпиколинимидат, пиридоксальфосфат, пиридоксаль, хлорборгидрид, тринитробензолсульфоновая кислота, O-метилизомочевина, 2,4-пентадион, а также катализируемую трансаминазой реакцию с глиоксилатом.

Остатки аргинила модифицируют путем реагирования с одним или несколькими стандартными реагентами, включая фенилглиоксаль, 2,3-бутандион, 1,2-циклогександион и нингидрин. Дериватизация остатков аргинина требует, чтобы реакция проводилась в щелочной среде по причине высокого значения pK_a функциональной группы гуанидина. Кроме того, такие реагенты могут реагировать с группами лизина, а также эпсилон-аминогруппой аргинина.

Специфическая модификация остатков тирозила может производиться, в частности, путем введения спектральных меток в остатки тирозила путем реакции с ароматическими соединениями диазония или тетранитрометана. Наиболее часто используются N-ацетилимидазол и тетранитрометан с образованием O-ацетил-тирозил форм и 3-нитро производных соответственно. Остатки тирозила подлежат йодированию с использованием ^{125}I или ^{131}I для получения меченых белков для использования в радиоиммуноанализе.

Боковые карбоксильные группы (аспартил или глутамил) избирательным образом модифицируют путем реакции с карбодиимидами (R-N=C=N-R'), при этом R и R' являются различными алкильными группами, например, 1-циклогексил-3-(2-морфолинил-4-этил) карбодиимида или 1-этил-3-(4-азония-4,4-диметилпентил) карбодиимида. Кроме того, остатки аспартила и глутамила подлежат конвертации в аспарагинил и глутаминил путем реакции с ионами аммония.

Остатки глутаминила и аспарагинила часто подлежат дезамидации в соответствующие остатки глутамила и аспартила соответственно. Такие остатки подвергаются дезамидации при нейтральных или основных условиях. Дезаминированная форма таких остатков попадает в область применения данного изобретения.

Другие модификации включают гидроксилирование пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп остатков серила или треонила, метилирование α-аминогрупп боковых цепей лизина, аргинина и гистидина (T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, p. 79-86 (1983)), ацетилирование N-концевого амина и амидирование любой C-концевой карбоксильной группы.

Другой тип ковалентной модификации предполагает химическое или ферментативное связывание гликозидов с полипептидным связующим агентом. Такие процедуры преимущественны тем, что они не требуют выработки полипептидного связующего агента в клетке-хозяине, приводя к возможности гликозилировать с образованием N- или O-сцепленного гликозирования. В зависимости от используемого режима связывания, сахар(а) может(гут) присоединяться к (а) аргинину и гистидину; (б) свободной карбоксильной группе; (в) свободным сульфгидрильным группам, например, цистеина; (г) свободным гидроксильным группам, например, серина, треонина или гидроксипролина; (д) ароматическим остаткам, например, фенилаланина, тирозина или триптофана; или (е) амидной группе глутамина. Такие способы описаны в WO 87/05330 и в Aplin and Wriston (CRC Crit. Rev. Biochem., p. 259-306 (1981)).

Удаление любой молекулы углевода, присутствующей в полипептидном связующем агенте, может проводиться химическим или ферментативным образом. Химическое дегликозилирование требует воздействия на полипептидный связующий агент соединения трифторметансульфоновой кислоты или экви-

валентного соединения. Такое воздействие приводит к расщеплению большей части или всех сахаров, за исключением соединяющего сахара (N-ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина), сохраняя интактность полипептидного связующего агента. Способы химического дегликозилирования описаны Hakimuddin et al. (Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 (1987)) и Edge et al. (Anal. Biochem. 118: 131 (1981)). Ферментативное расщепление молекул углеводов, присоединенных к полипептидному связующему агенту, может достигаться путем использования различных эндо- и экзогликозидаз, как это описано Thotakura et al. (Meth. Enzymol. 138: 350 (1987)).

Другой тип ковалентной модификации полипептидного связующего агента включает соединение полипептидного связующего агента с одной из целого ряда гидрофобных молекул или небелковых полимеров, например, полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, полиоксиэтилированных полиолов, полиоксиэтилированного сорбитола, полиоксиэтилированной глюкозы, полиоксиэтилированного глицерина, полиоксиалкиленов или полисахаридных полимеров, таких как декстран. Такие способы известны в науке (см., например, патенты США № 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192; 4179337; 4766106; 4179337; 4495285; 4609546 или EP 315456).

Производные.

Производное соединение относится к полипептидным связующим агентам, включая антитела, модифицированные химически такими способами, как убихитинилирование, мечение (например, радионуклидами или различными ферментами), ковалентное присоединение полимера, такого как пэгилирование (дериватизация с полиэтиленгликолем), и вставка или замена путем химического синтеза аминокислот, таких как орнитин. Производные полипептидных связующих агентов по изобретению, таких как антитело, также могут использоваться в качестве терапевтических агентов и могут быть получены с использованием способа по изобретению.

Конъюгированная молекула может быть введена или присоединена к полипептидному связующему агенту ковалентным образом или посредством ионных, ванн-дер-ваальсовых или водородных связей, например, введением радиоактивных нуклеотидов или биотинилированных нуклеотидов, которые распознаются стрептавидином.

Полиэтиленгликоль (ПЭГ) может быть присоединен к полипептидным связующим агентам для предоставления более длительного периода полужизни in vivo. Группа ПЭГ может иметь любой подходящий молекулярный вес и может быть линейной или разветвленной. Средняя молекулярная масса ПЭГ будет преимущественно варьировать от примерно 2 килодальтон (кДа) до примерно 100 кДа, преимущественно, от примерно 5 кДа до примерно 50 кДа, более преимущественно, от примерно 5 кДа до примерно 10 кДа. Группы ПЭГ будут обычно присоединены к полипептидным связующим агентам по изобретению посредством ацилирования или восстановительного алкилирования с использованием встречающихся в природе или полученных искусственно реакционных групп на молекуле ПЭГ (например, альдегидной, амино-, тиоловой или эфирной группы) с реакционной группой на полипептидном связующем агенте (например, альдегидная, амино- или эфирная группа). Добавление молекул ПЭГ к полипептидным связующим агентам может проводиться с использованием хорошо известных в науке способов. (См., например, международную публикацию WO 96/11953 и патент США № 4179337.)

Лигирование полипептидного связующего агента с ПЕГ обычно проводят в водной фазе, что может быть легко подвергнуто мониторингу с использованием аналитической ВЭЖХ с обращенными фазами. ПЭГилированные вещества очищают путем препаративной ВЭЖХ и характеризуют с использованием аналитической ВЭЖХ, анализа аминокислот и путем масс-спектрометрии с лазерной десорбцией.

Конъюгаты антител.

Полипептидный связующий агент может быть введен в его "голой" или неконъюгированной форме или может быть конъюгирован непосредственным образом с другими терапевтическими или диагностическими агентами, или может быть конъюгирован непрямым образом с полимерами-носителями, включающими также другие терапевтические или диагностические агенты. В некоторых вариантах воплощения изобретения полипептидный связующий агент конъюгирован с цитотоксическим агентом, таким как химиотерапевтический агент, препарат, агент-ингибитор роста, токсин (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, или их фрагменты) или радиоактивным изотопом (т.е. радиоконъюгат). Подходящие химиотерапевтические агенты включают дауномицин, доксорубицин, метотрексат и виндесин (Rowland et al. (1986), см. выше). Подходящие токсины включают: бактериальные токсины, такие как дифтерийный токсин; токсины растений, такие как рицин; токсины в виде небольших молекул, такие как гелданамицин (Mandler et al., J. Natl. Cancer Inst. 92(19):1573-81 (2000); Mandler et al., Bioorg. Med. Chem. Letters 10:1025-1028 (2000); Mandler et al., Bioconjugate Chem. 13.786-91 (2002)), майтансиноиды (EP 1391213; Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-23 (1996)), ауристатины (Doronina et al., Nat. Biotech. 21: 778-84 (2003) и калихимицин (Lode et al., Cancer Res. 58:2928 (1998); Hinman et al., Cancer Res. 53:3336-3342 (1993)).

Полипептидные связующие агенты могут быть определяемым образом помечены путем использования радиоизотопов, аффинных меток (таких как биотин, авидин и т.д.), ферментативных меток (таких как пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза и т.д.), флуоресцирующих или люминесцентных меток (таких как FITC или родамин и т.д.), парамагнитных атомов и т.п. Процедуры для достижения такого мече-

ния хорошо известны в науке (например, см. Sternberger, L.A. et al., J. Histochem. Cytochem. 18:315 (1970); Bayer, E.A. et al., Meth. Enzym. 62:308 (1979); Engval, E. et al., Immunol. 109:129 (1972); Goding, J.W. J. Immunol. Meth. 13:215 (1976)).

Конъюгация молекул полипептидного связующего агента описана в патенте США № 6306393. Такие способы также описаны в Shin et al., Int. J. Cancer 41:832-839 (1988); Shih et al., Int. J. Cancer 46:1101-1106 (1990); и Shih et al., патенте США № 5057313. Такой общий способ подразумевает реакцию компонента полипептидного связующего агента, имеющего окисленный углеводный фрагмент, с полимером-носителем, который имеет по меньшей мере одну свободную аминогруппу, и такой способ используют для целого ряда препаратов, токсинов, хелаторов, соединений бора или других терапевтических агентов. Такая реакция приводит к образованию первичного соединения с основанием Шиффа (иминосоединением), которое может быть стабилизировано путем восстановления во вторичный амин с образованием конечного конъюгата.

Полимер-носитель может быть представлен, например, аминодекстраном или полипептидом по меньшей мере с 50 остатками аминокислот. Науке известны различные способы конъюгации препарата или другого агента с носителем-полимером. Полипептидный носитель может использоваться вместо аминодекстрана, но полипептидный носитель должен иметь по меньшей мере 50 аминокислотных остатков в цепи, преимущественно 100-5000 аминокислотных остатков. По меньшей мере, некоторые из аминокислот должны быть представлены остатками лизина или глутамата, или аспартата. Боковые аминогруппы остатков лизина и боковые карбоксилаты глутамата и аспартата могут использоваться для присоединения к препарату, токсину, иммуномодулятору, хелатору, борным соединениям или другим терапевтическим агентам. Примеры подходящих полипептидных носителей включают полилизин, полиглутамат, полиаспартат, их сополимеры и смешанные полимеры таких и других аминокислот, например, серина, что позволит придать необходимые свойства растворимости носителю и получаемому конъюгату.

С другой стороны, конъюгированные полипептидные связующие агенты могут быть получены путем прямой конъюгации компонента полипептидного связующего агента с терапевтическим агентом. Общая процедура аналогична способу непрямой конъюгации, за исключением того, что терапевтический агент непосредственно присоединяют к окисленному компоненту полипептидного связующего агента. Например, молекула углевода полипептидного связующего агента может быть присоединена к полиэтиленгликолю для увеличения периода полужизни.

С другой стороны, терапевтический агент может быть присоединен к шарнирному участку восстановленного компонента антитела посредством образования дисульфидного мостика или путем использования гетеробифункционального кросс-линкера, такого как N-сукцинил 3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP). Yu et al., Int. J. Cancer56:244 (1994). Общие способы для такой конъюгации хорошо известны в науке. [См., например, Wong, Chemistry Of Protein Conjugation and Cross-Linking (CRC Press 1991); Upeslacis et al., "Modification of Antibodies by Chemical Methods," in Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch et al. (eds.), pages 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies", in Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, Ritter et al. (eds.), p. 60-84 (Cambridge University Press 1995).] В науке известен целый ряд бифункциональных белоксвязывающих агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол)пропионат (SPDP), иминотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидата HCL), активные эфиры (такие как дисукцинимидила суберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидо соединения (такие как бис-(р-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(р-диазониябензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол 2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол).

Белки слияния антител.

Способы получения белков слияния антител хорошо известны в науке. (См., например, патент США № 6306393.) Белки слияния антитела, включающие молекулу интерлейкина-2, описаны Boleti et al., Ann. Oncol. 6:945 (1995), Nicolet et al., Cancer Gene Ther. 2:161 (1995), Becker et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 93:7826 (1996), Hank et al., Clin. Cancer Res. 2:1951 (1996), и Hu et al., Cancer Res. 56:4998 (1996). Кроме того, Yang et al. (Hum. Antibodies Hybridomas 6:129 (1995)) описывают белок слияния, который включает фрагмент $F(ab')_2$ и молекулу фактора некроза опухолей-альфа. Дополнительные примеры белков слияния антитела описаны в Pastan et al., Nat. Reviews Cancer 6:559-65 (2006).

Способы получения белков слияния антитела-токсина, в которых рекомбинантные молекулы состоят из одного или нескольких компонентов антитела и токсина или химиотерапевтического агента, также известны специалисту в данной области. Например, белки слияния антитела-экзотоксина Pseudomonas A были описаны в Chaudhary et al., Nature 339:394 (1989), Brinkmann et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 88:8616 (1991), Batra et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:5867 (1992), Friedman et al., J. Immunol. 150:3054 (1993), Wels et al., Int. J. Can. 60:137 (1995), Fominaya et al., J. Biol. Chem. 271:10560 (1996), Kuan et al., Biochemistry 35:2872 (1996), и Schmidt et al., Int. J. Can. 65:538 (1996). Белки слияния антитела-токсина, содержащие молекулу дифтерийного токсина, были описаны в Kreitman et al., Leukemia 7:553 (1993), Nicholls et al., J. Biol. Chem. 268:5302 (1993), Thompson et al., J. Biol. Chem. 270:28037 (1995), и Vallera et

al., Blood 88:2342 (1996). Deonarain et al., Tumor Targeting 1:177 (1995) описали белок слияния антитела/токсина, содержащий молекулу РНКазы, в то время как Linardou et al., Cell Biophys. 24-25:243 (1994) был получен белок слияния антитела/токсина, включающего компонент ДНКазы I. Гелонин использовали в качестве молекулы токсина в белке слияния антитела/токсина в работе Wang et al., Abstracts of the 209th ACS National Meeting, Anaheim, Calif., Apr. 2-6, 1995, Part 1, BIOT005. В качестве дополнительного примера: Dohlsten et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 91:8945 (1994) сообщили о белке слияния антитела/токсина, включающем энтеротоксин Staphylococcal A.

Типичными примерами токсинов, которые подходят для получения таких белков слияния, являются рицин, абрин, рибонуклеаза, ДНКаза I, стафилококковый энтеротоксин-А, антивирусный белок лаконоса, гелонин, дифтерийный токсин, экзотоксин Pseudomonas и эндотоксин Pseudomonas. (См., например, Pastan et al., Cell 47:641 (1986), и Goldenberg, CA--A Cancer Journal for Clinicians 44:43 (1994).) Специалисту в данной области известны другие подходящие токсины.

Антитела по данному изобретению также могут использоваться в ADEPT путем конъюгации антитела с активирующим пролекарство ферментом, что приводит к преобразованию пролекарства (например, химиотерапевтическое вещество пептидил, (см. WO 81/01145)) в активный противораковый препарат. (См, например, WO 88/07378 и патент США № 4975278.)

Ферментный компонент иммуноконъюгата, который может использоваться для ADEPT, включает любой фермент, который способен активировать пролекарство таким образом, чтобы преобразовывать его в более активную цитотоксическую форму.

Ферменты, которые могут использоваться в данном изобретении, включают, но не ограничиваются, следующие: щелочная фосфатаза; арилсульфатаза; цитозиндезаминаза, 5-фторурацил; протеазы, такие как протеаза серратии; термолизин; субтилизин; карбоксипептидазы и катепсины (такие как катепсины B и L); D-аланилкарбоксипептидазы; расщепляющие углеводы ферменты, такие как β-галактозидаза и нейраминидаза; β-лактамаза; и пенициллиновые амидазы, такие как пенициллин V амидаза или пенициллин G амидаза. С другой стороны, антитела с ферментативной активностью, также известные в науке как абзимы, также могут использоваться для конвертации пролекарств в активные лекарственные вещества, не связанные с белками крови (см., например, Massey, Nature 328: 457-458 (1987)). Конъюгаты антитело/абзим могут быть получены в соответствии с представленным здесь описанием для поставки абзима к популяции опухолевых клеток.

Ферменты могут быть ковалентно связаны с антителами с использованием известных науке способов, например, с использованием описанных выше гетеробифункциональных реагентов, обеспечивающих перекрестное связывание. С другой стороны, белки слияния, включающие как минимум антигенсвязывающий участок антитела по изобретению, связанный как минимум с функционально активным участком фермента, могут быть получены с использованием способов рекомбинантной ДНК, хорошо известных науке (см., например, Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984)).

Получение вариантов аминокислотных последовательностей.

Предусматривается получение композиций модифицированных полипептидов, включающие один, два, три, четыре, пять и/или шесть CDR антитела или полипептидного связующего агента, при этом участок CDR или другой участок модифицируют для придания повышенной специфичности или аффинности к антигену, или для обеспечения повышенной модуляции аффинности связывания между мишенью и сигнальным партнером. Например, сайты в пределах CDR антитела обычно модифицируют сериями, например, путем замещения вначале консервативных аминокислот (например, гидрофобная аминокислота замещается на неидентичную гидрофобную аминокислоту), а затем более отличающейся аминокислотой (например, гидрофобная аминокислота замещается на заряженную аминокислоту), и впоследствии в конкретном участке могут быть выполнены делеции или вставки. Предусматривается, что замещения консервативных аминокислот в пределах CDR позволяют сохранить биологическую активность вариабельного участка. Например, с использованием консервативных последовательностей каркасного участка вокруг CDR, получают праймеры ПЦР, комплементарные таким консенсусным последовательностям, что позволяет амплифицировать антигенспецифическую последовательность CDR, расположенную между участками праймера. Способы клонирования и экспрессии нуклеотидных и полипептидных последовательностей хорошо известны в науке [см., например, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, New York (1989)]. Амплифицированные последовательности CDR лигируют в соответствующую плазмиду. Плазмида, включающая один, два, три, четыре, пять и/или шесть клонированных CDR, в некоторых случаях содержит дополнительные полипептидные кодирующие участки, присоединенные к CDR.

Полипептидные связующие агенты, включающие модифицированные CDR, подвергают скринингу на предмет аффинности связывания с исходным антигеном. Кроме того, антитело или полипептид дополнительно тестируют на их способность нейтрализовать активность присущего антигена. Например, антитела по изобретению могут быть проанализированы, как это описано в примерах, для определения их способности влиять на биологическую активность мишени.

Модификации могут быть выполнены путем замещения консервативных или неконсервативных аминокислот, что более подробно описано ниже. "Вставки" или "делеции", преимущественно, охватыва-

ют примерно от 1 до 20 аминокислот, более преимущественно от 1 до 10 аминокислот. Вариация может быть внесена путем систематических замещений аминокислот в полипептидной молекуле антитела с использованием способов рекомбинации ДНК и анализа активности полученных рекомбинантных вариантов. Изменения в нуклеиновых кислотах могут быть выполнены в участках, в которых нуклеиновые кислоты отличаются в различных видах (вариабельные положения) или в крайне консервативных участках (константных участках). Способы изменения последовательностей антитела и экспрессии полипептидных композиций антител по изобретению более подробно описаны ниже.

Вставки в аминокислотные последовательности включают амино- и/или карбоксильные терминальные слияния, варьирующие в длину от одного остатка для полипептидов, содержащих сотню или более остатков, а также вставки внутри последовательности одного или нескольких аминокислотных остатков. Примеры терминальных вставок включают антитело с N-терминальным остатком метионина или антитело (включая фрагмент антитела), слитое с тэгом антигенной детерминанты или антигенной детерминантой "спасительного" рецептора. Другие варианты вставки молекулы антитела включают слияние с полипептидом, что повышает период полужизни антитела в сыворотке, например, на N-конце или С-конце.

Термин "тэг антигенной детерминанты" обозначает антитело, слитое с тэгом в виде антигенной детерминанты. Полипептид с тэгом-антигенной детерминантой имеет достаточно остатков для образования антигенной детерминанты, но такой полипептид достаточно короткий, поэтому не оказывает влияния на активность антитела. Тэг-антигенная детерминанта является довольно уникальной, поэтому антитело не участвует в перекрестной реакции с другими антигенными детерминантами. Подходящие полипептиды-тэги, как правило, имеют по меньшей мере 6 аминокислотных остатков, но обычно примерно от 8 до 50 аминокислотных остатков (преимущественно, примерно от 9 до 30 аминокислотных остатков). Примеры включают полипептид-тэг гемагглютинина вируса гриппа (HA) и его антитело 12CAA5 (Field et al., Mol. Cell. Biol. 8: 2159-2165 (1988)); тэг c-myc и антитела к нему 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 и 9E10 (Evan et al., Mol. Cell. Biol. 5:3610-16 (1985)); и тэг-гликопротеин D (gD) вируса простого герпеса и антитела к нему (Paborsky et al., Protein Engineering 3:547-53 (1990)). Другие типичные тэги представляют собой полигистидиновую последовательность, обычно примерно шесть остатков гистидина, что позволяет выделить соединение, меченое с использованием хелатообразования с никелем. Другие метки и тэги, такие как тэг FLAG® (Eastman Kodak, Rochester, NY), хорошо известны и обычно используются в науке, и предусмотрены изобретением.

В контексте данного изобретения термин "антигенная детерминанта для связывания со "спасительным" рецептором" относится к антигенной детерминанте участка Fc молекулы IgG (например, IgG_1, IgG_2, IgG_3 или IgG_4), которая ответственна за повышение периода полужизни в сыворотке in vivo молекулы IgG.

Другой тип варианта представлен вариантом с замещением аминокислот. В таких вариантах отсутствует по меньшей мере один аминокислотный остаток в молекуле антитела, и на его место вставлен другой остаток. Предусмотрен мутагенез путем замещения в любом гипервариабельном участке или CDR, или каркасных участках. Замены консервативных аминокислот включают замену аминокислоты другим членом этого же класса. Замены неконсервативных аминокислот включают замену члена одного из таких классов членом из другого класса.

Замены консервативных аминокислот выполняют на основе подобия показателя полярности, заряда, растворимости, гидрофобности, гидрофильности и/или амфипатической природы отдельных остатков. Например, неполярные (гидрофобные) аминокислоты включают аланин (Ala, A), лейцин (Leu, L), изолейцин (Ile, I), валин (Val, V), пролин (Pro, P), фенилаланин (Phe, F), триптофан (Trp, W) и метионин (Met, M); полярные нейтральные аминокислоты включают глицин (Gly, G), серин (Ser, S), треонин (Thr, T), цистеин (Cys, C), тирозин (Tyr, Y), аспарагин (Asn, N) и глутамин (Gln, Q); положительно заряженные (основные) аминокислоты включают аргинин (Arg, R), лизин (Lys, K) и гистидин (His, H); и отрицательно заряженные (кислые) аминокислоты включают аспарагиновую кислоту (Asp, D) и глутаминовую кислоту (Glu, E).

Любой остаток цистеина, не задействованный в поддержании надлежащей конформации антитела, также может быть замещен, обычно серином, для улучшения устойчивости к окислению молекулы и предотвращения аберрантного образования перекрестных связей. С другой стороны, в антитело могут быть добавлены цистеиновые связи для улучшения устойчивости антитела (в частности, если антитело представлено фрагментом антитела, таким как фрагмент Fv).

Созревание аффинности.

Созревание аффинности обычно включает получение и скрининг вариантов антитела, которые имеют замещения в пределах CDR исходного антитела, и отбор вариантов, которые обладают улучшенными биологическими свойствами, такими как усиленная аффинность связывания относительно исходного антитела. Удобный способ получения таких замещенных вариантов включает применение способа аффинной зрелости с использованием фаговых дисплеев. В нескольких словах это можно описать следующим образом: несколько сайтов гипервариабельного участка (например, 6-7 сайтов) подвергаются мутации для получения всех возможных замен аминокислот в каждом сайте. Варианты антитела, полученные таким образом, отображаются моновалентно из структур нитевидных фагов как слияния продук-

та гена III M13, соединенного с каждой частицей. Затем варианты фаговых дисплеев подвергаются скринингу на предмет своей биологической активности (например, аффинность связывания). (См., например, WO 92/01047, WO 93/112366, WO 95/15388 и WO 93/19172.)

Используемые в настоящее время способы созревания аффинности принадлежат к двум категориям мутагенеза: стохастическому и нестохастическому. ПЦР пониженной точности, мутантные бактериальные штаммы (Low et al., J. Mol. Biol. 260, 359-68 (1996)) и насыщающий мутагенез (Nishimiya et al., J. Biol. Chem. 275:12813-20 (2000); Chowdhury, P. S. Methods Mol. Biol. 178, 269-85 (2002)) являются типичными примерами способов стохастического мутагенеза (Rajpal et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 102:8466-71 (2005)). Нестохастические способы часто используют сканирование аланином или сайт-направленный мутагенез для получения лимитированных коллекций специфических вариантов. Некоторые способы описаны более подробно ниже.

Созревание аффинности способом пэннинга - созревание аффинности рекомбинантных антител обычно проводят в течение нескольких этапов пэннинга кандидатных антител в присутствии пониженных количеств антигена. Снижение количества антигена на каждом этапе позволяет отобрать антитела с наибольшей аффинностью к антигену, что позволяет получить антитела с высокой аффинностью из большого пула исходного материала. Созревание аффинности посредством пэннинга хорошо известно в науке и описано, например, в Huls et al. (Cancer Immunol Immunother. 50:163-71 (2001)). Способы созревания аффинности с использованием способов фаговых дисплеев описаны в тексте данного изобретения и известны в науке (см., например, Daugherty et al., Proc Natl Acad Sci USA. 97:2029-34 (2000)).

Сканирующий мутагенез - сканирующий мутагенез (CM) (Rajpal et al., Proc Natl Acad Sci USA. 102:8466-71 (2005)) обеспечивает способ быстрого картирования антителосвязующего сайта. Для CM девять аминокислот, являющихся представителями основной боковой цепи молекулы и входящих во встречающиеся в природе 20 аминокислот, выбирают для функциональных участков боковой цепи для связывания в каждом положении во всех шести CDR антитела. CM приводит к отдельной серин мутаций в положениях в пределах CDR, при этом каждый остаток "дикого типа" систематически замещают одной из девяти отобранных аминокислот. Мутированные CDR комбинируют для получения комбинаторной библиотеки одноцепочечных фрагментов (scFv) с повышенной сложностью и размером без необходимости в количественном отображении всех вариантов. После положительного отбора клоны с большей аффинностью связывания подвергаются секвенированию, и преимущественные мутации картируют.

ПЦР пониженной точности - ПЦР пониженной точности предполагает рандомизацию нуклеиновых кислот в ходе нескольких этапов селекции. Рандомизация происходит с низкой скоростью со свойственной частотой ошибок используемой полимеразы, но рандомизация не может быть повышена ПЦР пониженной точности (Zaccolo et al., J. Mol. Biol. 285:775-783 (1999)) с использованием полимеразы, обладающей высокой свойственной частотой ошибок во время транскрипции (Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226:889-96 (1992)). После циклов мутации, клоны с большей аффинностью к связыванию с антигеном подвергают селекции с использованием стандартных и известных в науке способов.

Перестановки в ДНК - Перестановки в нуклеиновой кислоте представляют собой способ для in vitro или in vivo гомологичной рекомбинации пулов более коротких или меньших полинуклеотидов для получения вариантных полинуклеотидов. Перестановки в ДНК были описаны в патенте США № 6605449, патенте США № 6489145, WO 02/092780 и Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:10747-51 (1994). Как правило, перестановки в ДНК включают 3 этапа: фрагментация генов, которые необходимо переставить, ДНКазой I; случайная гибридизация фрагментов и повторная сборка или заполнение фрагментированного гена с использованием ПЦР в присутствии ДНК-полимеразы (определение пола способом ПЦР); и амплификация собранного повторно продукта с использованием стандартной ПЦР.

Перемещение в ДНК отличается от ПЦР пониженной точности тем, что оно представлено обратимой цепной реакцией. В ходе ПЦР пониженной точности, экспоненциальным образом увеличивается количество сайтов начала действия полимеразы и количество молекул. В отличие от этого, в ходе повторной сборки или перемещения в нуклеиновой кислоте случайных полинуклеотидов происходит снижение количества точек начала репликации и количества (но не размера) случайных полинуклеотидов с течением времени.

В случае антитела, перемещение в ДНК позволяет образовывать несвязанную комбинаторную ассоциацию всех CDR1 со всеми CDR2, со всеми CDR3, например. Предусматривается, что множественные семейства последовательностей могут быть перемещены в ходе одной реакции. Кроме того, перемещение обычно сохраняет относительный порядок, такой как, например, CDR1 не будет находиться в положении CDR2. Редкие участки для перемещения будут содержать большое количество наилучших (т.е. с максимальной аффинностью) CDR, и такие редкие участки для перемещения могут быть отобраны на основе их улучшенной аффинности.

Шаблонный полинуклеотид, который может использоваться в перемещении в ДНК, может быть представлен ДНК или РНК. Он может иметь различную длину в зависимости от размера гена или короче или меньше полинуклеотида, который необходимо рекомбинировать или переставить. Преимущественно, шаблонный полинуклеотид составляет от 50 пар оснований до 50000 пар оснований. Шаблонный полинуклеотид обычно представлен двухцепочечным.

Предусматривается, что к шаблонному полинуклеотиду во время первичного этапа селекции генов могут быть добавлены одноцепочечные или двухцепочечные полинуклеотиды нуклеиновых кислот, имеющих участки идентичности шаблонному полинуклеотиду и участки гетерологичности шаблонному полинуклеотиду. Также предусматривается, что во время первичного этапа могут быть смешаны два различных, но родственных полинуклеотидных шаблона.

Сканирование аланином - сканирующий аланином мутагенез может проводиться для идентификации остатков гипервариабельного участка, которые, по существу, способствуют связыванию с антигеном. Cunningham and Wells, (Science 244:1081-1085 (1989)). Были идентифицированы остаток или группа отдельных остатков (например, заряженных остатков, таких как arg, asp, his, lys и glu) и замещены нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (более преимущественно, аланином или полиаланином) для влияния на взаимодействие аминокислот с антигеном. Аминокислоты в таких положениях, демонстрируя функциональную чувствительность к замещениям, в дальнейшем обновляют путем введения дополнительных или других вариантов в/для участков замещения.

Компьютерное моделирование - С другой стороны или кроме того, может быть преимущественным проведение анализа кристаллической структуры комплекса антиген/антитело для идентификации точек контакта между антителом и антигеном, или для использования компьютерного программного обеспечения для моделирования таких контактных точек. Такие контактные остатки и соседние остатки являются кандидатами на замещение в соответствии с используемыми здесь способами. Как только такие варианты будут получены, панель вариантов подвергается скринингу в соответствии с представленным здесь описанием, и антитела с превосходящими свойствами по результатам одного или нескольких релевантных анализов могут быть отобраны для дальнейшей разработки.

Разработка фармацевтических композиций.

Для введения полипептидных связующих агентов по изобретению человеку или исследуемым млекопитающим, преимущественным является разработка полипептидного связующего агента в стерильной композиции, включающей один или несколько стерильных и фармацевтически приемлемых носителей. Фраза "фармацевтически или фармакологически приемлемый" относится к молекулярным единицам и композициям, которые не приводят к аллергии или другим нежелательным реакциям при введении с использованием хорошо известных в науке путей введения, как это описано ниже. "Фармацевтически приемлемые носители" включают любые и все клинически используемые растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотоничные и замедляющие абсорбцию агенты и т.п.

Полипептидный связующий агент вводят любым подходящим способом, включая парентеральное, подкожное, интраперитонеальное, интрапульмональное и интраназальное, и, если это необходимо для локального введения, введение внутрь поражения. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, интраартериальное, интраперитонеальное, интрадермальное или подкожное введение. Доза принимается преимущественным образом в виде инъекций, наиболее предпочтительно в виде внутривенных или подкожных инъекций, частично в зависимости от кратковременного или продолжительного введения. Предусмотрены и другие способы введения, включая местное, в частности, трансдермальное, трансмукозальное, ректальное, пероральное или локальное введение, например, с помощью катетера, расположенного поблизости от требуемого места.

Фармацевтические композиции по данному изобретению, содержащие полипептидный связующий агент по изобретению в качестве активного действующего вещества, могут содержать стерильные и фармацевтически приемлемые носители или добавки, в зависимости от пути введения. Примеры таких носителей или добавок включают воду, фармацевтически приемлемый органический растворитель, коллаген, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, карбоксивиниловый полимер, натрия карбоксиметилцеллюлозу, натрия полиакрилат, натрия альгинат, водорастворимый декстран, натрия карбоксиметиловый крахмал, пектин, метилцеллюлозу, этилцеллюлозу, ксантановую камедь, аравийскую камедь, казеин, желатин, агар, диглицерин, глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, вазелин, парафин, стеариловый спирт, стеариновую кислоту, человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), маннит, сорбитол, лактозу, фармацевтически приемлемый сурфактант и т.п. Используемые добавки выбирают, но не ограничиваются, из представленных выше соединений или их комбинаций соответствующим образом, в зависимости от лекарственной формы по данному изобретению. Для растворов или эмульсий подходящие носители или основы включают, например, водные или спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая физиологический раствор и забуференную среду. Парентеральные носители могут включать раствор натрия хлорида, декстрозу Рингера, декстрозу и натрия хлорид, содержащий лактат раствор Рингера или жирные масла. Внутривенные носители могут включать различные добавки, консерванты или жидкости, питательные вещества или электролитические компенсаторы. Представлен целый ряд водных носителей, например, стерильные забуференные растворы натрия фосфата, бактериостатическая вода, забуференная вода, 0,4% физиологический раствор, 0,3% глицин и т.п., и такие носители могут включать другие белки для повышения стабильности, такие как альбумин, липопротеин, глобулин и т.д., подвергнутые незначительным химическим модификациям или т.п.

Терапевтические композиции полипептидного связующего агента могут быть приготовлены для

хранения путем смешивания полипептидного связующего агента с необходимой степенью чистоты с физиологически приемлемыми носителями, вспомогательными средствами или стабилизаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)) в форме лиофилизированных композиций или водных растворов. Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы представлены нетоксичными для реципиента при используемых дозах и концентрациях и включают следующие: буферы, такие как фосфатные, цитратные, сукцинатные и буферы других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты, такие как октадецилдиметилбензил аммония хлорид; гексаметония хлорид; бензалкония хлорид, бензетония хлорид; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол; м-крезол; полипептид с низким молекулярным весом (менее 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатные вещества, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннитол, трегалоза или сорбитол; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы с металлом (например, комплексы Zn-белок); и/или неоинные сурфактанты, такие как ТВИН®, ПЛУРОНИКС® или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Активное действующее вещество также может быть заключено в микрокапсулы, например, путем коацервации или межфазной полимеризации, например, с помощью гидроксиметилцеллюлозы, микрокапсулы из желатина и микрокапсулы из полиметилметакрилата, соответственно, представлено в виде коллоидных систем доставки препарата (например, в липосомах, белковых микросферах, микроэмульсиях, наночастицах и нанокапсулах) или в виде макроэмульсий. Такие способы описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Композиции, используемые для in vivo введения, должны быть стерильными. Это сопровождается фильтрацией через стерильные фильтрационные мембраны.

Водные суспензии могут содержать активное действующее вещество в смеси с вспомогательными веществами, подходящими для производства водных суспензий. Такие вспомогательные вещества представлены суспендирующими агентами, например, натрия карбоксиметилцеллюлозой, метилцеллюлозой, гидроксипропилметилцеллюлозой, натрия альгинатом, поливинилпиролидоном, трагакантовой камедью и аравийской камедью; диспергирующие или смачивающие агенты могут быть представлены встречающимися в природе фосфатидами, например, лецитином, или продуктами конденсации алкиленоксида с жирными кислотами, например, полиоксиэтилена стеаратом, или продуктами конденсации этиленоксида с алифатическими спиртами с длинной цепью, например, гептадекаэтиленоксикетанол, или продуктами конденсации этиленоксида с частичными эфирами, полученными из жирных кислот и гекситола, таких как полиоксиэтиленсорбитола моноолеат, или продуктами конденсации этиленоксида с частичными эфирами, полученными из жирных кислот и ангидридов гекситола, например, полиэтиленсорбитана моноолеат. Водные суспензии также могут содержать один или несколько консервантов, например, этил, или n-пропил, p-гидроксибензоат.

Антитела по изобретению могут быть подвергнуты сублимации для хранения и восстановлены в подходящем носителе перед использованием. Было доказано, что такой способ эффективен для стандартных иммуноглобулинов. Может использоваться любой подходящий способ лиофилизации и восстановления. Специалисту в данной области будет очевидно, что лиофилизация и восстановление могут привести к потере активности антитела в различной степени, и что используемые уровни могут быть скорректированы для компенсации.

Диспергируемые порошки и гранулы, подходящие для получения водной суспензии путем добавления воды, позволяют получить активное действующее вещество в смеси с диспергируемым или смачивающим агентом, суспендирующим агентом и одним или несколькими консервантами. Подходящие диспергируемые или смачивающие агенты и суспендирующие агенты представлены веществами, указанными выше.

Концентрация полипептидного связующего агента в таких композициях может широко варьировать, например, от менее чем примерно 0,5%, обычно на уровне или по меньшей мере примерно 1% до не менее чем 15 или 20% по весу, и могут быть выбраны преимущественно на основе жидкостных объемов, вязкости и т.д., в соответствии с отдельным выбранным путем введения. Таким образом, типичная фармацевтическая композиция для парентерального введения может быть получена с содержанием 1 мл стерильной забуференной воды и 50 мг полипептидного связующего агента. Типичная композиция для внутривенной инфузии может быть получена с содержанием 250 мл стерильного раствора Рингера и 150 мг полипептидного связующего агента. Фактические способы для получения композиций для парентерального введения известны специалисту в данной области и более подробно описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1980). Эффективная доза полипептидного связующего агента состоит в диапазоне от 0,01 до 1000 мг на 1 кг массы тела на введение.

Фармацевтические композиции могут быть представлены в форме стерильной инъецируемой водной, масляной суспензии, дисперсий или стерильных порошков для приготовления стерильных инъеци-

руемых растворов или дисперсий непосредственно перед введением. Суспензия может иметь состав в соответствии с известными способами при использовании подходящих диспергирующих или смачивающих агентов и суспендирующих агентов, которые указаны выше. Стерильный препарат для инъекций может быть представлен в виде стерильного раствора или суспензии в нетоксичном и приемлемом для парентерального введения растворителе или разбавителе, например, в виде раствора в 1,3-бутандиоле. Носитель может быть представлен растворителем или дисперсией, содержащими, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), а также их подходящими смесями, растительными маслами, раствором Рингера и изотоническим раствором натрия хлорида. Кроме того, в качестве растворителя или среды для суспензии могут использоваться стерильные и нелетучие масла. Для этой цели может использоваться любое нелетучее сбалансированное масло, включая синтетические моно-или диглицериды. Кроме того, при получении препаратов для инъекций могут использоваться жирные кислоты, такие как олеиновая кислота.

Во всех случаях форма должна быть стерильной и должна быть представлена жидкостью для облегчения забора в шприц. Надлежащая влажность может поддерживаться, например, путем использования материалов покрытия, таких как лецитин, поддержанием необходимого размера частиц в случае дисперсий и использованием сурфактантов. Фармацевтические композиции должны быть устойчивыми в условиях производства и хранения; таким образом, композиции должны быть защищены от контаминации микроорганизмами, такими как бактерии и грибы. Предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто путем включения различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабена, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты, тимеросала и т.п. В большинстве случаев желательно добавление изотонических агентов, например, Сахаров или натрия хлорида. Продолжительная абсорбция инъецируемых композиций может обеспечиваться включением в композицию агентов, которые замедляют абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

Композиции, подходящие для введения, могут быть приготовлены с усилителями захвата или абсорбции для повышения их эффективности. Такие усилители включают, например, салицилат, гликохолат/линолеат, глихолат, апротинин, бацитрацин, SDS, капрат и т.п. [См., например, Fix (J. Pharm. Sci., 85:1282-1285 (1996)) и Oliyai and Stella (Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32:521-544 (1993))].

Биофизические анализы.

Комплексные биологические явления могут быть изучены посредством молекулярных биофизических способов, которые рассматривают такие явления как системы взаимодействующих единиц, которые могут изучаться в понятиях статистических механизмов, термодинамики и химической кинетики.

В определенных вариантах воплощения изобретения анализы по данному изобретению могут включать определяемую молекулу. Определяемая молекула может быть представлена любой молекулой, которая способна воспроизводить, прямым или косвенным образом, измеряемый сигнал, такой как радиоактивный, хромогенный, люминесцентный или флуоресцентный сигнал, который может использоваться для количественного анализа связанной определяемой молекулы или метки в образце. Определяемые метки, используемые в науке, включают радиоизотопы, такие как ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S или ^{125}I, электрохемилюминесцентные метки, такие как катализатор на основе рутения (Ru) в сочетании с субстратами и т.д., люминесцентные или биолюминесцентные метки (например, европий, ванадий), флуоресцентные или хемилюминесцентные соединения, такие как флуоресцеина изотиоцианат, родамин или люциферин, ферменты (например, фермент, такой как щелочная фосфатаза, β-галактозидаза или пероксидаза хрена), колориметрические метки, такие как коллоидальное золото, окрашенное стекло или пластиковые гранулы (например, полистирен, полипропилен, латекс и т.д.), парамагнитные атомы или магнитные агенты, электроноплотные реагенты, нано- или микрогранулы, содержащие флуоресцентный краситель, нанокристаллы, квантовую точку, квантовые гранулы, нанотэг, дендримеры с флуоресцентной меткой, микропередатчик, молекулу-донора электронов или молекулярную структуру, или светоотражающую частицу, при этом микрочастицы могут быть представлены нанокристаллами или квантовыми точками. Нанокристаллы представляют собой вещества, которые поглощают фотоны света, затем испускают фотоны при различной длине волны (флуорофоры). Кроме того, с нанокристаллами могут быть конъюгированы дополнительные флуоресцентные метки или вторичные антитела. Нанокристаллы представлены на рынке такими компаниями, как Invitrogen and Evident Technologies (Troy, N.Y.). Другие метки включают (E)-5-[2-(метоксикарбонил)этенил]цитидин, являющийся нефлуоресцирующей молекулой, которая была подвергнута ультрафиолетовому (UV) облучению, что приводит к получению продукта 3-бета-D-рибофуранозил-2,7-диоксопиридо[2,3-d]пиримидин с сильным флуоресцирующим сигналом. Метки в виде шрих-кода описаны в публикации патента США № 20070037195.

В данном изобретении может использоваться целый ряд способов анализов, известных в науке, таких как анализы конкурентного связывания, прямые и непрямые сендвич-анализы, анализы иммунопреципитации, резонансный перенос энергии с флуоресценцией (FRET), электроиммуноанализы поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и способы на основе наночастиц.

Анализы конкурентного связывания основываются на способности меченого стандарта (например, антигена или его фрагмента, с которым связывается полипептидный связующийся агент) конкурировать с антигеном в исследуемом образце за связывание с полипептидным связующим агентом. Количество

антигена в исследуемом образце универсально пропорционально количеству стандарта, связанного с антителами. Для облегчения определения количества стандарта, который необходимо связать, антитела обычно инсолюбилизируют до или после конкуренции, поэтому связанный антиген может быть удобным образом разделен от несвязанного антигена. В альтернативных вариантах воплощения изобретения анализы конкурентного связывания измеряют способность меченого полипептидного связующего агента конкурировать с немеченым полипептидным связующим агентом за связывание с антигеном или его фрагментом.

Сендвич-анализы обычно предполагают использование двух антител, каждое из которых способно связываться с различными иммуногенными участками или антигенной детерминантой белка, который необходимо определить и/или измерить количественно. В ходе сендвич-анализа аналит в исследуемом образце обычно связывается с первым полипептидным связующим агентом, который иммобилизируют на твердой фазе, и затем второй полипептидный связующий агент связывается с аналитом, образуя, таким образом, нерастворимый комплекс из трех компонентов. (См., например, патент США № 4376110.) Второй полипептидный связующий агент может быть сам по себе помечен определяемой молекулой (прямой сендвич-анализ) или может быть измерен с использованием антитела к иммуноглобулину, которое помечено определяемой молекулой (непрямой сендвич-анализ). Например, один тип сендвич-анализа представлен иммуноферментным анализом (ИФА), в котором определяемая молекула представлена ферментом. (См., например, главу 18 в Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, New York, NY (1995).)

Еще один пример способа анализа включает испускание флуоресцирующей резонансной передаваемой энергии (FRET).

Например, одно соединение помечают молекулой-донором FRET, и его связующийся партнер помечают молекулой-акцептором FRET, или наоборот. При возникновении связывания между связующимися партнерами, молекулы донора FRET и акцептора FRET сближаются и испускают флуоресцирующий сигнал при определенной длине волны. Для блокирования всех длин волн, за исключением длины волны для метки, может использоваться узкополосный фильтр. Пары молекул FRET представлены на рынке и известны в науке (например, представлены компанией Invitrogen), и могут использоваться в соответствии с протоколом производителя. Эмиссия FRET определяется с использованием способов оптической визуализации, такой как ПЗС камера.

Еще один пример способа анализа представлен резонансным переносом энергии биолюминесценции (BRET), например, с использованием биодатчиков, как это описано в WO 06/086883.

Другой тип анализа предполагает мечение донором электронов. Одна молекула метится донором электронов, а взаимодействующая молекула связывается с электрическим контактом, или наоборот. При возникновении связывания между связующимися партнерами, метка отдает электроны электрическому контакту. (См., например, Ghindilis, Biochem Soc Trans. 28:84-9, (2000) and Dai et al., Cancer Detect Prev. 29:233-40 (2005), где описываются способы электроиммуноанализов.) Электронный контакт затем будет считан с помощью преобразователя A в D (аналогового сигнала в цифровой) и количественно подсчитан. Чем выше число электронов, тем больше отмечаемое взаимодействие.

Один вариант воплощения изобретения описывает метку, позволяющую определять отдельную молекулу, т.е. использование плазмон-резонансных частиц (ПРЧ) в качестве оптических репортеров, как это описано в Schultz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:996-1001 (2000) (включено в данный документ посредством ссылки). ПРЧ представлены металлическими наночастицами, например, с диаметром 40-100 нм, которые рассеивают свет по причине коллективного резонанса проведения электронов в металле (т.е. поверхностного плазмонного резонанса). Амплитуда, пиковая длина волны и ширина спектра плазмонного резонанса, ассоциированного с наночастицей, зависят от размера частицы, формы и состава материала, а также от окружающей среды. Путем влияния на такие параметры во время приготовления, могут быть сформированы такие ПРЧ, которые обладают пиком рассеяния в любой части видимого диапазона спектра. Для сферических ПРЧ пиковая длина волны рассеивания и эффективность рассеивания увеличиваются с увеличением радиуса, обеспечивая способ получения различно окрашенных меток. Популяции серебряных сфер, например, могут быть получены воспроизводимым образом, и пиковая длина волны рассеивания для таких сфер составляет несколько нанометров установленной длины волны, что может быть достигнуто путем корректировки финального радиуса сфер во время получения. Принимая во внимание, что ПРЧ являются яркими и наноразмерными, они используются в качестве индикаторов для определения отдельных молекул, т.е. присутствие связанной ПРЧ в поле зрения указывает на одно явление связывания. Примером детекторной системы поверхностного плазмонного резонанса является система анализа BIAcore. (См., например, Malmquist, J. Molec Recognition, 7:1-7 (1994)).

Молекулярные взаимодействия также могут быть определены с использованием основанных на наночастицах способов. (См., например, Ao et al., Anal Chem. 78:1104-6 (2006), где описано гашение наночастицами золота, Tang et al., Biosens Bioelectron. 2005 Nov 30, где описаны поверхности наночастиц SiO(2)/Au в определении антитела, и Lieu et al., J. Immunol Methods. 307:34-40 (2005), где описаны наночастицы диоксида кремния, содержащие дибромфлуоресцеин для использования в ходе иммуноанализа флуоресценции при комнатной температуре на твердом субстрате (SS-RTP-IA).)

Анализ KinExA также может использоваться для измерения аффинности модулирующего антитела к своему антигену. Типичный анализ KinExA описан в примере 20. Например, анализ KinExA измеряет очень низкие уровни лиганда в питательной среде клеток. Этот анализ позволяет лиганду связываться с клетками, экспрессирующими когнатный рецептор, который может быть измерен путем определения уровня снижения лиганда из питательной среды клеток. Как только лиганд свяжется с клетками, концентрация лиганда в питательной среде клеток падает. Путем использования титрации клеток, экспрессирующих рецептор, и измерения процента несвязанного лиганда, аффинность взаимодействия лиганд/рецептор оценивают с использованием программного обеспечения KinExA (Sapidyne, Boise ID). Такой анализ используют для измерения степени модуляции активности связывания лиганда при использовании различных антител к рецепторам.

Любое из указанных выше измерений аффинности связывания или параметров скорости связывания могут проводиться в анализах, в которых один или несколько компонентов - первый компонент, второй компонент и полипептидный связующий агент -находятся в растворе, или в анализах, в которых один или несколько компонентов - первый компонент, второй компонент и полипептидный связующий агент - связаны с твердой фазой (ковалентным или нековалентным образом), или в анализах, в которых один или несколько компонентов - первый компонент, второй компонент или полипептидный связующий агент экспрессируются на клеточной поверхности. Первый и/или второй компоненты могут быть сами по себе комплексами из нескольких соединений.

Введение и доза.

В одном аспекте изобретения способы по изобретению включают этап введения фармацевтической композиции.

Способы по изобретению выполняют с использованием любых принятых в медицине средств для введения препарата прямым или непрямым образом в организм млекопитающего, включая, но не ограничиваясь, инъекции, пероральное введение, интраназальное, местное, трансдермальное, парентеральное введение, ингаляционный спрей, вагинальное или ректальное введение. В контексте данного изобретения термин "парентеральный" включает подкожные, внутривенные, внутримышечные и интрацистернальные инъекции, а также способ катетера или инфузии. Также предусмотрены интрадермальная, интрамаммарная, интраперитонеальная, интратекальная, ретробульбарная, интрапульмонарная инъекции и/или хирургическая имплантация в отдельном месте. Подходящие устройства для доставки могут включать устройства, разработанные для доставки инсулина (см., например, Owens et al. Diabetic Med. 20(11):886-898, 2003).

В одном варианте воплощения изобретения введение проводят в области рака или пораженной ткани, нуждающейся в лечении, путем прямой инъекции в область или посредством непрерывной доставки, или механизма замедленного высвобождения, которые могут доставить композицию внутрь организма. Например, биоразрушаемые микросферы или капсулы, или другие конфигурации биоразрушаемого полимера с возможностью непрерывной доставки композиции (например, растворимого полипептида, антитела или небольшой молекулы) могут быть включены в композиции по изобретению, имплантированные в отдельный участок.

Терапевтические композиции также могут быть доставлены пациенту в нескольких участках. Одновременно могут использоваться несколько путей введения, или такие разные пути введения могут проводиться с течением времени. В определенных случаях преимущественным является обеспечение непрерывной доставки терапевтической композиции. Дополнительная терапия может вводиться периодически, например, каждый час, каждый день, каждую неделю, каждые 2 недели, каждые 3 недели, или ежемесячно.

В данном изобретении также предусмотрено введение нескольких агентов, таких как композиция антитела в сочетании со вторым агентом, как это описано в тексте данного изобретения.

Количества композиции антитела при заданной дозе будут варьировать в соответствии с размером индивидуума, которому вводят терапию, а также от характеристик подвергнутого лечению расстройства. В типичных способах лечения может быть необходимым введение примерно 1, 5, 10, 20, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 500 или 1000 мг/сутки. Такие концентрации могут вводиться в виде одной лекарственной формы или в виде нескольких доз. Стандартные исследования дозозависимого эффекта, вначале на моделях животных, а затем в клинических испытаниях, выявили оптимальные дозировки для отдельных состояний болезни и популяций пациентов.

Комбинированная терапия.

В одном варианте воплощения изобретения антитело по изобретению вводят со вторым агентом, используемым для лечения нарушения или заболевания, как это описано в тексте данного изобретения. Предусматривается, что два или более антител к различным антигенным детерминантам антигена-мишени могут быть смешаны таким образом, что комбинация антител может обеспечить повышенную эффективность относительно состояния или нарушения, которое подвергнуто лечению и ассоциировано с отдельным полипептидом. Композиции, включающие одно или несколько антител по изобретению, могут быть введены человеку или млекопитающим, страдающим, или предрасположенным к страданию, от состояния или нарушения, которое следует подвергнуть лечению и которое ассоциировано с отдель-

ным полипептидом.

Сопутственное введение двух терапевтических агентов не требует, чтобы агенты были введены в одно и то же самое время или одним и тем же путем введения до тех пор, пока существует перекрывание во временном периоде, в течение которого агенты проявляют свой терапевтический эффект. Предусматривается одновременное или последовательное введение, равно как и введение в различные дни или недели.

Второй агент может быть представлен другими терапевтическими агентами, такими как противодиабетические агенты, цитокины, факторы роста, другие противовоспалительные агенты, антикоагулянты, агенты, которые снижают или восстанавливают давление крови, агенты, которые снижают уровень холестерина, триглицеридов, ЛПНП, ЛПОНП или липопротеинов или повышают ЛПВП, агенты, которые повышают или снижают уровни регулирующих холестерин белков, противоопухолевые препараты или молекулы. Для пациентов с гиперпролиферативным расстройством, таким как рак или опухоль, комбинация со вторым терапевтическим способом, таким как радиотерапия, химиотерапия, фотодинамическая терапия или операция, также предусмотрена.

Типичные антидиабетические агенты, включают, но не ограничиваются, следующие: 1) сульфонилмочевину (например, глимепирид, глисентид, сульфонилмочевина, AY31637); 2) бигуаниды (например, метформин); 3) ингибиторы альфа-глюкозидазы (например, акарбоза, миглитол); 4) тиазолидинедионы (например, троглитазон, пиоглитазон, розиглитазон, глипизид, балаглитазон, ривоглитазон, нетоглитазон, троглитазон, энглитазон, AD 5075, T 174, YM 268, R 102380, NC 2100, NIP 223, NIP 221, MK 0767, сиглитазон, адаглитазон, CLX 0921, дарглитазон, CP 92768, BM 152054); 5) глюкагонподобные пептиды (GLP) и аналоги GLP или агонисты рецептора GLP-1 (например, эксендин) или их стабилизаторы (например, ингибиторы DPP4, такие как ситаглиптин); и 6) инсулин или его аналоги или миметики (например, ЛАНТУС®).

Предусматривается, что антитело по изобретению и второй агент могут быть введены одновременно, в одной и той же композиции. Дополнительно предусмотрено, что агенты вводят в отдельной композиции и вводятся одновременно, при этом упоминается, что агенты вводят с промежутком в 30 мин один от другого.

В другом аспекте изобретения второй агент вводят перед введением композиции антитела. Перед введением указывают введение второго агента в диапазоне одной недели перед лечением антителом до 30 мин перед введением антитела. Дополнительно предусмотрено, что второй агент вводят после введения композиции с антителом. Последующее введение обозначает введение спустя от 30 мин после лечения антителом до одной недели после введения антитела.

Дополнительно предусмотрено, что может проводиться и другая адъювантная терапия (где это необходимо). Например, пациент также может находиться на диабетической диете или плане питания, он может быть подвергнут хирургическому лечению или лучевой терапии (где это необходимо).

Очевидно, что доза может быть модифицирована в случае введения традиционных лекарственных препаратов в комбинации с препаратами по изобретению.

Способы применения.

Терапевтические показания для агонистов INSR/положительных модуляторов.

В другом варианте воплощения изобретение описывает способ ингибирования активности мишени путем введения мишень-специфического антитела нуждающемуся в этом пациенту. В лечебных целях может использоваться любой тип описанного здесь антитела. В типичных вариантах воплощения изобретения мишень-специфическое антитело представлено человеческим, химерным или гуманизированным антителом. В другом типичном варианте воплощения изобретения мишень имеет человеческое происхождение, и пациент представлен пациентом-человеком. С другой стороны, пациент может быть представлен млекопитающим, которое экспрессирует мишень-белок, с которым перекрестным образом связывается отдельное специфическое антитело. Антитело может быть введено млекопитающему, не являющемуся человеком, которое экспрессирует мишень-белок, с которым перекрестным образом связывается антитело (т.е. примата), в ветеринарных целях или для использования в качестве животной модели заболевания человека. Такие животные модели могут использоваться для оценки терапевтической эффективности мишень-специфических антител по изобретению.

Резистентность к инсулину описывает состояние, при котором физиологические количества инсулина не соответствуют для выработки нормального ответа на инсулин в клетках и тканях. Резистентность к инсулину связана с целым рядом болезненных состояний и условий и присутствует примерно у 30-40% индивидуумов, не страдающих диабетом. Такие состояния и условия болезни включают, но не ограничиваются, предиабетическое состояние, метаболический синдром (также обозначаемый как синдром резистентности к инсулину), сахарный диабет 2 типа, поликистоз яичников (ПКЯ) и неалкогольный стеатоз печени (неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП)) (проанализировано в Woods et al., End, Metab & Immune Disorders - Drug Targets 9: 187-198, 2009).

Предиабетическое состояние представляет собой состояние аномальной переносимости глюкозы, характеризующееся нарушением переносимости глюкозы (IGT) или нарушением уровня глюкозы натощак (IFG). Пациенты с предиабетическим состоянием имеют резистентность к инсулину и находятся под

высоким риском прогрессирования к диабету 2 типа в будущем. Метаболический синдром представляет собой связанную группу признаков, которые включают, не ограничиваясь, гиперинсулинемию, аномальную переносимость глюкозы, ожирение, перераспределение жиров в абдоминальной области или верхних отделах организма, гипертензию, дисфибринолиз, а также дислипидемию, характеризующуюся высоким уровнем триглицеридов, низким уровнем ЛПВП-холестерина и небольшой плотностью частиц ЛПНП. Резистентность к инсулину была связана с каждым признаком, что указывает на то, что метаболический синдром и резистентность к инсулину связаны друг с другом. Диагноз метаболического синдрома является сильным фактором риска для развития диабета 2 типа в будущем, а также ускорению атеросклероза, приводящего к сердечным приступам, инфаркту и заболеванию периферических сосудов.

Сахарный диабет представляет собой метаболическое нарушение у людей с частотой встречаемости примерно один процент в общей популяции (Foster, D. W., Harrison's Principles of Internal Medicine, Chap. 114, p. 661-678, 10th Ed., McGraw-Hill, New York). Заболевание проявляется в виде серин индуцируемых гормоном метаболических нарушений, которые, в конце концов, ведут к серьезным, длительным и ослабляющим осложнениям, охватывающим несколько систем органов, включая глаза, почки, нервы и кровеносные сосуды. Патологически заболевание характеризуется поражениями базальных мембран, видимых под электронным микроскопом. Сахарный диабет может быть разделен на два клинических синдрома - сахарный диабет 1 типа и 2 типа.

Тип 1, или инсулинозависимый сахарный диабет (ИЗСД), также обозначаемый как ювенильная форма, представляет собой хроническое аутоиммунное заболевание, характеризующееся обширной потерей бета-клеток в островках Лангерганса поджелудочной железы, вырабатывающих инсулин. Т.к. эти клетки уничтожаются прогрессивным образом, количество секретируемого инсулина снижается, что, в конце концов, приводит к гипергликемии (аномально высокому уровню глюкозы в крови), когда количество секретируемого инсулина падает ниже нормальных уровней глюкозы в крови. Несмотря на то, что точный механизм запуска такого иммунного ответа не известен, пациенты с ИЗСД имеют высокие уровни антител к белкам, экспрессируемым в бета-клетках поджелудочной железы. Однако не у всех пациентов с высокими уровнями таких антител развивается ИЗСД. Диабет 1 типа характеризуется очень низким или не измеряемым уровнем инсулина в плазме с повышенным уровнем глюкагона. Независимо от существующей этиологии, большинство пациентов с диабетом 1 типа имеют циркулирующие антитела, направленные против собственных клеток поджелудочной железы, включая антитела к инсулину, к цитоплазме клеток островков Лангерганса и к ферменту декарбоксилазы глутаминовой кислоты. Иммунный ответ, направленный специфически против бета-клеток (клеток, вырабатывающих инсулин), приводит к диабету 1 типа. Используемые в настоящее время способы лечения пациентов с диабетом 1 типа включают введение инсулина, а также могут включать изменения в диете для сведения к минимуму гипергликемии, возникающей в результате нехватки естественного инсулина, что, в свою очередь, является результатом поврежденных бета-клеток. Диета также подвергается изменению относительно введения инсулина с учетом гипогликемических эффектов гормона.

Диабет 2 типа (также обозначаемый как инсулиннезависимый сахарный диабет (ИНЗСД), зрелая форма, взрослая форма) развивается в случае отсутствия нормального ответа клеток мышц, жировой ткани и печени на инсулин. Такой ненормальный ответ (обозначаемый резистентностью к инсулину) может возникнуть по причине пониженного количества рецепторов к инсулину на таких клетках или в результате дисфункции сигнальных путей в клетках, или в результате обеих причин. Бета-клетки изначально компенсируют такую резистентность к инсулину путем повышения выработки инсулина. Со временем такие клетки становятся неспособными вырабатывать количество инсулина, достаточное для поддержания нормальных уровней глюкозы, указывая на прогрессирование к диабету 2 типа. Диабет 2 типа возникает в результате комбинации генетических и приобретенных факторов риска, включая диету с высоким содержанием жиров, недостаточную физическую нагрузку и старение. Более чем 90% пациентов-диабетиков страдают от диабета 2 типа, и частота его возникновения продолжает повышаться, становясь лидирующей причиной смерти, заболеваемости и затрат на здравоохранение по всему миру (Amos et al., Diabetic Med. 14:Sl-85, 1997).

Диабет 2 типа является сложным заболеванием, характеризующимся нарушениями уровня глюкозы и липидного метаболизма. Как правило, отмечаются изменения во многих метаболических параметрах, включая повышение уровней глюкозы натощак в плазме, уровней несвязанных жирных кислот и уровней триглицеридов, а также снижение соотношения ЛПВП/ЛПНП. Как уже обсуждалось выше, одной из принципиальных основополагающих причин диабета считается повышение резистентности к инсулину в периферических тканях, в частности, в мышцах и жировой ткани. Причины диабета 2 типа еще до конца не выяснены. Считается, что возникает резистентность указанных тканей к действию инсулина и снижение секреции инсулина ("нарушение функции β-клеток"). Основные ткани, отвечающие на инсулин, что важно для гомеостаза глюкозы, представлены печенью, в которой инсулин стимулирует синтез гликогена и ингибирует глюконеогенез, мышцами, в которых инсулин стимулирует усвоение глюкозы и гликоген стимулирует усвоение глюкозы и ингибирует липолиз. Таким образом, как следствие диабетического состояния, отмечаются повышенные уровни глюкозы в крови, что может привести к глюкозо-опосредованной клеточной токсичности и последующим заболеваниям (нефропатии, нейропатии, рети-

нопатии и т.д.). Резистентность к инсулину сильно коррелирует с развитием диабета 2 типа.

В настоящее время существуют различные фармакологические способы лечения диабета 2 типа (Scheen et al., Diabetes Care, 22(9):1568-1577, 1999; Zangeneh et al., Mayo Clin. Proc. 78: 471-479, 2003; Mohler et al., Med Res Rev 29(1):125-195, 2009).

Они действуют посредством различных механизмов действия: 1) сульфонилмочевина (например, глимепирид, глисентид, сульфонилмочевина, AY31637) существенно стимулирует секрецию инсулина; 2) бигуаниды (например, метформин) действуют путем способствования утилизации глюкозы, снижая выработку глюкозы в печени и уменьшая выход глюкозы из кишечника; 3) ингибиторы альфа-гликозидазы (например, акарбоза, миглитол) замедляют расщепление углеводов и последующую абсорбцию из желудка и снижают постпрандиальную гипергликемию; 4) тиазол-идинедионы (например, троглитазон, пиоглитазон, розиглитазон, глипизид, балаглитазон, ривоглитазон, нетоглитазон, троглитазон, энглитазон, AD 5075, T 174, YM 268, R 102380, NC 2100, NIP 223, NIP 221, MK 0767, циглитазон, адаглитазон, CLX 0921, дарглитазон, CP 92768, BM 152054) повышают действие инсулина, способствуя, таким образом, утилизации глюкозы в периферических тканях; 5) глюкагон-подобные пептиды и агонисты (например, эксендин) или их стабилизаторы (например, ингибиторы DPP4, такие как ситаглиптин) усиливают стимулированную глюкозой секрецию инсулина; и 6) инсулин или его аналоги (например, LANTUS®) стимулируют утилизацию глюкозы в тканях и ингибируют выработку глюкозы в печени. Представленные выше фармакологические способы могут использоваться индивидуально или в виде комбинированной терапии. Однако каждый способ имеет свои ограничения и нежелательные эффекты. С течением времени снижается ответ на такие агенты у большого процентного показателя субъектов с диабетом 2 типа. У 63% пациентов с диабетом 2 типа отмечается невозможность достижения глобальных уровней HbA_{1c} <7% по представлению Американской диабетической ассоциации, и такие пациенты имеют высокий риск развития осложнений. Более того, практически всегда у пациентов отмечают прогрессирование через стадии снижения функции поджелудочной железы. Лечение инсулином обычно начинают после того, как применение диеты, упражнений и пероральных препаратов было безуспешным в соответствующем контроле уровня глюкозы в крови. Недостатками лечения инсулином являются необходимость в введении препарата, потенциальное возникновение гипогликемии и увеличение веса. Вследствие этого, все еще существует настоятельная потребность в новейших противодиабетических препаратах.

Schaffer et al. использовали способ фаговых дисплеев для идентификации серин пептидов, связывающихся с дискретными горячими точками на INSR, при этом отмечалась агонистическая или антагонистическая активность при ковалентном соединении для формирования гомодимеров или гетеродимеров (Schaffer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100(8):4435-4439, 2003).

Дополнительный фармакологический подход в лечении диабета 2 типа заключается в использовании небольших непептидных молекул, которые могут активировать INSR или потенциировать активацию INSR инсулином (Moller, Nature 414:821-827). Такие молекулы оказалось невозможно идентифицировать, однако две группы сообщили о результатах. L783281 (DMAQ-B1, L7) и его производное, соединение 2, являются миметиками инсулина и идентифицированы из экрана для небольших молекул, которые активируют тирозинкиназу INSR (Zhang et al., Science 284: 974-977, 1999; Qureshi et al., J. Biol. Chem. 275(47): 36590-36595, 2000). TLK16998 и TLK19780 являются сенсибилизаторами инсулина, идентифицированные по своей способности повышать аутофосфорилирование выделенного, экспрессируемого естественным образом человеческого INSR (Manchem et al., Diabetes 50: 824-830, 2001; Pender et al., J. Biol. Chem. 277(46): 43565-43571, 2002). L783281 и TLK16998 потенциируют действие инсулина в резистентных к инсулину клетках путем действия на внутриклеточный участок β-субъединицы INSR, усиливая аутофосфорилирование β-субъединицы и последующую нисходящую передачу сигнала (Li et al., Diabetes 50: 2323-2328, 2001). Было показано, что соединение 2 и TLK16998 снижают уровни глюкозы в крови на мышиных моделях диабета при продолжительном введении высоких доз (Strowski et al., Endocrinology 145(11): 5259-5268, 2004; Manchem et al., Diabetes 50: 824-830, 2001). Однако, как оказалось, ни одно из таких соединений не было включено в клинические исследования. Ожидается, что агенты, которые направлены на домен INSR с тирозинкиназной активностью, будут иметь побочные эффекты по причине неспецифической активации гомологичных тирозинкиназных доменов в других молекулах. Внутриклеточный фрагмент β-субъединицы INSR не является подходящей мишенью для больших молекул, таких как антитела, которые не способы диффундировать в клетку.

Были идентифицированы поликлональные антитела из сыворотки пациентов с инсулинрезистентным диабетом, которые затем использовали в качестве датчиков для исследования действия инсулина. Такие аутоантитела ингибировали связывание инсулина с INSR, и двухвалентные (а не моновалентные) формы приводили к возникновению инсулиноподобных биологических эффектов при воздействии на ткани в условиях in vitro (Kahn et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75(9): 4209-4213, 1978; Heffetz and Zick, J. Biol. Chem. 261(2): 889-894, 1986).

Jacobs and Cuatrecasas описали два поликлональных кроличьих антитела и сообщили, что такие антитела, а также целый ряд поликлональных антител, полученных другими исследователями, были способны опосредовать различные инсулиноподобные эффекты (Jacobs and Cuatrecasas, CIBA Found. Symp.

90: 82-90, 1982).

Kull et al. описали три мышиных моноклональных антитела αIR-1, αIR-2 и αIR-3 и поликлональное антитело A410, а также их использование в исследовании иммунохимической перекрестной реакционной способности, идентификации субъединиц рецепторов инсулина и соматомедина-С (IGF-1) (Kull et al., J. Biol. Chem. 258(10):6561-6566, 1983). Herrera et al. также получили антитела (поликлональные кроличьи пептидные антитела к INSR P4 и P5) для изучения взаимодействия между рецепторами INSR и IGF-1 человека (Herrera et al., J. Biol. Chem. 261(6):2489-2491, 1986).

Положительное модулирующее антитело, которое повышает скорость ассоциации или снижает скорость диссоциации инсулина (аналога инсулина или агониста INSR) для INSR, может привести к повышению времени связывания рецептора с инсулином (аналогом инсулина или агонистом INSR), изменению в скорости интернализации INSR и/или изменению в степени фосфорилирования сигнальных белков, активированных или деактивированных INSR. Такие изменения могут существенно изменить метаболическую и митогенную активность инсулина (аналога инсулина или агониста INSR) и степень и частоту приема доз экзогенного инсулина (аналога инсулина или агониста INSR).

Отрицательное модулирующее антитело, которое повышает скорость ассоциации или снижает скорость диссоциации инсулина (аналога инсулина или агониста INSR) для INSR, может привести к понижению времени связывания рецептора с инсулином (аналогом инсулина или агонистом INSR), изменению в скорости интернализации INSR и/или изменению в степени фосфорилирования сигнальных белков, активированных или деактивированных INSR. Такие изменения могут существенно изменить метаболическую и митогенную активность инсулина (аналога инсулина или агониста INSR) и степень и частоту приема доз экзогенного инсулина (аналога инсулина или агониста INSR).

Предусматривается, что пациенты-диабетики, получающие положительное модулирующее антитело по изобретению, будут иметь улучшения уровней глюкозы в крови, пробы на переносимость глюкозы и других параметров чувствительности к инсулину в сравнении с пациентами, не принимающими лечение. Например, ожидается, что введение положительного модулирующего антитела по изобретению снизит повышенные уровни глюкозы в крови относительно нормальных уровней глюкозы, которые составляют примерно от 70 мг/дл до 125 мг/дл для уровней глюкозы натощак в соответствии с Американской диабетической ассоциацией. В одном варианте воплощения изобретения введение антитела по изобретению снижает уровни глюкозы в крови примерно на 15, 20, 25, 30, 35, 40% или более в сравнении с пациентом, не принимавшим лечение антителом.

Согласно критериям Международной организации здравоохранения и Американской диабетической ассоциации (ADA), нормальная переносимость глюкозы определяется как уровни глюкозы ниже 140 мг на дл, измеренные спустя 2 ч после перорального приема 75 г глюкозы. Нарушенная переносимость глюкозы определяется как уровни глюкозы, составляющие от 140 до 199 мг на дл (7,8-110 ммоль) спустя 2 ч после перорального приема 75 г глюкозы. Считается, что пациент имеет нарушенную переносимость глюкозы, если уровень глюкозы повышен (в сравнении с нормальным здоровым пациентом) спустя 2 ч, однако не слишком повышен для того, чтобы можно было диагностировать сахарный диабет 2 типа. Пациент с нарушенной переносимостью к глюкозе может иметь показатель глюкозы натощак, находящийся в норме или только незначительно повышенный. В одном варианте воплощения изобретения введение антитела по изобретению снижает уровни глюкозы в крови (спустя 2 ч после перорального приема 75 г глюкозы) примерно на 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50% или более в сравнении с пациентом, не принимавшим лечение антителом.

ADA также рекомендует, чтобы уровень гемоглобина A1c у взрослых составлял менее чем 7%. Для детей рекомендуемый ADA уровень A1c составляет больше уровня, указанного для A1c взрослых. У детей младше 6 лет рекомендуемый уровень составляет от 7,5 до 8,5%. У детей в возрасте 6-12 лет рекомендуемый уровень составляет менее 8%, а рекомендуемый уровень для подростков 13-19 лет составляет менее 7,5%. A1c является мерой того, насколько уровни сахара в крови остаются в пределах заданного диапазона в течение предшествующих 2-3 месяцев. (American Diabetes Association, Diabetes Care, 28(1):186-212, 2005.) Предусматривается, что введение антитела по изобретению для лечения диабета снижает уровни A1c относительно таких уровней, отмечаемых у индивидуума, не страдающего диабетом. В одном варианте воплощения изобретения введение антитела по изобретению снижает уровни A1c у пациента по абсолютному измерению процентного показателя HbA1c по меньшей мере на 0,5%, 0,7%, 1,0% или 1,5%.

Бета-клетки в островках Лангерганса поджелудочной железы продуцируют и высвобождают инсулин - гормон, который контролирует уровень глюкозы в крови. Существует исходный уровень инсулина, поддерживаемый поджелудочной железой, однако он может быстро реагировать на вспышки уровня глюкозы в крови путем высвобождения запасенного инсулина при одновременной выработке нового инсулина. Время реакции достаточно быстрое. При диабете 1 типа прогрессивная и экстенсивная потеря бета-клеток приводит к пониженным уровням секретируемого инсулина, что, в конце концов, приводит к гипергликемии (аномально высокому уровню глюкозы в крови). При диабете 2 типа бета-клетки первично компенсируют резистентность к инсулину у субъекта путем повышения выработки инсулина, однако с течением времени клетки становятся неспособными вырабатывать достаточно инсулина для поддержа-

ния нормальных уровней глюкозы. Считается, что возникает резистентность указанных тканей к действию инсулина и снижение секреции инсулина, в частности, по причине возникновения нарушения функции бета-клеток. Введение антител или полипептидов, описанных в данном изобретении, которые улучшают усвоение глюкозы и другие симптомы диабета, также полезно для улучшения функции бета-клеток у нуждающегося в этом субъекта. Такое улучшение включает, но не ограничивается, сохранение вариабельности бета-клеток или снижение метаболизма бета-клеток, повышение пролиферации бета-клеток или повышение секреции инсулина. Дополнительные способы и результаты улучшения функции бета-клеток описаны в международной заявке этого же заявителя no. WO 2010/028273.

В определенных вариантах воплощения изобретения лечение положительным модулирующим антителом или частичным агонистическим антителом приводит к улучшению одного, двух, трех или более симптомов диабета или резистентности к инсулину, выбираемых из группы, включающей повышенные уровни триглицеридов в плазме, повышенные уровни неэтерифицированного холестерина в плазме, общий уровень холестерина, повышенный уровень инсулина в плазме (характерный признак резистентности к инсулину), повышенный уровень HOMA-IR, повышенное соотношение ЛПНП/ЛПВП (или высокое соотношение общего холестерина/ЛПВП), улучшенную функцию бета-клеток, а также повышенные уровни лептина в плазме (характерный признак резистентности к лептину). В случаях, когда повышенные уровни являются характерным признаком диабета, резистентность к инсулину или повышенный риск сердечнососудистых осложнений, "улучшение" проявляется в качестве пониженного уровня, и наоборот. В контексте данного изобретения "улучшение" относится к нормализации уровня относительно уровня, отмечаемого у здоровых субъектов.

Несмотря на то, что "нормальные" уровни, определенные в ходе тестирования, варьируют в зависимости от лаборатории, и каждая лаборатория имеет свой собственный диапазон нормы, в целом, нормальные уровни триглицеридов составляют при диабете менее 150 мг/дл (пограничное значение 150-199 мг/дл); нормальные уровни холестерина составляют менее 200 мг/дл, нормальные или установленные значения соотношения ЛПНП/ЛПВП холестерина составляют примерно <3,25 (основываясь на <130 мг/дл установленного значения ЛПНП и >41 нг/дл установленного значения ЛПВП), нормальный или установленный диапазон для уровня инсулина натощак составляет примерно 5-20 мкЕд/м, и нормальный или установленный диапазон лептина (обычно часто его связывают с индексом массы тела (ИМТ) или гиперинсулинемией) составляет 3-25 нг/мл, например 3 нг/мл необходимо для нормальной метаболической функции, а 20-25 нг/мл уже характеризует наличие болезни. В некоторых вариантах воплощения изобретения лечение нормализирует любой один или несколько указанных выше симптомов по меньшей мере на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50% или более.

Поликистоз яичников (ПКЯ) является наиболее частым гинекологическим эндокринным нарушением и встречается примерно у 5-10% женщин детородного возраста. Клинические признаки включают нарушение менструации, ожирение, стерильность и гирсутизм. Резистентность к инсулину при ПКЯ возникает в результате дефекта сигнализации после связывания инсулина. Такому дефекту способствует гиперфосфорилирование INSR и субстрата рецептора инсулина (IRS)-l серина неопределенной киназой(ами). Отмечалось повышение митогенной сигнализации в скелетной мышце женщин с ПКЯ (Corbould et al., Diabetes 55: 751-59, 2006). Агонисты и/или положительные модуляторы связывания инсулина с INSR могут оказаться полезными в лечении и/или снижении вероятности возникновения нарушений и симптомов, относящихся к ПКЯ. Агонисты и/или положительные модуляторы связывания инсулина с INSR, которые не повышают соотношение митогенной и метаболической сигнализации, могут частично использоваться для лечения ПКЯ.

Неалкогольный стеатогепатит (НАСГ) является частью спектра патологий (известных как НАЖБП), варьируя от простого стеатоза (жировой инфильтрации) до НАСГ, включая цирроз и гепатоклеточную карциному (Farrell and barter, Hepatol. 43, S99-112, 2006). Резистентность к инсулину ассоциирована с накоплением жиров в печени, и в настоящее время этот орган считают основным местом поражения у пациентов с резистентностью к инсулину. Считается, что примерно 20% всех взрослых имеет НАЖБП, и 2-3% взрослых имеют НАСГ. До трети пациентов с НАСГ в дальнейшем будет иметь развившийся цирроз. Заболевание печени является важным осложнением при диабете 2 типа.

У индивидуумов с ожирением и дислипидемией отмечается более худший показатель резистентности к инсулину, чем в средней популяции. Ожирение является хроническим заболеванием, которое в высокой степени превалирует и ассоциируется не только с социальной стигмацией, но также с пониженной продолжительностью жизни и многочисленными медицинскими проблемами, включая нежелательное психологическое развитие, дерматологические нарушения, такие как инфекции, варикозное расширение вен, непереносимость физической нагрузки, сахарный диабет, резистентность к инсулину, гипертензию, гиперхолестеринемию и коронарную болезнь сердца (Rissanen et al., British Medical Journal, 301: 835-837, 1990). Ожирение в высокой степени коррелирует с резистентностью к инсулину и диабетом у экспериментальных животных и человека. Ожирение и резистентность к инсулину, которая обычно сопровождается гиперинсулинемией или гипергликемией, или обоими явлениями, являются основными признаками диабета 2 типа. Кроме того, диабет 2 типа ассоциирован с двух-четырехкратным риском заболевания коронарной артерии. Несмотря на то, что на исследование таких серьезных проблем с сердцем были по-

трачены десятилетия, этиология ожирения и резистентности к инсулину остается неизвестной. В тексте данного изобретения описано, что положительные модулирующие антитела и частичные агонистические антитела могут снизить или замедлить увеличение веса, т.е. нормализовать увеличение веса, отмечаемое у животных с диабетом. Предусматривается, что антитела обладают таким же самым эффектом на увеличение веса у пациентов, страдающих ожирением. Также было показано, что введение положительных модулирующих антител может уменьшить или замедлить потерю веса, т.е. нормализовать потерю веса, у животных с диабетом, у которых понижена популяция бета-клеток, что часто приводит к значительной потере веса и слабости.

В некоторых вариантах воплощения изобретения предусматривается, что введение положительных модулирующих антител или частичных агонистических антител, описанных в тексте данного изобретения, может снизить или замедлить увеличение веса у субъекта по меньшей мере на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50% в сравнении с не подвергнутым лечению субъектом.

В альтернативном варианте воплощения изобретения предусматривается, что введение положительных модулирующих антител или частичных агонистических антител, описанных в тексте данного изобретения, может снизить или замедлить потерю веса у индивидуума, такого как пациент-диабетик, или индивидуума, имеющего, по меньшей мере, частичную потерю бета-клеток, по меньшей мере на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50% в сравнении с не подвергнутым лечению субъектом.

В некоторых вариантах воплощения изобретения предусматривается, что введение положительных модулирующих антител или частичных агонистических антител, описанных в тексте данного изобретения, может способствовать или индуцировать потерю веса в сравнении с не подвергнутыми лечению субъектами, например, по меньшей мере на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50% в сравнении с не подвергнутым лечению субъектом.

Ингибиторы протеазы, используемые для лечения пациентов с ВИЧ, ассоциированы с развитием группы метаболических нарушений, включая резистентность к инсулину (Graham, JAIDS 25: S4-S11, 2000). Резистентность к инсулину, обусловленная ингибитором протеазы ВИЧ, может привести к гипергликемии, которая может прогрессировать к диабету и, в конце концов, к угрожающему жизни кетоацидозу. (Carr et al., Lancet 351:1881-1883, 1998). Для некоторых пациентов такие метаболические побочные эффекты существенно ограничивают использование таких поддерживающих жизнь препаратов. Murata et al. (J. Biol. Chem. 275(27):20251-54, 2000) сообщили, что по меньшей мере три из представленных на рынке препаратов-ингибиторов протеазы ВИЧ также ингибируют переносчик глюкозы из локализации в мембране клеток адипоцитов 3T3 L1 с последующим ингибированием усвоения глюкозы такими клетками. Такое ингибирование клеточного переноса глюкозы внутрь клеток такими ингибиторами протеазы ВИЧ соответствует повышению уровней глюкозы и липидов, отмечаемому в клинических показателях некоторых пациентов, подвергнутых лечению такими препаратами ингибиторами протеазы. Таким образом, агонисты и/или положительные модуляторы связывания инсулина с INSR могут использоваться для лечения метаболических побочных эффектов ингибиторов протеазы ВИЧ.

Резистентность к инсулину также представляет собой один из патологических признаков у пациентов с инфекцией вируса гепатита С (HCV) и играет критическую роль в развитии различных осложнений и явлений, ассоциированных с инфекцией HCV (Kawaguchi and Sata, World J. Gastroenterol. 16: 1943-52, 2010). Таким образом, агонисты и/или положительные модуляторы связывания инсулина с INSR могут использоваться для лечения осложнений и явлений, ассоциированных с инфекцией HCV.

Сигнализация INSR также может играть роль в других заболеваниях. Например, было указано, что сигнализация INSR/IGF-1R может играть роль в метаболизме бета-амилоида (Freude et al., Curr. Alzheimer Res. 6(3):213-23, 2009). Было установлено, что активация IR является важнейшим элементом нейропротекции фоторецептора (Rajala et al., J. Biol. Chem. 283(28):19781-92, 2008). Было указано, что инсулиновая сигнализация способствует формированию кости (Rosen and Motyl, Cell 142: 198-200). Было сообщено, что лечение сенсибилизаторами инсулина улучшает функцию легких у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких и сахарным диабетом (Kim et al., Int. J. Tuberc. Lung Dis. 14(3):362-67, 2010).

Было описано несколько пациентов с гомозиготными мутациями гена INSR, которые вызывают синдром Донахью или лепречаунизм. Такое аутосомно-рецессивное заболевание приводит к полной дисфункции рецептора инсулина. Такие пациенты характеризуются низким расположением ушей, часто выпяченными ушами, расширенными ноздрями, утолщенными губами и замедлением роста тяжелой степени. В большинстве случаев внешний вид таких пациентов достаточно плох, и смерть возникает в течение первого года жизни. Другие мутации гена INSR вызывают менее тяжелый синдром Рабсона-Менденхолла, при котором у пациентов отмечаются аномальные зубы, гипертрофические десна и увеличение шишковидного тела. При обоих заболеваниях отмечаются колебания уровня глюкозы: после приема пищи уровень глюкозы изначально очень высокий, а затем быстро падает до аномально низких уровней (Longo et al., Hum. Mol. Genet. 11(12):1465-75, 2002).

Терапевтические показания для антагонистов INSR/отрицательных модуляторов.

INSR также задействован при раке. Несколько эпидемиологических исследований показали, что состояния резистентности к инсулину, характеризующейся гиперинсулинемией, ассоциированы с повы-

шенным риском ряда злокачественных новообразований, включая карциному молочной железы, предстательной железы, толстого кишечника и почек. INSR, в частности, форма INSR-A, гиперэкспрессируется при некоторых злокачественных новообразованиях человека. Формы INSR гибридизируют с IGF-IR, который также обычно гиперэкспрессируется при раке. Гибридные рецепторы, содержащие гемидимеры INSR-A, обладают широкой специфичностью связывания, поскольку они связываются с IGF-I, а также IGF-II и инсулином. Путем связывания с гибридными рецепторами, инсулин может стимулировать специфические пути передачи сигнала IGF-IR. Таким образом, антагонисты и/или отрицательные модуляторы связывания инсулина с INSR и/или с гибридными рецепторами INSR/IGF-1R могут использоваться в качестве новейшей противораковой терапии (Belfiore Current Pharm. Design 13 (7):671-686, 2007). Сообщалось, что INSR играет важную роль при вирус-индуцированном образовании опухоли саркомы Капоши (Rose et al., Onogene 26: 1995-2005, 2007).

Гиперинсулинемия представляет собой состояние, определяемое по аномально высоким уровням инсулина в крови. Причины гиперинсулинемии включают инсулиному и резистентность к инсулину, которые могут быть вызваны врожденной гиперинсулинемией или другими состояниями, такими как недостаточная активность, ожирение, синдром поликистоза яичников или передозировка инсулина. Инсулинома представляет собой опухоль поджелудочной железы, которая вырабатывает избыточные количества инсулина. Высокие уровни инсулина вызывают гипогликемию, или низкий уровень глюкозы (сахара) в крови. Гиперинсулинемия является наиболее частой причиной неонатальной гипогликемии в течение первых нескольких часов жизни. Лечение такого состояния часто может оказаться необходимым для предотвращения развития паралича и неврологических последствий.

Передозировка инсулина может быть вызвана, например, следующим: введение слишком большого количества инсулина; введение правильного количества инсулина, но неправильного типа, например, инсулина кратковременного действия вместо инсулина длительного действия; введение инсулина без последующего принятия пищи; или путем преднамеренного введения избыточного количества инсулина.

В целом, гипогликемия может быть легкой степени и привести к симптомам, таким как беспокойство и голод, однако у пациентов также существует риск развития тяжелой гипогликемии, которая может вызвать припадки, кому и даже смерть. Типичные симптомы, связанные с гипогликемией и на которые жалуются пациенты, включают утомляемость, слабость, дрожь и голод. Для предотвращения симптомов по причине низкого уровня сахара в крови, большинство пациентов часто принимают пищу. У некоторых пациентов по причине низкого уровня сахара в крови могут развиться психиатрические симптомы.

В настоящее время пациенты с инсулиномами или другими тяжелыми формами гиперинсулинемии подвергаются лечению хирургическим образом, таким как частичное иссечение поджелудочной железы, или путем введения препаратов, таких как диазоксид или соматостатин, которые в некоторых случаях снижают выработку инсулина. В некоторых случаях необходимы непрерывные инфузии глюкозы. Несмотря на то, что были описаны пептидные антагонисты INSR (Schaffer et al., BBRC 376: 380-383, 2008), лечение, снижающее эффекты циркулирующего инсулина, отсутствует. Антагонисты и/или отрицательные модуляторы связывания инсулина с INSR могут использоваться для стабилизации пациентов с инсулиномами перед проведением операции или как часть плана лечения. Антагонисты и/или отрицательные модуляторы также полезны для лечения саркомы Капоши.

Кроме того, у достаточно большого числа пациентов (25000-100000) в США, подвергнутым диализу, присутствует гипогликемия по причине почечной недостаточности (хронического заболевания почек, хронической почечной недостаточности, хронической болезни почек, хронической недостаточности почек, установленного хронического заболевания почек), и для таких пациентов лечение антагонистами или отрицательными модуляторами INSR, описанными в тексте данного изобретения, может оказаться полезным.

Антагонисты и/или отрицательные модуляторы связывания инсулина с INSR могут использоваться для лечения и/или снижения вероятности возникновения расстройств и симптомов, относящихся к гиперинсулинемии у субъекта, таких как снижение беспокойства, аномального голода, аномальной утомляемости, переедания, психиатрических симптомов, связанных с низким уровнем сахара в крови, и/или гипогликемии (включая приступ, вызванный гипогликемией, кому и смерть). Антагонисты и/или отрицательные модуляторы связывания инсулина с INSR могут использоваться для лечения различных типов существующих состояний гиперинсулинемии, таких как незидиобластоз (диффузное заболевание KATP-H1, фокальное заболевание KATP-H1 или "PHHI"), GDH-H1 (синдром гиперинсулинизма/гипераммониемии (HI/HA), лейцин-чувствительная гипогликемия или диазоксид-чувствительная гипогликемия), синдром дисрегуляции островковых клеток, идиопатическая гипогликемия у младенцев, персистирующая гиперинсулинемическая гипогликемия младенцев (PHHI) и врожденный гиперинсулинизм, инсулинома, передозировка инсулина, гипогликемия, вызванная почечной недостаточностью (острой или хронической) и хроническое заболевание почек, например, типа III, IV или V.

Диагностические показания для агонистов INSR/положительных модуляторов.

Антитела, специфические к рецептору инсулина, использовали в качестве инструментов для диагностики диабета. Патент США № 7732154 описывает поликлональные антитела к субъединице А рецептора инсулина (IR-A) для диагностики диабета, и сообщает, что повышенные уровни несвязанного IR-A

были выявлены в сыворотке пациентов, страдающих диабетом и раком. Антитела к INSR, описанные в тексте данного изобретения, используются для измерения рецептора инсулина, например, водорастворимого рецептора А инсулина, или уровней инсулина в образце пациента для определения, являются ли уровни INSR или инсулина индикаторными факторами диабета или резистентности к инсулину у пациента. Субъект с измененными уровнями инсулина или рецептора инсулина в сравнении с приемлемыми уровнями нормы таких факторов у здорового индивидуума может находиться под риском развития диабета или резистентности к инсулину. Антитела к INSR, описанные в тексте данного изобретения, также используются для измерения рецептора инсулина, например, водорастворимого рецептора А инсулина, или уровней инсулина в образце пациента для определения, являются ли уровни INSR или инсулина индикаторными факторами рака у пациента. Субъект с измененными уровнями инсулина или рецептора инсулина в сравнении с приемлемыми уровнями нормы таких факторов у здорового индивидуума может находиться под риском развития рака.

В одном варианте воплощения изобретение описывает способ диагностирования резистентности к инсулину или чувствительности к инсулину с использованием любых описанных здесь антител. В одном варианте воплощения изобретения способ включает измерение уровней инсулина или рецептора инсулина, например, водорастворимого рецептора А к инсулину, в образце, взятом у субъекта, с использованием описанного здесь антитела, при этом измененный уровень инсулина или рецептора инсулина указывает на наличие у субъекта диабета или резистентности к инсулину, или риска развития диабета, резистентности к инсулину, чувствительности к инсулину или рака, и, в некоторых случаях, включает введение лекарственного средства для лечения диабета указанному субъекту с наличием или риском развития диабета, резистентности к инсулину, чувствительности к инсулину или рака. В определенных вариантах воплощения изобретения образец представлен биологическим образцом. В некоторых вариантах воплощения изобретения биологический образец выбирают из группы, состоящей из крови, сыворотки, плазмы, мочи, выделений из сосков, цереброспинальной жидкости и биопсии опухоли. Способы измерения рецептора инсулина в образце включают, но не ограничиваются, иммуноанализы, анализы конкурентного связывания, анализы иммунопреципитации, а также другие описанные здесь анализы.

Анализы, используемые для измерения эффектов введения модулятора.

Эффекты введения положительных или отрицательных модулирующих антител субъектам измеряют в условиях in vivo и in vitro. В одном варианте воплощения изобретения предусматривается, что антитела, положительно модулирующие активность инсулина/рецептора инсулина, снижают в условиях in vivo уровни HbA1c, холестерина, ЛПНП, триглицеридов или неэтерифицированных жирных кислот, а также ЛПВП у субъекта. Такие факторы измеряют с использованием способов, известных специалисту в данной области.

Субъекты, принимающие положительное модулирующее антитело, также могут характеризоваться снижением веса или снижением набора веса, пониженной частотой или показателем гипогликемии или явлений гипергликемии и улучшением следующих показателей: соотношение ЛПВП/ЛПНП, секреция инсулина, гликемический контроль (измерено в ходе пробы переносимости глюкозы (ППГ)), чувствительность к инсулину (измерено по пробе на переносимость инсулина (ППИ)), функция бета-клеток (измерено, например, по массе клеток, секреции инсулина, уровням С-белка), состояние покоя бета-клеток, дислипидемия.

Улучшенная резистентность к инсулину измеряется по нормализированной экспрессии любого из следующих генов в печени, жировой ткани и/или мышцах: Pck1 (PEPCK), G6pc (G6Pase), Srebf1 (SREBP-1), Gck (GK), Ppargc1a (PGC-1), Abca1 (ABC-1), Acaca (ацетил-КоА карбоксилаза), ИЛ1b (ИЛ-1бета), ИЛ6 (ИЛ-6), Tnf (ФНО-альфа), Cc12 (MCP-1), Slc2a4 (GLUT4), ИЛ-1rn (ИЛ-1ra), CD68, SAA1, SAA2, FAS (синтаза жирных кислот), Emr1 (F4/80), Irs1, Irs2. Все вышеперечисленное измеряют с использованием хорошо известных в науке способов.

Анализы in vitro также используют для измерения эффектов введения модулятора активности инсулина/рецептора инсулина. Ожидается, что положительные модулирующие антитела приведут к повышению транслокации GLUT4 относительно клеточной поверхности. Способы измерения транслокации GLUT4 от внутриклеточного положения к плазматической мембране описаны, например, в патентах США № 6632924, US 2007/0141635, US 2003/0104490 и Liu et al., Biochem. J. 418(2), 413-20 (2009). Эффекты положительных модуляторов также могут быть оценены путем анализа повышенного усвоения глюкозы печенью, жировыми и/или мышечными клетками, усиленному снижению количества глюкозы в печени, питательной среде жировых и/или мышечных клеток, а также путем измерения соотношения метаболической к митогенной сигнализации INSR (повышенной или неизменной), активации pAKT и активации pIRS-1. Также измеряют относительный наклон кривой Хилла взаимодействия инсулин/INSR. Однако некоторые кривые доза-ответ более крутые или пологие, чем стандартные кривые. Крутизна количественно оценивается по наклону кривой Хилла, также называемого угловым коэффициентом. Кривая доза-ответ со стандартным уклоном имеет уклон Хилла, равный 1,0. Более крутая кривая имеет больший угловой коэффициент, а более пологая кривая имеет меньший угловой коэффициент. Типичные анализы для анализа таких факторов описаны в примерах.

Использование антител к INSR в качестве агентов для доставки препаратов.

Антитело к INSR 83-14 было гуманизировано в целях создания "молекулярного троянского коня" для доставки белка и невирусной генной терапии для проникновения через гематоэнцефалический барьер. Связывание 83-14 приводит к быстрой интернализации INSR. Таким образом, дополнительные антитела с таким свойством или улучшенными свойствами могут использоваться для доставки препаратов к мозгу и центральной нервной системе (Boado et al., Biotech and BioEng. 96(2):381-391; WO 04/050016).

Наборы.

В качестве дополнительного аспекта, изобретение включает наборы, которые состоят из одного или нескольких соединений или композиций, упакованных таким образом, чтобы облегчить их применение при практическом использовании способов по изобретению. В одном варианте воплощения изобретения такой набор включает описанное здесь соединение или композицию (например, композицию, включающую антитело к рецептору инсулина или антитело, специфическое к комплексу инсулин/рецептор инсулина, или такое антитело в комбинации с другим агентом), упакованные в контейнер, такой как герметичный флакон или сосуд, с этикеткой, прикрепленной к контейнеру или вложенной в упаковку, на которой описано применение соединения или композиции для практического использования способа.

Преимущественно, соединение или композиция упакованы в виде дозированной лекарственной формы. Набор может дополнительно включать устройство, подходящее для введения композиции в соответствии со специфическим путем введения или для использования в анализе-скрининге. Преимущественно, набор включает этикетку, которая описывает использование композиции антитела.

Дополнительные аспекты и детали изобретения станут очевидны из следующих примеров, которые являются только иллюстративными, а не ограничивающими.

Примеры

Пример 1.

Выделение антител к INSR из библиотек фаговых дисплеев антител.

(1) Пэннинг фагов и восстановление.

А. Библиотеки фаговых дисплеев нативных антител.

Рецептор инсулина человека (hINSR) (R&D Systems, MN) был биотинилирован с Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce, Rockford, IL) с использованием протокола производителя и 16-кратным молярным избытком реагента биотина. Биотинилирование hINSR было подтверждено поверхностным плазмонным резонансом (SPR).

Для первого этапа пэннинга фагов $1,6\times10^{11}$ КОЕ фаговых частиц из библиотеки фаговых дисплеев scFv (BioInvent, Lund, Sweden) было блокировано в течение 1 ч при комнатной температуре (КТ) в 1 мл 5% молоко/ФСБ (Teknova, Hollister, CA) при осторожном перемешивании. Блокированный фаг был дважды подвергнут повторной селекции в течение 30 мин относительно покрытых стрептавидином магнитных гранул Dynabeads® M-280 (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway). Для образования комплекса биотин/hINSR/hINS, 100 пмоль биотинилированного hINSR было предварительно инкубировано с избытком (2100 пмоль) инсулина человека (hINS) (Sigma, MO), растворенного в 5% молоко/ФСБ в течение 1 ч при КТ и осторожном перемешивании. Для второго этапа пэннинга 50 пмоль биотина/hINSR использовали с 1050 пмоль hINS. Для финального этапа пэннинга 25 пмоль биотина/hINSR использовали с 525 пмоль hINS.

Раствор биотин/hINSR/hINS был инкубирован с блокированными и покрытыми стрептавидином магнитными гранулами Dynabeads® M-280 (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway) в течение 30 мин при осторожном перемешивании для иммобилизации комплекса биотин-hINSR-hINS. Отсеянный фаг был инкубирован с гранулами со стрептавидином/биотин/hINSR/hINS в течение 2 ч при КТ. Для насыщения hINSR с использованием hINS в раствор было добавлено hINS (2100 пмоль). Гранулы были промыты. В ходе первого этапа пэннинга гранулы были быстро промыты (т.е. гранулы были удалены из раствора с использованием магнита и ресуспендированы в 1 мл промывочного буфера) трижды с использованием ФСБ/0,1% ТВИН, затем трижды с использованием ФСБ. В ходе второго этапа пэннинга гранулы были быстро промыты пять раз с использованием ФСБ/0,1% ТВИН, затем было одно 5-минутное промывание (в 1 мл промывочного буфера при комнатной температуре и осторожном перемешивании) с использованием ФСБ/0,1% ТВИН, и затем пять раз с использованием ФСБ, затем одним 5-минутным промыванием в ФСБ. В течение третьего этапа пэннинга гранулы были быстро промыты четыре раза ФСБ/0,1% ТВИН, затем два раза промыты в течение 5 мин ФСБ/0,1% ТВИН, и затем быстрое четырехкратное промывание ФСБ, затем два 5-минутных промывания ФСБ.

Фаг, связанный с hINSR/hINS, был элюирован 100 мМ триэтиламином (TEA) (30 мин инкубирования при КТ), который затем был нейтрализован 1 М Tris-HCl (pH 7,4). Элюированный фаг использовали для инфицирования бактериальных клеток TG1 (Stratagene, CA), и в ходе реакции OD_{600} составило ~0,5. После инфекции в течение 30 мин при 37°C без перемешивания, а также в течение 30 мин при 37°C с перемешиванием при скорости 90 об/мин, клетки были пеллетированы и ресуспендированы в среде 2YT, дополненной 100 мкг/мл ампициллина и 2% глюкозы. Ресуспендированные клетки были высеяны на чашки с агаром и 2YT, а также с 100 мкг/мл карбенициллина 2% глюкозы, с последующей инкубацией в течение ночи при 30°C.

Затем фаг был восстановлен с использованием фага-хелпера VCSM13 (New England Biolabs, MA)

при кратности инфицирования (MOI) ~10. После инфекции фагом-хелпером при OD_{600} 0,6 и 37°C в течение 30 мин без вращения и инкубации в течение 30 мин при 37°C при скорости вращения 150 об/мин, пеллеты клеток были ресуспендированы в среде 2YT, дополненной 100 мкг/мл ампициллина и 50 мкг/мл канамицина, и им дали выстоять в течение ночи при 30°C. Фаг в супернатанте был восстановлен после тщательного центрифугирования, и его использовали для следующего этапа пэннинга. Для мониторинга обогащения после селекции фага, количества введенного и полученного фага было титровано в ходе трех этапов пэннинга.

Исключение гена III и получение периплазматических экстрактов бактерий.

Перед скринингом фага, полученного в ходе пэннинга клонов scFv для связывания комплекса hINSR/hINS, ген III был впервые исключен из фагемидных векторов для возможности секреции scFv. Для этого плазмидный набор мидипреп (Qiagen, Valencia, CA) пула клонов, полученного в ходе третьего этапа пэннинга, был расщеплен рестриктазой EagI (New England Biolabs, MA). Продукт расщепления без гена III был подвергнут аутолигированию с T4 ДНК-лигазой (New England Biolabs, MA), и его использовали для трансформации химически-компетентных клеток TOP10 E.coli (Invitrogen, Carlsbad, CA). Индивидуальные трансформированные колонии в 96-луночных планшетах использовали для получения бактериальных периплазматических экстрактов в соответствии со стандартными способами при объемном соотношении ледяного раствора PPB (Teknova, Hollister, CA) и дистиллята двойной перегонки (ddH2O) 1:3, а также с использованием двух таблеток коктейля ингибиторов протеазы (Roche, IN). Супернатант лизата был проанализирован способом ИФА, как это описано ниже.

B. Библиотеки иммунизированных фаговых дисплеев антител.

Библиотека фаговых дисплеев Omniclonal™ была получена у мышей, гипериммунизированных комплексом hINSR/hINS в соответствии со способами, описанными в патенте США № 6057098. Материал для иммунизации состоял из примерно равных молярных количеств рекомбинантного инсулина человека (номер по каталогу 19278, Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, MO) и рекомбинантного INSR человека (28-956) (номер по каталогу 1544-IR/CF, R&D Systems, MN). Концентрация белка в комплексе составила примерно 0,24 мг/мл. Отдельные колонии, полученные из библиотеки Omniclonal™ согласно протоколу из патента США № 6057098, были подвергнуты скринингу на предмет активности связывания в ходе ИФА, как это описано ниже.

(2) Скрининг клонов антитела на комплексе hINSR/hINS путем ИФА.

Чашки ELISA Maxisorp® (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY) были выдержаны в течение ночи при 4°C с 3 мкг/мл hINSR в ФСБ. Затем чашки были блокированы в течение 1 ч при КТ с 400 мкл/лунка 5% молоко/ФСБ. Для получения лунок, содержащих комплекс hINSR-hINS, 50 мкл/лунка hINS (2,1 мкМ) дали связаться с hINSR в течение 30 мин при КТ. Бактериальные периплазматические экстракты также были блокированы 5% молоко/ФСБ в течение 1 ч и затем добавлены к покрытым чашкам для ИФА (50 мкл/лунка), затем дали связаться с hINSR или комплексом hINSR/hINS на чашке для ИФА в течение 2 ч при КТ. Мышиное моноклональное антитело 83-7 к hINSR использовали в качестве положительного контроля скрининга при ИФА (Soos et al., Biochem. J. 235: 199-208, 1986). Связанные фрагменты scFv были определены с мышиным моноклональным антителом к c-myc (Roche, IN) в течение 1 ч при КТ с последующим использованием антисыворотки козы с конъюгироаннымми антителами к HRP мыши (Thermo Scientific, Rockford, IL). После каждого этапа скринингов ИФА проводили трехкратное промывание ФСБ/0,1% ТВИН-20 (Teknova, Hollister, CA). Положительный контроль MAT 83-7 был определен по антителу козы к HRP мыши (Thermo Scientific, Rockford, IL) после инкубации в течение 1 ч при КТ. Цвет проявлялся при поглощении при 450 нм с 50 мкл/лунка растворимого субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (TMB) (EMD chemicals, Calbiochem, NJ) и прекращался при 1 M H_2SO_4 (50 мкл/лунка).

Результаты.

Скрининг ИФА бактериальных периплазматических экстрактов позволил идентифицировать множественные связующиеся агенты с hINSR или комплексом hINSR/hINS, которые были получены в ходе селекции фага способом пэннинга. 58% (868 из 1488) клонов, выбранных из нативной библиотеки, были способны связываться с hINSR или комплексом hINSR/hINS. 43% (200 из 465) клонов, выбранных из иммунизированной библиотеки, были способны связываться с hINSR или комплексом hINSR/hINS.

Периплазматические экстракты из выбранных клонов также были проанализированы способом FACS (см. пример 2). Выбранные клоны были реформированы в виде антител IgG1 или IgG2. Вариабельные тяжелые (VH) и легкие (VL) цепи выбранных фрагментов scFv были подвергнуты ПЦР-амплификации, клонированы в векторы плазмид, содержащие константные гены антител, и трансфицированы в клетки человека 293E EBNA с использованием стандартных способов.

Пример 2.

Экран оккупации рецепторов для определения связывания антитела с INSR в присутствии или отсутствии инсулина человека.

Данный пример описывает использование анализов на основе проточной цитометрии (FACS) для измерения дифференциального связывания антитела с клетками в присутствии или отсутствии инсулина человека (hINS). Антитела к рецептору инсулина (INSR) из библиотек фаговых дисплеев были подверг-

нуты скринингу в анализах для идентификации модуляторов связывания INS-INSR.

Клетки IM-9 были получены из Американской коллекции типовых культур (ATCC) и содержались в RPMI 1640+10% ФБС. Перед использованием в анализах, клетки были промыты в не содержащей сыворотку RPMI 1640, подсчитаны, и их концентрация была приведена к 2×10^6 клеток/мл в RPMI 1640+0,5% БСА (Sigma-Aldrich). Клетки были культивированы в течение ночи в данной среде, и поэтому были обозначены как "бессывороточные". Такие клетки были промыты один раз и ресуспендированы при концентрации 2×10^6 клеток/мл в ФСБ, содержащем 0,5% БСА и 0,01% натрия азида (буфер FACS).

Клетки, подвергнутые действию инсулина, были ресуспендированы в буфере FACS, в который было добавлено 70 нМ инсулина человека (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Обе популяции клеток (+hINS) или (-hINS) были инкубированы при 4°C в течение 30 мин, промыты один раз буфером FACS и ресуспендированы при концентрации 2×10^6 клеток/мл в буфере FACS. Аликвоты клеток по 25 мкл были распределены по 96-луночным планшетам, смешаны с 25 мкл антитела или PPE и инкубированы на льду в течение 1 ч.

Затем клетки были промыты 1 раз в буфере FACS, и связывание антитела было определено по добавлению 25 мкл соответствующего конъюгированного с фторохромом вторичного антитела. Если первичная инкубация проводилась с PPE, содержащим антитело с тэгом myc, 25 мкл при разведении 1/1000 антитела к c-myc (Roche) было добавлено в лунки, и клетки инкубировали на льду в течение 30 мин. Затем клетки были промыты один раз в буфере FACS, и связывание антитела к c-myc было определено по добавлению антитела к IgG мыши, конъюгированного с фикоэритрином. После финальной инкубации в течение 15 мин на льду, клетки были промыты, и гранулы ресуспендированы в буфере FACS. Клетки были проанализированы с использованием FACSCAN™ (Becton-Dickinson, Milipitas, CA), и данные были проанализированы с использованием FLOWJO™ (Treestar, Ashland, OR) и Microsoft Excel™.

Такой анализ позволил определить четыре типа антитела, примеры которых представлены на фиг. 1.

1. Антитела, которые связываются только с клетками IM-9, если они были подвергнуты воздействию инсулином человека (связывание только с комплексом INS/INSR).

2. Антитела, которые лучше связываются с клетками IM-9, если они были подвергнуты воздействию инсулином человека (связывание преимущественно с комплексом INS/INSR).

3. Антитела, которые связываются с клетками IM-9 хуже, если они были подвергнуты воздействию инсулином человека (связывание преимущественно с не включенным в комплекс INSR).

Антитела были обозначены как прогнозируемые положительные модуляторы, если соотношение антитела, связанного с комплексом INS/INSR, и антитела, связанного с не включенным в комплекс INSR, было более чем 1,3. Антитела были обозначены как прогнозируемые отрицательные модуляторы, если соотношение антитела, связанного с комплексом INS/INSR, и антитела, связанного с не включенным в комплекс INSR, было менее чем 0,6. Антитела были обозначены как прогнозируемые немодуляторы, если соотношение антитела, связанного с комплексом INS/INSR, и антитела, связанного с не включенным в комплекс INSR, было менее чем 1,1.

Пример 3.

Скрининг биотинилированного лиганда для определения эффектов антител к INSR на связывание инсулина с INSR.

Данный пример описывает использование анализов на основе FACS для измерения дифференциального связывания лиганда (инсулина человека) с клетками в присутствии или отсутствии антител к INSR. Антитела к INSR из библиотек фаговых дисплеев были подвергнуты скринингу в анализах для идентификации модуляторов связывания комплекса INS/INSR.

Клетки IM9 были получены из Американской коллекции типовых культур (ATCC) и содержались в RPMI 1640+10% ФБС. Перед использованием в анализах, клетки были промыты в не содержащей сыворотку RPMI 1640, подсчитаны, и их концентрация была приведена к 2×10^6 клеток/мл в RPMI 1640+0,5% БСА (Sigma-Aldrich). Клетки были культивированы в течение ночи в данной среде, и поэтому были обозначены как "бессывороточные". Такие клетки были промыты один раз и ресуспендированы при концентрации 2×10^6 клеток/мл в ФСБ, содержащем 0,5% БСА (буфер связывания).

Клетки, не содержащие сыворотку, были предварительно подвергнуты воздействию антител к INSR при комнатной температуре в течение 15 мин, а затем инкубированы с различными концентрациями биотинилированного инсулина человека, приобретенного у R&D Systems, в течение дополнительных 30 мин при комнатной температуре. Связывание биотинилированного инсулина было выявлено путем добавления 1/100 разведения стрептавидина-фикоэритрина к данной смеси в течение дополнительных 15 мин при комнатной температуре. Затем клетки были промыты один раз буфером связывания и ресуспендированы в равных объемах в ФСБ, содержащем 0,5% БСА, 0,1% натрия азида и 2% параформальдегида. Клетки были проанализированы с использованием FACSCAN™ (Becton-Dickinson, Milipitas, CA), и данные были проанализированы с использованием FLOWJO™ (Treestar, Ashland, OR) и Microsoft Excel™.

Фиг. 2 отображает связывание биотинилированного инсулина с клетками IM9 в присутствии или отсутствии антител к INSR при различных концентрациях инсулина. Антитело 83-7 усиливало связывание биотинилированного инсулина; антитело MA-20 снижало связывание биотинилированного инсули-

на; контрольный мышиный IgG не обладал каким-либо эффектом на связывание биотинилированного инсулина.

Пример 4.

Анализ для определения способности антител к INSR стимулировать фосфорилирование pIRS-1.

Субстратные белки, которые подвергаются фосфорилированию INSR, включают белок, обозначаемый субстратом инсулинового рецептора-1 (IRS-1). Фосфорилирование IRS-1 для образования pIRS-1, в конце концов, приводит к повышению количества молекул высокоаффинного переносчика глюкозы (Glut4) на внешней мембране реагирующих на инсулин тканей, и, следовательно, к повышению захвата глюкозы из крови в эти ткани. Анализ pIRS-1 был разработан с использованием технологической платформы Luminex® (Luminex Corp., Austin, TX). Было разработано два вида анализа (а) титрация исследуемого антитела при фиксированной концентрации инсулина; и (б) титрация инсулина при фиксированной концентрации антитела. Антитела к INSR, выбранные на основе их дифференциального связывания с включенным и не включенным в комплекс INSR, были тестированы в ходе анализов для идентификации модуляторов сигнального комплекса INS/INSR.

Обработка клеток и лизис клеток.

Клетки IM-9 были бессывороточными и были подвергнуты обработке в течение 16-20 ч путем подсчета, центрифугирования, промывания один раз в ФСБ и ресуспендирования при концентрации примерно 2×10^6 клеток/мл в RPMI +0,5% Sigma Conn V БСА (10% маточный раствор в RPMI, стерилизация фильтрацией, хранение при 4°C).

Растворы инсулина с двукратной концентрацией (Sigma I-9278 (10 мг/мл) 1,77 мМ жидкий маточный раствор, хранение при 4°C) были приготовлены в RPMI +0,5% БСА. Стандартная титрация инсулина может включать 4-кратные серийные разведения, например 6,25, 1,56, 0,39, 0,097, 0,024, 0,006, 0,0015, 0 нМ.

Буфер для сигнальных клеток Milliplex MAP Cell Signaling Buffer и набор для определения (Millipore, номер по каталогу 48-602) и Phospho-IRS-1 MAP Mates (Millipore, номер по каталогу 46-627) использовали для определения уровней pIRS-1 в соответствии с инструкциями производителя.

Краткое описание: были подготовлены планшеты с V-образными лунками, содержащими 50 мкл/лунка 2X среды для обработки (RPMI с содержанием 0,5% БСА +/- исследуемого антитела), и в каждую лунку было добавлено 1×10^6 клеток IM-9, не содержащих сыворотку и ресуспендированных в 50 мкл RPMI+0,5% БСА. Предварительная обработка антителом проводилась в течение 15 мин до обработки инсулином, в виде: (а) общей смеси антитело/клетки при одной концентрации антитела, и такая смесь в дальнейшем вводилась в лунки, содержащие серийные разведения инсулина; или (б) путем добавления клеток непосредственно в лунки, содержащие серийные разведения антитела, и внесением инсулина при концентрации 0,1 нМ. Чашки были помещены в инкубатор при 37°C и центрифугированы при скорости 1500 об/мин при КТ в течение последних 3 мин обработки (общее время 15 мин). Супернатант был удален путем инверсии и осторожном блоттинге, а клеточные гранулы были обработаны и лизированы путем трехкратной титрации с использованием многоканальной пипетки с 100 мкл буфера для лизиса, приготовленного в соответствии с табл. 4 ниже (лабильные компоненты, т.е. ингибиторы протеазы и бензоназы, были добавлены непосредственно перед использованием). Чашки были помещены на мешалку при КТ в течение 30 мин и центрифугированы при 3000 об/мин в течение 10 мин для очистки лизата и удаления любых пузырьков воздуха, которые могли возникнуть во время титрации. 50 мкл очищенного лизата было удалено и разведено в соотношении 1:1 в 50 мкл буфера для анализа-1 (АВ-1) из набора Detection Kit, подвергнуто титрации 2-3 раза для перемешивания, и 50 мкл было загружено на мембрану фильтровальной пластины сверху разведенных гранул в количестве 25 мкл/лунка (см. ниже).

Таблица 4

Компоненты буфера для лизиса

Буфер лизиса	10 лунок 1 мл	20 лунок 2 мл	25 лунок 2,5 мл	30 лунок 3 мл	40 лунок 4 мл	50 лунок 5 мл	60 лунок 6 мл	100 лунок 10 мл
Буфер для лизиса (Millipore номер по каталогу 43-040)	1	2	2.5	3	4	5	6	10
SDS 20% маточный раствор	0,045	0,09	0,1125	0,135	0,18	0,225	0,27	0,45
MgCl 50 мМ (Invitrogen номер по каталогу Y02016)	0,02	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1	0,12	0,2
Ингибиторы протеазы (50X) (Millipore номер по каталогу 20-201)	0,02	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1	0,12	0,2
Бензоназа EMD 1.01697.0002 при 250 мкг/мл	0,004	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02	0,024	0,04

Мембраны фильтровальной пластины (Millipore номер по каталогу MABVN1250) были предварительно смочены АВ-1 25 мкл/лунка. Буфер для предварительного смачивания был аспирирован из фильтровальной пластины с использованием вакуумного коллектора Millipore, при этом соблюдали осторожность, чтобы не высушить мембраны, а любая оставшаяся жидкость была пропущена через нижнюю часть фильтровальной пластины. 25 мкл суспензии гранул 1X было добавлено в каждую лунку (гранулы pIRS-1 (Millipore номер по каталогу 46-627) были предварительно приготовлены путем разведения из концентрата 20X в буфер АВ-1, или перемешиванием и обработкой ультразвуком 3 раза в течение 5 с каждый).

Лунки с фильтровальной пластиной были покрыты приспособлением для заклеивания планшетов, потом покрыты алюминиевой фольгой для предотвращения воздействия света и инкубированы на планшетном шейкере (настройка 7-8 на планшетном шейкере Labline, Bellco или подобной модели) при КТ в течение 2 ч или при 4°С в течение всей ночи.

Определение с помощью Luminex.

Чашки с фильтром были аспирированы, и из них было удалено дно. Гранулы, оставшиеся в лунках, были промыты 100 мкл АВ-1 и помещены на мешалку на 1-2 мин. Чашки были аспирированы, затем был повторен этап промывания.

В каждую лунку было добавлено 25 мкл 1X биотинилированного антитела для определения, разведенного из 20X маточного раствора с буфером АВ-1, и чашки были инкубированы на мешалке при КТ в течение 1 ч. Чашки были аспирированы, и из них было удалено дно. В каждую лунку было добавлено 25 мкл 1X стрептавидина-фикоэритрина, разведенного из 25X маточного раствора с буфером АВ-1, и чашки были инкубированы на мешалке при КТ в течение 15 мин. 25 мкл буфера для амплификации (Millipore номер по каталогу 48-602) было добавлено в каждую лунку, и чашки были инкубированы на мешалке при КТ в течение дополнительных 15 мин. Чашки были аспирированы, и гранулы были ресуспендированы в 150 мкл АВ-1 и проанализированы на приборе Luminex®.

Результаты.

Фиг. 3 отображает результаты анализа pIRS-1, полученные после титрации инсулина в присутствии фиксированных концентраций репрезентативных исследуемых антител. MFI были нормализированы таким образом, что максимум соответствия кривой был приведен до 100%. Некоторые антитела (положительные модуляторы) смещали кривую титрации инсулина влево. Другие антитела (отрицательные модуляторы) смещали кривую титрации инсулина вправо. Отмечались различные амплитуды модуляции. Данные на фиг. 3 отображают антитела, приводящие до 9-кратного увеличения или до 24-кратного снижения чувствительности к инсулину.

Фиг. 4 отображает репрезентативные примеры различных функциональных классов антитела на основе данных анализа pIRS-1. В каждом случае показаны результаты двух способов анализа (i) титрация инсулина при фиксированной концентрации антитела; и (ii) титрация исследуемого антитела при фиксированной концентрации инсулина.

Фиг. 5 представляет собой таблицу, отображающую значения EC_{50} инсулина, полученные в ходе анализа pIRS-1 в присутствии или отсутствии фиксированных концентраций различных исследуемых антител. Результаты ранжируют в соответствии с соотношением EC_{50} +Ab/-Ab.

Пример 5.

Измерение эффектов антител к INSR на фосфорилирование AKT и MAPK, индуцированное INSR.

INSR представляет собой тирозинкиназу, которая подвергается аутофосфорилированию после связывания инсулина, и впоследствии катализирует фосфорилирование внутриклеточных белков, таких как семейство белков субстрата рецептора к инсулину (IRS), Shc и Gab1. Каждый из таких белков служит в качестве места соединения для задействования молекул нисходящей передачи сигнала, что приводит к

активации различных путей передачи сигнала, включая пути PI(3)K/AKT и MAP киназа (MAPK). Такие пути координируют для регуляции роста клеток и их дифференциации, генной экспрессии, синтеза гликогена, белка и липидов, а также метаболизма глюкозы.

Эффекты исследуемого антитела на сигнализацию посредством комплекса INS/INSR могут измеряться путем оценки способности антитела усиливать индуцируемое инсулином фосфорилирование серина или тирозина специфических внутриклеточных белков, таких как AKT и MAPK (ERK1/2), которые являются специфическими относительно сигнального пути INSR. Фосфорилирование таких белков может быть измерено и количественно определено с использованием электрохемилюминесценции, вестерн-блоттинга, ИФА и других известных в науке способов.

В данном примере анализа использовали клетки CHOK1, полученные рекомбинантным образом для экспрессии INSR человека или мыши. Такие клетки содержали в питательной среде, содержащей бессывороточную среду EX-CELL 302 для клеток CHO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 2 мМ L-глутамина и 0,4 мг/мл генетицина® (Invitrogen, Carlsbad, CA). Парентеральные клетки CHOK1 использовали в качестве контроля и содержали в питательной среде без генетицина®.

За один день до анализа клетки были промыты ФСБ, ресуспендированы в количестве 1×10^6 клеток/мл в обедненной среде, содержащей RPMI 1640 (Invitrogen), 2 мМ L-глутамин, 0,4 мг/мл ГЕНЕТИЦИН® и 0,5% БСА, и инкубированы в течение 16-20 ч при 37°C в инкубаторе с 5% CO_2. Парентеральные клетки CHOK1 инкубировали в обедненной среде без генетицина®. На следующий день клетки были ресуспендированы в ФСБ с 0,5% БСА и 1×10^5 клеток были добавлены в лунки 96-луночного планшета. Исследуемое антитело было добавлено в концентрациях 0, 1 или 10 мкг/мл примерно за 10 мин до добавления инсулина. После инкубации в течение 5-60 мин при 37°C, в инкубаторе с 5% CO_2, подвергнутые обработке клетки были центрифугированы и лизированы в буфере, содержащем 20 мМ Трис-HCl (pH 7,5), 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 1% Тритон X-100, 10 мМ NaF, коктейль ингибитора фосфотазы 1 и 2 (Sigma-Aldrich), и полный ингибитор мини-протеазы (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN) в течение 1 ч с перемешиванием при 4°C. Лизаты были очищены путем центрифугирования при 485×g в течение 3 мин. Для количественной оценки фосфорилированного AKT или MAPK, присутствующих в лизате, использовали системы анализа путем электрохемилюминесценции MesoScale Discovery Multi-spot (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Данные были проанализированы с использованием программного обеспечения GraphPad Prism® (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) для расчета значений EC_{50} на основе 4-параметрического логического уравнения.

Для исследования агонистической активности анализ проводили следующим образом. За один день до анализа клетки были промыты ФСБ, ресуспендированы в количестве 1×10^6 клеток/мл в обедненной среде, содержащей RPMI 1640 (Invitrogen), 2 мМ L-глутамин, 0,4 мг/мл генетицин® и 0,5% БСА, и инкубированы в течение 16-20 ч при 37°C в инкубаторе с 5% CO_2. Парентеральные клетки CHOK1 инкубировали в обедненной среде без генетицина®. На следующий день клетки были ресуспендированы в ФСБ с 0,5% БСА и 1×10^5 клеток были добавлены в лунки 96-луночного планшета. После инкубации с исследуемым антителом в течение 5-60 мин при 37°C в инкубаторе с 5% CO_2, подвергнутые обработке клетки были центрифугированы и лизированы в буфере, содержащем 20 мМ Трис-HCl (pH 7,5), 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 1% Тритон X-100, 10 мМ NaF, коктейль ингибитора фосфотазы 1 и 2 (Sigma-Aldrich), и полный ингибитор мини-протеазы (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN) в течение 1 ч с перемешиванием при 4°C. Лизаты были очищены путем центрифугирования при 485×g в течение 3 мин. Для количественной оценки фосфорилированного AKT или MAPK, присутствующих в лизате, использовали системы анализа путем электрохемилюминесценции MesoScale Discovery Multi-spot (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, Maryland). Данные были проанализированы с использованием программного обеспечения GraphPad Prism® (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) для расчета значений EC_{50} на основе 4-параметрического логического уравнения.

Фиг. 6 отображает результаты анализа pAKT для репрезентативных антител (A) положительные модуляторы (повышение индуцируемой инсулином передачи сигнала); (B) положительные модуляторы с агонизмом (повышение индуцируемой инсулином передачи сигнала и повышение инсулиннезависимой передачи сигнала); (C) немодуляторы (отсутствие значительного эффекта на индуцируемую инсулином передачу сигнала); (D) агонисты (повышение передачи сигнала независимо от инсулина; модуляторная активность может присутствовать/отсутствовать); (E) отрицательные модуляторы (снижение индуцируемой инсулином передачи сигнала). Результаты анализа показывают, что антитела обладают функциональной перекрестной реакционной способностью, т.е. обладают эффектом на передачу сигнала, опосредованную INSR человека и мыши.

Пример 6.

Антитела к INSR обладают спектром агонистической активности.

Анализ pIRS-1 из примера 4 и анализ pAKT из примера 5 использовали для измерения степени агонизма выбранных антител к INSR. Вместо того, чтобы использовать титрацию антител или инсулина, к анализу при отсутствии инсулина было добавлено 5 мкг/мл антитела к INSR. Анализ измерил уровень индуцируемой антителом активации сигнализации посредством INSR в отсутствии инсулина (агонизм).

Фиг. 7 отображает табличные результаты для иллюстрации того, что выбранные антитела обладают

спектром агонистической активности.

Пример 7.

Изменение в кооперативном эффекте связывания инсулина с INSR под воздействием положительного модулирующего антитела к INSR.

Анализ pAKT из примера 5 проводили с использованием одного из положительных модулирующих антител при различных концентрациях антитела с добавлением серийных разведений инсулина. Результаты приведены на фиг. 8. Фиг. 8A указывает реакцию на дозу при связывании INSR в присутствии различных концентраций антитела и инсулина. Фиг. 8B отображает относительный уклон Хилла взаимодействия инсулин/INSR в присутствии различных концентраций антитела.

Пример 8.

Повышение усвоения глюкозы положительным модулирующим антителом к INSR.

Были измерены эффекты положительного модулирующего антитела к INSR на усвоение глюкозы в адипоцитах 3T3-L1. После воздействия инсулином, INSR фосфорилируется, активируя путь передачи сигнала, который приводит к повышенному захвату глюкозы переносчиком глюкозы 4 (GLUT4) в адипоцитах (жировой ткани) или миоцитах (мышечной ткани). Измерение захвата (усвоения) глюкозы обеспечивает релевантный анализ конечных точек чувствительности к инсулину.

Использовали анализ с ^{3}H-2-дезоксиглюкозой в качестве субстрата для GLUT4 (Zen-Bio, Inc., Research Triangle Park, NC). Краткое описание: преадипоциты 3T3-L1 были дифференцированы в изопланшеты с 96 лунками. После созревания, клетки были дважды промыты буфером для анализа, после чего клетки оставили в буфере для анализа на 4 ч. Клетки были подвергнуты воздействию антителом к INSR или контрольным антителом (10 мкг/мл) и серийными концентрациями инсулина, или инсулином при концентрации 0,8 нМ в течение 15 мин. Спустя 15 мин было инициировано усвоение глюкозы путем добавления коктейля ^{3}H-2-дезоксиглюкозы, и клетки были инкубированы при 37°C, 5% CO_2 в течение 10 мин. Спустя 10 мин клетки были промыты ФСБ, дозированы и смешаны со сцинтилляционной жидкостью. Было измерено значение числа импульсов в минуту (имп/мин). Цитохалазин B (10 мкМ) использовали в качестве отрицательного контроля.

Результаты приводятся на фиг. 9. Фиг. 9 иллюстрирует улучшения инсулинозависимого усвоения глюкозы под действием положительного модулирующего антитела. Положительное модулирующее антитело приводило примерно к 2-кратному повышению захвата ^{3}H-2-дезоксиглюкозы клетками 3T3-L1 в присутствии 10 мкг/мл исследуемого антитела Ab001 в сравнении только с инсулином.

Такие результаты указывают, что положительные модулирующие антитела могут использоваться для индуцирования усвоения глюкозы in vivo и лечения пациентов с резистентностью к инсулину.

Пример 9.

Измерение эффектов антител к INSR на снижение глюкозы в питательных средах для выращивания клеток.

Снижение уровня глюкозы в питательной среде для выращивания клеток может использоваться в качестве суррогатных измерений усвоения глюкозы. Эффекты антител к INSR относительно обеднения среды с глюкозой измеряют следующим образом.

Для измерения снижения уровня глюкозы используют набор Wako autokit glucose (номер по каталогу 439-90901, Autokit C) в соответствии с указаниями производителя. Краткое описание: линии клеток CHOK1, адаптированные к сращению с DMEM +10% ФБС в 24- или 96-луночных планшетах, были высеяны в соответствующей концентрации. Перед использованием клетки были подвергнуты обеднению содержания глюкозы и сыворотки в течение ночи в 0,5% БСА DMEM (без глюкозы). Обедненная среда была аспирирована, и добавлена среда, состоящая из следующих компонентов, в присутствии и отсутствии исследуемого антитела или изотипа контрольного антитела: группа 1-4 части DMEM без глюкозы:1 часть DMEM с высоким содержанием глюкозы (0,9 мг/мл); группа 2-4 части DMEM без глюкозы:1 часть DMEM с высоким содержанием глюкозы (0,9 мг/мл) + инсулин. В каждой желаемой временной точке было отобрано 2 мкл образцов из каждой лунки, и добавлено 118 мкл рабочего раствора Вако. В некоторых вариантах воплощения изобретения образцы отбирают по истечении 0, 1, 2-5, 5, 10 и 24 ч. Усвоение глюкозы оценивали с использованием FLEXSTATION при поглощении 505 нм и 600 нМ. Количество глюкозы определяли следующим образом: [Средний показатель для похожих образцов]/[Средний показатель для стандартов]. Число клеток подсчитывали до и после экспериментов для нормализации роста клеток.

Пример 10.

Измерение эффектов антител к INSR на баланс между митогенной и метаболической сигнализацией INSR.

Сигналы INSR передаются посредством двух основных путей:

(1) пути PI3 киназа/PDK1/PKB, который преимущественно регулирует метаболизм с незначительным влиянием на рост; и

(2) митогенный путь Ras/ERK, который преимущественно регулирует рост клеток.

Эффекты антител к INSR на баланс между митогенной и метаболической сигнализацией INSR измеряют в соответствии с представленным в науке описанием. [См., например, Jensen et al. (Vitam Horm.

80:51-75, 2009), De Meyts and Shymko, (Novartis Found. Symp. 227:46-57, 2000); и Rakatzi et al. (Diabetes 52:2227-2238, 2003)].

Пример 11.

Измерение in vivo эффектов антител к INSR.

Как оказалось, антитела к INSR обладают перекрестной активностью с INSR мыши, и такие антитела измеряют с использованием целого ряда in vivo моделей. В модели DIO C57BL/6J (B6) мыши-самцы (The Jackson Laboratory, Maine) находились на диете с высоким содержанием жиров (HFD) в течение 12 недель, в результате чего у них отмечалось ожирение, гипергликемия легкой/умеренной степени и нарушение переносимости глюкозы. Такая модель использовалась для оценки способности антител к INSR влиять на чувствительность к инсулину при строго контролируемых условиях. Такая система также позволяет проводить прямое сравнение действия и модуляции INSR при нормальных условиях в сравнении с условиями при наличии заболевания. В данном эксперименте мыши DIO или мыши B6 соответствующего возраста получали дозу антитела к INSR за 24 ч до введения предопределенной субмаксимальной дозы инсулина в ходе пробы на переносимость инсулина (ППИ). Контрольный IgG или максимальный уровень инсулина служил в качестве отрицательного и положительного контроля соответственно. Иммунный ответ на инсулин оценивается путем измерения уровня глюкозы в плазме; предполагается, что чем больше снижение уровня глюкозы в течение 60 мин, тем больше ответ на INSR. В отдельном исследовании мыши DIO или B6 получали дозу антитела за 24 ч до проведения пробы на переносимость глюкозы (ППГ). Согласно такому измерению, пониженные уровни глюкозы натощак и площадь под кривой (AUC) указывают на улучшенную чувствительность к инсулину.

Для оценки влияния антител к INSR на прогрессирование диабета 2 типа использовали две мышиные модели. Мыши ob/ob (The Jackson Laboratory, ME) характеризуются дефицитом лептина, страдают ожирением и гипергликемией только легкой степени по причине компенсаторной гиперинсулинемии. В такой модели животные получают антитела к INSR, начиная от возраста 6 недель, или розиглитазон (PPAR-гамма агонист) - агент, который, как это было показано ранее, улучшает гликемический контроль у данных животных. Как в исследовании с DIO, гликемический контроль оценивают по ППИ и ППГ каждые 2 недели в течение 6 недель. Кроме того, по окончании исследования оценивали уровень гемоглобина A1c (HbA1c), ключевого индикатора продолжительных повышенных уровней глюкозы в плазме, и липидограмму. Во второй модели стрептозотоцина (STZ)/HFD бета-клетки поджелудочной железы мышей Swiss Albino (The Jackson Laboratory, Maine) были подвергнуты абляции посредством введения нескольких низких доз стрептозотоцина, в то время как резистентность к инсулину была индуцирована посредством диеты с высоким содержанием жиров. В этой модели животные имеют гипергликемию тяжелой степени по причине нарушения выработки инсулина поджелудочной железой, т.е. данная ситуация аналогична поздней стадии T2D (Dakshinamoorty et al., J. Pharm. and Pharmacology 60: 1167-73 (2008)). Животные STZ/HFD подвергаются лечению и оцениваются таким же самым способом, как и мыши из модели ob/ob, для измерения эффекта антител к INSR на прогрессирование заболевания.

Пример 12.

Эффекты частичных агонистических антител к INSR на гликемический контроль у мышей DIP.

В модели с индуцированным диетой ожирением (DIO) мыши C57BL/6 могут стать резистентными к инсулину спустя примерно 12-14 недель нахождения на диете с высоким содержанием жиров (HFD). Было показано, что антитела к INSR ведут себя в качестве частичных агонистов или положительных модуляторов in vitro, и такие антитела были оценены в данной модели для определения того, улучшают ли они чувствительность к инсулину и/или гликемический контроль in vivo.

Для определения того, снижают ли частичные агонистические антитела к INSR уровень глюкозы натощак, мыши DIO в возрасте 20 недель (14 недель нахождения на HFD; n=8/группа) не получали пищи в течение 5 ч, после чего им было введено внутривенно частичные агонистические антитела Ab030 и Ab037, или контрольный изотип (5 мг/кг). В дополнительных контрольных исследованиях мыши DIO были подвергнуты действию инсулина (0,5 Ед/кг), или мыши соответствующего возраста находились на нормальной диете (ND) и получали дозу контрольного изотипа (5 мг/кг). Перед введением (время=0), и спустя 1, 2 и 4 ч после введения были отобраны образцы крови для определения содержания глюкозы. В сравнении с контрольными животными соответствующего возраста, у мышей DIO (диета HFD/контрольный изотип) отмечались повышенные уровни глюкозы в крови во временной точке 1 час, что соответствовало резистентности к инсулину у животных, находившихся на диете HFD (фиг. 10A). Введение инсулина или частичных агонистических антител приводило к статистически значимому снижению ($p<0,05$; односторонний критерий Стьюдента) уровня глюкозы в крови (фиг. 10B). Никакое антитело не индуцировало гипогликемию в любой временной точке (определено в виде значения уровня глюкозы в крови <36 мг/дл). Такие результаты указывают, что частичные агонистические антитела к INSR безопасно и эффективно снижают уровень глюкозы в крови натощак.

Для дополнительной оценки эффекта частичного агонистического антитела к INSR на гликемический контроль, мышам DIO в возрасте 18 недель (12 недель на диете HFD; n=8/группа) было введено интраперитонеально (и/п) Ab037 (0,1, 1,0 или 9 мг/кг) или контрольный изотип (1,0 мг/кг). В качестве дополнительного контроля контрольные мыши соответствующего возраста получали дозу контрольного

изотипа (1,0 мг/кг), или животным DIO давали инсулин (0,75 Ед/кг; и/п). Проба на переносимость глюкозы (ППГ) проводилась спустя 24 ч после введения антитела (30 мин после инсулина), при этом животные не получали пищу в течение 16 ч (начиная примерно с 8 ч после введения антитела), им была введена доза глюкозы (1,0 Ед/кг), и уровень глюкозы в крови измерялся спустя 2 ч. В данном эксперименте HFD не имел какого-либо значительного влияния на уровень глюкозы натощак (фиг. 11B) или пиковое значение глюкозы после болюсного введения (фиг. 11A). Тем не менее, у мышей DIO частичное агонистическое антитело значительно снижало уровень глюкозы натощак в сравнении с контрольным изотипом при введении дозы 1,0 мг/кг или выше (фиг. 11B) и снижало площадь под кривой (AUC) ППГ при дозе 9,0 мг/кг (фиг. 11C).

Такой результат показывает, что частичное агонистическое антитело к INSR может снижать уровень глюкозы натощак и улучшать гликемический контроль in vivo.

Пример 13.

Эффекты положительных модулирующих антител к INSR на гликемический контроль у мышей DIP.

Для определения способности положительного модулирующего антитела к INSR улучшать чувствительность к инсулину in vivo, мышам DIO в возрасте 18 недель (n=8/группа) были выполнены и/п инъекции Ab01 (положительного модулятора) (0,1, 1,0 или 10 мг/кг), частичного агонистического антитела (Ab037) (10 мг/кг) или контрольного изотипа (1,0 мг/кг). Мыши соответствующего возраста, находящиеся на диете ND, получали дозу контрольного изотипа (1,0 мг/кг), и служили в качестве дополнительного контроля (фиг. 12A). Спустя 24 ч была выполнена проба на переносимость инсулина (ППИ) путем введения инсулина (0,5 Ед/кг) через 5 ч нахождения без еды и мониторинга уровней глюкозы в крови по истечении 2 ч. HFD не оказывала существенного влияния на уровень глюкозы натощак (фиг. 12B) или ППИ AUC (фиг. 12C) относительно нормальной диеты, и ни введение частичного агонистического антитела (Ab037), ни введение положительного модулирующего антитела (Ab001) не привело к статистически значимому снижению AUC ППИ относительно животных DIO, подвергнутых лечению контрольным изотипом (фиг. 12C). Частичное агонистическое антитело Ab037, существенно снижало уровень глюкозы натощак, в то время как положительное модулирующее антитело Ab001 индуцировало не статистически значимые, дозо-зависимые тенденции относительно снижения уровня глюкозы натощак.

На следующей неделе проводили ППГ на тех же самых животных после введения дополнительной дозы антитела (фиг. 13A). В данном исследовании HFD привела к статистически незначимому повышению уровня глюкозы натощак (фиг. 13B) и AUC ППГ (фиг. 13C) в сравнении с контрольными животными. В сравнении с мышами DIO, подвергнутыми лечению контрольным изотипом, частичное агонистическое антитело и положительное модулирующее антитело существенно снижало уровень глюкозы натощак при всех исследуемых дозах. Кроме того, частичное агонистическое антитело и положительное модулирующее антитело существенно снижало AUC ППГ при дозе 10 мг/кг в сравнении с контрольным изотипом.

Эффект Ab001 и Ab037 на липидограммы был исследован путем воздействия на мышей DIO в возрасте 18 недель антителом и/п два раза в неделю (BIW) (10 мг/кг; n=5/группа) в течение 12 недель. В данном эксперименте в уровне глюкозы натощак, ППГ и ППИ отмечалась эффективность, подобная эффективности, установленной в ходе двухнедельного исследования (как это описано выше). По окончании исследования была собрана плазма для измерения липидов с использованием стандартных и основанных на ИФА способов. Относительно контрольного изотипа, Ab001 и Ab037 снижали уровень триглицеридов натощак и уровни общего холестерина у мышей DIO ($p<0,05$; фиг. 14A и 14B), указывая на то, что такие антитела способны улучшать дисрегуляцию липидов, ассоциированную с резистентностью к инсулину.

Два дополнительных положительных модулирующих антитела к INSR были оценены на предмет улучшения гликемических параметров in vivo с использованием мышей DIO в возрасте 18 недель (n=10/группа). В данном исследовании положительные модулирующие антитела Ab083 и Ab085 были сопоставлены относительно Ab001 и Ab037 и контрольного изотипа антитела. Группа с нормальным питанием и соответствующего возраста была подвергнута лечению контрольным изотипом антитела, служащим в качестве дополнительного контроля. Все антитела вводили в дозе 10 мг/кг и/п BIW. Один день спустя после введения третьей дозы антитела, был измерен уровень глюкозы в крови натощак и выполнена ППГ. Гликемический контроль был существенно нарушен у мышей DIO, подвергнутых лечению контрольным изотипом, в сравнении с животными, находящимися на ND, соответствующего возраста, как это отражено по оценке динамики ППГ и соответствующему определению AUC (фиг. 15A и 15B). В данном эксперименте Ab037 и Ab083 улучшили AUC до уровней, не отличаемых от нормы ($p<0,05$ относительно HFD/контрольного изотипа), в то время как Ab001 не приводил к значительным улучшениям. Подобным образом, относительно уровня глюкозы натощак, значительная разница отмечалась между мышами DIO, которым вводили контрольный изотип, и мышами соответствующего возраста, находящимися на диете ND, и Ab037 и Ab001 обладали статистически значимыми эффектами нормализации ($p<0,05$; фиг. 15C). Ab083 приводило к небольшому, статистически незначимому улучшению уровня глюкозы натощак, в то время как Ab085 не приводило к какому-либо улучшению в данном параметре.

Другая мера эффектов антител к INSR на in vivo функцию представляет собой оценку модели го-

меостаза-резистентности к инсулину (HOMA-IR). HOMA-IR представляет собой математическую формулу, основанную на уровне глюкозы в плазме натощак и уровне инсулина в плазме натощак, которая была разработана в качестве суррогатного измерения чувствительности к инсулину in vivo. HOMA-IR=уровень инсулина в плазме натощак (мкМЕ/мл)×уровень глюкозы в плазме натощак (моль/л)/22,5, или используют другую формулу: инсулин (нг/мл)×глюкоза (мМ), при использовании коэффициента перевода 22,5. Примеры HOMA-IR описаны в Owyang et al., Endocrinology 151:2515-27, 2010 и Matthews et al., Diabetologia. 28:412-9, 1985.

Спустя 4 недели после приема дозы были оценены уровни глюкозы в плазме, инсулина и липидов в плазме. В этой временной точке Ab083 и Ab037 снижали уровень глюкозы в плазме, в то время как Ab083 и Ab085 снижали уровень инсулина ($p<0,05$; фиг. 16A и 16B). Такие эффекты были транспонированы на улучшенную чувствительность к инсулину в данной модели резистентности к инсулину для Ab083 и Ab085, как это определено по HOMA-IR ($p<0,05$; фиг. 16C). Относительно липидов: Ab085 существенно улучшало только показатели триглицеридов ($p<0,05$; фиг. 16D), в то время как Ab083 и Ab037 существенно снижали уровень общего, неэтерифицированного и ЛПНП холестерина ($p<0,05$; фиг. 16E-G). Последние два антитела также улучшали соотношение ЛПНП/ЛПВП холестерина (фиг. 16H). Ab001 существенно снижало уровни общего и ЛПНП холестерина.

Удивительно, но все четыре антитела снижали набор веса у мышей DIO относительно контрольного изотипа в течение 3 недель лечения, без снижения массы тела ниже исходного значения (фиг. 17A и 17B). Такие результаты показывают, что положительное модулирующее антитело Ab083 и агонистическое антитело Ab037 исправляют нарушенную переносимость глюкозы у мышей DIO, при этом модулирующие антитела Ab083 и Ab085 улучшают чувствительность к инсулину, и можно предположить, что все четыре антитела обладают способностью снижать вес, набранный в результате нахождения на HFD.

Такие результаты указывают, что частичные агонистические и положительные модулирующие антитела, специфичные к INSR, улучшают гликемический контроль у субъектов, страдающих диабетом.

Пример 14.

Эффекты частичных агонистических и положительных модулирующих антител к INSR на гликемический контроль и заболевание у мышей db/db.

Мыши, гомозиготные относительно спонтанного аллеля $Lepr^{db}$, ответственного за недостаточную функцию рецептора лептина, стали прогрессивным образом резистентными к инсулину, и ожирение возникло в возрасте от трех до четырех недель. У таких мышей уровни инсулинов повышаются до возраста 8-10 недель, когда животные приобретают тяжелую степень резистентности к инсулину и становятся гиперинсулинемическими. Тем не менее, такое генетическое основание приводит к неконтролируемой гипергликемии, что приводит к дисфункции бета-клеток поджелудочной железы по истечении периода 10 недель и, в конце концов, к гибели бета-клеток. Было показано, что антитела к INSR ведут себя в качестве частичных агонистов или положительных модуляторов in vitro, и такие антитела были оценены в данной модели для определения того, улучшают ли они чувствительность к инсулину, гликемический контроль и/или прогрессирование заболевания in vivo.

Мышей db/db использовали для оценки активности Ab001 и Ab037 при наличии прогрессирующей резистентности к инсулину и дисфункции бета-клеток в комбинации с ожирением тяжелой степени. В данном эксперименте Ab001 (1 мг/кг или 10 мг/кг), Ab037 (10 мг/кг) или контрольный изотип антитела (1 мг/кг или 10 мг/кг) вводили и/п, BIW мышам db/db в возрасте 5 недель ($n=10$/группа). В качестве дополнительного контроля группа гетерозиготных однопометных детенышей соответствующего возраста с обычно нормальным фенотипом получала дозу 10 мг/кг контрольного изотипа антитела. Как и в модели DIO, набор веса был существенно снижен у животных, принимавших 10 мг/кг Ab001 или Ab037, в сравнении с мышами, принимавшими контрольный изотип, в течение первых пяти недель лечения ($p<0,05$; фиг. 18A и 18C). Важно, что спустя 5 недель лечения, что соответствует возрасту 10 недель, когда мыши db/db обычно начинают терять вес в результате снижения количества бета-клеток поджелудочной железы, оба антитела снижали потерю веса ($p<0,05$; фиг. 18B и 18D). Спустя 10 недель лечения лечение Ab001 или Ab037 в дозе 10 мг/кг существенно улучшало наблюдаемый уровень глюкозы в крови натощак в сравнении с соответствующими группами, принимавшими контрольный изотип ($p<0,05$; фиг. 19A). Кроме того, в данной временной точке значение HbA1c было существенно снижено в группе приема 1 мг/кг Ab001, и также было снижено, в меньшей, степени в группе 10 мг/кг Ab001 ($p<0,05$; фиг. 19B).

Уровни инсулина и липидов в плазме были оценены спустя 14 недель приема доз. К этому времени Ab001 (10 мг/кг) и Ab037 повышали уровень циркулирующего инсулина в возрасте (примерно 20 недель), при котором у таких животных прогнозируется дисфункция бета-клеток поджелудочной железы ($p<0,05$; фиг. 20A), что указывает на то, что оба MAT способны восстанавливать выработку инсулина у инсулинопенических животных. Кроме того, Ab001 (10 мг/кг) существенно снижал уровни триглицеридов в плазме, общего холестерина, ЛПНП холестерина, неэтерифицированного холестерина и соотношения ЛПНП/ЛПВП холестерина ($p<0,05$; фиг. 20B-F). Значительное снижение уровня неэтерифицированного холестерина и тенденция относительно понижения уровня триглицеридов отмечалась в плазме животных, принимавших Ab037 ($p<0,05$ и $p=0,08$ соответственно; фиг. 20B и 20C).

Интересно, что снижение набора веса возникает рано, когда животные все еще остаются резистент-

ными к инсулину, но серьезного снижения количества бета-клеток не ожидается, как в модели DIO. Однако в данном эксперименте индуцированные Ab001 изменения в гликемическом контроле и гликозилированном гемоглобине возникали только в течение поздней фазы, когда прогнозировалась дисфункция бета-клеток. Более того, во время данного периода оба антитела снижали патологическую потерю веса. Не будучи привязанным к какой-либо теории, такой результат указывает, что антитело к INSR влияет на вес и гликемический контроль, что может возникнуть в тандеме, но являются отдельными эффектами. Такие данные указывают, что Ab001 способно нормализовать вес, улучшая гликемический контроль и частично корректируя дислипидемию при условиях комбинированной резистентности к инсулину и снижения количества бета-клеток.

Для оценки активности антител в условиях тяжелой резистентности к инсулину и инсулинопении, мыши db/db в возрасте 10 недель, у которых, как ожидалось, должна была проявиться прогрессирующая дисфункция бета-клеток поджелудочной железы, получали Ab001, Ab037, Ab083, Ab085 или контрольный изотип антитела в дозе 10 мг/кг, и/п, BIW в течение 8 недель. Уровни глюкозы в крови натощак измеряли еженедельно в течение всего исследования. В данном исследовании Ab085 существенно снижало уровень глюкозы в крови натощак в сравнении с контрольным изотипом ($p<0,05$; фиг. 21). Это указывает на то, что Ab085 улучшает состояние заболевания в условиях резистентности к инсулину и гипоинсулинемии.

Два дополнительных положительных модулирующих антитела к INSR были оценены на предмет улучшения резистентности к инсулину у мышей db/db в возрасте 5 недель, у которых ожидалось проявление резистентности к инсулину тяжелой степени. Мыши получали Ab001, Ab037, Ab083, Ab085 или контрольный изотип антитела в дозе 10 мг/кг, и/п, BIW в течение 4 недель для оценки эффекта антитела на резистентность к инсулину до возникновения дисфункции бета-клеток. По окончании исследования были измерены уровни глюкозы в плазме натощак и уровни инсулина в плазме натощак, и рассчитано значение HOMA-IR. В данном исследовании Ab083 и Ab085 существенно улучшали резистентность к инсулину в сравнении с контрольным изотипом ($p<0,05$; фиг. 22), указывая, что такие антитела улучшают резистентность к инсулину в данной модели диабета.

Пример 15.

Эффекты частичных агонистических и положительных модулирующих антител к INSR на гликемический контроль и заболевание у мышей MLDS/HFD.

В модели приема множественных низких доз стрептозотоцина (MLDS)/HFD резистентность к инсулину достигается путем нахождения мышей ICR в возрасте 6 недель на диете HFD (40 ккал%жиры) в течение 4 недель, и в течение данного периода для частичной абляции функции бета-клеток мышам было введено и/п 5 суточных доз стрептозотоцина (40 мг/кг, во время третьей недели). Было показано, что антитела к INSR ведут себя в качестве частичных агонистов или положительных модуляторов in vitro, и такие антитела были оценены в данной модели для определения того, улучшают ли они чувствительность к инсулину, гликемический контроль и/или прогрессирование заболевания in vivo.

Для оценки эффекта Ab001 и Ab037 на заболевание в данной модели комбинированной резистентности к инсулину и дисфункции бета-клеток, мыши MLDS/HFD ($n=10$/группа) принимали дозу Ab001, Ab037 или контрольного изотипа 10 мг/кг и/п, BIW в течение 6 недель. Спустя одну неделю после первой дозы у мышей, принимавших контрольный изотип, отмечалось трехкратное повышение уровня глюкозы натощак в сравнении с соответствующими здоровыми животными, что подтверждает достижения диабетического фенотипа. На тот момент была проведена ППГ, которая выявила значительные улучшения в гликемическом контроле для Ab001 и Ab037 ($p<0,05$; фиг. 23A и 23B). Уровень глюкозы в крови натощак также был существенно снижен в группе мышей, принимавших Ab037 ($p<0,05$), в то время как для Ab001 какого-либо значимого изменения не отмечалось (фиг. 23C). Спустя одну неделю был оценен уровень глюкозы после приема пищи. Подобно уровню глюкозы натощак, заболевание у мышей MLDS/HFD проявлялось по существенному повышению уровня глюкозы после приема пищи, который был улучшен Ab037 ($p<0,05$; фиг. 24A). В соответствии с такими улучшениями в ППГ и уровнях глюкозы после приема пищи/натощак, Ab037 снижало HbA1c примерно на 1,5% спустя 6 недель приема дозы ($p<0,05$; фиг. 24B). Окончательный анализ исследования плазмы выявил, что лечение Ab037 привело к статистически значимой нормализации уровня инсулина в плазме и меньшему снижению соотношения ЛПНП/ЛПВП холестерина, в то время как Ab001 существенно улучшил уровни лептина в плазме, с похожим, но меньшим, корректирующим влиянием на уровень инсулина в плазме ($p<0,05$; фиг. 25A-C). Такая модель не соответствует существующему и связанному с заболеванием изменению в весе, наблюдаемому в модели db/db, и антитела Ab001 и Ab037 не влияли на массу тела в такой модели (фиг. 26), что указывает на то, что снижение набора веса, отмечаемое для таких антител, в других моделях in vivo не было неспецифическим эффектом. Такие данные показывают, что Ab037 улучшает множественные проявления заболевания у мышей MLDS/HFD, в то время как Ab001 также корректирует некоторые параметры нарушенного гликемического контроля в данной модели.

Два дополнительных положительных модулирующих антитела к INSR были оценены на предмет улучшения гликемических параметров in vivo. Мыши MLDS/HFD ($n=10$/группа) принимали Ab001, Ab037, Ab083, Ab085 или контрольный изотип антитела в дозе 10 мг/кг, и/п, BIW в течение 6 недель.

Спустя 3 недели лечения была проведена ППГ, которая выявила, что Ab037 и Ab083 полностью нормализовали гликемический контроль в сравнении с контрольным изотипом ($p<0,05$; фиг. 27A и 27B). Уровень глюкозы в крови натощак также был существенно снижен в группе мышей, принимавших Ab037 или Ab083 в течение периода исследования 6 недель ($p<0,05$), в то время как для Ab001 или Ab085 какого-либо значимого изменения не отмечалось (фиг. 28). По окончании исследования были оценены уровни липидов в плазме. Ab083 существенно улучшало уровни триглицеридов в плазме, неэтерифицированного холестерина, общего холестерина, ЛПНП холестерина, соотношения ЛПНП/ЛПВП холестерина и свободных жирных кислот ($p<0,05$; фиг. 29A-F). Кроме того, Ab001 существенно снижает уровень общего, ЛПНП и неэтерифицированного холестерина, а также соотношения ЛПНП/ЛПВП холестерина. Ab037 улучшало уровень ЛПНП холестерина, неэтерифицированного холестерина, соотношение ЛПНП/ЛПВП холестерина и несвязанных жирных кислот. В данном эксперименте Ab085 существенно снижало только уровень несвязанных жирных кислот. В соответствии с наблюдаемыми улучшениями при ППГ и уровне глюкозы натощак, Ab037 и Ab083 существенно снижали HbA1c спустя 6 недель приема дозы ($p<0,05$; фиг. 30). Кроме того, Ab001 и Ab085, обладающие меньшим эффектом на уровень глюкозы натощак и переносимость глюкозы, улучшали определенные липидные параметры и также снижали HbA1c. Как и в предыдущем эксперименте, ни одно из МАТ существенно не влияло на массу тела в данной модели, за исключением Ab085, при этом масса тела была снижена в течение первых 3 недель приема дозы (фиг. 31). Такие данные показывают, что все четыре исследуемых антитела улучшали множественные проявления заболевания у мышей MLDS/HFD без влияния на массу тела в данной нейтральной модели массы тела.

Пример 16.

Эффекты 24-часового введения частичных агонистических и положительных модулирующих антител к INSR на фосфорилирование INSR in vivo.

Повышение фосфорилирования тирозина INSR в инсулин-чувствительных тканях, таких как печень и мышцы, путем кратковременного введения антител к INSR подтверждает, что антитела подлежат биоразрушению и способны действовать подобным образом на INSR in vivo, как это отмечается in vitro. В данном эксперименте антитела к INSR, идентифицированные как частичные агонистические или положительные модуляторы in vitro, вводили в течение 24 ч мышам-самцам C56BL/6 и оценивали на предмет их эффекта на базальное и инсулин-индуцированное фосфорилирование INSR в печени и мышцах.

Для определения повышения фосфорилирования INSR частичными агонистическими или положительными модулирующими антителами к INSR в печени и мышцах, мышам-самцам C56BL/6 в возрасте 10 недель ($n=3$) вводили антитела к INSR или контрольный изотип антитела (10 мг/кг) в течение 24 ч, и эффекты на фосфорилирование тирозина INSR в печени и мышцах были определены путем ИФА у мышей, которым вводили инсулин болюсно (1 Ед/кг) или ФСБ в течение 10 мин. Концентрации фосфорилированного INSR были нормализованы к общим концентрациям рецептора инсулина и выражены в виде процентов.

Экзогенный инсулин (1 Ед/кг) существенно не увеличивал фосфорилирование INSR у контрольных животных (несмотря на наличие положительной тенденции) в печени или мышцах (фиг. 32A, B). Однако в печени значительные повышения в стимулированном инсулином фосфорилировании INSR отмечались у мышей, принимавших Ab083 и Ab037 ($p<0,05$), а у мышей, принимавших Ab085, отмечались околозначимые улучшения ($p=0,07$; фиг. 32A). Такой результат указывает, что частичные агонистические и положительные модулирующие антитела способны повышать ответ на инсулин in vivo. Интересно, что в печени Ab083 существенно повышало фосфорилирование INSR даже в базальном состоянии (неэкзогенный инсулин), что указывает на то, что Ab083 способно сенсибилизировать ответ на инсулин даже в присутствии низких уровней эндогенного инсулина натощак.

Наиболее заметные эффекты частичных агонистических и положительных модулирующих антител к INSR отмечались в мышцах. В то время как все три антитела к INSR положительно модулировали сигнализацию инсулина у мышей, которым инсулин вводили болюсно, Ab083 и, в большей степени, Ab085 также сенсибилизировали сигнализацию INSR в мышцах относительно уровней эндогенного инсулина натощак при сравнении с контрольными животными (фиг. 32B).

Такие результаты указывают, что частичные агонистические и положительные модулирующие антитела к INSR улучшают ответ на опосредованную инсулином сигнализацию в печени и мышцах in vivo. Относительно эффектов Ab037, антитела Ab083 и Ab085 сенсибилизируют INSR при относительно низких концентрациях инсулина.

Пример 17.

Выделение антител к INSR из дополнительных библиотек фаговых дисплеев антител.

Дополнительные библиотеки нативных антител были подвергнуты скринингу на антитела, специфические к INSR.

(1) Пэннинг фагов и восстановление.

Рецептор инсулина человека (hINSR) (R&D Systems, Minneapolis, MN) был биотинилирован, как это описано в примере 1, и использован для пэннинга дополнительных библиотек фаговых дисплеев нативных антител.

A. Библиотека scFv.

Нативная библиотека scFv: для первого этапа пэннинга фага, $4,5\times10^{12}$ КОЕ фаговых частиц из библиотеки дисплея фага лямбда scFv или $4,12\times10^{12}$ КОЕ фаговых частиц из библиотеки дисплея фага каппа scFv (XOMA LLC, Berkeley, CA) были блокированы в течение 1 ч при комнатной температуре (КТ) в 1 мл 5% молоко/ФСБ (Teknova, Hollister, CA) с осторожным перемешиванием. Было проведено два отдельных пэннинга: для scFv-каппа и scFv-лямбда. Блокированный фаг был дважды подвергнут повторной селекции в течение 30 мин относительно покрытых стрептавидином магнитных гранул Dynabeads® M-280 (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway). Для образования комплекса биотин/hINSR/hINS, 103 пмоль биотинилированного hINSR было предварительно инкубировано с избытком (2100 пмоль) инсулина человека (hINS) (Sigma, St Louis, MO), растворенного в 5% молоко/ФСБ в течение 1 ч при КТ и осторожном перемешивании. Для второго этапа пэннинга 50 пмоль биотина/hINSR использовали с 1050 пмоль hINS. Для финального этапа пэннинга 25 пмоль биотина/hINSR использовали с 525 пмоль hINS.

B. Библиотека Fab.

Нативная библиотека Fab: для первого этапа фагового пэннинга $1,2\times10^{13}$ КОЕ фаговых частиц или $1,8\times10^{13}$ КОЕ фаговых частиц из двух различных библиотек Fab лямбда (XOMA LLC, Berkeley, CA), или $7,2\times10^{12}$ КОЕ фаговых частиц или $1,8\times10^{13}$ КОЕ фаговых частиц из двух различных библиотек Fab каппа (XOMA LLC, Berkeley, CA) были блокированы в течение 1 ч при комнатной температуре (КТ) в 1 мл 5% молоко/ФСБ (Teknova, Hollister, CA) при осторожном перемешивании. Было выполнено четыре отдельных пэннинга. Блокированный фаг был дважды подвергнут повторной селекции в течение 30 мин относительно покрытых стрептавидином магнитных гранул Dynabeads® M-2 80 (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway). Для образования комплекса биотин/hINSR/hINS, 103 пмоль биотинилированного hINSR было предварительно инкубировано с избытком (2100 пмоль) инсулина человека (hINS) (Sigma, St. Louis, MO), растворенного в 5% молоко/ФСБ в течение 1 ч при КТ и осторожном перемешивании. Для второго этапа пэннинга 50 пмоль биотина/hINSR использовали с 1050 пмоль hINS. Для финального этапа пэннинга 25 пмоль биотина/hINSR использовали с 525 пмоль hINS.

Раствор биотин/hINSR/hINS был инкубирован с блокированными и покрытыми стрептавидином магнитными гранулами Dynabeads® M-280 (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway) в течение 30 мин при осторожном перемешивании для иммобилизации комплекса биотин/hINSR/hINS. Отсеянный фаг был инкубирован с гранулами со стрептавидином/биотин/hINSR/hINS в течение 2 ч при КТ. Для насыщения hINSR с использованием hINS, в раствор было добавлено hINS (2100 пмоль). Гранулы были промыты. В ходе первого этапа пэннинга гранулы были быстро промыты (т.е. гранулы были удалены из раствора с использованием магнита и ресуспендированы в 1 мл промывочного буфера) трижды с использованием 0,5% молока/ФСБ/0,1% ТВИН, затем трижды промыты с использованием 0,5% молоко/ФСБ с последующей одной быстрой промывкой ФСБ. В ходе второго этапа пэннинга гранулы были быстро промыты пять раз с использованием 0,5% молоко/ФСБ/0,1% ТВИН, затем было одно 5-минутное промывание (в 1 мл промывочного буфера при комнатной температуре и осторожном перемешивании) с использованием 0,5% молоко/ФСБ/0,1% ТВИН, и затем пять раз с использованием 0,5% молоко/ФСБ, затем одним 5-минутным промыванием в 0,5% молоко/ФСБ с последующей одной быстрой промывкой ФСБ. В течение третьего этапа пэннинга гранулы были быстро промыты четыре раза 0,5% молоко/ФСБ/0,1% ТВИН, затем два раза промыты в течение 5 мин 0,5% молоко/ФСБ/0,1% ТВИН, и затем быстрое четырехкратное промывание 0,5% молоко/ФСБ, затем два 5-минутных промывания 0,5% молоко/ФСБ с последующей одной быстрой промывкой ФСБ.

C. Элюирование и восстановление.

Фаг, связанный с гранулами hINSR/hINS-стрептавидин был элюирован с 0,5 мл 100 мМ триэтиламина (ТЭА) в течение 30 мин при КТ и осторожном перемешивании. Гранулы были разделены от элюата. Элюат был удален и нейтрализован с 0,5 мл 1 М Трис-HCl (pH 7,4). Гранулы были нейтрализованы с 1 мл 1 М Трис-HCl (pH 7,4). Элюированный фаг из гранул или элюата использовали отдельным образом для инфицирования бактериальных клеток TG1 (Stratagene, La Jolla, CA), и в ходе реакции OD_{600} составило ~0,5. После инфекции в течение 30 мин при 37°C без перемешивания, а также в течение 30 мин при 37°C с перемешиванием при скорости 90 об/мин, клетки были пеллетированы и ресуспендированы в среде 2YT, дополненной 100 мкг/мл карбенициллина и 2% глюкозы. Ресуспендированные клетки были высеяны на чашки с агаром и 2YT, а также с 100 мкг/мл карбенициллина и 2% глюкозы, с последующей инкубацией в течение ночи при 30°C.

Затем фаг был восстановлен с использованием фага-хелпера M13KO7 (New England Biolabs, MA) при кратности инфицирования (MOI) ~20. После инфекции фагом-хелпером клеток TG1 при OD_{600} 0,5 и 37°C в течение 30 мин без перемешивания и инкубации в течение 30 мин при 37°C при скорости вращения 100 об/мин, пеллеты клеток были ресуспендированы в среде 2YT, дополненной 100 мкг/мл карбенициллина и 50 мкг/мл канамицина, и дали выстоять в течение ночи при 25°C и скорости вращения 250 об/мин. Фаг в супернатанте был восстановлен после тщательного центрифугирования и использован для следующего этапа пэннинга. Для мониторинга обогащения после селекции фага, количество введенного и полученного фага было титровано в ходе трех этапов пэннинга.

(2) Скрининг FACS клонов антитела с использованием комплекса INSR/hINS человека или INSR/hINS мыши.

Индивидуальные колонии были собраны и выращены в 96-луночных планшетах, и затем их использовали для получения бактериальных периплазматических экстрактов в соответствии со стандартными способами при объемном соотношении ледяного раствора PPB (Teknova, Hollister, CA) и дистиллята двойной перегонки (ddH2O) 1:3, а также с использованием ингибитора протеазы (Roche, Indianapolis, IN). Супернатант лизата был проанализирован способом FACS на комплексе hINSR/hINS или INSR/hINS мыши с использованием протокола, описанного в примере 2, за исключением того, что адаптированная суспензия CHO-K1, трансфицированная hINSR или muINSR, использовалась вместо клеток IM-9, и клетки, подверженные воздействию инсулина, были ресуспендированы в буфере FACS, в который было добавлено 150 нМ вместо 70 нМ инсулина человека. Такой анализ позволил определить по меньшей мере 6 типов антител.

1. Антитела, которые связываются только с клетками hINSR-CHO, если они были подвергнуты воздействию инсулином человека (связывание только с комплексом INS/INSR видоспецифическим образом).

2. Антитела, которые связываются только с клетками muINSR-CHO, если они были подвергнуты воздействию инсулином человека (связывание только с комплексом INS/INSR видоспецифическим образом).

3. Антитела, которые связываются с клетками hINSR-CHO и muINSR-CHO, если они были подвергнуты воздействию инсулином человека (связывание только с комплексом INS/INSR видов перекрестным образом).

4. Антитела, которые связываются только с клетками hINSR-CHO (связывание только с INSR видоспецифическим образом).

5. Антитела, которые связываются только с клетками muINSR-CHO (связывание только с INSR видоспецифическим образом).

6. Антитела, которые связываются с клетками hINSR-CHO и muINSR-CHO (связывание только с INSR видоспецифическим перекрестным образом).

Антитела, которые были обозначены, как это описано в примере 2, были секвенированы на предмет последовательности легкой цепи и тяжелой цепи выделенных антител и установлены в последовательностях SEQ ID NO: 87-147 (легкая цепь) и SEQ ID NO: 223-284 (тяжелая цепь).

Результаты.

Скрининг FACS бактериальных периплазматических экстрактов идентифицировал множественные антитела, которые связываются с рецептором человека или комплексом рецептор/лиганд, hINSR или hINSR/hINS, или мышиным рецептором или комплексом рецептор/лиганд, muINSR или muINSR/hINS. 33% (484 из 1488) клонов, выбранных из таких нативных библиотек, были способны связываться с hINSR или комплексом hINSR/hINS. 25% (370 из 1488) клонов, выбранных из таких нативных библиотек, были способны связываться с muINSR или комплексом muINSR/hINS. 16% (234 из 1488) клонов связывались с hINSR или hINSR/hINS и muINSR или комплексами muINSR/hINS (определено FACS).

Выбранные клоны были реформированы в виде антител IgG2. Вариабельные тяжелые (VH) и легкие (VL) цепи выбранных фрагментов scFv были подвергнуты ПЦР-амплификации, клонированы в векторы плазмид, содержащие константные гены антител, и трансфицированы в клетки человека 293E EBNA с использованием стандартных способов. Связывание реформированных антител с hINSR или hINSR/hINS, или muINSR, или muINSR/hINS было оценено способом FACS, как это описано выше. Результаты приводятся на фиг. 33.

Результаты показывают, что определенные реформированные антитела связываются с INSR мыши и человека. Фиг. 33 также показывает, что определенные реформированные антитела связываются дифференциальным образом с INSR в присутствии и отсутствии инсулина и, следовательно, прогнозируют, что они будут модулировать связывание инсулина с INSR.

Пример 18.

Пэннинг аллостерических агонистических антител к INSR.

Селекция агонистических антител, которые обладают большим связыванием с комплексом рецептор/лиганд, чем со свободными рецепторами, повышает вероятность идентификации антител, которые не конкурируют с лигандом и не блокируют или не снижают связывания лиганда с ортостерическим сайтом рецептора. Антитело такого типа, которое связывается с сайтом на рецепторе-мишени, отличающегося от эндогенного сайта связывания, называется аллостерическим агонистом (Kenakin et al., Journal of Receptors and Signal Transduction, 27:247-259, 2007; Jahns et al., J. Am Coll Cardiol. 36:1280-87, 2000; May et al., Ann Rev Toxicol. 47:1-51, 2007).

Описанные выше способы для скрининга агонистических антител также используются для скрининга аллостерических агонистов. Преимущественное связывание исследуемого антитела с комплексом рецептор/лиганд соответствует аллостерической активности, при этом преимущественное связывание исследуемого антитела со свободным рецептором соответствует антителу, которое конкурирует с инсулином за ортостерический сайт. Скрининг используют для обогащения пула кандидатных клонов алло-

стерических агонистов путем элиминации некоторых кандидатов, не являющихся конкурирующими агонистами.

Аллостерические антитела с меньшей вероятностью влияют на аффинность связывания и эффективность лиганда, и, следовательно, с меньшей вероятностью влияют на максимальную сигнализацию лиганда или максимальную чувствительность к лиганду. Аллостерические антитела могут обладать диапазоном агонистических свойств от слабых частичных агонистов до уровня агонизма, подобного таковому эндогенного лиганда. Частичный аллостерический агонист будет вызывать максимальный сигнальный ответ, который существенно ниже в своей амплитуде, чем максимальный ответ эндогенного лиганда. В некоторых видах применения, когда продолжительная субмаксимальная активация сигнала преимущественна в сравнении с максимальной активацией сигнала, частичное агонистическое антитело преимущественно относительно полного агонистического антитела. Отличительные характеристики между частичным аллостерическим агонистом и положительным модулятором (сенсибилизатором) очевидны при сравнении кривых доза-ответ, представленных на фиг. 34 и 17, которые отображают различные кривые связывания для частичного аллостерического агониста (фиг. 34) и положительного модулирующего антитела (сенсибилизатора) (фиг. 35).

Фиг. 34A отображает пример ответа на дозу частичного аллостерического агониста в сравнении с ответом на дозу эндогенного лиганда, и фиг. 34B отображает активацию лигандом в присутствии или отсутствии аллостерического агониста. Фиг. 35A отображает ответ на дозу положительного аллостерического модулирующего антитела в сравнении с ответом на дозу эндогенного лиганда, в то время как фиг. 35B отображает ответ на дозу эндогенного лиганда в присутствии и отсутствии положительного модулирующего антитела. Фиг. 36 иллюстрирует активирующие параметры для ряда частичных аллостерических агонистов в сравнении с эндогенным лигандом. Природа активации сигнала частичными аллостерическими агонистами отличается от таковой положительного модулятора, получаемого с использованием одинаковых способов первичного скрининга.

Неконкурирующее частичное аллостерическое агонистическое антитело может предоставлять терапевтическое преимущество над конкурирующим агонистом, когда преимущественным является независимая активация сигнала частичным агонистом и эндогенным лигандом одновременно. Например, не ограничиваясь теорией, частичный аллостерический агонист может использоваться для повышения базальной активации пути передачи сигнала, обеспечивая ответ на преходящие колебания уровней эндогенного лиганда. В определенных случаях, при условиях присутствия частичного аллостерического агониста такого типа, ответ на дозу эндогенного лиганда будет приводить к повышению исходного уровня сигнализации (конститутивного или базального), что позволит достичь одинакового или большего максимального ответа на эндогенный лиганд с незначительным или несущественным изменением в значении EC_{50} лиганда. Например, фиг. 34B отображает ответ на дозу эндогенного лиганда в присутствии и отсутствии частичного аллостерического агониста, и фиг. 37 отображает максимальную активацию инсулина в присутствии частичных аллостерических агонистических антител относительно максимального ответа на эндогенный лиганд в присутствии отрицательного контрольного антитела. Фиг. 37 указывает, что частичные аллостерические агонистические антитела Ab037 и Ab040 обладают незначительным или несущественным влиянием на EC_{50} ответа на дозу и максимальное фосфорилирование Akt в положении Ser473 инсулином при сравнении в этом же анализе с отрицательным контрольным антителом.

Пример 19.

Примеры функциональных классов антител к INSR: дифференциальные эффекты на индуцируемое инсулином фосфорилирование Akt.

Эффекты исследуемых антител на сигнализацию посредством комплекса инсулин/рецептор инсулина были измерены путем оценки способности антител сенсибилизировать и агонизировать индуцируемое инсулином фосфорилирование Akt. Анализы проводили с использованием способа, описанного в примере 5. Во всех представленных данных процентные значения pAtk pSer473 относительны и необязательно представляют абсолютные клеточные уровни pAtk pSer473.

Фиг. 38-40 отображают кривые доза-ответ на антитело к pAkt в отсутствии инсулина или в присутствии субмаксимальной концентрации инсулина для материнских клеток CHO-K1, клеток CHO-K1, экспрессирующих рецептор инсулина человека, и клеток CHO-K1, экспрессирующих рецептор инсулина мыши. Титрации антител в отсутствии инсулина (незакрашенные символы) указывают на агонистическую активность антитела. Параллельная титрация антител в присутствии субмаксимального уровня инсулина (закрашенные символы) указывает на сенсибилизирующую активность относительно агонистической активности. Сенсибилизирующая активность может отмечаться в виде повышения уровней pAkt выше таковых уровней, вызываемых концентрацией инсулина EC_{30} (пунктирная линия), и такие повышенные уровни имеют большую амплитуду, чем агонистическая активность при одинаковой концентрации антитела. Антитела Ab077, Ab078 и Ab085 (фиг. 38A-C) не обладают значительным агонизмом в отсутствии инсулина. Антитела Ab001, Ab079 и Ab083 являются слабыми агонистами (фиг. 39A-C), и антитело Ab080 характеризуется умеренным уровнем агонизма (фиг. 40). Результаты анализа показывают, что антитела обладают функциональной перекрестной реакционной способностью, т.е. обладают эффектом на передачу сигнала, опосредованную INSR человека и мыши. Следует отметить, что антитела

Ab078 и Ab085 связываются только с рецептором инсулина в присутствии инсулина, т.е. они не связываются определяемым образом с незанятым рецептором инсулина, что было установлено по связыванию с рецептором инсулина, экспрессируемым в клетках CHO-K1 в ходе анализа на основе FACS. Фиг. 41A-C отображают индуцируемую инсулином активацию pAkt в присутствии фиксированных концентраций сенсибилизирующих антител в сравнении с инсулином в присутствии контрольного изотипа антитела к KLH IgG2 (жирные линии). Уровни активации pAkt для антител в отсутствии инсулина при концентрациях, используемых в титрации ответа на дозы инсулина, представлены в виде пунктирных линий. Значения EC_{50} для индуцированной инсулином активации pAkt в присутствии сенсибилизирующих антител и кратное изменение в значениях EC_{50} относительно контрольного изотипа представлены в табл. 5.

Таблица 5

Значение EC_{50} для индуцируемой инсулином активации pAkt в присутствии сенсибилизирующих антител

Эксперимент	*Антитело*	*Концентрация антитела (мкг/мл)*	*EC50 (пМ)*	*Кратное изменение в EC50 относительно контрольного изотипа*
INSR человека в клетках CHO-K1	Ab001	2	59	12
	Ab077	10	81	9
	Ab078	20	221	3
	Ab079	10	100	7
	Ab083	2	68	11
	Ab085	1	207	3
	Ab085	10	81	9
	Антитело к KLH.G2	10	724	
INSR мыши в клетках CHO-K1	Ab001	2	354	7
	Ab077	20	301	8
	Ab078	20	990	2
	Ab079	20	300	8
	Ab083	10	276	9
	Ab085	20	312	8
	Антитело к KLH.G2	10	2414	

Фиг. 42A-B указывают активность активации pAkt частичными аллостерическими агонистическими антителами в отсутствии инсулина в сравнении с присутствием только инсулина. Антитела Ab037, Ab053 и Ab062 действуют в качестве агонистов активности pAkt, при этом максимальные плато активации по существу меньше, чем у инсулина в клетках CHO-K1, которые экспрессируют рецептор инсулина человека или мыши. Результаты анализа также показывают, что антитела обладают функциональной перекрестной реакционной способностью, т.е. обладают эффектом на передачу сигнала, опосредованную рецептором инсулина человека и мыши. Значение EC_{50} для антитела и максимальные уровни активации представлены в табл. 6.

Таблица 6

Максимальные уровни активации и значения EC_{50} для частичных аллостерических агонистов

		Инсулин человека	Ab037	Ab053	Ab062
INSR человека в клетках CHO-K1	*Относительная максимальная активация*	100%	79%	64%	52%
	EC_{50} (нМ)	0,15	0,65	0,42	2,43
INSR мыши в клетках CHO-K1	*Относительная максимальная активация*	100%	42%	48%	34%
	EC_{50} (нМ)	1,70	1,42	0,69	1,10

Фиг. 43 отображает инсулинозависимую активацию pAkt в присутствии фиксированных концентраций частичных аллостерических агонистических антител в сравнении с только инсулином. Агонистическая активность антител отмечается в виде повышения исходного ответа на дозу инсулина. Агонистические антитела Ab037 и Ab053 обладают незначительным эффектом на чувствительность к инсулину, которая отражается в недостатке существенного изменения EC_{50} инсулина и коэффициенте Хилла в при-

сутствии таких антител (см. табл. 7). Как оказалось, антитело Ab062 снижает чувствительность к инсулину, поскольку EC_{50} для инсулина в присутствии Ab062 выше в 6,6 раз (см. табл. 7).

Таблица 7

Параметры активации инсулина в присутствии и отсутствии агонистических антител

Рекомбинантная линия клеток, вырабатывающая рецептор инсулина и используемая в анализе	*Параметр анализа, определенный при приращении сигмоидальной кривой доза-ответ*	*Инсулин человека с 2 мкг/мл контрольного антитела (95% доверительный интервал)*	*Инсулин человека с 2 мкг/мл Ab037 (95% доверительный интервал)*	*Инсулин человека с 2 мкг/мл Ab053 (95% доверительный интервал)*	*Инсулин человека с 2 мкг/мл Ab062 (95% доверительный интервал)*
INSR человека в клетках CHO-K1	Относительная максимальная активация pAkt в присутствии 2 мкг/мл антитела	100% (93% до 108%)	109% (106% до 112%)	99% (97% до 102%)	106% (100% до 112%)
	EC_{50} инсулина в присутствии 2 мкг/мл антитела (нМ)	0,58 (0,35 до 0,96)	1,11 (0,84 до 1,5)	0,92 (0,68 до 1,3)	3,91 (2,7 до 5,7)
	Коэффициент Хилла инсулина в присутствии 2 мкг/мл антитела	0,74 (0,48 до 1,0)	0,79 (0,63 до 0,95)	0,93 (0,69 до 1,2)	0,71 (0,54 до 0,89)

Пример 20.

Антитело к INSR 83-7 не является положительным модулятором связывания инсулина с Hinsr.

Антитело к INSR 83-7 ранее было идентифицировано как специфическое к рецептору инсулина человека, однако не было доказано, что антитело 83-7 обладает какими-либо модулирующими свойствами на связывание инсулина с рецептором инсулина. Для оценки способности антитела 83-7 кинетически модулировать взаимодействия инсулин/рецептор инсулина, опосредованное инсулином фосфорилирование АКТ было измерено в присутствии 83-7.

Последовательности VH и VL, кодирующие антитело 83-7 (McKern et al., Nature 443:218-221, 2006), были синтезированы, и антитело (IgG1, легкая лямбда-цепь) было временно экспрессировано в клетках HEK293 EBNA. Антитело было очищено с использованием захвата белка А и эксклюзионной хроматографии. Способность 83-7 усиливать индуцируемое инсулином фосфорилирование серина АКТ была измерена с использованием способа, описанного в примере 5. Фиг. 44 отображает результаты анализа pAKT для антитела 83-7 и Ab001 на клетках CHOK1, экспрессирующих (A) INSR человека или (B) INSR мыши. Антитело 83-7 не характеризовалось положительной модуляцией инсулинозависимой сигнализации INSR, обладая только агонистической активностью на INSR человека и не обладая агонистической активностью на INSR мыши. В отличие от этого, Ab001 положительно модулировало инсулинозависимую сигнализацию INSR примерно в 10 раз для INSR человека и INSR мыши.

Пример 21.

Анализ для измерения модуляции аффинности связывания инсулина с INSR антителами к INSR.

Для определения способности модулирующих антител влиять на связывание инсулина с рецептором инсулина, аффинность немодифицированного связывания инсулина с INSR человека, экспрессируемого на поверхности бессывороточных клеток CHOK1 (hINSR8-CHOK1), была измерена в присутствии и отсутствии моноклональных антител к INSR. Анализ KinExA был разработан для измерения очень низких уровней инсулина в питательной среде с клетками. Этот анализ позволяет инсулину связываться с клетками, экспрессирующими INSR, который может быть измерен путем определения уровня снижения инсулина из питательной среды клеток. Как только инсулин свяжется с клетками, концентрация инсулина в питательной среде клеток падает. Путем использования титрации клеток, экспрессирующих INSR, и измерения процента несвязанного инсулина, аффинность взаимодействия INS/INSR может быть оценена с использованием программного обеспечения KinExA. Такой анализ используют для измерения степени модуляции активности связывания инсулина при использовании различных антител к INSR.

Клетки hINSR8-CHOK1 были обеднены на предмет содержания сыворотки в течение ночи и затем приготовлены для анализа путем пеллетирования клеток и ресуспендирования в концентрации 2X от финальной концентрации для анализа для максимальных разведений (между $3,5\times10^7$ и $2,0\times10^7$ клеток/мл в буфере разведения ФСБ для анализа (Teknova, Hollister CA) с 500 мкг/мл БСА и 0,1% натрия азидом (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)). Двукратное серийное разведение клеток было приготовлено, включая серию десятибалльных разведений, при этом клеток в качестве контроля не использовали. Были отобраны аликвоты суспензий клеток в полипропиленовые пробирки для анализа объемом 2 мл каждая. В каждую пробирку к таким суспензиям клеток было добавлено 1 мл исследуемого антитела 40 мкг/мл (или 100 мкг/мл для Ab078), осторожно перемешано и инкубировано в течение 30-45 мин на льду. Используемые антитела были тестированы в сравнении с отрицательным контрольным антителом IgG2 человека к KLH. Для установления финальной концентрации инсулина 50 пМ (300 пг/мл) (Sigma-Aldrich, St. Louis,

MO), в каждую пробирку было добавлено 1 мл инсулина 200 пМ. Образцы были инкубированы в течение ночи при 4°C в течение 18 ч, затем центрифугированы до пеллетов клеток, и супернатант был отобран для исследования. Анализ KinExA 3000 проводили с использованием гранул, покрытых моноклональным антителом к инсулину. 2 г гранул из полиметилметакрилата (PIMA) (Sāpidyne, Boise, ID) было суспендировано в 9 мл буфера для анализа ФСБ, содержащем 65 мкг/мл клона D6C4 мышиного моноклонального антитела к инсулину (Fitzgerald Industries, Acton MA). Гранулы были подвергнуты перемешиванию при комнатной температуре в течение 6 ч, затем им дали осесть. Супернатант был замещен ФСБ с 50 мг/мл БСА фракции V (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), и пробирки были подвергнуты перемешиванию в течение ночи при 4°C. Используемый для определения раствор был представлен биотинилированным клоном антитела мыши D3E7 к инсулину (Fitzgerald Industries, Acton MA) при концентрации 0,15 мкг/мл в буфере для анализа со стрептавидином-ФЭ в концентрации 1 мкг/мл (Invitrogen, Carlsbad, CA). С использованием KinExA 3000 образцы вводили при скорости 0,25 мл/минута в течение 240 с, затем промывали в течение 60 с в буфере для промывки (ФСБ с 0,05% натрия азида), затем вводили раствор для определения в течение 240 с, после чего проводили финальное промывание в течение 90 с со скоростью 1 мл/мин. Была измерена разница в напряжении ранней временной точки начала и временной точки около завершения прогона, и такое значение использовали для расчета аффинности. Концентрация INSR на клетках была установлена на уровне $2,5\times10^5$ рецепторов/клетка. Аффинность была определена с использованием программного обеспечения (Sāpidyne, Boise ID), а значение EC_{50} рассчитано по нелинейному выравниванию в Prism (GraphPad Software, La Jolla CA.).

Целый ряд антител к INSR повышал аффинность инсулина к клеткам. Другие антитела не обладали эффектом на аффинность инсулина к клеткам (табл. 8). Одно из исследуемых антител снижало аффинность инсулина к клеткам примерно в 3 раза. Фиг. 45 отображает процентный показатель несвязанного инсулина относительно оцененной концентрации рецептора инсулина. Уровень инсулина был зафиксирован на значении 50 пМ, и концентрация антитела составила 10 мкг/мл (67 нМ) для всех клонов, за исключением Ab078, которое было тестировано при концентрации 25 мкг/мл (167 нМ). Представленные кривые являются нелинейным регрессионным выравниванием в Prism, используемым для вычисления EC_{50}.

Фиг. 46 отображает процентный показатель несвязанного инсулина относительно оцененной концентрации рецептора инсулина. Уровень инсулина был зафиксирован на значении 50 пМ, и концентрация антитела составила 10 мкг/мл (67 нМ) для всех клонов. Представленные кривые являются нелинейным регрессионным выравниванием в Prism, используемым для вычисления EC_{50}.

Таблица 8

Антитело	K_D (пМ)	EC50 (пМ)	Кратное смещение аффинности
lgG2-KLH	272	365	1,0
Ab037	271	471	1,0
Ab001	49	104	+5,6
Ab053	228	33	+1,2
Ab062	762	760	-2,8
Ab078	41	80	+6,6
Ab079	12,1	40	+22,5
Ab080	11,2	34	+24,3
Ab083	13,7	39	+19,9
Ab085	34	70	+8,0

Пример 22.

Анализ для измерения пролиферации клеток MCF-7, опосредованной инсулином, IGF-1 и IGF-2, в присутствии или отсутствии антител к INSR.

Инсулин, IGF-1 и IGF-2 способствуют митогенезу в клетках MCF-7 аденокарциномы молочной железы человека. Проведенные ранее исследования показали, что аналоги инсулина способствуют митогенной сигнализации в добавление к метаболической сигнализации с последующим связыванием с INSR. Положительные модулирующие и агонистические антитела к INSR, описанные в тексте данного изобретения, как оказалось, способствовали опосредованной INSR митогенной сигнализации параллельно активации INSR-опосредованной метаболической сигнализации. Эффекты модулирующих антител на инсулин-опосредованные митогенные стимулы измеряли с использованием клеток MCF-7, экспрессирующих рецепторы.

Клетки MCF-7 были культивированы в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM), содержащей глюкозу в концентрации 4,5 г/л, дополненной 10% ФСБ и 2 мМ глутамина (Invitrogen) для нормального выдерживания. Для анализа пролиферации клетки были высеяны в 96-луночные белые непрозрачные планшеты для микротитрации при плотности 1×10^4 клеток/лунка (Costar 3917), и дали клеткам повторно соединиться в течение 24 ч. Спустя 24 ч клетки были дважды промыты предвари-

тельно нагретым ФСБ и инкубированы в DMEM, содержащем глюкозу 1 г/л, без красного фенола, с добавлением 0,1% ФСБ и 2 мМ глутамина (Invitrogen), и такая среда в течение следующих 24 ч обозначалась "обедненной средой". Инсулин (Sigma), IGF-1 (R&D Systems) и IGF-2 (R&D Systems) были приготовлены как 10× маточные растворы в обедненной среде и серийно разведены в 5 раз, начиная от 1 мкМ до 64 нМ (6 разведений), и добавлены к клеткам после 24-часового периода обеднения. Для экспериментов совместной инкубации, которые включают антитела к INSR вместе с фактором роста, был приготовлен маточный раствор 50 мкг/мл каждого антитела в обедненной среде и добавлен к клеткам перед добавлением фактора роста до финальной концентрации 5 мкг/мл.

Клетки были инкубированы при 37°C в течение 48 ч и клеточная пролиферация была измерена с использованием люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega). Результаты приведены в табл. 9.

Таблица 9

Результаты пролиферации MCF-7

	EC_{50} и 95% доверительные интервалы					
	Инсулин (нМ)		IGM-1 (нМ)		IGM-2 (нМ)	
	EC_{50}	95% ДИ	EC_{50}	95% ДИ	EC_{50}	95% ДИ
Нет антитела	0,80	0,48-1,33	1,73	1,07-2,08	1,30	0,80-2,11
KLH*	1,54	1,03-2,29	2,10	1,33-3,30	2,66	1,75-4,06
Ab001*	3,46	2,22-5,40	4,71	3,28-6,75	2,54	1,87-3,43
Ab037*	1,54	1,00-2,37	2,33	1,51-3,58	2,09	1,44-3,05
Ab083*	1,08	0,49-2,38	0,91	0,58-1,43	1,47	0,77-2,81
Ab085*	0,48	0,28-0,81	2,11	1,38-3,21	1,84	1,30-2,60

* концентрация антитела 5 мкг/мл.

Такие результаты показывают, что в присутствии антител к INSR, что удивительно, не отмечалось каких-либо значительных изменений в митогенном ответе на любой из указанных выше факторов роста в пределах 95% доверительного интервала. Возможно, что такие антитела могут реагировать перекрестным образом и слабо связываться с IGF-1 и IGF-2, но представленный выше анализ показывает, что любое возможное перекрестное связывание не вызывает функциональный эффект, т.е. не способствует сигнализации посредством рецептора. Это позволяет предположить, что антитела способны повышать соотношение опосредованной INSR метаболической к митогенной сигнализации.

Пример 23.

Эффекты антитела к INSR обращать инсулинрезистентное усвоение жирных кислот в дифференцированных адипоцитах 3T3-L1.

ФНО-α может ингибировать инсулинозависимое усвоение жирных кислот. Поскольку известно, что ФНО-α может вызывать резистентность к инсулину путем дезактивации промежуточных соединений сигнального пути инсулина, такого как IRS-1 (Nguyen et al., J. Biol. Chem. 280(42):35361-71, 2005; Luca and Olefsky, FEBS Let. 582: 97-105, 2008), которые также являются частью инсулинозависимого пути усвоения глюкозы, обратное ингибирование ФНО-α пути инсулинозависимого усвоения жирных кислот антителами к INSR является характерным признаком способности таких антител отменять опосредованное ФНО-α ингибирование инсулинозависимого усвоения глюкозы.

Эмбриональные фибробласты мыши 3T3-L1 могут быть индуцированы на дифференцировку в адипоциты, после чего они становятся высокочувствительными к опосредованному инсулином усвоению жирных кислот. Было установлено, что диета с высоким содержанием жиров является причиной резистентности к инсулину жировой ткани. Для исследования такого состояния in vitro, адипоциты 3T3-L1 были подвергнуты воздействию тремя несвязанными жирными кислотами (FFA), что привело к нарушенной передаче сигнала, опосредованной рецептором инсулина, и, в конце концов, снизило стимулированное инсулином усвоение глюкозы. Одна из нисходящих эффекторных молекул, индуцированная воздействием FFA и способствующая развитию резистентности к инсулину, представлена ФНО-α. Также было показано, что ФНО-α ингибирует инсулин-опосредованное усвоение жирных кислот и обеспечивает также определенную систему in vitro для оценки способности антител к INSR отменять обусловленный инсулином транспорт жирных кислот.

Клетки 3T3-L1 были культивированы в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла

(DMEM), содержащей глюкозу в концентрации 4,5 г/л, дополненной 10% сывороткой новорожденных телят (NCS; Invitrogen) и 2 мМ глутамина (Invitrogen) для нормального выдерживания. Для дифференцирования клеток в адипоциты в 96-луночных планшетах для микротитрации использовали следующий протокол (1) на день 5 было высеяно 2×10^3 клеток/лунка в 96-луночный планшет с черным/прозрачным дном (BD Falcon 353948); (2) на день 2 клетки достигли конфлюентности и были оставлены на дополнительных 2 дня; (3) на день 0 были добавлены среды для дифференциации; (4) на день 3 среда была заменена на нормальную среду роста, содержащую 0,425 мкМ инсулина; (5) на день 7 среда была заменена на нормальную среду для роста. Для индуцирования резистентности к инсулину были приготовлены 10× маточные растворы ФНО-α (R&D Systems) в нормальной среде для роста, и такие растворы были добавлены к клеткам на день 9 процесса дифференциации. Используемые рабочие концентрации ФНО-α находились между 1-10 нг/мл. Усвоение жирных кислот было начато клетками на день 10. Используемый протокол усвоения жирных кислот был следующим. Клетки были промыты в 2× сбалансированном соляном растворе Хенка (HBSS; Invitrogen), содержащем 0,2% не содержащего жирных кислот БСА (FAF-BSA; Sigma) и 20 мМ HEPES (Invitrogen), после чего был проведен процесс обеднения содержания сыворотки в HBSS в течение 1-2 ч при 37°C. Антитела к INSR или другие релевантные контрольные вещества были добавлены из 10× маточного раствора или HBSS, после чего проводили инкубацию при 37°C в течение 30 мин, добавлен инсулин в разведениях от 10× маточного раствора с последующей инкубацией при 37°C в течение 30 мин. Затем был добавлен равный объем восстановленного загрузочного буфера QBT Fatty Acid Uptake Assay (Molecular Devices) с последующей инкубацией при 37°C в течение 3 ч, и показатели чашек были считаны с использованием планшет-ридера в условиях флуоресценции для измерения интернализированных флуоресцирующих аналогов жирных кислот.

Фиг. 47 отображает тот факт, что ФНО-α индуцирует десенсибилизацию инсулин-опосредованного усвоения жирных кислот в адипоцитах 3T3-L1 в присутствии антитела к INSR Ab085. Табл. 10 показывает относительное значение EC_{50} для антител при усвоении жирных кислот, указывая, что Ab085 снижает EC_{50} для усвоения жирных кислот. В присутствии антитела Ab085 к INSR, индуцируемая ФНО-α десенсибилизация инсулин- опосредованного усвоения жирных кислот была практически восстановлена до значений контроля, не подвергнутого воздействию. Подобные результаты были получены и для Ab083.

Таблица 10

Значения EC_{50} и 95% доверительные интервалы

	Инсулин (нМ)	
	EC_{50}	95% ДИ
Только инсулин	0,77	0,37-1,60
+ ФНО-α	2,89	1,37-6,08
+ ФНО-α + антитело к KLH	3,39	1,42-8,11
+ ФНО-α + Ab085	0,32	0,14-0,75

ФНО-α концентрация 1,25 нг/мл.

Ab085 концентрация 50 мкг/мл.

Такие результаты показывают, что положительное модулирующее антитело может повышать усвоение жирных кислот в адипоцитах, что позволяет предположить, что такое антитело может использоваться для лечения нарушения или состояния, при котором повышение усвоения жирных кислот может оказаться полезным.

Пример 24.

Характеристика высокоочищенных антител к INSR по инсулинозависимой активации pAkt.

Определенное число вариаций было отмечено в ходе выполнения функциональных анализов pIRS-1 и pAKT от анализа к анализу. Также было определено, что такая вариабельность может быть снижена при очистке исследуемых антител с использованием дополнительного этапа в дополнение к очистке белком A, например, путем эксклюзионной хроматографии, что позволяет получить антитела с чистотой примерно >95%. Такой этап очистки снижал или элиминировал агрегаты и примесные факторы роста, которые, как считалось, мешают проведению функционального анализа.

В ходе анализа pAKT, описанного в примере 5, был тестирован целый ряд высокоочищенных антител к INSR с использованием клеток CHOK1, экспрессирующих INSR человека или INSR мыши. Кроме того, определенные антитела к INSR были исследованы на предмет своей активности на клетках линии CHOK1, трансфицированных INSR яванского макака (CHOK1-cynoINSR-4).

Эффекты положительных модулирующих антител к INSR Ab001, Ab037, Ab077, Ab079, AB080, Ab083 были измерены в ходе анализа pAKT, и результаты представлены на фиг. 48 (INSR человека) и Фиг. 49 (INSR мыши).

Относительные значения % pAKT для агонистических антител Ab037, Ab030, Ab053 и Ab062 для INSR человека и INSR мыши представлены на фиг. 50 и 51 соответственно.

Относительные значения % pAKT для положительных модулирующих антител и агонистических антител также были измерены в клетках CHOK1, экспрессирующих INSR4 яванского макака. Фиг. 52 отображает тот факт, что антитела к INSR Ab030, Ab037, Ab053, Ab001, Ab079, AB080 и Ab083 способны индуцировать фосфорилирование AKT после активации INSR обезьяны.

Кроме того, относительные значения % pAKT отрицательных модулирующих антител Ab061, Ab070 и Ab081 также были измерены в клетках CHOK1, экспрессирующих INSR человека. Результаты представлены в табл. 11 и на фиг. 53.

Таблица 11

	10 мкг/мл Ab061	20 мкг/мл Ab070	20 мкг/мл Ab081	20 мкг/мл контрольного изотипа MAT
EC50 инсулина	32,43	2,09	4,53	0,12
Кратное изменение в EC50 относительно контрольного изотипа MAT	269	17	38	
EC50 95% доверительные интервалы	14,36 до 73,25	1,686 до 2,598	3,503 до 5,843	0,09691 до 0,1496

Такие результаты показывают, что отрицательные модулирующие антитела повышают EC_{50} инсулина, в некоторых случаях, в несколько сот раз.

Пример 25.

Оценка видовой перекрестной реакционной способности антител к INSR.

Данный пример описывает использование анализа на основе FACS для оценки связывания антител к рецептору инсулина с клетками видов, таких как кролик и яванский макак, которые часто используются в токсикологических исследованиях. Антитела к INSR из библиотек фаговых дисплеев были подвергнуты скринингу на предмет связывания с моноцитами периферической крови человека, кролика и яванского макака, а также на предмет дифференциального связывания в присутствии или отсутствии лиганда (инсулина) с моноцитами указанных выше видов.

Цельная кровь яванского макака была получена из Калифорнийского национального исследовательского центра приматов (Davis, CA), а цельная кровь кролика была получена от LifeSource Biomedical, LLC (Moffett Field, CA). МКПК человека были очищены с использованием фиколла-пака от лейкоцитарной пленки, полученной от Американского общества Красного Креста. МКПК яванского макака и кролика затем были очищены с использованием градиентов фиколла-пака (Pharmacia). Очищенные МКПК были заморожены и хранились в жидком азоте перед использованием в анализе. МКПК человека, яванского макака и кролика были оттаяны и промыты в буфере FACS (0,5% БСА и 0,1% NaN_3 в ФСБ). После того, как клетки были приготовлены, их использовали в анализе окрашивания FACS при финальной концентрации 2×10^6 клеток/мл.

Для наблюдения за дифференциальным связыванием, клетки были инкубированы в присутствии или отсутствии инсулина с понижающимися концентрациями антитела к INSR при 4°C в течение 1 ч и промыты один раз буфером FACS. Связывание антитела к INSR было выявлено путем добавления антитела козы к IgG человека Alexa647 (Jackson ImmunoResearch) в течение 30 мин при 4°C. После двукратного промывания в буфере FACS, клетки были окрашены различными маркерами для захвата популяции моноцитов. Клетки человека и яванского макака были окрашены CD45 и CD14. Клетки кролика были окрашены CD11b и CD14. Затем антитела инкубировали в течение 20 мин и дважды промывали в буфере FACS. Потом клетки фиксировали 2% параформальдегидом, и перед анализом клеток был добавлен равный объем буфера FACS. Клетки были проанализированы с использованием FACScan™ (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ), и данные были проанализированы с использованием FloJo™ (Tristar, Paso Robles, CA) и GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

Связывание, отмечаемое для МКПК человека, кролика или яванского макака, было подтверждено путем получения клеточных линий CHO, которые экспрессируют рецептор инсулина соответствующих видов, с повторением описанного выше анализа связывания. Данные, представленные на фиг. 54, показывают, что существует много антител, которые связываются с рецептором инсулина человека и также связываются с рецептором инсулина кролика и яванского макака, и что такое связывание опосредовано присутствием инсулина.

Пример 26.

Измерение аффинности антител к INSR в присутствии и отсутствии инсулина человека.

Аффинность различных антител к INSR к рекомбинантному человеческому INSR, экспрессируемому на поверхности бессывороточных клеток CHOK1 (hINSR8-CHOK1), была измерена в присутствии и отсутствии инсулина. Анализ KinExA был разработан для измерения очень низких уровней инсулина в инкубационном буфере. Этот анализ позволяет антителам связываться с клетками, экспрессирующими INSR, который может быть измерен путем определения уровня снижения антитела в инкубационном буфере. Как только антитело свяжется с клетками, концентрация антитела в инкубационном буфере падает. Путем использования титрации клеток, экспрессирующих INSR, и измерения процента несвязанного антитела, аффинность взаимодействия INSR с антителом может быть оценена с использованием программного обеспечения KinExA. Данный анализ использовали для определения относительной аффинности исследуемых клонов антител в присутствии или отсутствии инсулина, и была показана инсулинозависимая модуляция связывания антитела с клетками.

Клетки hINSR8-CHOK1 были подвергнуты обеднению на содержание сыворотки в течение ночи и затем были приготовлены для анализа, как это описано в примере 20. В каждую пробирку с клетками для установления финальной концентрации инсулина 0 или 175 нМ (1 мкг/мл) был добавлен 1 мл инсулина 4 мкг/мл или буфер. Затем в каждую пробирку для получения финальной концентрации антитела 10 нг/мл или 66,6 пМ был добавлен 1 мл антитела 40 нг/мл. Образцы были инкубированы в течение ночи при 4°C в течение 18 ч, затем центрифугированы до пеллетов клеток, и супернатант был отобран для исследования в ходе KinExA. Анализ KinExA 3000 проводили в соответствии с описанием из примера 20 с использованием гранул, покрытых фрагментом $(Fab')_2$ антитела козы к IgG (H+L) человека (Jackson Immuno Research, West Grove PA). Используемый для определения раствор был представлен фрагментом R-PE-$(Fab')_2$ антитела козы к IgG (H+L) человека (Jackson Immuno Research, West Grove PA). Для мышиного антитела 83-7 гранулы были конъюгированы в соответствии с представленным выше описанием с антителом кролика к $F(ab')_2$ мыши (Jackson Immuno Research, West Grove PA), а используемый раствор для определения был представлен фрагментом R-PE-$(Fab')_2$ антитела козы к IgG(H+L) мыши (Jackson Immuno Research). Концентрация INSR на клетках была оценена как $2,5\times10^5$ рецепторов/клетка, после чего было предположено связывание двухвалентного антитела с INSR.

В табл. 12 представлена аффинность целого ряда антител к INSR в присутствии и отсутствии инсулина. Агонистические антитела Ab037, Ab053 и Ab062 обладают связыванием, независимым от инсулина, и характеризуются менее чем двукратным смещением аффинности в присутствии или отсутствии инсулина. Мышиное антитело 83-7 характеризовалось умеренным трехкратным смещением аффинности в присутствии инсулина, при этом положительные модулирующие антитела Ab001, Ab079, Ab080 и Ab083 характеризовались положительным модулированием связывания в присутствии инсулина, варьируя от 17-кратного для Ab080 до более чем 100-кратного для Ab001. Положительные модуляторы Ab077 и Ab078 обладают более слабой аффинностью в отсутствии инсулина, чем другие клоны, и, в результате этого, их аффинность "без инсулина" находилась за пределами диапазона анализа, который был ограничен максимальной концентрацией рецептора при условии использования клеток в качестве источника рецептора. Несмотря на то, что связывание таких клонов отмечалось в отсутствии инсулина, такое связывание существенно слабее в присутствии инсулина и модулировано в большей степени, чем для 83-7, однако степень модулирования не может быть установлена точным образом при данных условиях анализа. Ab085 характеризовалось отсутствующим или незначительным связыванием в отсутствии инсулина, и такое связывание было определено как инсулинозависимое.

Таблица 12

Аффинность антител к клеткам hINSR8-CHOK1

MAT	С инсулином	Без инсулина	Кратное улучшение с инсулином
Ab001	1,16E-10	1,20E-08	103
Ab037	8,00E-11	1,08E-10	1,4
Ab053	9,60E-11	1,48E-10	1,5
Ab062	1,08E-10	1,24E-10	1,1
Ab077	6,40E-09	Вне диапазона*	
Ab078	3,40E-10	Вне диапазона*	
Ab079	4,96E-10	9,60E-09	19,4
Ab080	6,80E-10	1,20E-08	17,6
Ab083	3,76E-10	7,60E-09	20,2
Ab085	2,00E-10	Нет связывания	
83-7	1,60E-10	4,80E-10	3,0

Пример 27.

Связывание антител к INSR с антигенной детерминантой.

Для определения способности различных антител к INSR связываться с потенциально подобными антигенными детерминантами или наличия у них различных связующих свойств и способности распознавания различных антигенных детерминант, был предпринят многофакторный подход к количественному определению антигенных детерминант. Проводили эксперименты конкурентного связывания или "количественного определения", а также анализ способности антител связываться с различными видами рецепторов инсулина человека и мыши, а также их способности связываться в присутствии и отсутствии инсулина. Все это является факторами для определения потенциального сходства или различия сайтов связывания с антигенными детерминантами антител. Анализы проточной цитометрии проводили путем анализа связывания биотинилированного IgG с бессывороточными клетками hINSR8-CHOK1 и клетками mINSR-CHOK1 в присутствии и отсутствии инсулина.

Для анализа конкурентного связывания клетки hINSR8-CHOK1 и mINSR-CHOK1 были подвергнуты обеднению на наличие сыворотки в течение ночи, а затем приготовлены для анализа, как это описано в примере 20. В некоторых вариантах воплощения изобретения возможно рассчитать количество рецепторов на поверхности клеток для проведения анализов конкурентного связывания. Например, уровни экспрессии рецептора на клетках hINSR8-CHOK1 были определены изначально путем стандартного окрашивания клеток и способа проточной цитометрии. Краткое описание: анализ проводился путем окрашивания клеток с насыщающей концентрацией моноклонального антитела MA-20 (ThermoFisher Scientific, Waltham MA) и определения конъюгированного с R-фикоэритрином антитела козы к IgG мыши (Jackson Immuno Research, West Grove PA), а затем сравнения относительной флуоресценции с использованием BD Quantibrite™ PE Beads (BD Biosciences, Franklin Lakes NJ) для получения числа связанных молекул фикоэритрина и экстраполяции числа рецепторов инсулина, основываясь на количестве связанных молекул фикоэритрина. Такое количество затем было дополнительно тестировано и проанализировано с использованием KinExA, как это описано в Rathanaswami et al. (Analytical Biochemistry 373:52-60, 2008). Краткое описание: эксперименты KinExA проводили при наблюдении связывания антитела и инсулина, при этом концентрация лиганда была намного выше, чем описанная здесь комбинация для определения аффинности, что приводит к возникновению более стехиометрически ограниченного ответа на дозу. Данные были проанализированы с использованием программного обеспечения (Sapidyne, Boise ID) и модели неизвестного лиганда, и для подтверждения концентрации связанного рецептора использовали добавочный параметр для лиганда. Например, в данном анализе установлено, что клетки hINSR8-CHOK1 после обеднения содержания сыворотки экспрессировали примерно 250000 тетрамерных рецепторов INSR на клетку. Относительно аффинности антитела это обозначает стехометрию 2 антител на тетрамер рецептора, а также соотношение тетрамера к инсулину 1:1 для высокой аффинности сайта связывания инсулина.

Антитела для исследования были биотинилированы с использованием стандартных реакций с аминами и активированного PEG4-биотина (Thermo-Fisher, Waltham MA). Также исследовали мышиные антитела 83-7 и 83-14. Сообщалось, что такие антитела связываются с аминокислотами 233-281 домена CR и домена FnIII-I INSR соответственно (McKern et al., 2006; Nature 443: 218-21). После обеднения содержания сыворотки трансфицированных клеток в течение ночи, клетки были окрашены с титрацией биотинилированных антител в присутствии 1 мкг/мл инсулина. Антитела были инкубированы на клетках при 4°C примерно 30 мин. Затем образцы были промыты дважды в буфере FACS, и для определения биотинилированного антитела использовали стрептавидин-фикоэритрин (Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove, PA, USA). Концентрации биотинилированных антител, используемых в эксперименте количественного определения, были выбраны на основе субнасыщения, но при наличии все еще сильного сигнала относительно линии клеток человека в присутствии инсулина. Как только были определены концентрации биотинилированных антител для использования в эксперименте, анализ конкурентного связывания был выполнен следующим образом.

Клетки были подвергнуты обеднению содержания сыворотки в течение ночи и затем ресуспендированы в холодном буфере FACS с или без 1 мкг/мл инсулина человека. Затем клетки были смешаны 1:1 с 60 мкг/мл холодного или немеченого конкурирующего антитела и инкубированы при 4°C в течение примерно 30 мин, при этом концентрация холодного антитела была установлена на уровне 30 мкг/мл. Затем были добавлены биотинилированные антитела с разведением 1:2 (трехкратная концентрация) с последующей инкубацией при 4°C в течение примерно 30 мин. Затем клетки были промыты дважды в буфере FACS, определены с использованием стрептавидина-фикоэритрина и проанализированы на анализаторе FACS (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Было проведено сравнение MFI между биотинилированными антителами при смешивании с несвязывающимся контрольным антителом или конкурирующим антителом. Степень связывания была измерена на линии клеток человека и мыши и в присутствии или отсутствии инсулина. Использовали матричный способ, при котором каждое биотинилированное антитело тестировали относительно каждого холодного конкурента. Антитела с одинаковыми профилями конкуренции считаются включенными в одну группу. Типичные группы представлены в табл. 13 и получены в клетках hINSR8-CHOK1 в присут-

ствии инсулина, т.к. фактически все клоны обладают максимально сильным связыванием при данных условиях. Клоны, представленные в табл. 13, меченые для отражения других связующих свойств, таких как инсулинозависимость и реакционная способность мышиных антител.

Результаты эксперимента позволили получить примерно семь различных конкурирующих групп антител к INSR. Антитело с отсутствием конкурирования определяют как антитело, обладающее менее чем 30%-ым конкурированием, частичное конкурирование представлено конкурированием более чем 30%-ым и менее чем 80%-ым, и полное конкурирование представлено более чем 80%-ым конкурированием с использованием способа, описанного выше для клеток hINSR8-CHOK1.

Антитела, которые картированы в группу 1, являющиеся человеческими и мышиными реакционоспособными антителами, не конкурировали с AB079, AB076, AB083, частично или полностью конкурировали с AB085 и AB086, и полностью конкурировали с AB030, AB037, AB053, AB001, AB018 и AB064, AB040.

Антитела из группы 2, являющиеся человеческими и мышиными реакционоспособными антителами, обладали таким же профилем, как и антитела из группы 1, но не конкурировали с AB086 и частично конкурировали с AB078.

Антитела из группы 3, которые связываются с INSR человека и мыши, не конкурировали с Ab062 и Ab086, частично конкурировали с Ab086, Ab064, Ab001, Ab018, и полностью конкурировали с Ab079, Ab076, Ab083, Ab080, Ab062 и Ab020, Ab019, Ab088, Ab089.

Антитела из группы 4, которые связываются только с рецептором человека, не конкурировали с Ab062, Ab086, Ab001, Ab018, Ab030, Ab037, Ab064 и полностью конкурировали с Ab079, Ab076, Ab083, Ab080, Ab062 и Ab020, Ab019, Ab088, Ab089.

Антитела из группы 5 не конкурировали с AB077, AB001, AB018, AB030, AB037, AB079, AB076, AB083, AB019, AB088, AB089 и AB040 и полностью конкурировали с AB064, AB062, AB085 и AB078. Такие антитела реагируют с рецептором человека и мыши.

Антитела из группы 6 обладали полным и частичным конкурированием почти со всеми исследуемыми клонами. Клон Ab061 характеризовался менее чем 30%-ым конкурированием с Ab019, и клон Ab074 не конкурировал с Ab088. Такие антитела реагируют с рецептором человека и мыши.

Антитела из группы 7 не конкурировали с Ab053, Ab064, 83-7, Ab019, Ab088 и Ab089, частично конкурировали с Ab037, Ab078, Ab083, Ab080 и Ab085 и полностью конкурировали с Ab040, Ab062, Ab030, Ab001 и Ab018. Такие антитела реагируют с рецептором человека и мыши.

Конкурирующие антитела из группы 4, которые включают мышиный клон 83-7, содержали все клоны с отсутствующей реакционной способностью к рецепторам мыши. Группирование антител коррелировало с их функциональными свойствами. Все человеческие агонистические антитела сгруппированы в группу 1. Положительные модулирующие антитела сгруппированы в группы 3 и 5, за исключением Ab004. Антитела из группы 3 связываются с комплексом INSR-инсулин и INSR, в то время как антитела из группы 5 связываются с комплексом INSR-инсулин, но не связываются с INSR.

Таблица 13

Группы антител

1	2	3	4	5	6	7
Ab030	83-14	Ab079	Ab020	Ab078	Ab061	Ab004
Ab037		Ab080	Ab019	Ab085	Ab074	
Ab053		Ab083	Ab088		Ab077	
Ab001			Ab089			
Ab018			Ab087			
Ab086			83-7			
Ab062			Специфичное к рецептору человека			
Ab064						
Ab040						

Агонист

Положительный модулятор (комплекс-специфическое связывание)

Положительный модулятор (связывает включенный в комплекс и не связанный INSR)

Отрицательный модулятор

Принимается, что многочисленные модификации и изменения по изобретению, изложенные в иллюстративных примерах выше, станут очевидными для специалиста в данной области. Вследствие этого, в изобретение будут включены только ограничения, представленные в прилагаемой формуле изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, связывающееся с (i) рецептором инсулина или (ii) комплексом, включающим инсулин и рецептор инсулина, или связывающееся с (i) и (ii), с равновесной константой диссоциации K_D 10^{-5} M или менее; при этом антитело способно ослаблять аффинность связывания между инсулином и рецептором инсулина по меньшей мере примерно в 3 раза, где антитело включает (a) все шесть CDR Ab081 (SEQ ID NO: 279, 139) или (b) вариабельный участок тяжелой цепи SEQ ID NO: 279 и вариабельный участок легкой цепи SEQ ID NO: 139.

2. Антитело, связывающееся с (i) рецептором инсулина или (ii) комплексом, включающим инсулин и рецептор инсулина, или связывающееся с (i) и (ii), с равновесной константой диссоциации K_D 10^{-5} M или менее; при этом антитело способно ослаблять аффинность связывания между инсулином и рецептором инсулина по меньшей мере примерно в 3 раза, где антитело включает (a) все шесть CDR Ab061 (SEQ ID NO: 241, 103) или (b) вариабельный участок тяжелой цепи SEQ ID NO: 241 и вариабельный участок легкой цепи SEQ ID NO: 103.

3. Антитело, связывающееся с (i) рецептором инсулина или (ii) комплексом, включающим инсулин и рецептор инсулина, или связывающееся с (i) и (ii), с равновесной константой диссоциации K_D 10^{-5} M или менее; при этом антитело способно ослаблять аффинность связывания между инсулином и рецептором инсулина по меньшей мере примерно в 3 раза, где антитело включает (a) все шесть CDR Ab070 (SEQ ID NO: 258, 119) или (b) вариабельный участок тяжелой цепи SEQ ID NO: 258 и вариабельный участок легкой цепи SEQ ID NO: 119.

4. Антитело по любому из пп.1-3, отличающееся тем, что способно ослаблять аффинность связывания между указанным инсулином и рецептором инсулина примерно от 3 до 500 раз.

5. Антитело по п.4, где антитело повышает EC_{50} сигнальной активности инсулина примерно от 2 до 1000 раз в pAKT анализе.

6. Антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что включает константный участок IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека.

7. Антитело по п.6, где константный участок включает Fc участок с измененной эффекторной функцией.

8. Антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что является моноклональным антителом.

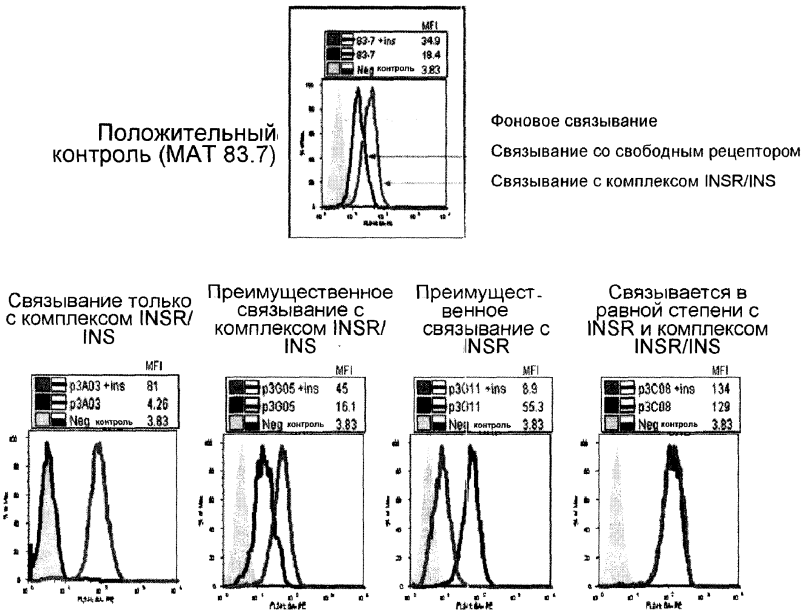
9. Антитело по п.8, отличающееся тем, что моноклональное антитело является человеческим, гуманизированным, химерным или одноцепочечным (scFv) антителом, или конъюгированным с гидрофобной молекулой.

10. Антитело по п.1, где вариабельный участок тяжелой цепи приведен в SEQ ID NO: 279 и вариабельный участок легкой цепи приведен в SEQ ID NO: 139.

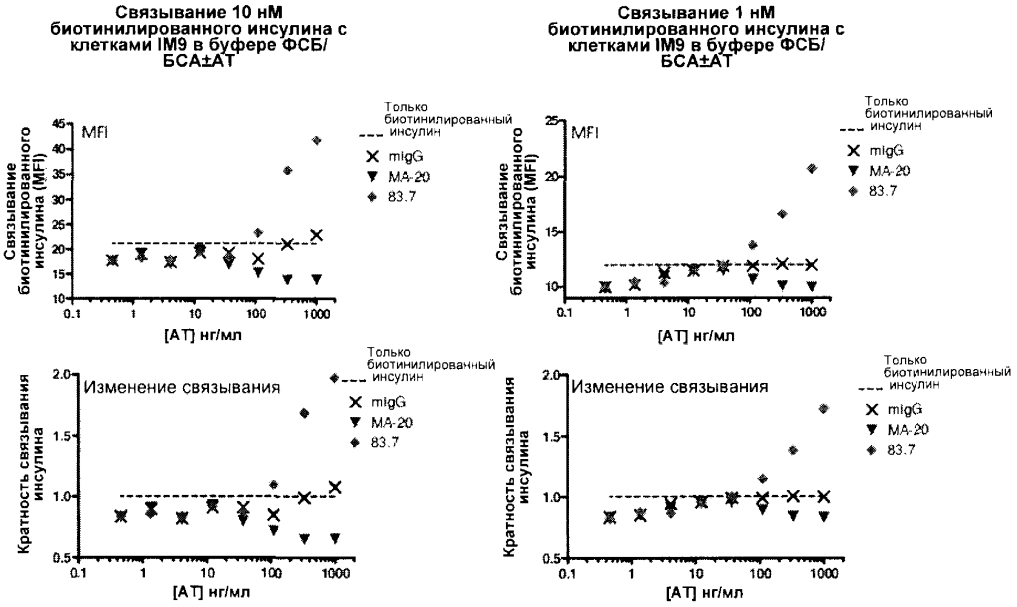
11. Антитело по п.1, где три CDR тяжелой цепи приведены в SEQ ID NO: 279 и три CDR легкой цепи приведены в SEQ ID NO: 139.

12. Стерильная фармацевтическая композиция для лечения или профилактики болезненных состояний, характеризующихся аномальной выработкой и/или использованием инсулина, включающая антитело по любому из пп.1-11 и стерильный фармацевтически приемлемый разбавитель.

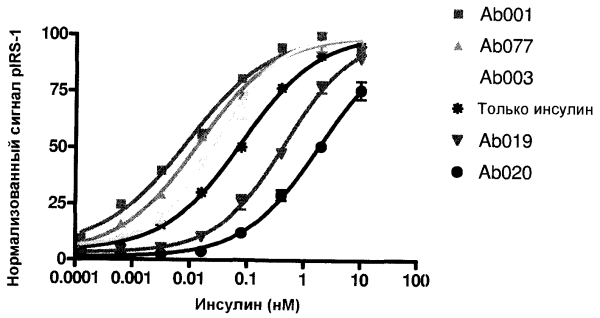
13. Применение антитела по любому из пп.1-11 при получении лекарственного средства для лечения состояния, ассоциированного с гиперинсулинемией или избыточной инсулиновой сигнализацией, инсулиномы, передозировки инсулином, гипогликемии, незидиобластоза (диффузного заболевания KATP-H1, фокального заболевания KATP-H1 или "PHHI"), GDH-H1 (синдрома гиперинсулинизма/гипераммониемии (HI/HA), лейцин-чувствительной гипогликемии или диазоксид-чувствительной гипогликемии), синдрома дисрегуляции островковых клеток, идиопатической гипогликемии у младенцев, персистирующей гиперинсулинемической гипогликемии младенцев (PHHI), врожденного гиперинсулинизма, гипогликемии, вызванной почечной недостаточностью (острой или хронической), и гипогликемии, вызванной хроническим заболеванием почек.



Фиг. 1

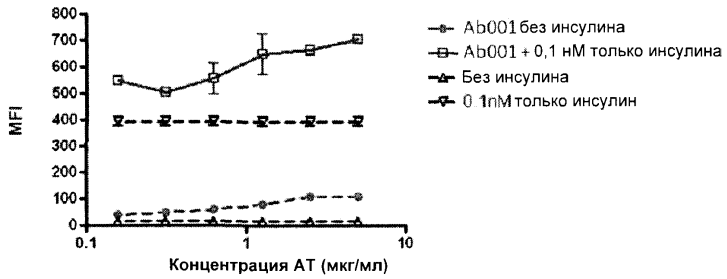


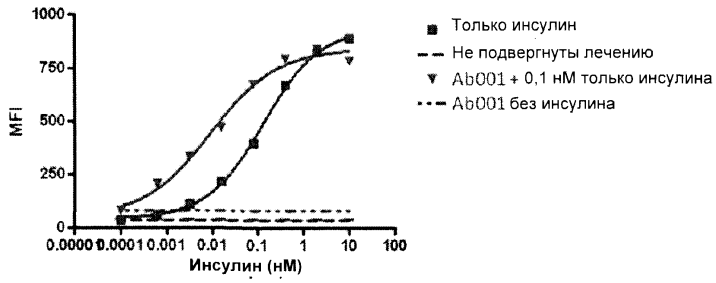
Фиг. 2



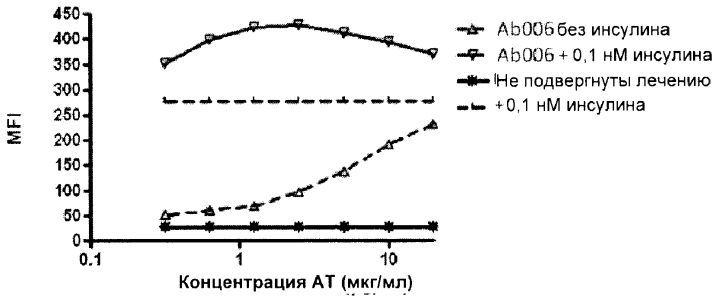
Фиг. 3

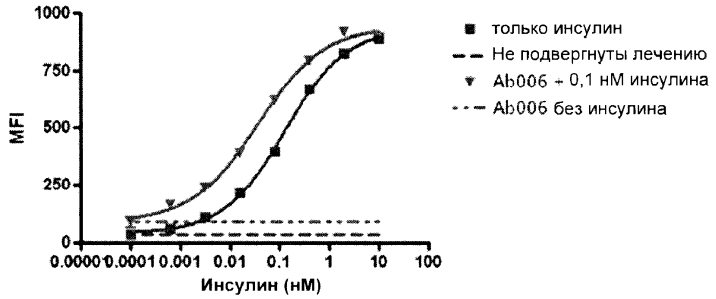
A Положительный модулятор



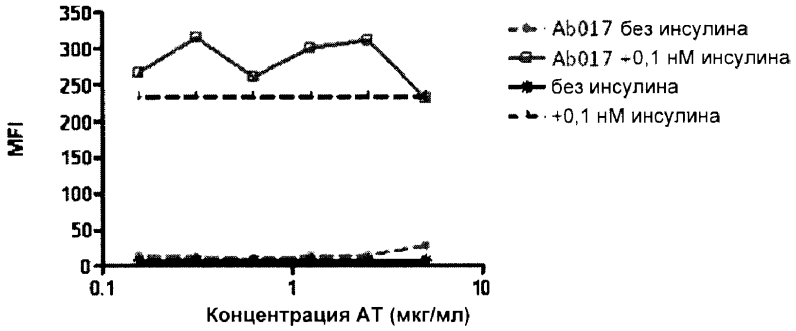


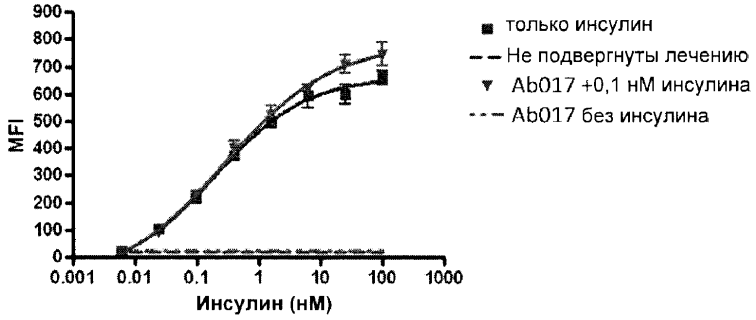
B. Положительный модулятор со значительным агонизмом



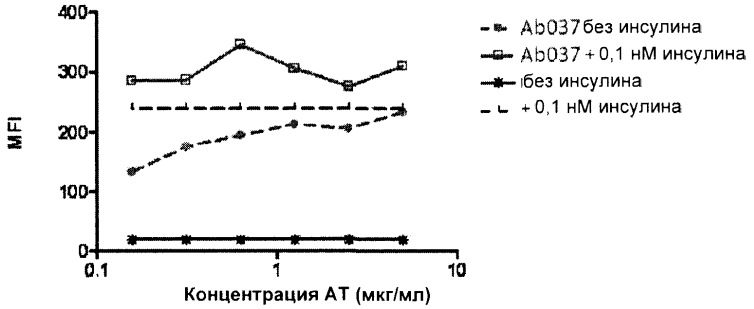


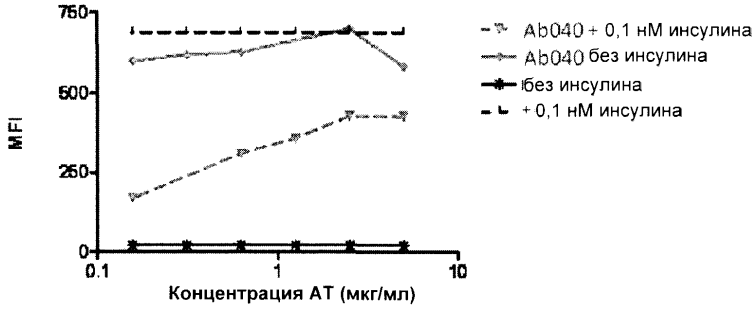
C. Немодулятор



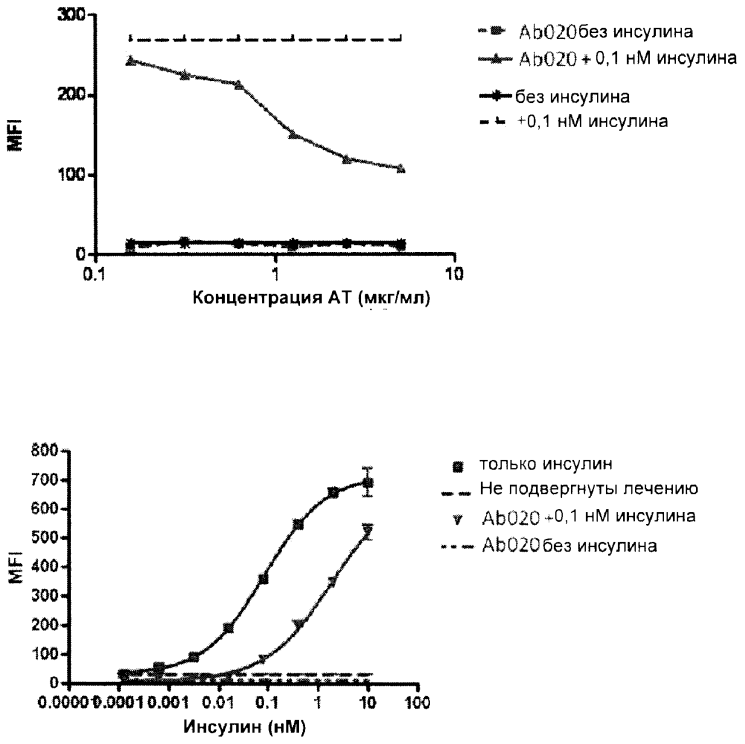


D. Агонистические антитела





E. Отрицательный модулятор

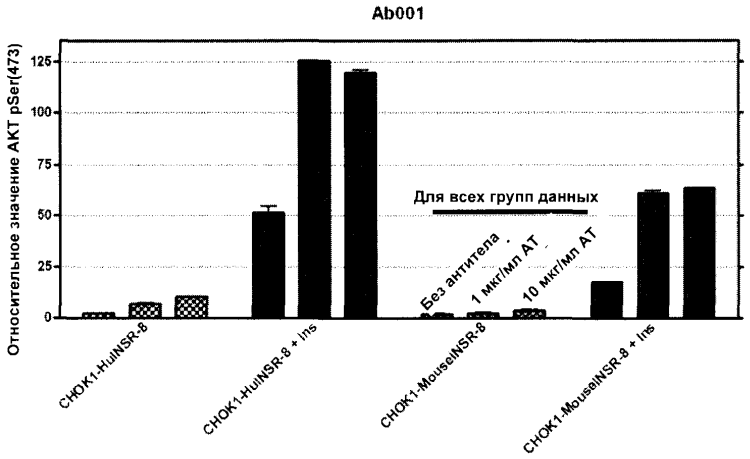


Фиг. 4

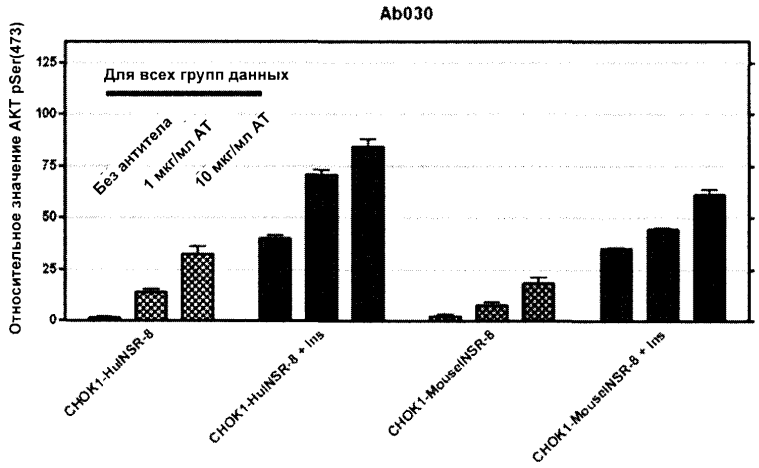
АТ	*Тип АТ*	*[АТ] (мкг/мл)*	*EC50 инсулина (нМ)*		*Кратное изменение в EC50 инсулина*			*Свойство АТ*
			Только инсулин	*Инсулин+ антитело*	*-АТ EC50/+АТ EC50*	*+АТ EC50/-АТ EC50*	*Абсолютное изменение*	
Ab001	IgG2	5,00	0,11	0,0048	23,32	0,04	23,32	АТ со значительной положительной модуляцией
Ab002	IgG2	2,50	0,12	0,0166	7,32	0,14	7,32	
Ab003	IgG2	2,25	0,12	0,0171	7,11	0,14	7,11	
Ab004	IgG2	5,00	0,13	0,0239	5,34	0,19	5,34	
Ab005	Fab	2,50	0,08	0,0188	4,48	0,22	4,48	
Ab006	IgG2	1,25	0,13	0,0367	3,47	0,29	3,47	
Ab007	IgG2	5,00	0,11	0,0346	3,22	0,31	3,22	
Ab008	Fab	0,63	0,08	0,0270	3,11	0,32	3,11	
Ab009	IgG2	5,00	0,13	0,0461	2,77	0,36	2,77	
Ab010	IgG2	2,50	0,12	0,0463	2,62	0,38	2,62	
Ab011	IgG2	2,50	0,13	0,0719	1,78	0,56	1,78	АТ без значительной модуляции
Ab012	IgG2	2,50	0,08	0,0504	1,67	0,60	1,67	
Ab013	IgG2	1,25	0,08	0,0540	1,56	0,64	1,56	
Ab014	IgG2	5,00	0,11	0,0984	1,13	0,88	1,13	
Ab015	IgG2	1,25	0,20	0,2450	0,82	1,23	1,23	
Ab016	IgG2	1,25	0,20	0,2714	0,74	1,36	1,36	
Ab017	IgG2	2,50	0,20	0,2747	0,73	1,37	1,37	
Ab018	IgG2	5,00	0,09	0,2969	0,29	3,48	3,48	АТ со значительной отрицательной модуляцией
Ab019	Fab	5,00	0,09	0,4527	0,19	5,31	5,31	
Ab020	IgG2	5,00	0,09	1,8570	0,05	21,79	21,79	

Фиг. 5

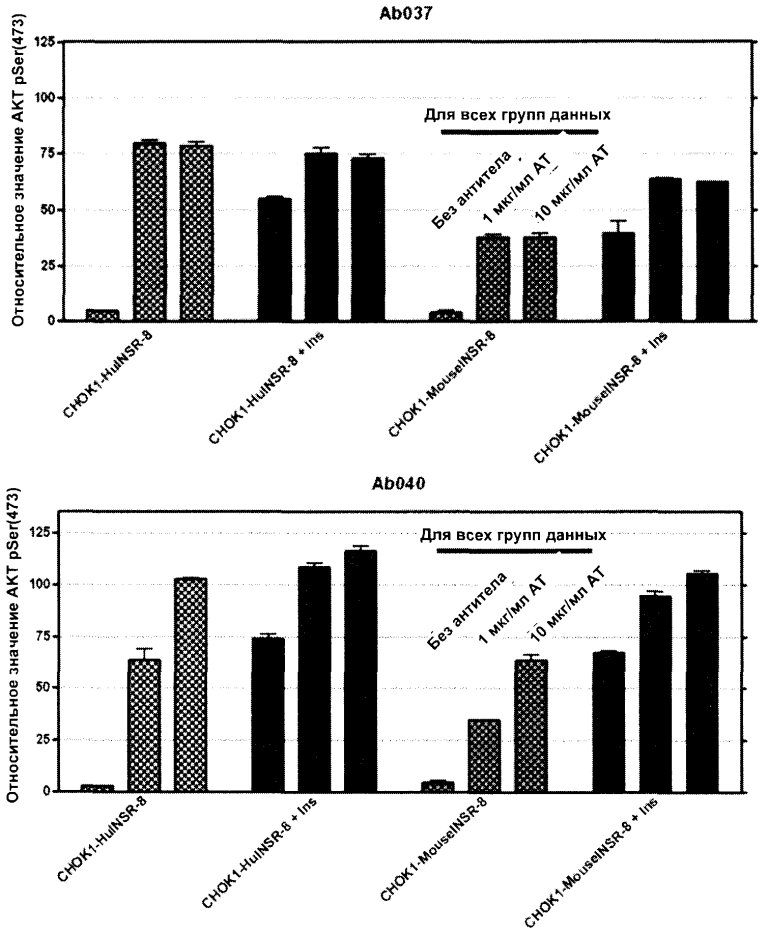
A. Положительный модулятор с очень низким агонизмом



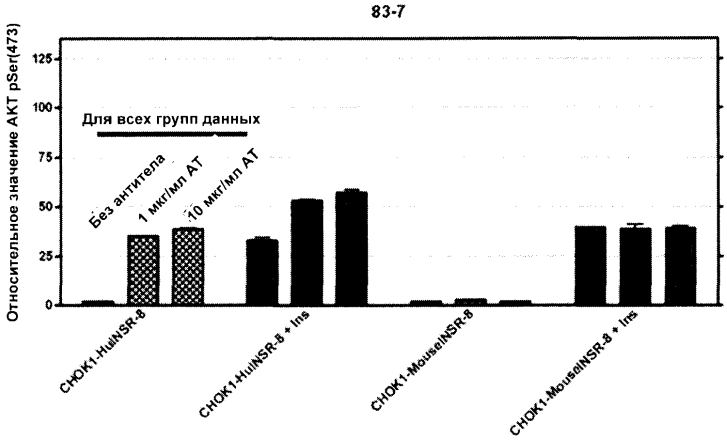
B. Положительный модулятор с агонизмом



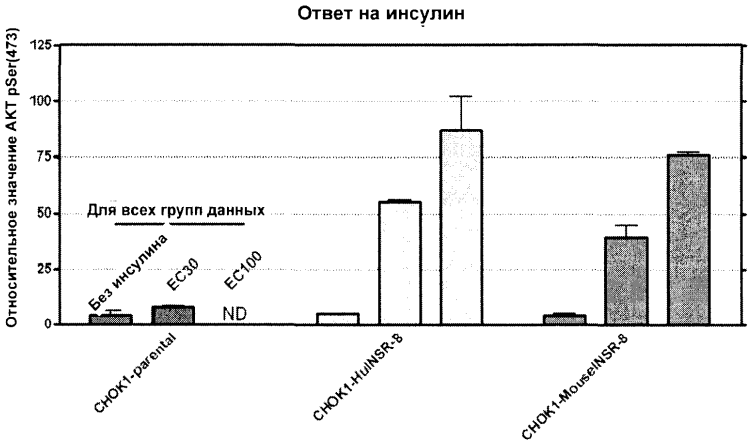
C. Агонистические антитела



D. 83-7



E. Ответ на инсулин и основной ответ в отсутствие антитела



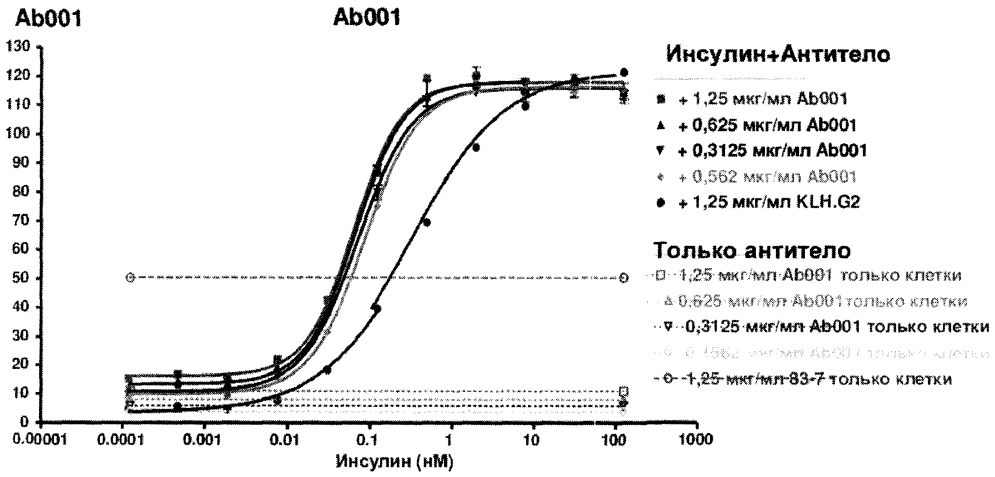
Фиг. 6

Класс агонизма	*Антитело*	*Агонизм INSR путем pIRS-1*	*Агонизм INSR человека путем pAkt*	*Агонизм INSR мыши путем pAkt*	*Перекрестная реактивность с INSR способом FACS*	*Перекрестная реактивность с INSR способом pAkt*
АТ со слабым или очень слабым агонизмом	Ab021	да	но	но	но	но
	Ab022	да	но	но	но	но
	Ab023	да	но	но	но	но
	Ab024	да	но	но	нет	но
	Ab025	да	но	но	нет	но
	Ab026	да	но	но	нет	но
	Ab027	да	но	но	нет	но
	Ab028	да	но	но	нет	но
	Ab013	да	но	но	нет	но
	Ab011	да	но	но	да	но
	Ab001	да	да	нет	да	да
	Ab015	да	да	нет	нет	нет
	Ab002	да	да	нет	нет	нет
АТ с умеренным агонизмом	Ab029	да	но	но	но	но
	Ab017	да	да	нет	да	нет
	Ab030	да	да	да	да	да
	Ab031`	да	но	но	нет	но
	Ab009	да	да	да	да	да
	Ab032	да	да	да	да	да
	Ab018	да	но	но	да	но
	Ab033	да	но	но	да	но
	Ab012	да	да	нет	нет	да
	Ab014	да	да	да	да	да
	Ab034	да	но	но	но	но
	Ab010G1	да	да	нет	нет	нет
	Ab010G2	да	да	нет	да	да
	Ab003	да	но	но	но	но
АТ с сильным агонизмом	Ab006	да	да	да	да	да
	Ab035	да	но	но	нет	но
	Ab036	да	да	да	да	да
	Ab037	да	да	да	да	да
	Ab038	да	да	нет	да	нет
	Ab039	да	да	да	да	да
	Ab040	да	да	да	да	да
	Ab041	да	но	но	но	но
	Ab042	да	но	но	нет	но
	Ab043	да	да	да	да	да
	Ab044	да	но	но	да	но
	Ab045	да	но	но	да	но
	Ab046	да	да	да	да	да
	Ab047	да	но	но	нет	но
	Ab048	да	да	нет	да	нет
	Ab049	да	да	нет	нет	нет

но = не определено

Фиг. 7

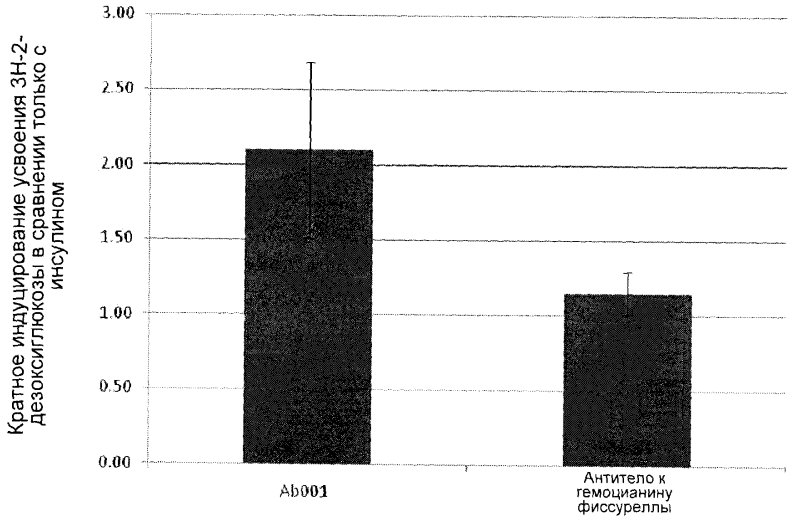
A



B

Концентрация АТ (мкг/мл)	УКЛОН ХИЛЛА	EC50 (пМ)	Кратное изменение в EC50
1.25 Ab001	1,49	51	5,9
0.62 Ab001	1,44	53	5,7
0.31 Ab001	1,32	57	5,3
0.15 Ab001	1,33	68	4,4
1.25 антитело к KLH	0,76	301	

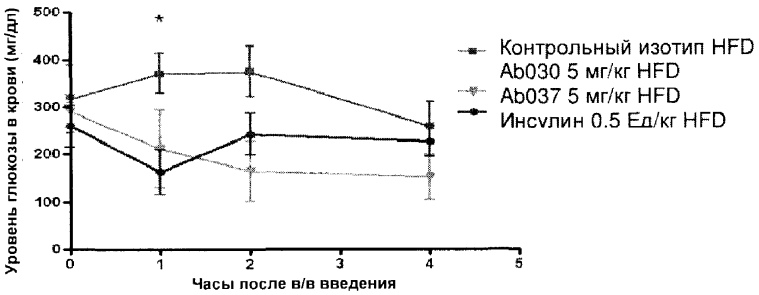
Фиг. 8



Фиг. 9

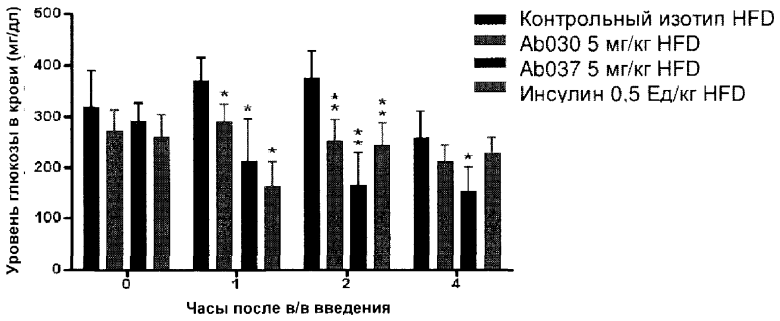
Уровни глюкозы в крови у мышей DIO, подвергнутых воздействию частичными агонистическими антителами к INSR

A.



*p<0,01 (односторонний критерий) ND/изотип в сравнении с HFD/изотип

B.

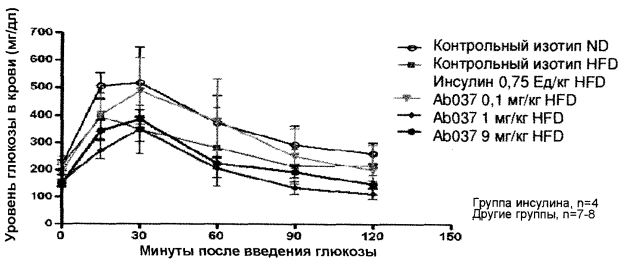


*p<0,01 (двусторонний критерий) в сравнении с HFD/изотип

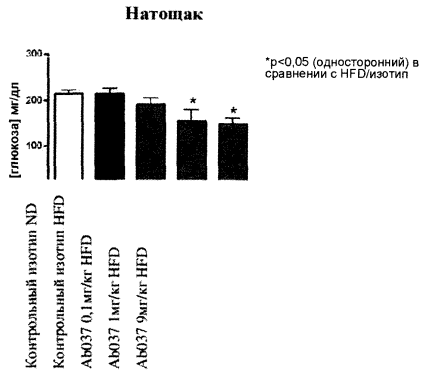
**p<0,001 (двусторонний критерий) в сравнении с HFD/изотип

Фиг. 10

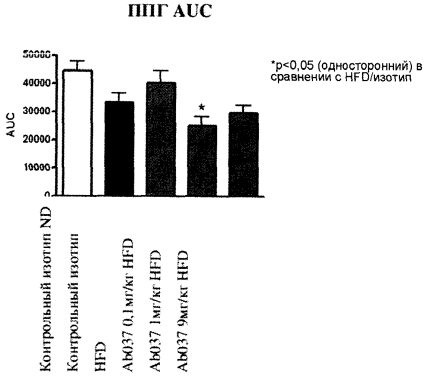
A.



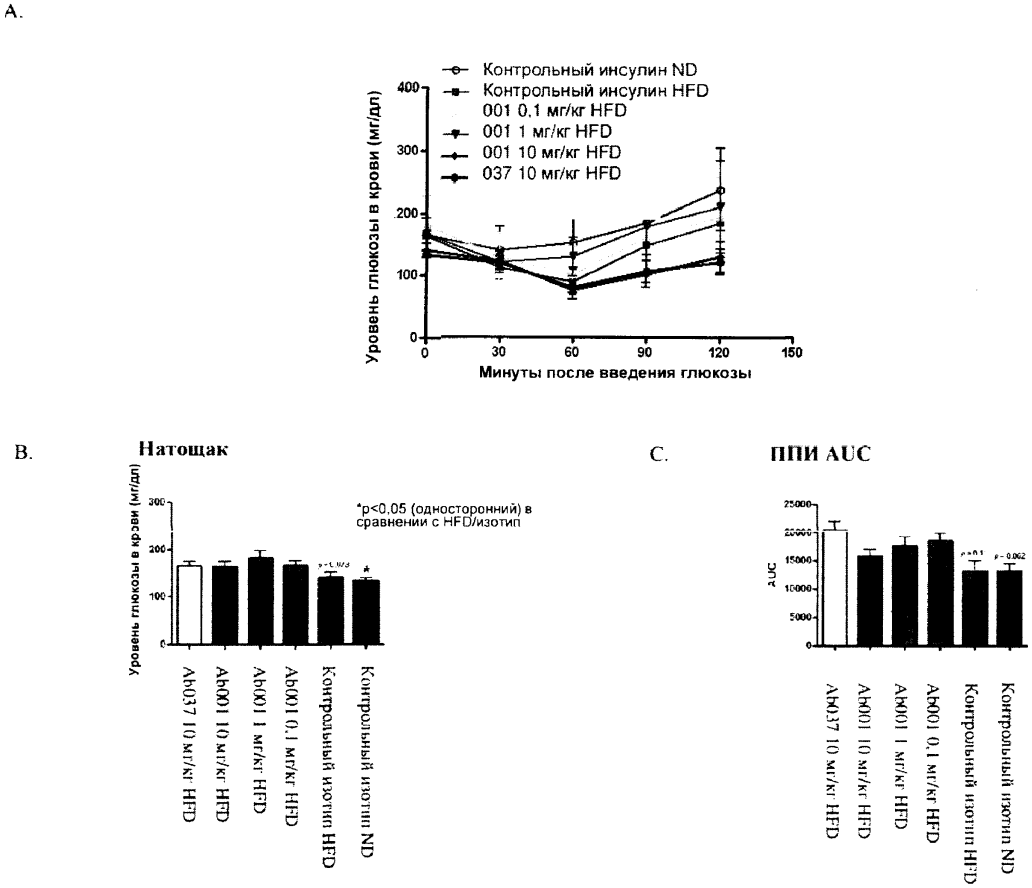
B.



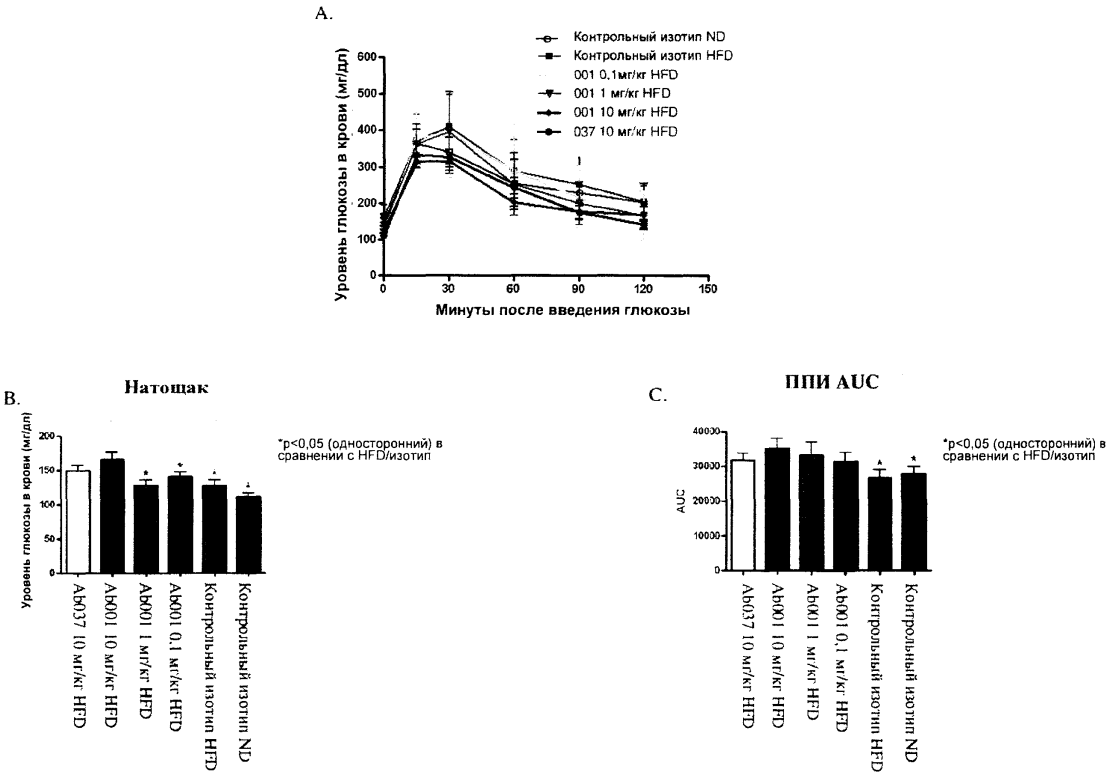
C.



Фиг. 11

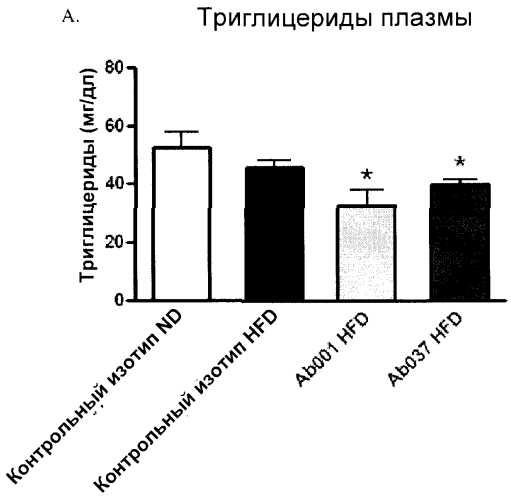

A.
Контрольный инсулин ND
Контрольный инсулин HFD
001 0,1 мг/кг HFD
001 1 мг/кг HFD
001 10 мг/кг HFD
037 10 мг/кг HFD
Уровень глюкозы в крови (мг/дл)
Минуты после введения глюкозы
B.
Натощак
*p<0,05 (односторонний) в сравнении с HFD/изотип
Уровень глюкозы в крови (мг/дл)
Ab037 10 мг/кг HFD
Ab001 10 мг/кг HFD
Ab001 1 мг/кг HFD
Ab001 0,1 мг/кг HFD
Контрольный изотип HFD
Контрольный изотип ND
C.
ППИ AUC
AUC

Фиг. 12

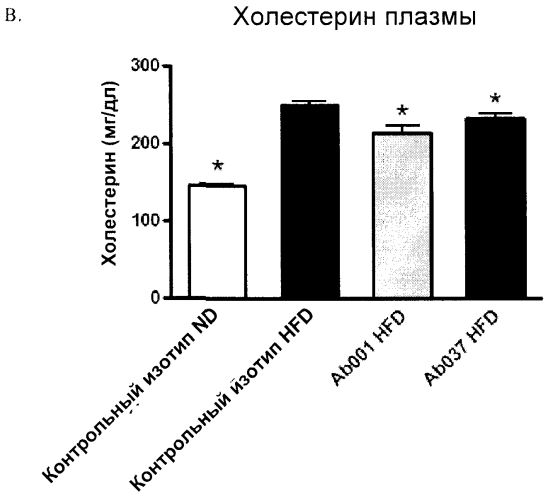

A.
Контрольный изотип ND
Контрольный изотип HFD
001 0,1мг/кг HFD
001 1 мг/кг HFD
001 10 мг/кг HFD
037 10 мг/кг HFD
Уровень глюкозы в крови (мг/дл)
Минуты после введения глюкозы
B.
Натощак
*p<0,05 (односторонний) в сравнении с HFD/изотип
Уровень глюкозы в крови (мг/дл)
Ab037 10 мг/кг HFD
Ab001 10 мг/кг HFD
Ab001 1 мг/кг HFD
Ab001 0,1 мг/кг HFD
Контрольный изотип HFD
Контрольный изотип ND
C.
ППИ AUC
*p<0,05 (односторонний) в сравнении с HFD/изотип
AUC

Фиг. 13

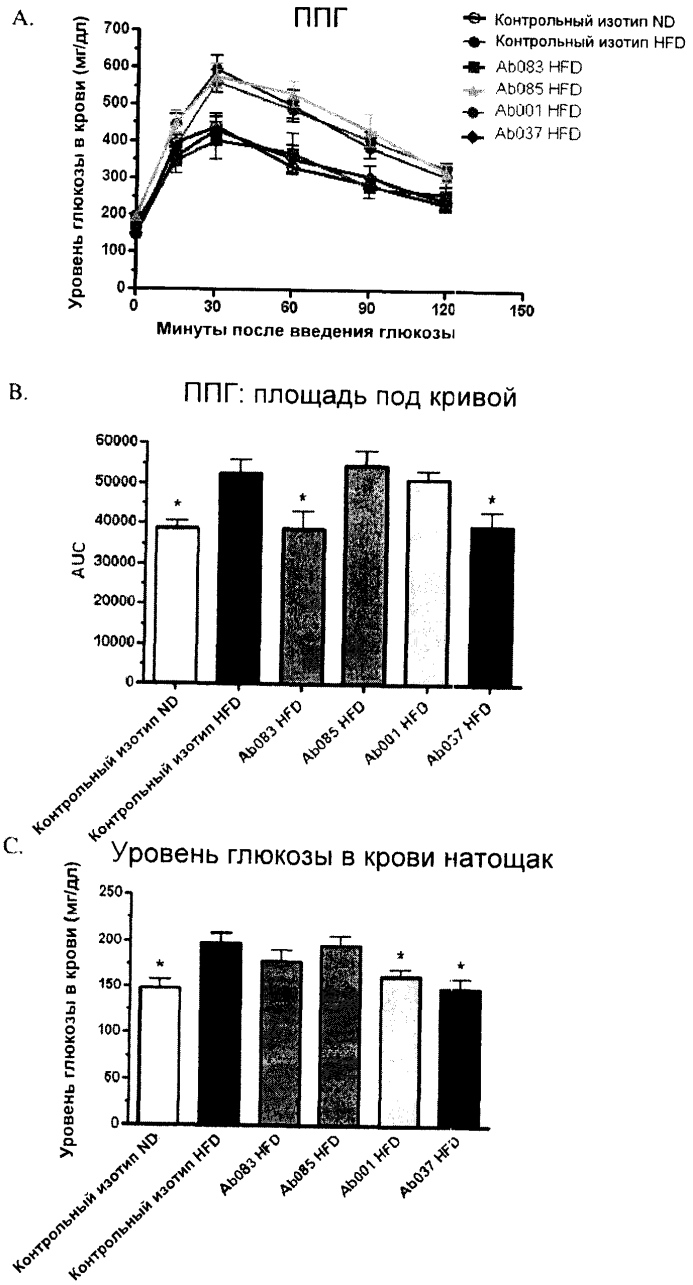
A.


Триглицериды плазмы
Триглицериды (мг/дл)
80
60
40
20
0
*
*
Контрольный изотип ND
Контрольный изотип HFD
Ab001 HFD
Ab037 HFD

B.

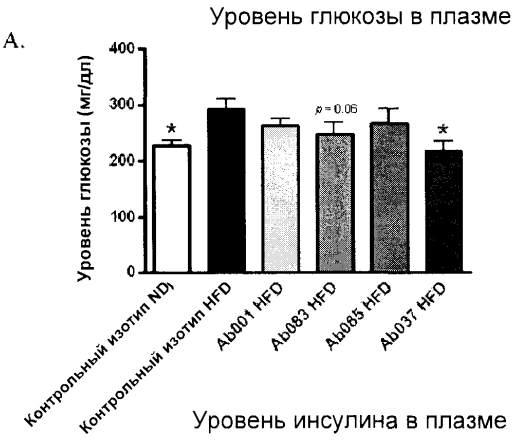

Холестерин плазмы
Холестерин (мг/дл)
300
200
100
0
*
*
*
Контрольный изотип ND
Контрольный изотип HFD
Ab001 HFD
Ab037 HFD

Фиг. 14

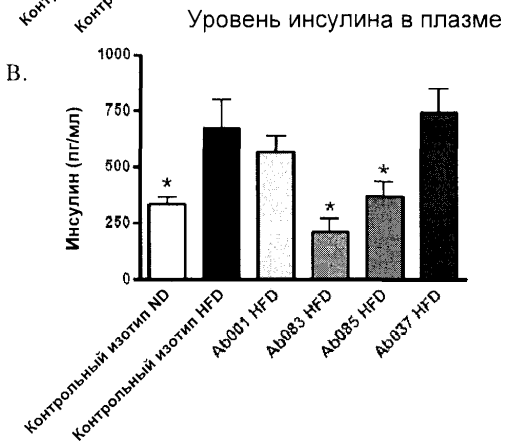

A.
ППГ
Уровень глюкозы в крови (мг/дл)
Минуты после введения глюкозы
Контрольный изотип ND
Контрольный изотип HFD
Ab083 HFD
Ab085 HFD
Ab001 HFD
Ab037 HFD
B.
ППГ: площадь под кривой
AUC
C.
Уровень глюкозы в крови натощак
Уровень глюкозы в крови (мг/дл)

Фиг. 15

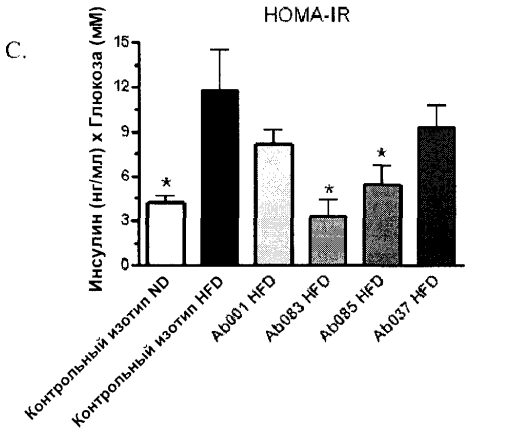
A.

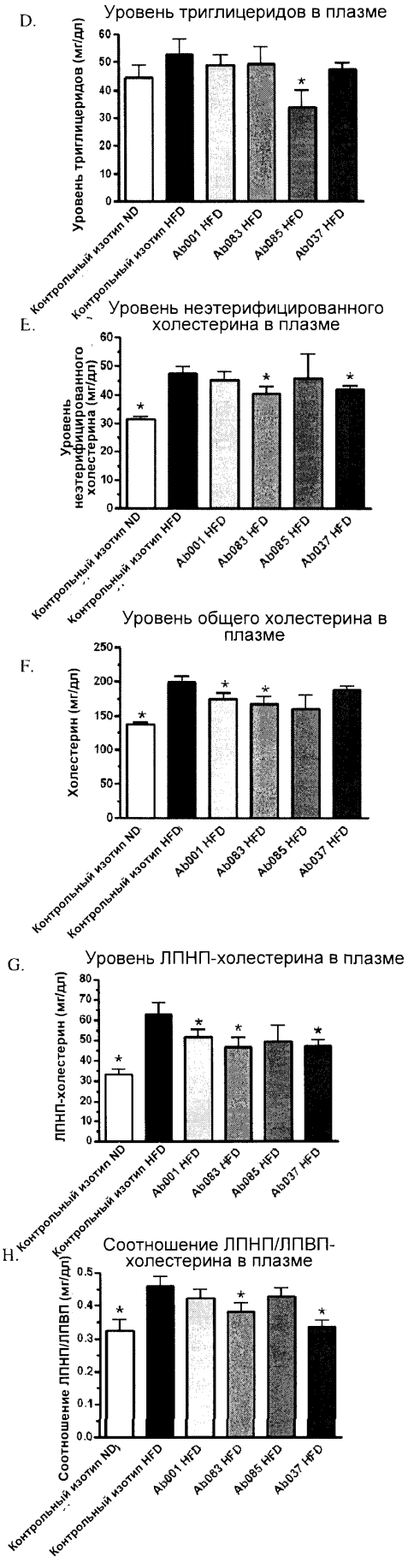

Уровень глюкозы в плазме
Уровень глюкозы (мг/дл)
400
300
200
100
0
p = 0.05
*
*
Контрольный изотип ND
Контрольный изотип HFD
Ab001 HFD
Ab083 HFD
Ab085 HFD
Ab037 HFD

B.

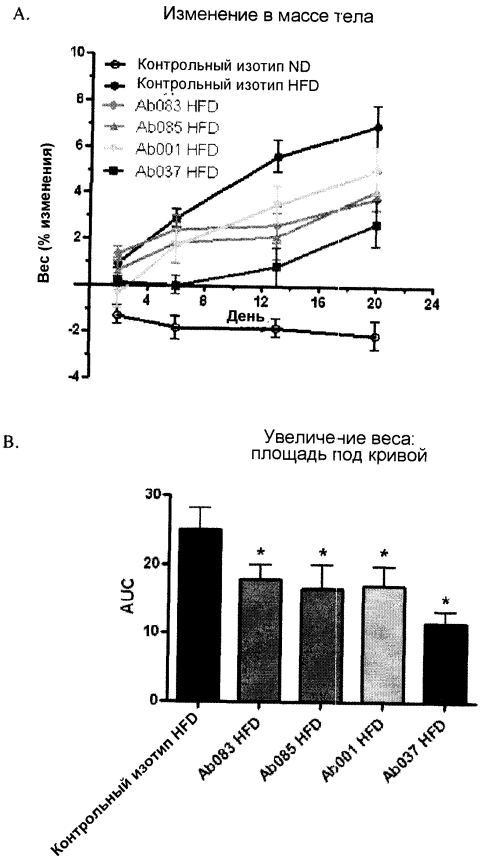

Уровень инсулина в плазме
Инсулин (пг/мл)
1000
750
500
250
0
*
*
*
Контрольный изотип ND
Контрольный изотип HFD
Ab001 HFD
Ab083 HFD
Ab085 HFD
Ab037 HFD

C.

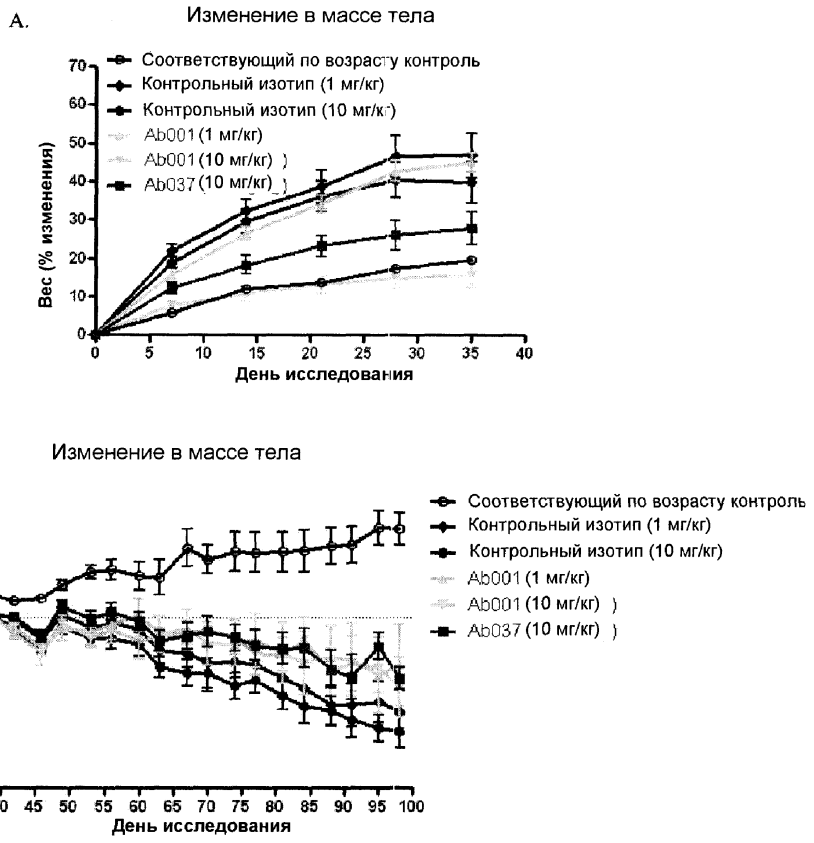

HOMA-IR
Инсулин (нг/мл) x Глюкоза (мМ)
15
12
9
6
3
0
*
*
*
Контрольный изотип ND
Контрольный изотип HFD
Ab001 HFD
Ab083 HFD
Ab085 HFD
Ab037 HFD


D.
Уровень триглицеридов в плазме
Уровень триглицеридов (мг/дл)
Контрольный изотип ND
Контрольный изотип HFD
Ab001 HFD
Ab083 HFD
Ab085 HFD
Ab037 HFD
E.
Уровень неэтерифицированного холестерина в плазме
Уровень неэтерифицированного холестерина (мг/дл)
F.
Уровень общего холестерина в плазме
Холестерин (мг/дл)
G.
Уровень ЛПНП-холестерина в плазме
ЛПНП-холестерин (мг/дл)
H.
Соотношение ЛПНП/ЛПВП-холестерина в плазме
Соотношение ЛПНП/ЛПВП (мг/дл)

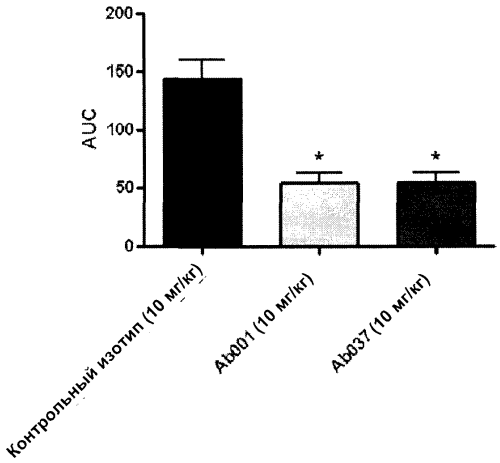
Фиг. 16


A.
Изменение в массе тела
Контрольный изотип ND
Контрольный изотип HFD
Ab083 HFD
Ab085 HFD
Ab001 HFD
Ab037 HFD
Вес (% изменения)
День
B.
Увеличение веса: площадь под кривой
AUC
Контрольный изотип HFD
Ab083 HFD
Ab085 HFD
Ab001 HFD
Ab037 HFD

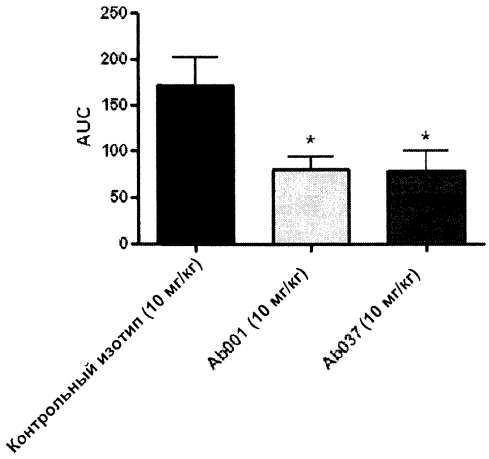
Фиг. 17


A.
Изменение в массе тела
Соответствующий по возрасту контроль
Контрольный изотип (1 мг/кг)
Контрольный изотип (10 мг/кг)
Ab001 (1 мг/кг)
Ab001 (10 мг/кг)
Ab037 (10 мг/кг)
Вес (% изменения)
День исследования
Изменение в массе тела
B.
Соответствующий по возрасту контроль
Контрольный изотип (1 мг/кг)
Контрольный изотип (10 мг/кг)
Ab001 (1 мг/кг)
Ab001 (10 мг/кг)
Ab037 (10 мг/кг)
Вес (% изменения)
День исследования

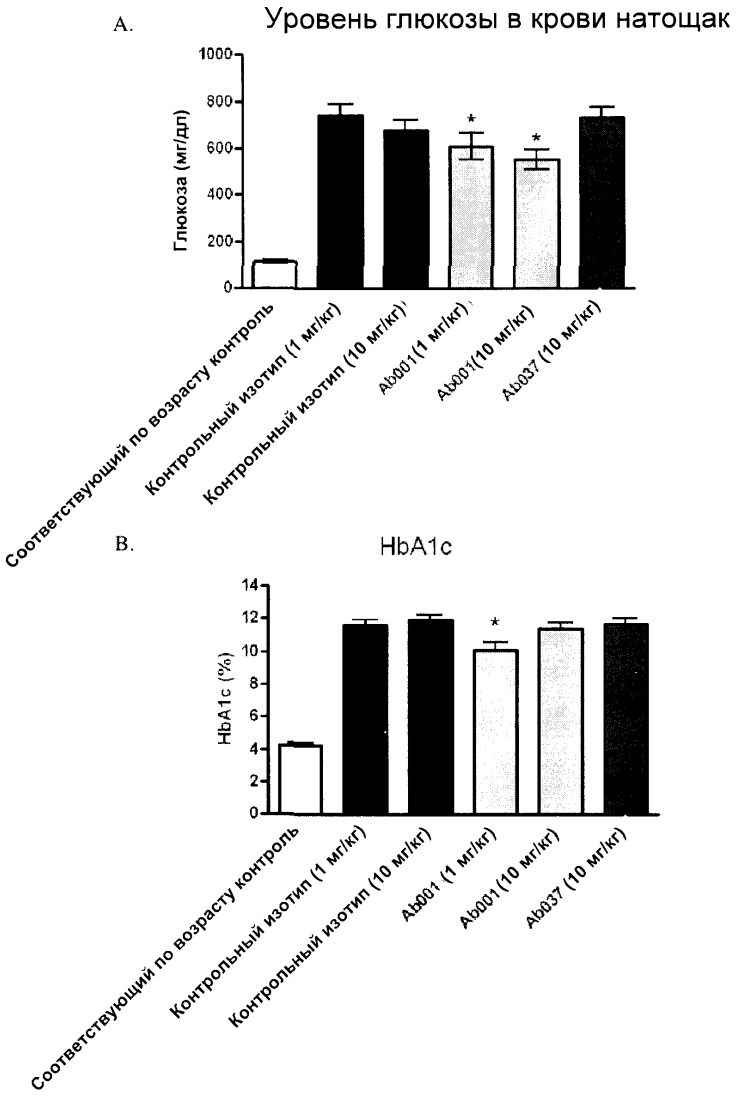
C. Увеличение веса: площадь под кривой



D. Снижение веса: площадь под кривой

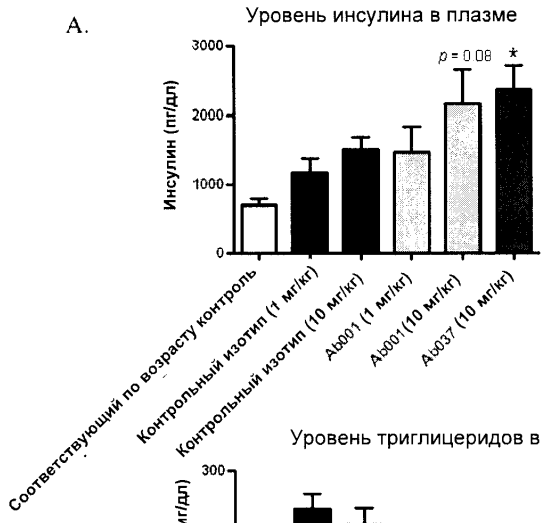


Фиг. 18

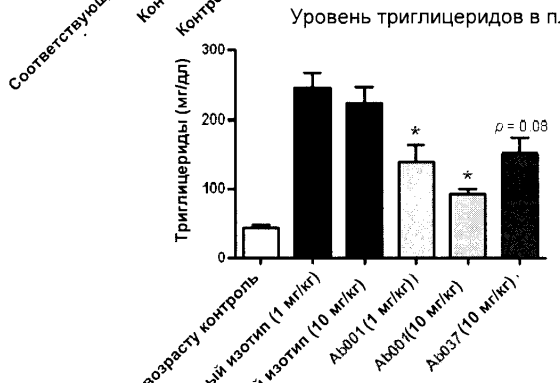

A.
Уровень глюкозы в крови натощак
Глюкоза (мг/дл)
1000
800
600
400
200
0
*
*
Соответствующий по возрасту контроль
Контрольный изотип (1 мг/кг)
Контрольный изотип (10 мг/кг)
Ab001(1 мг/кг)
Ab001(10 мг/кг)
Ab037 (10 мг/кг)
B.
HbA1c
HbA1c (%)
14
12
10
8
6
4
2
0
*
Соответствующий по возрасту контроль
Контрольный изотип (1 мг/кг)
Контрольный изотип (10 мг/кг)
Ab001 (1 мг/кг)
Ab001(10 мг/кг)
Ab037 (10 мг/кг)

Фиг. 19

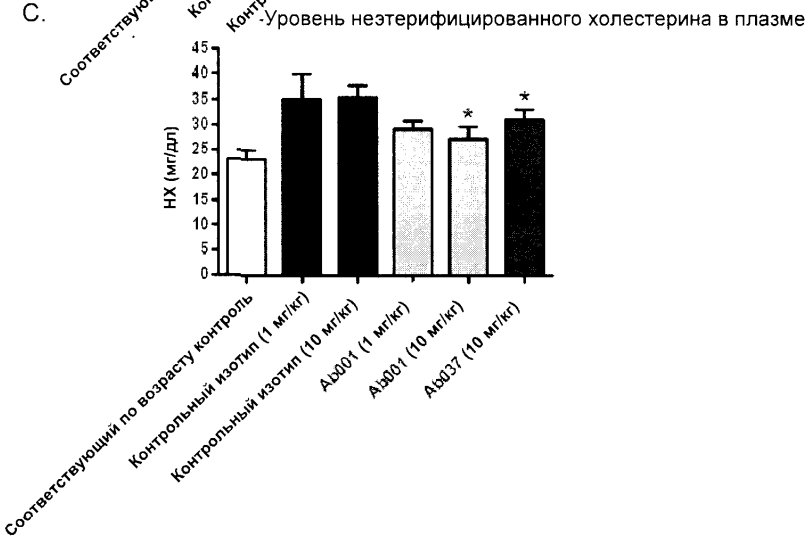
A.

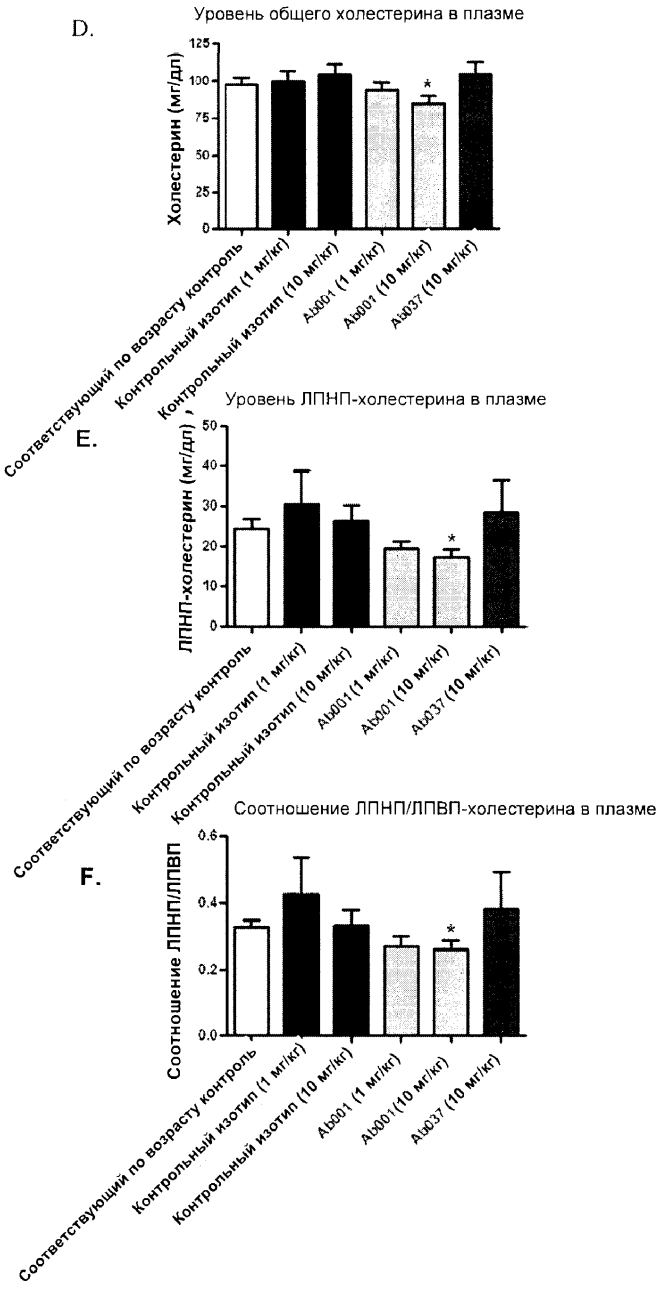

Уровень инсулина в плазме
Инсулин (пг/дл)
3000
2000
1000
0
p = 0.08
*
Соответствующий по возрасту контроль
Контрольный изотип (1 мг/кг)
Контрольный изотип (10 мг/кг)
Ab001 (1 мг/кг)
Ab001(10 мг/кг)
Ab037 (10 мг/кг)

B.


Уровень триглицеридов в плазме
Триглицериды (мг/дл)
300
200
100
0
*
*
p = 0.08
Соответствующий по возрасту контроль
Контрольный изотип (1 мг/кг)
Контрольный изотип (10 мг/кг)
Ab001 (1 мг/кг)
Ab001(10 мг/кг)
Ab037 (10 мг/кг)

C.

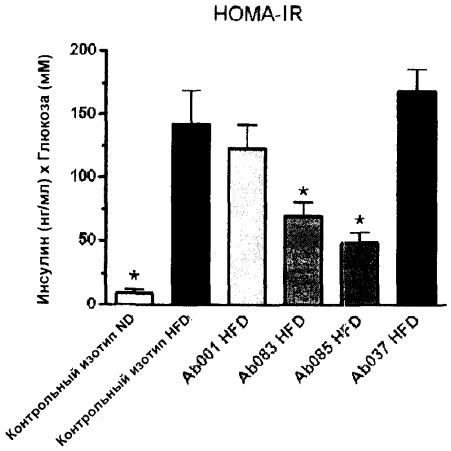

Уровень неэтерифицированного холестерина в плазме
НХ (мг/дл)
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
*
*
Соответствующий по возрасту контроль
Контрольный изотип (1 мг/кг)
Контрольный изотип (10 мг/кг)
Ab001 (1 мг/кг)
Ab001 (10 мг/кг)
Ab037 (10 мг/кг)


D.
Уровень общего холестерина в плазме
Холестерин (мг/дл)
125
100
75
50
25
0
*
Соответствующий по возрасту контроль
Контрольный изотип (1 мг/кг)
Контрольный изотип (10 мг/кг)
Ab001 (1 мг/кг)
Ab001 (10 мг/кг)
Ab037 (10 мг/кг)
E.
Уровень ЛПНП-холестерина в плазме
ЛПНП-холестерин (мг/дл)
50
40
30
20
10
0
*
Соответствующий по возрасту контроль
Контрольный изотип (1 мг/кг)
Контрольный изотип (10 мг/кг)
Ab001 (1 мг/кг)
Ab001 (10 мг/кг)
Ab037 (10 мг/кг)
F.
Соотношение ЛПНП/ЛПВП-холестерина в плазме
Соотношение ЛПНП/ЛПВП
0.6
0.4
0.2
0.0
*
Соответствующий по возрасту контроль
Контрольный изотип (1 мг/кг)
Контрольный изотип (10 мг/кг)
Ab001 (1 мг/кг)
Ab001 (10 мг/кг)
Ab037 (10 мг/кг)

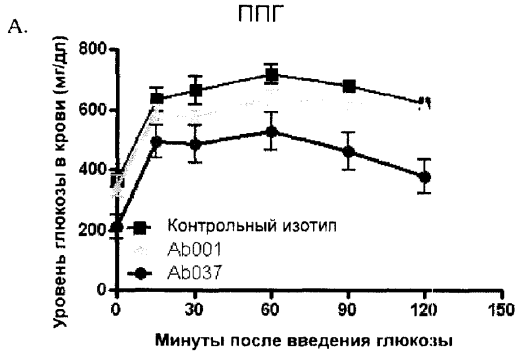
Фиг. 20

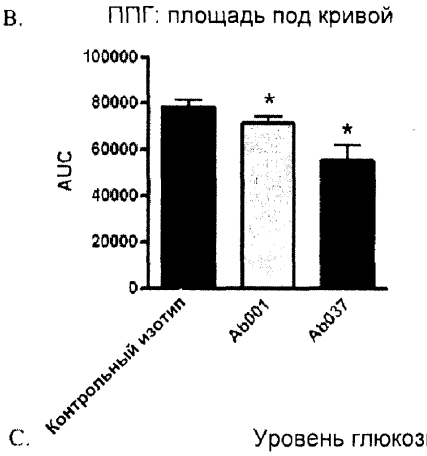

Уровень глюкозы в крови натощак
Уровень глюкозы в крови (мг/дл)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Неделя исследования
*
Соответствующий по возрасту контроль
Контрольный изотип
Ab001
Ab083
Ab085
Ab037

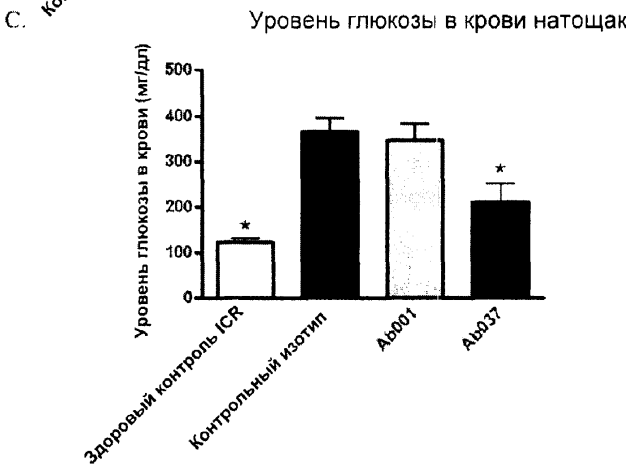
Фиг. 21


HOMA-IR
Инсулин (нг/мл) x Глюкоза (мМ)
200
150
100
50
0
*
*
*
Контрольный изотип ND
Контрольный изотип HFD
Ab001 HFD
Ab083 HFD
Ab085 HFD
Ab037 HFD

Фиг. 22


A.
ППГ
Уровень глюкозы в крови (мг/дл)
800
600
400
200
0
0
30
60
90
120
150
Минуты после введения глюкозы
Контрольный изотип
Ab001
Ab037


B.
ППГ: площадь под кривой
AUC
100000
80000
60000
40000
20000
0
*
*
Контрольный изотип
Ab001
Ab037

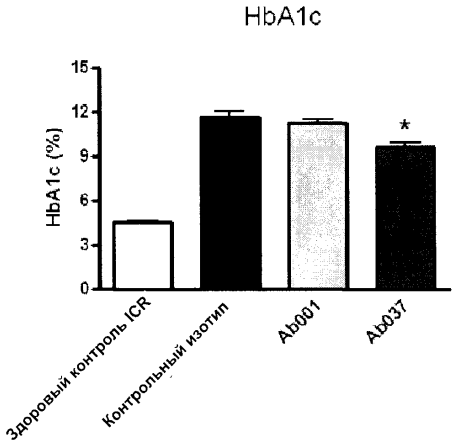

C.
Уровень глюкозы в крови натощак
Уровень глюкозы в крови (мг/дл)
500
400
300
200
100
0
*
*
Здоровый контроль ICR
Контрольный изотип
Ab001
Ab037

Фиг. 23

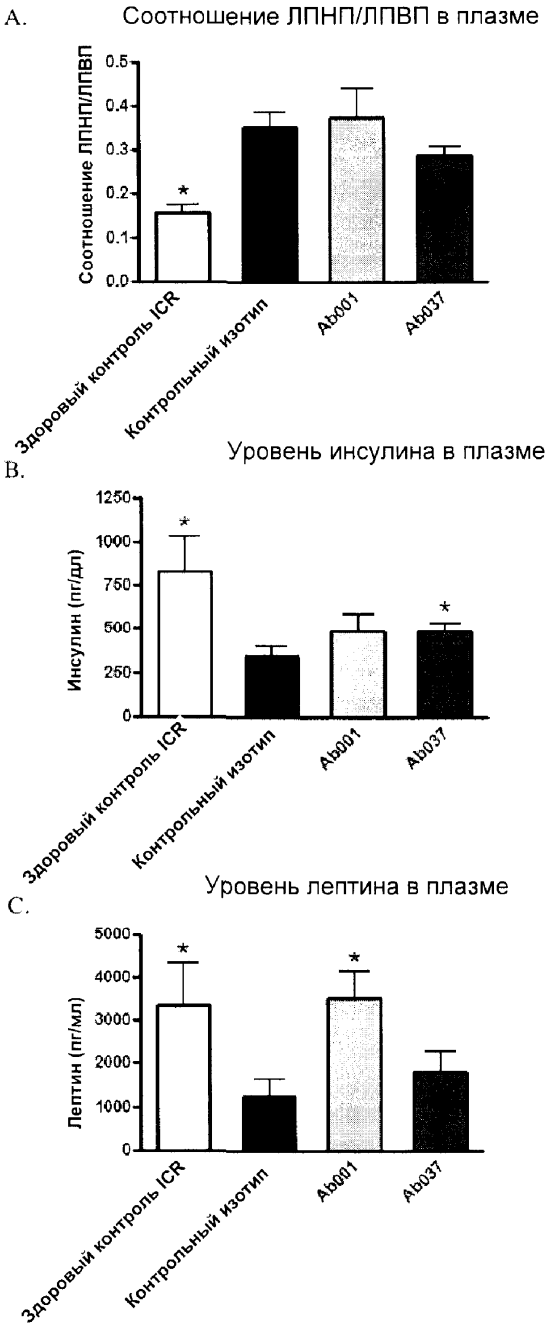
A.


Уровень глюкозы после приема пищи
Уровень глюкозы в крови (мг/дл)
800
600
400
200
0
*
*
Здоровый контроль ICR
Контрольный изотип
Ab001
Ab037

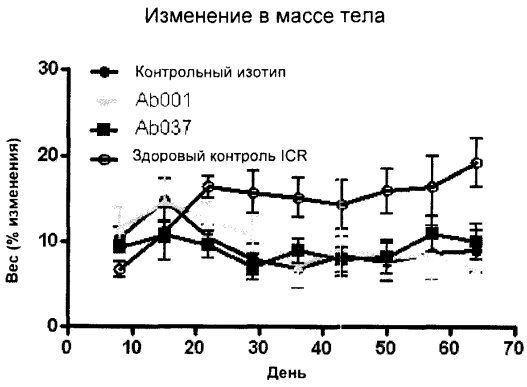
B.


HbA1c
HbA1c (%)
15
12
9
6
3
0
*
Здоровый контроль ICR
Контрольный изотип
Ab001
Ab037

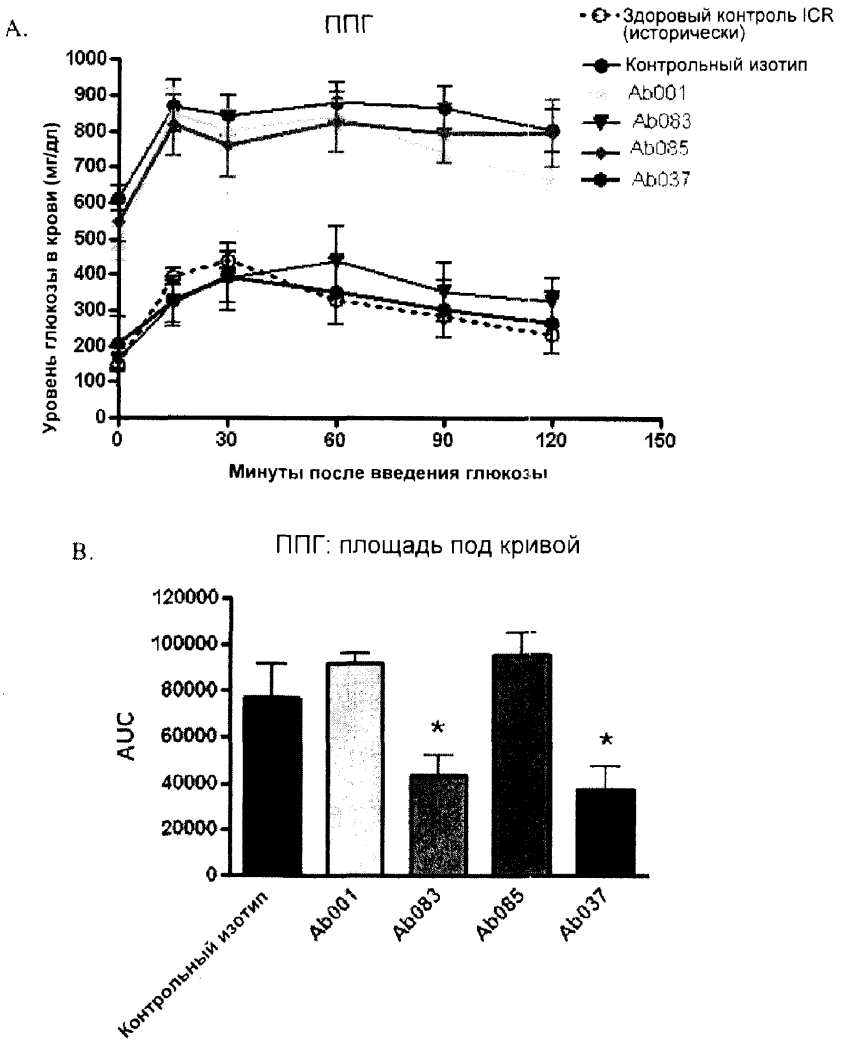
Фиг. 24


A.
Соотношение ЛПНП/ЛПВП в плазме
Соотношение ЛПНП/ЛПВП
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
*
Здоровый контроль ICR
Контрольный изотип
Ab001
Ab037
B.
Уровень инсулина в плазме
Инсулин (пг/дл)
1250
1000
750
500
250
0
*
*
Здоровый контроль ICR
Контрольный изотип
Ab001
Ab037
C.
Уровень лептина в плазме
Лептин (пг/мл)
5000
4000
3000
2000
1000
0
*
*
Здоровый контроль ICR
Контрольный изотип
Ab001
Ab037

Фиг. 25


Изменение в массе тела
Вес (% изменения)
30
20
10
0
Контрольный изотип
Ab001
Ab037
Здоровый контроль ICR
0
10
20
30
40
50
60
70
День

Фиг. 26

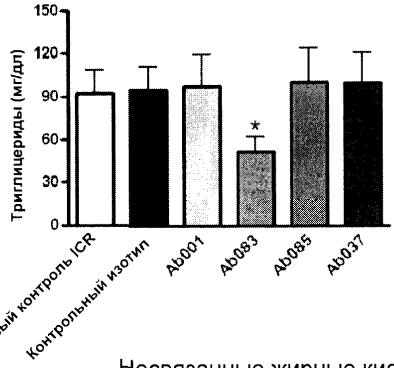

A.
ППГ
Здоровый контроль ICR (исторически)
Контрольный изотип
Ab001
Ab083
Ab085
Ab037
Уровень глюкозы в крови (мг/дл)
Минуты после введения глюкозы
B.
ППГ: площадь под кривой
AUC
Контрольный изотип
Ab001
Ab083
Ab085
Ab037

Фиг. 27

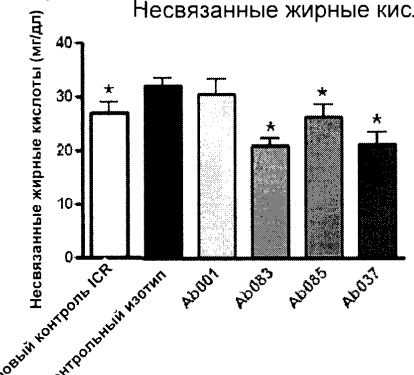

Уровень глюкозы в крови натощак
Здоровый контроль ICR
Контрольный изотип
Ab001
Ab083
Ab085
Ab037
Уровень глюкозы в крови (мг/дл)
Неделя исследования

Фиг. 28

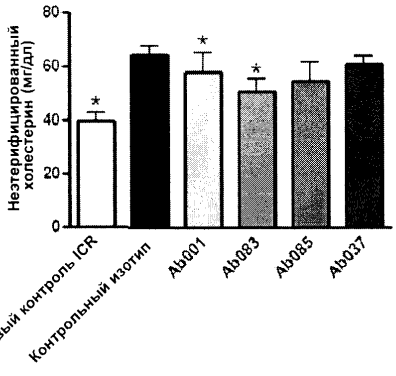
A. Триглицериды плазмы



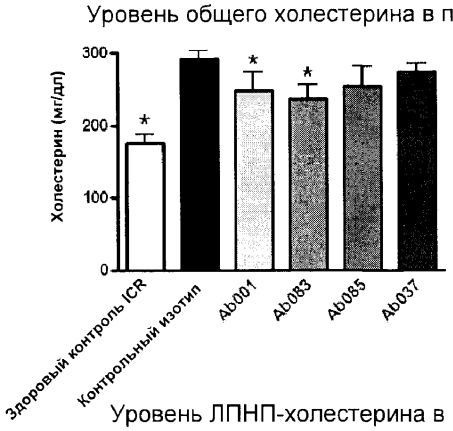
B. Несвязанные жирные кислоты в плазме



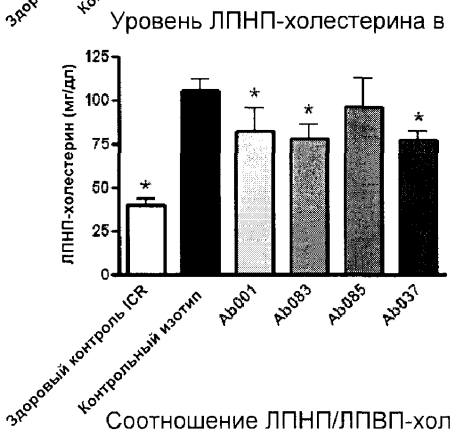
C. Неэтерифицированный холестерин плазмы



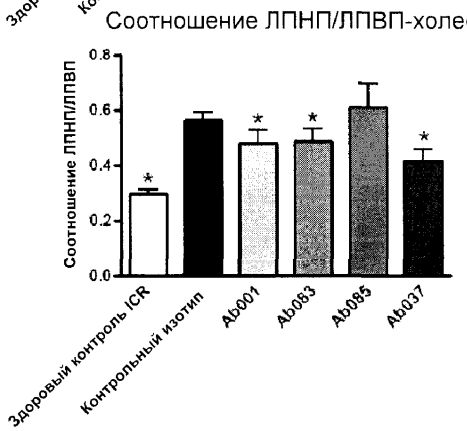
D.



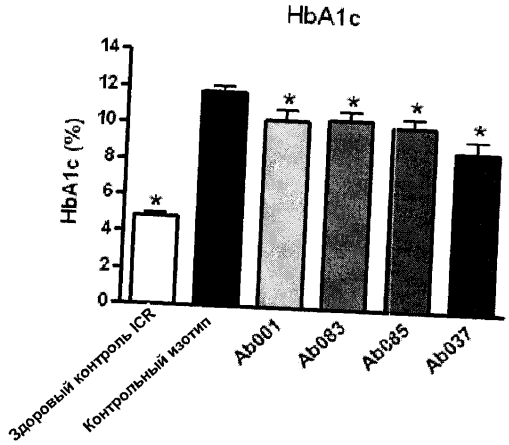
E.



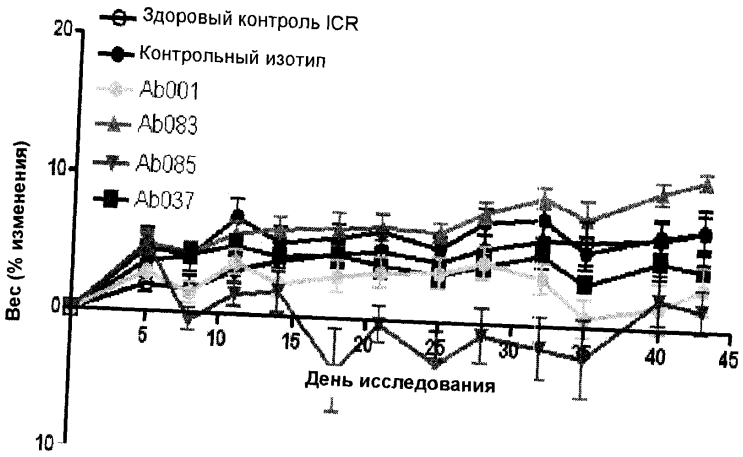
F.



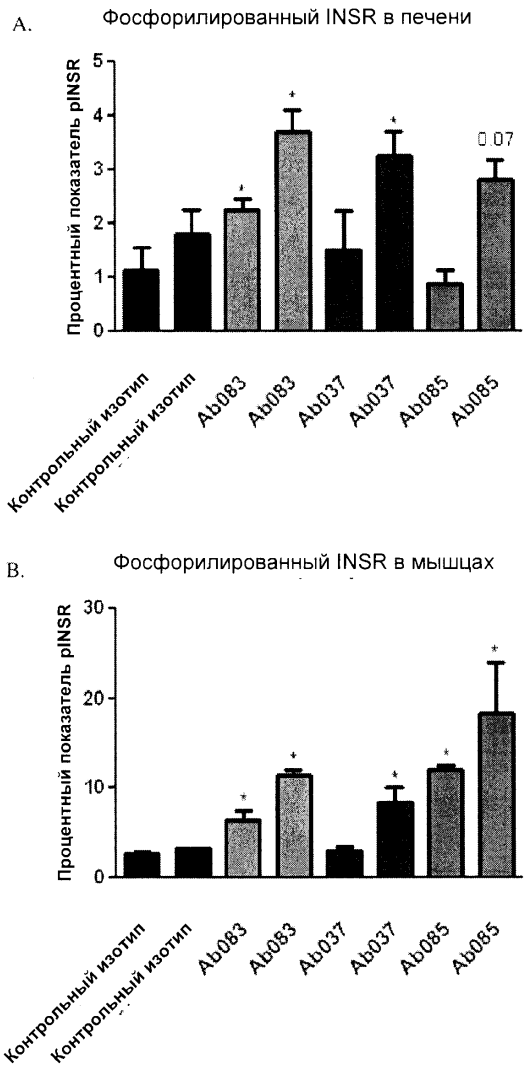
Фиг. 29



Фиг. 30


Здоровый контроль ICR
Контрольный изотип
Ab001
Ab083
Ab085
Ab037
Вес (% изменения)
20
10
0
10
5
10
15
20
25
30
35
40
45
День исследования

Фиг. 31

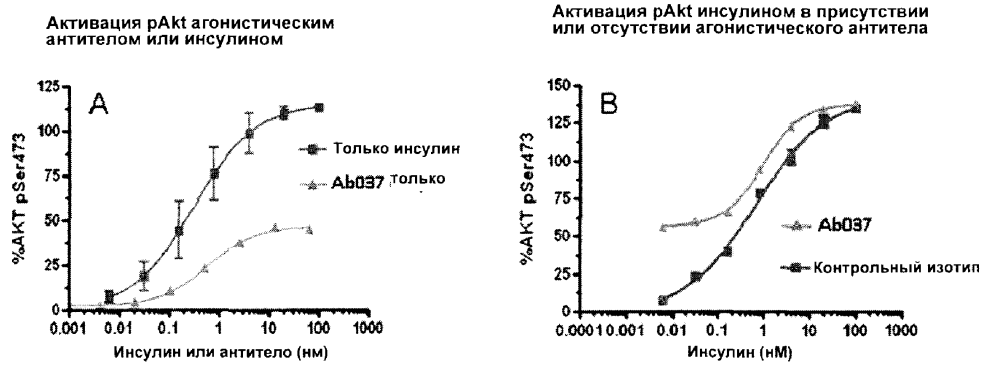

A.
Фосфорилированный INSR в печени
Процентный показатель pINSR
0.07
Контрольный изотип
Контрольный изотип
Ab083
Ab083
Ab037
Ab037
Ab085
Ab085
B.
Фосфорилированный INSR в мышцах
Процентный показатель pINSR
Контрольный изотип
Контрольный изотип
Ab083
Ab083
Ab037
Ab037
Ab085
Ab085

Фиг. 32

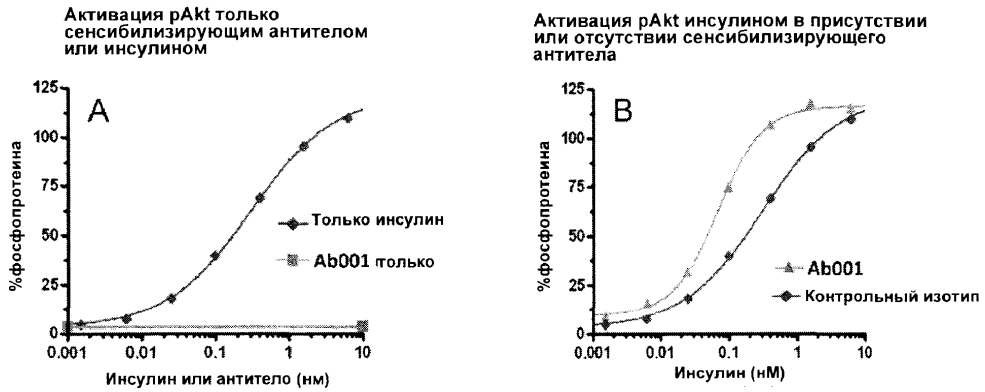
Исследуемое антитело	*Площадь FACS под log трансформированными данными MFI связывания клонов с INSR клеток CHO-K1 после обеднения сывороткой*				*Площадь FACS под log трансформированными данными соотношения MFI связывания клонов с INSR CHO-K1 человека с инсулином и без инсулина (+инсулин/-инсулин)*	
	INSR человека, без инсулина	*INSR мыши, без инсулина*	*INSR человека, с инсулином*	*INSR мыши, с инсулином*	*INSR человека*	*INSR мыши*
Ab050	252	424	81	170	0.32	0.40
Ab051	554	663	378	470	0.68	0.71
Ab052	445	892	134	397	0.30	0.45
Ab053	1331	1131	451	574	0.34	0.51
Ab054	1128	1027	356	519	0.32	0.51
Ab055	1192	1300	759	1050	0.64	0.81
Ab056	1110	21	927	41	0.84	1.98
Ab057	155	409	87	250	0.56	0.61
Ab058	1407	812	370	388	0.26	0.48
Ab059	22	14	764	13	34.25	НО
Ab060	460	210	308	388	0.67	1.85
Ab061	204	462	59	170	0.29	0.37
Ab062	1398	1448	790.3	1009	0.57	0.70
Ab063	943	1025	674	733	0.71	0.72
Ab064	1710	1019	1271	813	0.74	0.80
Ab065	205	483	57	177	0.28	0.37
Ab066	1564	1516	1157	1145	0.74	0.76
Ab067	1537	1281	1063	786	0.69	0.61
Ab068	1422	803	1028	445	0.72	0.55
Ab069	357	642	146	383	0.41	0.60
Ab070	283	587	150	389	0.53	0.66
Ab071	490	818	194	518	0.40	0.63
Ab072	226	508	84	267	0.37	0.53
Ab073	729	307	341	321	0.47	1.05
Ab074	596	932	260	503	0.44	0.54
Ab075	692	425	353	446	0.51	1.05
Ab076	552	268	543	391	0.98	1.46
Ab077	127	45	268	103	2.12	2.28
Ab078	11	12	704	217	66	17.6
Ab079	296	154	385	215	1.30	1.39
Ab080	282	157	386	191	1.37	1.22
Ab081	176	189	75	125	0.42	0.66
Ab082	399	257	236	267	0.59	1.04
Ab083	97	81	294	179	3.03	2.21
Ab084	532	196	508	344	0.95	1.75
Ab001+антитело к IgG APC p1 человека	294	34	565	127	1.92	3.68
Ab001+антитело к IgG APC p2 человека	687	443	1017	1062	1.48	2.40
Ab001+антитело к IgG APC p3 человека						
Ab001+антитело к IgG APC p5 человека	534	176	1006	485	1.89	2.76
Ab001+антитело к IgG APC p6 человека урезанное	693	232	1030	518	1.49	2.24

НО = не определено

Фиг. 33



Фиг. 34



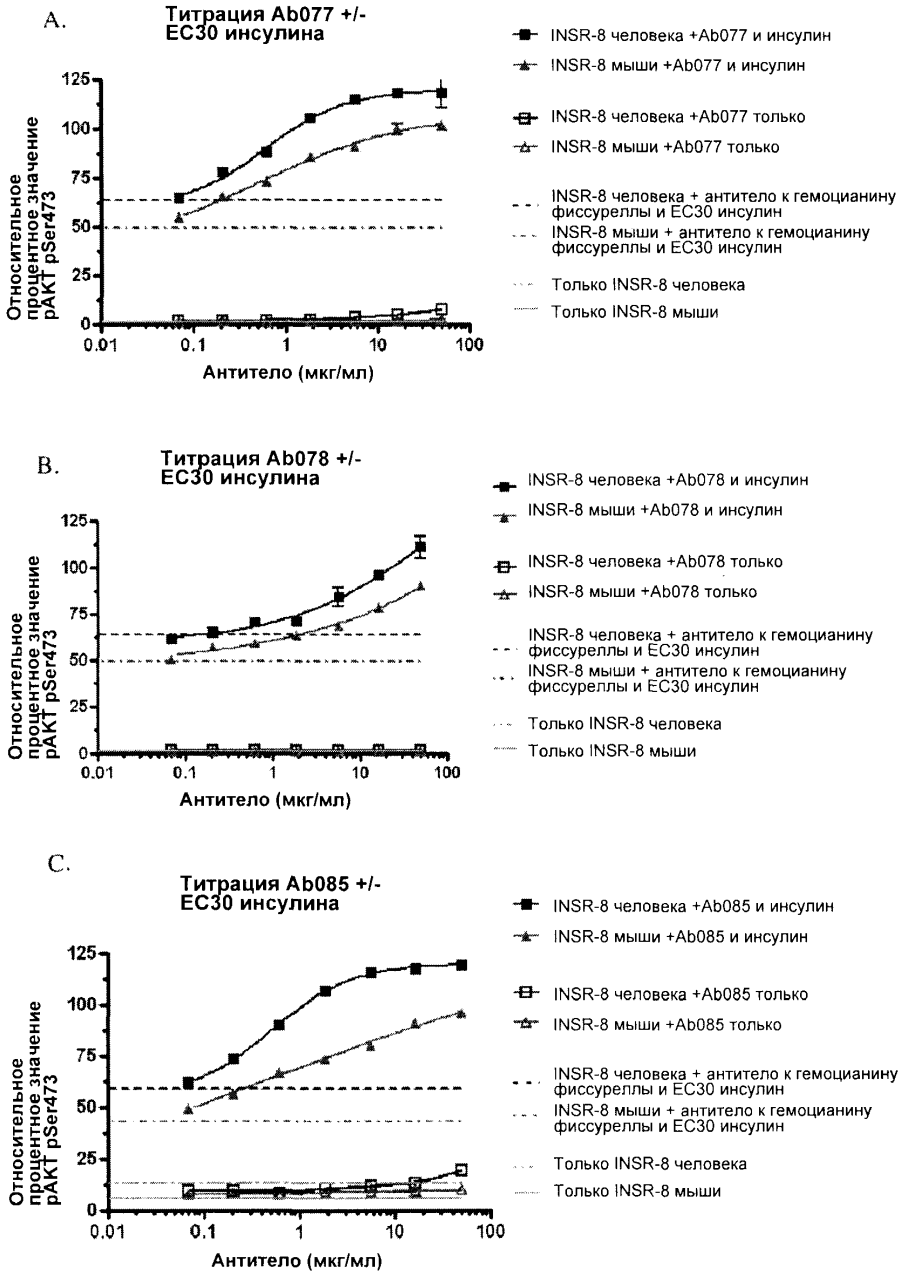
Фиг. 35

Рекомбинантная линия клеток, вырабатывающая рецептор инсулина и используемая в анализе	*Параметр анализа, определенный при приращении сигмоидальной кривой доза-ответ*	*Инсулин человека*	*Ab037*	*Ab030*	*Ab040*	*Ab018*
INSR человека в клетках CHO-K1	*Относительная максимальная активация pAkt инсулином или только антителом*	100%	44%	47%	19%	36%
	EC_{50} (нМ) инсулина или только антитела	0,6	0,8	12	4	1
	Коэффициент Хилла инсулина или только антитела	0,8	0,9	1,8	1,4	1,4
INSR мыши в клетках CHO-K1	*Относительная максимальная активация pAkt инсулином или только антителом*	100%	29%	37%	25%	26%
	EC_{50} (нМ) инсулина или только антитела	3,4	1,4	11	4	3
	Коэффициент Хилла инсулина или только антитела	0,7	1	1,7	1,3	1

Фиг. 36

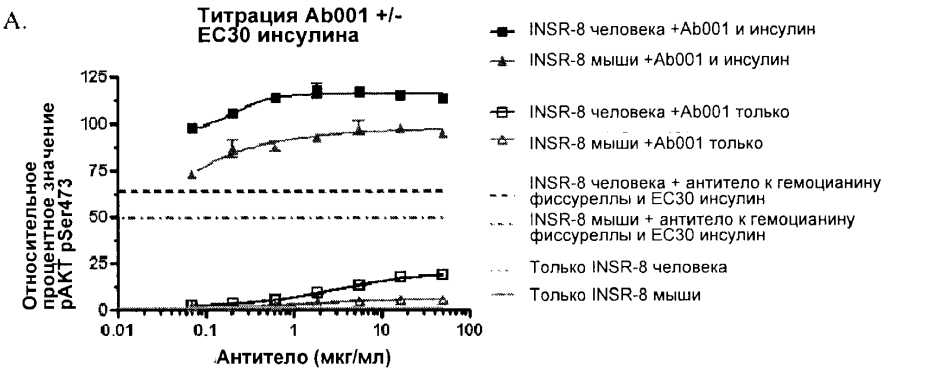
Рекомбинантная линия клеток, вырабатывающая рецептор инсулина и используемая в анализе	*Параметр анализа, определенный при приращении сигмоидальной кривой доза-ответ*	*Анализ 1*		*Анализ 2*	
		Инсулин человека с 10 мкг/мл контрольного антитела	*Инсулин человека с 10 мкг/мл Ab037*	*Инсулин человека с 10 мкг/мл контрольного антитела*	*Инсулин человека с 10 мкг/мл Ab040*
INSR человека в клетках CHO-K1	Относительная максимальная активация pAkt в присутствии 10 мкг/мл антитела	100 ± 5%	93 ± 2%	100 ± 3%	85 ± 1%
	EC_{50} инсулина в присутствии 10 мкг/мл антитела (нМ)	0.7 ± 0.3	1 ± 0.3	0.8 ± 0.2	0.3 ± 0.1
INSR мыши в клетках CHO-K1	Относительная максимальная активация pAkt в присутствии 10 мкг/мл антитела	100 ± 2%	99 ± 1%	100 ± 3%	98 ± 1%
	EC_{50} инсулина в присутствии 10 мкг/мл антитела (нМ)	3.3 ± 0.6	2.1 ± 0.4	3 ± 1	0.6 ± 0.2

Фиг. 37

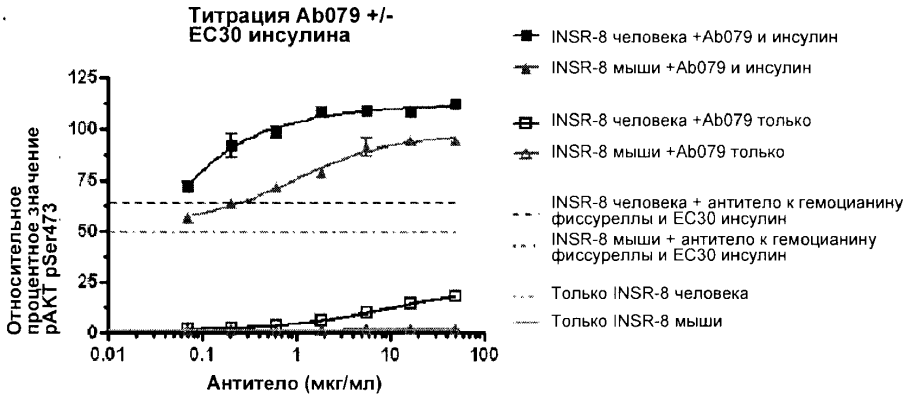

A.
Титрация Ab077 +/-
EC30 инсулина
Относительное процентное значение pAKT pSer473
125
100
75
50
25
0
0.01
0.1
1
10
100
Антитело (мкг/мл)
INSR-8 человека +Ab077 и инсулин
INSR-8 мыши +Ab077 и инсулин
INSR-8 человека +Ab077 только
INSR-8 мыши +Ab077 только
INSR-8 человека + антитело к гемоцианину фиссуреллы и EC30 инсулин
INSR-8 мыши + антитело к гемоцианину фиссуреллы и EC30 инсулин
Только INSR-8 человека
Только INSR-8 мыши
B.
Титрация Ab078 +/-
EC30 инсулина
Относительное процентное значение pAKT pSer473
125
100
75
50
25
0
0.01
0.1
1
10
100
Антитело (мкг/мл)
INSR-8 человека +Ab078 и инсулин
INSR-8 мыши +Ab078 и инсулин
INSR-8 человека +Ab078 только
INSR-8 мыши +Ab078 только
INSR-8 человека + антитело к гемоцианину фиссуреллы и EC30 инсулин
INSR-8 мыши + антитело к гемоцианину фиссуреллы и EC30 инсулин
Только INSR-8 человека
Только INSR-8 мыши
C.
Титрация Ab085 +/-
EC30 инсулина
Относительное процентное значение pAKT pSer473
125
100
75
50
25
0
0.01
0.1
1
10
100
Антитело (мкг/мл)
INSR-8 человека +Ab085 и инсулин
INSR-8 мыши +Ab085 и инсулин
INSR-8 человека +Ab085 только
INSR-8 мыши +Ab085 только
INSR-8 человека + антитело к гемоцианину фиссуреллы и EC30 инсулин
INSR-8 мыши + антитело к гемоцианину фиссуреллы и EC30 инсулин
Только INSR-8 человека
Только INSR-8 мыши

Фиг. 38

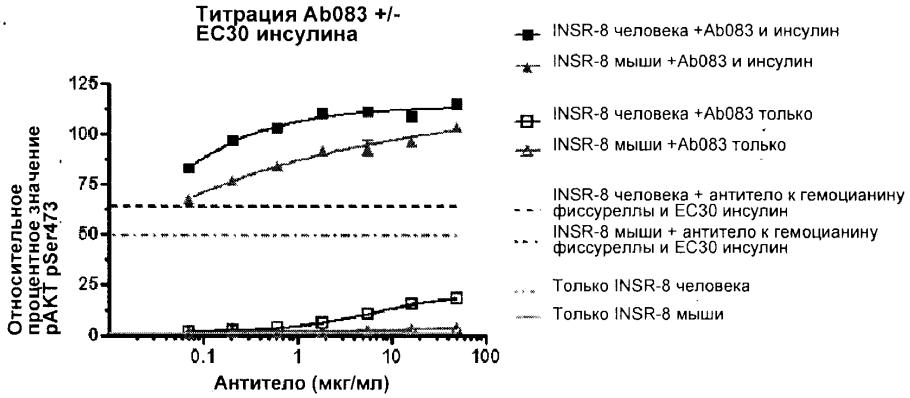
A.



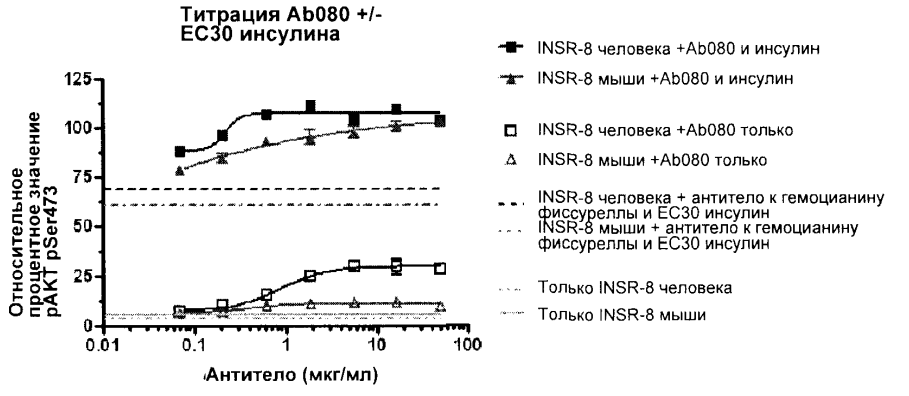
B.



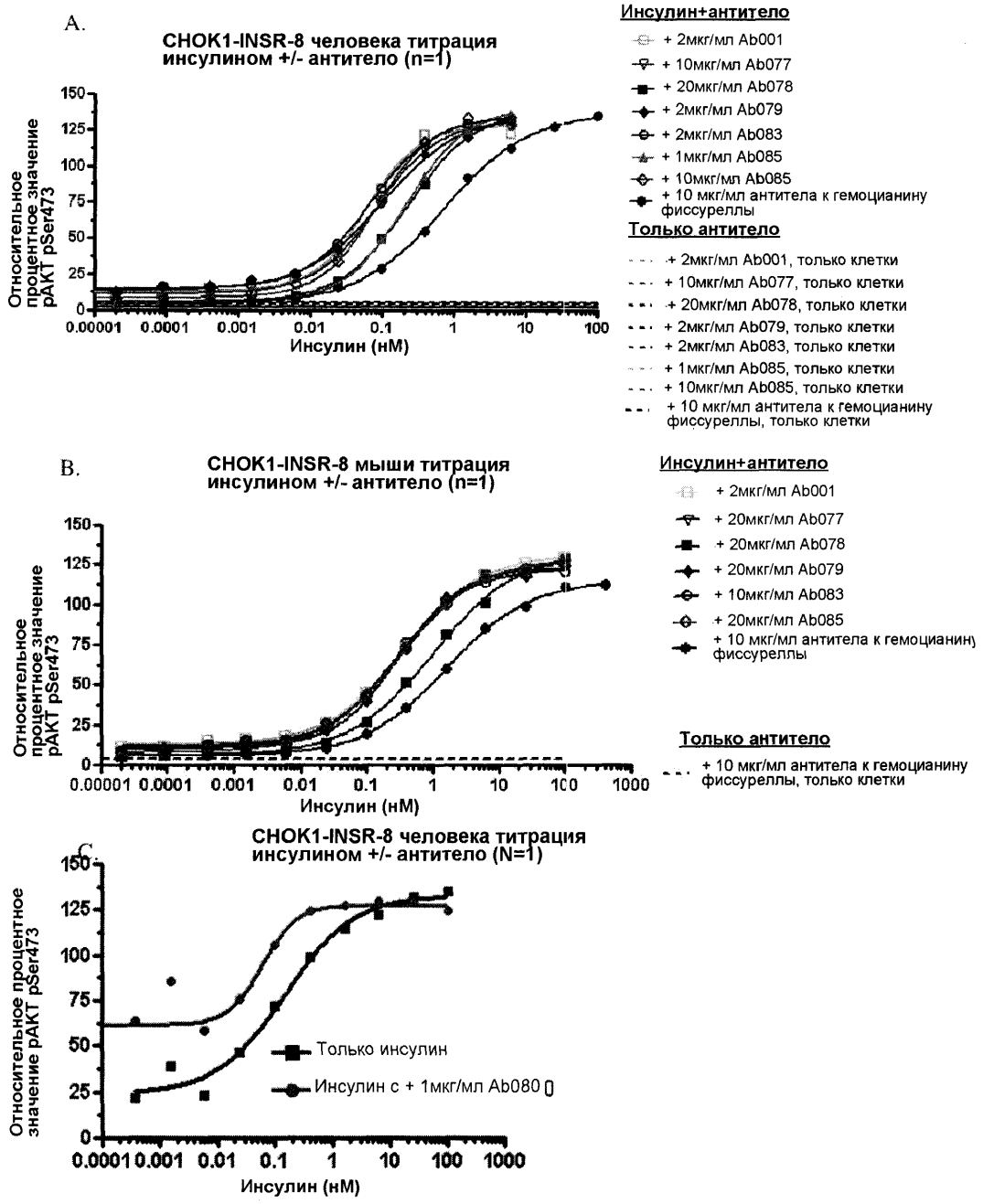
C.



Фиг. 39

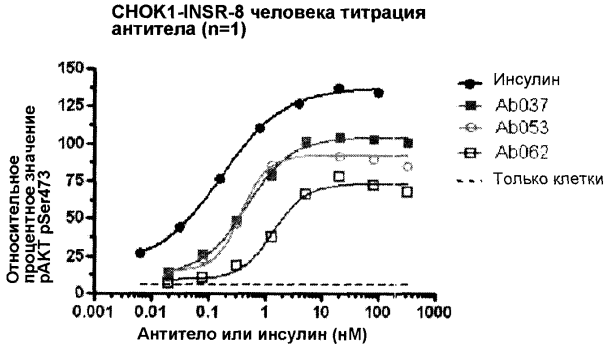


Фиг. 40

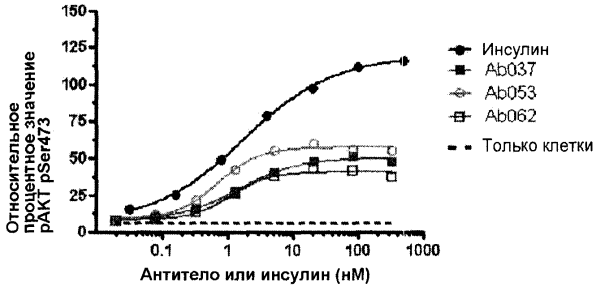

A.
CHOK1-INSR-8 человека титрация инсулином +/- антитело (n=1)
Относительное процентное значение pAKT pSer473
Инсулин (нМ)
Инсулин+антитело
+ 2мкг/мл Ab001
+ 10мкг/мл Ab077
+ 20мкг/мл Ab078
+ 2мкг/мл Ab079
+ 2мкг/мл Ab083
+ 1мкг/мл Ab085
+ 10мкг/мл Ab085
+ 10 мкг/мл антитела к гемоцианину фиссуреллы
Только антитело
+ 2мкг/мл Ab001, только клетки
+ 10мкг/мл Ab077, только клетки
+ 20мкг/мл Ab078, только клетки
+ 2мкг/мл Ab079, только клетки
+ 2мкг/мл Ab083, только клетки
+ 1мкг/мл Ab085, только клетки
+ 10мкг/мл Ab085, только клетки
+ 10 мкг/мл антитела к гемоцианину фиссуреллы, только клетки
B.
CHOK1-INSR-8 мыши титрация инсулином +/- антитело (n=1)
Относительное процентное значение pAKT pSer473
Инсулин (нМ)
Инсулин+антитело
+ 2мкг/мл Ab001
+ 20мкг/мл Ab077
+ 20мкг/мл Ab078
+ 20мкг/мл Ab079
+ 10мкг/мл Ab083
+ 20мкг/мл Ab085
+ 10 мкг/мл антитела к гемоцианину фиссуреллы
Только антитело
+ 10 мкг/мл антитела к гемоцианину фиссуреллы, только клетки
C.
CHOK1-INSR-8 человека титрация инсулином +/- антитело (N=1)
Относительное процентное значение pAKT pSer473
Инсулин (нМ)
Только инсулин
Инсулин с + 1мкг/мл Ab080

Фиг. 41

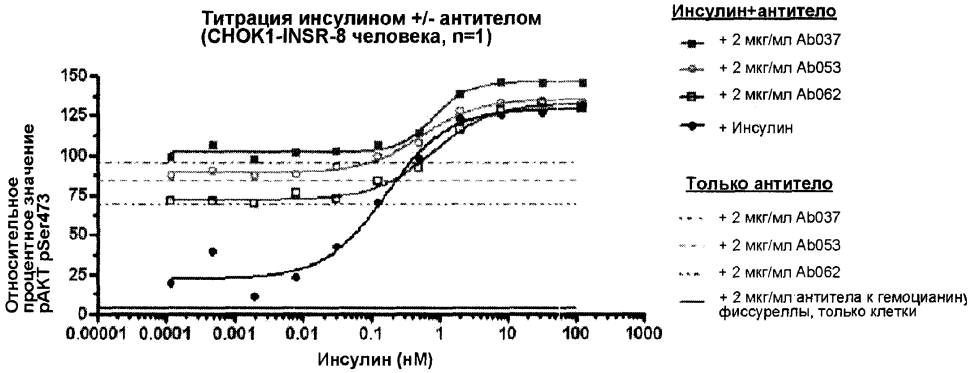
A..



B..

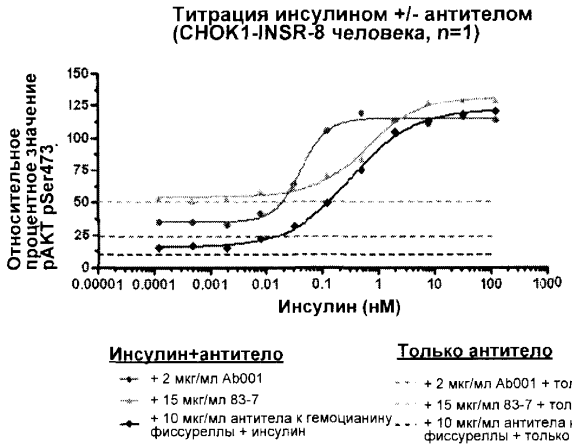


Фиг. 42



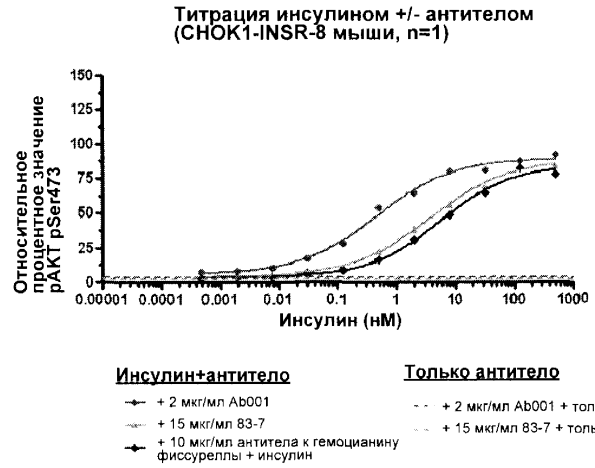
Фиг. 43

A.



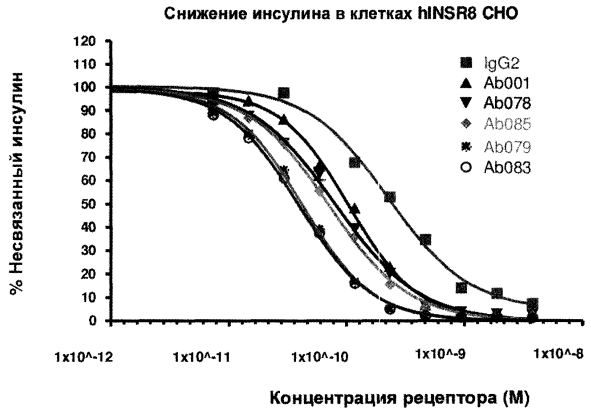
	+ 2 мкг/мл Ab001	+ 15 мкг/мл 83-7	+ 2 мкг/мл антитела к гемоцианину фиссуреллы
EC50	0.04093	0.6235	0.3129
EC50 (95% интервал достоверности	0.03330 до 0.05030	0.4215 до 0.9225	0.2483 до 0.3942

B.

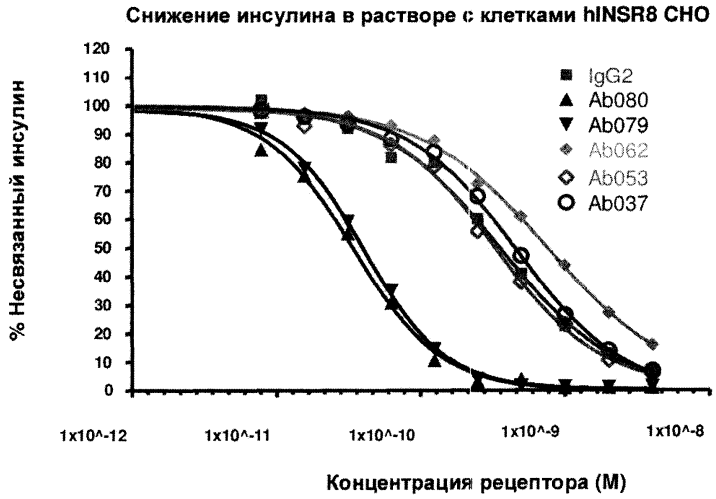


	+ 2 мкг/мл Ab001	+ 15 мкг/мл 83-7	+ 10 мкг/мл антитела к гемоцианину фиссуреллы
EC50	0.4418	3.622	5.293
EC50 (95% интервал достоверности	0.2741 до 0.7121	2.681 до 4.893	3.294 до 8.505

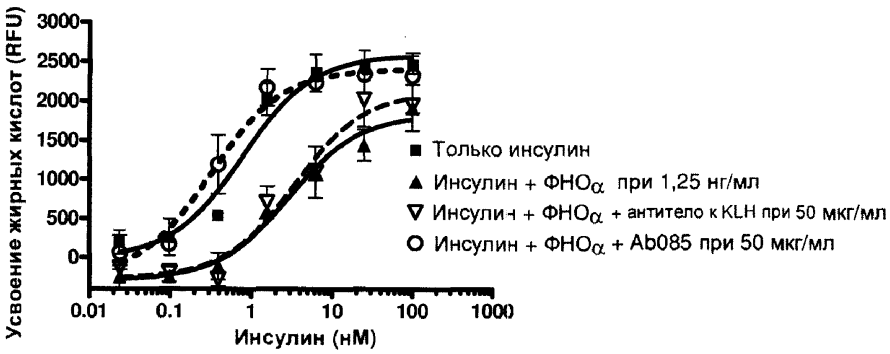
Фиг. 44



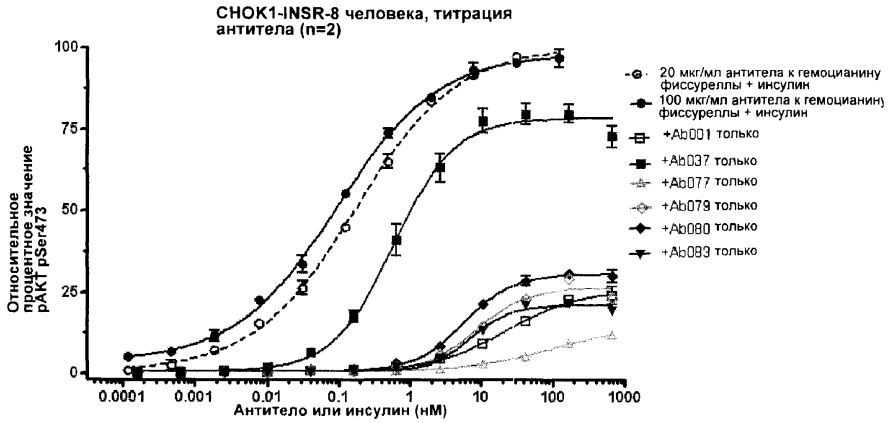
Фиг. 45



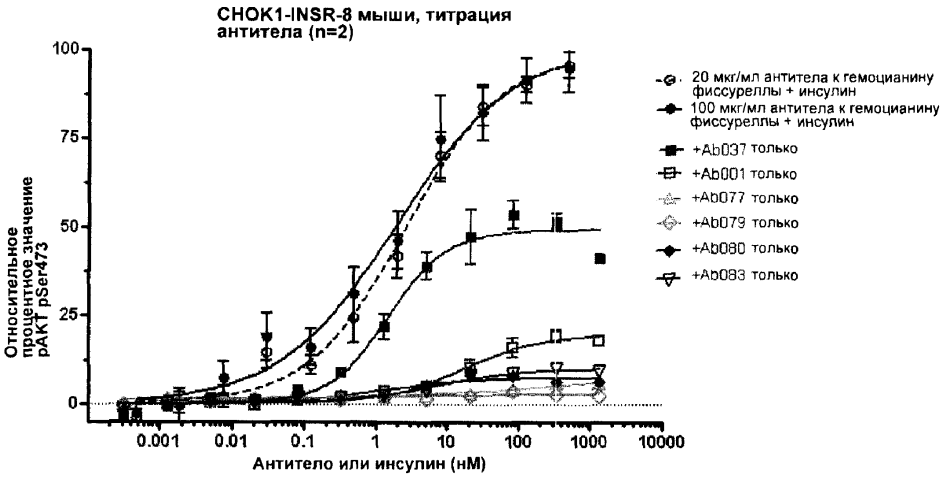
Фиг. 46



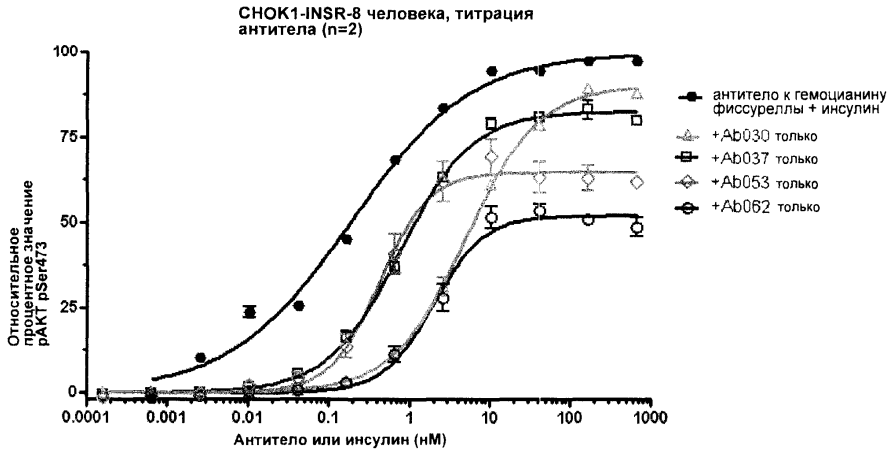
Фиг. 47



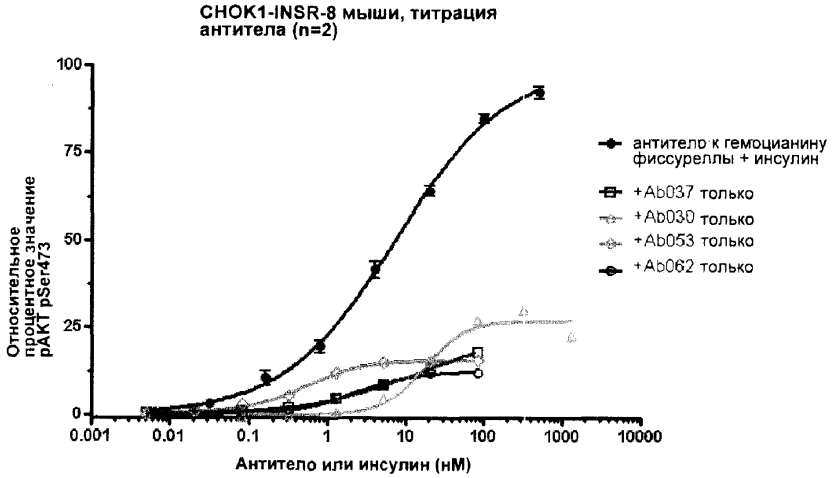
Фиг. 48



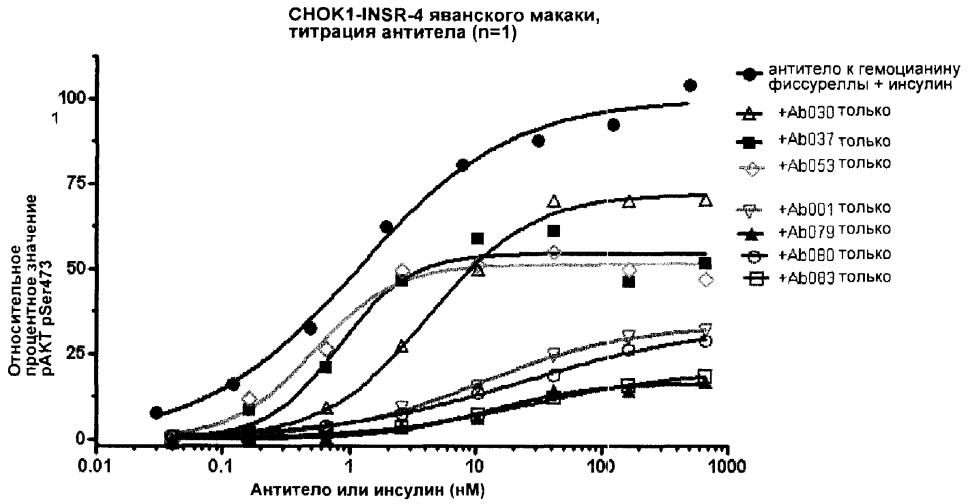
Фиг. 49



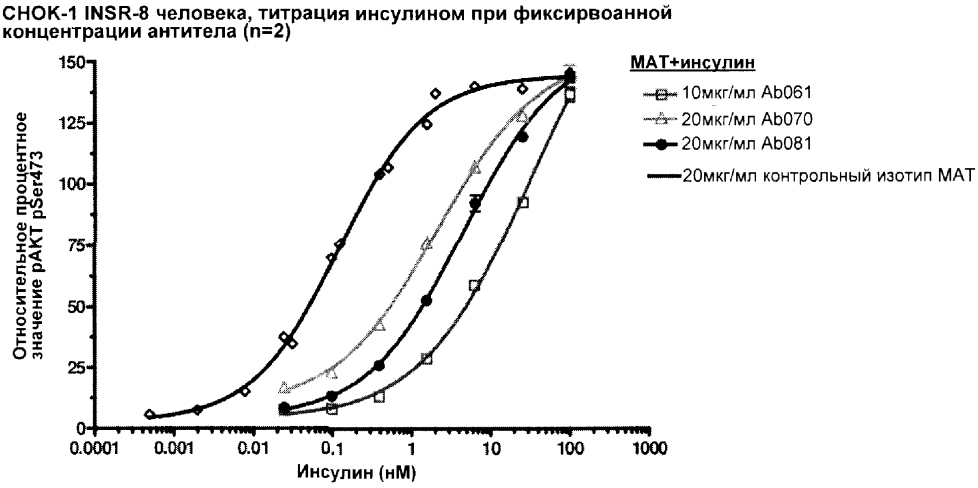
Фиг. 50



Фиг. 51



Фиг. 52



Фиг. 53

Таблица 1

Последовательности легкой цепи

Клон	МКПК человека		Рецептор инсулина CHO человека		МКПК яванского макаки		Рецептор инсулина CHO яванского макаки		МКПК кролика		Рецептор инсулина CHO кролика	
	(-) инсулин	*(+) инсулин*	*(-) инсулин*	*(+) инсулин*	*(-) инсулин*	*(+) инсулин*	*(-) инсулин*	*(+) инсулин*	*(-) инсулин*	*(+) инсулин*	*(-) инсулин*	*(+) инсулин*
Ab001	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	++	+
Ab010	+	++			-	-						
Ab018					+	++						
Ab030	+	++			+	+						
Ab037	+	+	+	++	+	++	+	++	+	+	++	+
Ab040	+	+			+	++						
Ab050			++	+			++	+			+	+
Ab052			+	+			+	+			++	+
Ab053			++	+	+	+	++	+	+	+	++	+
Ab054			++	+			++	+			++	+
Ab058			+	+			+	+			++	+
Ab062			+	+			+	+	+	+	++	+
Ab077					+	++			-	-		
Ab078			-	++	+	++	-	++	-	++	-	++
Ab079					+	++			+	++		
Ab080			+	++	+	+	+	++	+	+	+	++
Ab083					+	++			+	++		
Ab085			-	++	+	++	-	++	+	++	-	++

Название	Ab #	L-FR1	L-CDR1	L-FR2	L-CDR2	L-FR3	L-CDR3	L-FR4	SEQ ID NO:
XPA-15-093_VL_	Ab023	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	ISNIGSNY-	VSWYQQLPGTAPKLLIY	GNS	NRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS-LSPHV	VFGGGTKLTVLG	21
XPA-15-096_VL_		QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	FSNIGSNY-	VYWYQQLPGTARKLLIY	ADT	FRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS-LNGV-	VFGGGTKLTVLG	22
XPA-15-094_VL_	Ab043	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	ISNIGSNY-	VSWYQQLPGTAPKLLIY	GNS	NRPSGVPGRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS-LSPHV	VFGGGTKLTVLG	23
XPA-15-106_VL_		QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	SSNIGSNT--	VTWYQQLPGTAPKLLIY	SNN	QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	ATWDDS-LSGW-	VFGGGTKLTVLG	24
XPA-15-105_VL_		QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGG	FSNIGSNI-	VNWYQQLPGTAPKLLIY	SNN	QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	ETWDSN--TQ--	VFGGGTKLTVLG	25
XPA-15-100_VL_		QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	ASNLGMHF-	VSWYQQLPGTAPKLLIY	DND	QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	QSYDSS-LSGPV	LFGGGTKLTVLG	26
XPA-15-124_VL_		QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGG	SSNIGAGYD	VHWYQQLPGTAPKLLIY	GNN	NRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS-LSGP-	VFGGGTKLTVLG	27
XPA-15-121_VL_	Ab047	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	SSNIGSNT-	VNWYQQLPGTAPKLLIY	DNN	KRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	QSYDSS-LSGWE	VFGGGTKLTVLG	28
XPA-15-122_VL_		QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	SSNIGRNP-	VNWYQQLPGTAPKLLIY	GNS	NRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS-LNGQ-	VFGGGTKLTVLG	29
XPA-15-127_VL_		QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGN	SSNIGNNY-	VAWYQQLPGTAPKLLIY	SDH	QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS-LSGHV	IFGGGTKLTVLG	30
XPA-15-125_VL_		QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	NSNIGSRT-	VNWYQQLPGTAPKLLIY	ENN	KRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	SSYAGS--NNLG	VFGGGTKLTVLG	31
XPA-15-133_VL_		QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	FSNIGGNT-	VNWYQQLPGTAPKLLIY	SYD	QRPSGVPDRFSGSKSGTSALAISGLRSEDEADYYC	ASWDVS-LSGV-	VFGGGTKLTVLG	32
XPA-15-135_VL_		QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	SSNIGNNA-	VNWYQQLPGTAPKLLIY	TDS	RRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	VSRDDS-LNGW-	VFGGGTKLTVLG	33
XPA-15-139_VL_	Ab018	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	SSNIGSNT-	VNWYQQLPGTAPKLLIY	DNN	KRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	ATWDDS-LNGP-	IFGGGTKLTVLG	34
XPA-15-138_VL_	Ab001	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	TSNIGSNT-	VNWYQQLPGTAPKLLIY	RNN	QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS-LNGFV	VFGGGTKLTVLG	35
XPA-15-143_VL_		QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	SSNIGSNT-	VNWYQQLPGTAPKLLIY	GNT	NRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS-LSGV-	VFGGGTKLTVLG	36
XPA-15-141_VL_		QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	SSNIGNNY-	VFWYQQLPGTAPKLLIY	RNY	QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	ATWDDS-LTGW-	VFGGGTKLTVLG	37
XPA-15-145_VL_	Ab012	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	RSNIGANT-	VNWYQQLPGTAPKLLIY	GVN	HRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS-LSGW-	VFGGGTKLTVLG	38
XPA-15-140_VL_		QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	SSNIGSNT-	VNWYQQLPGTAPKLLIY	GAT	NRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	SSWDDS-LSGP-	VFGGGTKLTVLG	39
XPA-15-159_VL_	Ab015	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	TSNIGNNY-	VSWYQQLPGTAPKLLIY	GNS	NRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	SAWDDT-LNGP-	VFGGGTKLTVLG	40
XPA-15-167_VL_		QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	SSNIGNNY-	VSWYQQLPGTAPKLLIY	GDI	NRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDR-LNGP-	VFGGGTKLTVLG	41
XPA-15-169_VL_	Ab034	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGG	SSNIGSNT-	VYWYQQLPGTAPKLLIY	DNN	KRPAGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS-LNGP-	VFGGGTKLTVLG	42
XPA-15-013_VL_	Ab006	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	ISNIGSNY-	VSWYQQLPGTAPKLLIY	GNS	NRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS-LSPHV	VFGGGTKLTVLG	43
XPA-15-020_VL_		QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	SSNIGNNY-	VSWYQQLPGTAPKLLIY	SNN	QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS-LNGL-	VFGGGTKLTVLG	44
XPA-15-017_VL_	Ab017	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCTGS	SSNIGAGYD	VHWYQQLPGTAPKLLIY	GNS	NRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS-LSGW-	VFGGGTKLTVLG	45
XPA-15-009_VL_	Ab022	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCTGS	SSNIGAGYD	VHWYQQLPGTAPKLLIY	RND	QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDHS-LSAHV	VFGGGTKLTVLG	46
XPA-15-033_VL_		QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGT	SSNFGRRT-	VNWYQQLPGTAPKLLIY	SNN	LRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS-LNGW-	VFGGGTKLTVLG	47
XPA-15-037_VL_	Ab031	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGR	SSNIGYNY-	VSWYQQLPGTAPKLLIY	GNS	NRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS-LSGP-	VFGGGTKLTVLG	48
XPA-15-042_VL_	Ab027	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGR	SSNIENNY-	VSWYQQLPGTAPKLLIY	GNS	NRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS-LNGV-	VFGGGTKLTVLG	49
XPA-15-036_VL_	Ab030	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCTGS	SSNIGAGYD	VHWYQQLPGTAPKLLIY	DNN	KRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	ASWDDS-HLHV--	LFGGGTKLTVLG	50
XPA-15-047_VL_	Ab036	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	SSNIGGNS-	VHWYQQLPGTAPKLLIY	GNS	NRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS-LSPHV	VFGGGTKLTVLG	51
XPA-15-007_VL_	Ab029	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGN	SSNIGNSY-	VSWYQQLPGTAPKLLIY	SND	IRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS-LSGP-	VFGGGTKLTVLG	52
XPA-15-074_VL_	Ab039	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	SSNIGSNT-	VNWYQQLPGTAPKLLIY	RNN	QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS-LSGP-	VFGGGTKLTVLG	53
XPA-15-085_VL_	Ab011	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	ISNIGSNY-	VSWYQQLPGTAPKLLIY	GNS	NRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS-LSPHV	VFGGGTKLTVLG	54
XPA-15-075_VL_	Ab009	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	ISNIGSNY-	VSWYQQLPGTAPKLLIY	GNS	NRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS-LSPHV	VFGGGTKLTVLG	55
XPA-15-082_VL_	Ab041	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	SSNIGSNT-	VTWYQQLPGTAPKLLIY	SNN	QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	ATWDDS-LSGW-	VFGGGTKLTVLG	56
XPA-15-066_VL_	Ab004	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGG	NSNIGSNY-	VSWYQQLPGTAPKLLIY	RNN	QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS-LSGR-	VFGGGTKLTVLG	57
XPA-15-080_VL_		QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCTGS	SSNIGAGYV	VHWYQQLPGTAPKLLIY	TND	QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	QSYDRS-LSGS-	VFGGGTKLTVLG	58
XPA-15-099_VL_		QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	ISNIGSNY-	VSWYQQLPGTAPKLLIY	GNS	NRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS-LSPHV	VFGGGTKLTVLG	59
XPA-15-102_VL_	Ab044	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	TSNIGNNY-	VSWYQQLPGTAPKLLIY	GNS	NRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	SAWDDT-LNGP-	VFGGGTKLTVLG	60
XPA-15-115_VL_	Ab046	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	ISNIGSNY-	VSWYQXLPGTAPKLLIY	GNS	NRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS-LSPHV	VFGGGTKLTVLG	61
XPA-15-111_VL_	Ab045	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	SSNIGSNT-	VNWYQQLPGTAPKLLIY	GNS	NRSSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDR-LNGP-	VFGGGTKLTVLG	62
XPA-15-142_VL_		QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGR	NSNIGSNY-	VSWYQQLPGTAPKLLIY	RNN	QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDVADYYC	SSYAGS--NNFV	VFGGGTKLTVLG	63
XPA-15-146_VL_		QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGT	DSNFGSNS-	VNWYQQLPGTAPKLLIY	GNS	NRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS-LNGW-	VFGGGTKLTVLG	64
XPA-15-144_VL_		QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCTGS	SSNIGAGYD	VHWYQQLPGTAPKPLIY	GNS	NRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	TSYTGN--NQFV	IFGGGTKLTVLG	65
XPA-15-154_VL_	Ab033	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGI	SSNIGNNF-	VSWYQQLPGTAPKLLIY	GNS	NRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS-PRGP-	VFGGGTKLTVLG	66
XPA-15-158_VL_	Ab014	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGC	SSNIGNNA-	VNWYQQLPGTAPKLLIY	RSD	QRLAGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	QSYDSS-LIGHW	VFGGGTKLTVLG	67
XPA-15-155_VL_	Ab048	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGI	SSNIGNNF-	VSWYQQLPGTAPKLLIY	GNS	NRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS-PRGP-	VFGGGTKLTVLG	68
XPA-15-165_VL_	Ab049	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGR	SSNIGYNY-	VSWYQQLPGTAPKLLIY	GNS	NRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS-LSGP-	VFGGGTKLTVLG	69
XPA-15-023_VL_	Ab025	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	TSNIGNNY-	VSWYQQLPGTAPKLLIY	GNS	NRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	SAWDDT-LNGP-	VFGGGTKLTVLG	70
XPA-15-022_VL_	Ab024	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGT	SSNLGSHT-	VSWYQQLPGTAPKLLIY	DNN	ERPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS-LSAW-	VFGGGTKLTVLG	71
XPA-15-019_VL_		QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	SSNIGNNA-	VNWYQQLPGTAPKLLIY	SNN	QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	GTWDDS-LSVW-	VFGGGTKLTVLG	72
XPA-15-021_VL_	Ab023	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	SSNIGSNP-	VNWYQQLPGTAPKLLIY	DNS	KRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	GTWDDS-LSVW-	VFGGGTKLTVLG	73
XPA-15-006_VL_	Ab021	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCTGT	SSNIGAGFD	VHWYQQLPGTAPKLLIY	SNN	QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS-LNGL-	VFGGGTKLTVLG	74
XPA-15-026_VL_	Ab026	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	SSNIGNNY-	VSWYQQLPGTAPKLLIY	GNS	NRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS-LNGP-	VFGGGTKLTVLG	75
XPA-15-043_VL_		QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCTGS	SSNIGAGYD	VHWYQQLPGTAPKLLIY	KNN	QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS-LGG--	VFGGGTKLTVLG	76
XPA-15-048_VL_	Ab037	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	SSNIGNSA-	VNWYQQLPGTAPKLLIY	DNN	KRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	QVWDSG--TA--	VFGGGTKLTVLG	77
XPA-15-062_VL_		QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	SSNIGNNY-	VSWYQQLPGTAPKLLIY	GNS	NRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS-LNGP-	VFGGGTKLTVLG	78
XPA-15-059_VL_	Ab028	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	SSNIGNNY-	VSWYQQLPGTAPKLLIY	SNN	QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS-LNGL-	VFGGGTKLTVLG	79

XPA-15-064_VL_		QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	SSNIGRRT-	VNWYQQLPGTAPKLLIY	DNN	KRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	ATWDDS-LNGW-	VFGGGTKLTVLG	80
XPA-15-068_VL_	Ab013	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	TSNIGNNY-	VSWYQQLPGTAPKLLIY	GNS	NRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	SAWDDT-LNGP-	VFGGGTKLTVLG	81
XPA-15-081_VL_	Ab007	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	TSNIGNNY-	VSWYQQLPGTAPKLLIY	GNS	NRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	SAWDDT-LNGP-	VFGGGTKLTVLG	82
XPA-15-065_VL_	Ab038	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	SSNIGSNT-	VTWYQQLPGTAPKLLIY	SNN	QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	ATWDDS-LSGW-	VFGGGTKLTVLG	83
XPA-15-077_VL_	Ab040	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	SSNIGSNS-	VNWYQQLPGTAPKLLIY	DNN	KRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS-LSGP-	VFGGGTKLTVLG	84
XPA-15-086_VL_	Ab042	QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	SSNIGSNT-	VTWYQQLPGTAPKPLIY	SNN	QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	ATWDDS-LSGW-	VFGGGTKLTVLG	85
XPA-15-088_VL_		QSVLT---QPP-SASGTPGQRVTISCSGS	ASNLGMHF-	VSWYQQLPGTAPKLLIY	DND	QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	QSYDSS-LSGPV	LFGGGTKLTVLG	86
XPA.015.175_VL	Ab019	DLVLTQSPASLAVSLGQRATISCRAS	KSVSTSGYSY	IHWYQQKPGQPPKLLIY	LAS	NLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYC	-QHNREP	RTFGGGTNLEIKR	1
XPA.015.176_VL	Ab088	DLVLTQSPASLAVSLGQRATISCRAS	KSVTTSGYSY	IHWYQQKPGQPPKLLIY	LAS	NLESGAPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAGNYYC	-QHNREP	RTFGGGTKLEIKR	2
XPA.015.177_VL		DIVMTQSPASLAVSLGQRATISCRAS	KSVSTSGYSY	IHWYQQKPGQPPKLLIY	LAS	NLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYC	-QHNREP	RTFGGGTNLEIKR	3
XPA.015.178_VL	Ab089	DLVLTQSPASLAVSLGQRATISCRAS	KSVSTSGYSY	IHWYQQKPGQPPKLLIY	LAS	NLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYC	-QHNREL	RTFGGGTKLEIKR	4
XPA.015.179_VL		DLVLTQSPASVAVSLGQRATISCRAS	KSVSTSGYSY	MHWYQQKPGQPPKLLIY	LAS	NLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDVATYYC	-QHNRDP	RTFGGGTKLEIKR	5
XPA.015.181_VL	Ab010*	DVQIIQSPSYLAASPGETITINCRAS	KSIS----KY	LAWYQEKPGKTNKLLIY	SGS	TLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYC	QQHNEYP	LTFGAGTKLELKR	6
XPA.015.182_VL	Ab020	DVQITQSPSYLAASPGETITINCRAS	KSIS----KY	LAWYQEKPGKTNKLLIY	SGS	TLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYC	QQHNEYP	LTFGAGTKLELKR	7
XPA.015.183_VL		DLVLTQSPASLAVSLGQRATISCRAS	KSVSTSGYSY	IHWYQQKPGQPPKLLIY	LAS	NLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYC	-QHNREL	RTFGGGTKLEIKR	8
XPA.015.184_VL		DIVMTQSPTSLAVSLGQRATISCRAS	ESVSISGYSY	IHWYQQRPGQPPKLLIY	LAS	NLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDVATYYC	-QHNRDP	RTFGGGTKLEIKR	9
XPA.015.185_VL	Ab003	DIQMTQSPSYLAASPGETITINCRAS	KSIS----KY	LAWYQEKPGKTNKLLIY	SGS	TLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYC	QQHNEYP	LTFGAGTKLELKR	10
XPA.015.186_VL		DIQMTQSPSSLSASLGDTITITCHAS	QNIN----VW	LTWYQQKPGNIPKLLIS	KAS	NLHTGVPSRFSGSGSGTGFTLTISSLQPEDIATYYC	QQGQSYP	WTFGGGTKLEIKR	11
XPA.015.187_VL		DLVLTQSPASLAVSLGQRATISCRAS	KSVSTSGYSY	IHWYQQKPGQPPKLLIY	LAS	NLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAGNYYC	-QHNREP	RTFGGGTKLEIKR	12
XPA.015.188_VL	Ab008	DVQITQSPSYLTASPGETITINCRAS	KSIS----NY	LAWYQEKPGKTNKLLIY	SGS	TLQSGIPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEPEDFAMYYC	QQHNEYP	LTFGAGTKLELKR	13
XPA.015.189_VL		DIVMTQSPASLAVSLGQRATISCRAS	KSVSISGYSY	IHWYQQKPGQPPKLLIY	LAS	NLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAGNYYC	-QHNREP	RTFGGGTKLEIKR	14
XPA.015.190_VL	Ab002	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRAS	QDIS----NY	LNWYQQKPDGTVKLLIY	YTS	RLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATFYC	QQYSDLP	YTFGGGTKLEIKR	15
XPA.015.191_VL		DVQITQSPSSLSASLGERVSLTCRAS	QDIG----SS	LNWLQQEPDGTIKRLIS	ATS	TLDSGVPKRFSGSRSGSDYSLTISSLEPEDFVDYYC	LQYASYP	FTFGSGTKVEIKR	16
XPA.015.192_VL	Ab005	DIQMTQSPSYLAASPGETITINCRAS	KSIS----KY	LAWYQEKPGKTNKLLIY	SGS	TLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYC	QQHNEYP	LTFGAGTKLELKR	17
XPA.015.173_VL	Ab087	DIQMTQSPSSLSASLGGKVTITCKAS	QHIN----KY	IAWYQHKPGKGPRLLIH	YTS	TLQPGIPSRFSGSGSGRDYSFSISNLEPEDIATYYC	LQYDNL-	YTFGGGTKLEIKR	18
XPA.015.174_VL		DIVMTQSPSSLFASLGERVSLTCRAS	QDIG----DR	LYWLQQEPDGAIKRLIF	ATS	SLDSGVPKRFSGSRSGSEYSLTISSLESEDFVDYYC	LQYASSP	WTFGGGTKLEIKR	19
XPA.015.172_VL		DIVMTQSPTSLAVSLGQRATISCRAS	KSVSTSGYSY	IHWYQQKPGQPPKLLIY	LAS	NLESGVPARFSGSGSGTDFILNIHPVEEEDAATYYC	-QHNRDP	RTFGGGTKLELKR	20
XPA.15.193	Ab050	NFMLTQPHSVSESPGKTVSISCTGS	SGSIGSNY	VQWYQQRPGSAPTTVIY	EDN	QRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYC	QSYYSNNV	VFGGGTKLTVL	87
XPA.15.194	Ab051	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGN	SLRSFY	ATWYQQKPGQAPVLVIY	GKN	IRPSGIPDRFSGSNSGDTASLTITGTQAEDEADYYC	NSRDNNRNHL	LFAGGTKVTVL	88
XPA.15.195	Ab052	QAMLTQPASLSASPGASASLTCTLR	SGINVVAYN	IYWYRQKSGSPPQSVLR	YKSDSDS	ERDSGVPSRFSGSKDVSANAGILLISGLQSEDEADYYC	LIWHNSAW	VFGGGTQLTVL	89
XPA.15.196	Ab053	QSALTQPRSVSESPGKTVTISCTGS	GGSIGSNY	VQWYQQRPGSAPTTVIF	EDN	RRPSGVPDRFSGSIHSSSNSASLTISGLKTEDEADYYC	QSYVGTIV	VFGGGTKVTVL	90
XPA.15.197	Ab054	QSALTQPRSVSESPGKTVTISCTGS	GGSIGSNY	VQWYQQRPGSAPTTVIF	EDN	RRPSGVPDRFSGSIHSSSNSASLTISGLKTEDEADYYC	QSYVGTIV	VFGGGTKVTVL	91
XPA.15.198	Ab055	SYELTQLPSVSVSPGQTARITCSGD	ALPNKY	AYWYQQKSGQAPVLVIY	EDT	RRPSEIPERFSASSSGTMATLTISGAQVEDEAEYYC	YSTDSSGNER	VFGGGTKLTVL	92
XPA.15.199	Ab056	QSALTQPASVSESPGQSITISCTGT	GSDIGTYNL	VSWYQHHPGKAPKLMIY	EVT	KRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC	SSYTSSSTLY	VFGTGTKLTVL	93
XPA.15.200	Ab057	QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLT	SGSVSTSYY	FSWYQQTPGQAPRMLVH	STS	TRYSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYC	ALYMGSGIY	VFGGGTQLTVL	94
XPA.15.201		QAVLTQPSSSASPGESARLTCTLP	SDINVRYHN	IYWYQEKPGSPPRYLLY	YYSDSSK	GQGSGVPSRFSGSKDVSTNTGILVISGLQSEDEAEYYC	MTWSSNGSG	VFGGGTQLTVL	95
XPA.15.202	Ab058	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGS	RSNIGADHD	VHWYQQIPGRAPKLLIY	GNS	NRPSGVPDRFSGSRSGTSASLAITGLQAEDEADYYC	QSYDNSLSGS	VFGGGTKLTVL	96
XPA.15.203		QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLN	SASVSTYSY	FSWYQQTPGQAPRMLIY	STN	TRSSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYC	ALYMGSGIW	VFGGGTKLTVL	97
XPA.15.204	Ab059	QAVLTQPASLSASPGASASLTCTLR	SDISVGVYR	ISWYQQKPGSPPQYLLS	YNSDSNN	HQGSGVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQSEDEADYYC	MIWHINAW	VFGGGTKVTVL	98
XPA.15.205		QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCIGS	RSDIGYYA	VHWYRQLPGTAPKLVIY	AND	NRPSGVPDRFSGSKSGTSAFLAISGLQADDEADYYC	QSYDTVTGKG	VFGGGTKVTVL	99
XPA.15.206		QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGS	SSNIGAGYY	AHWYQQLPGTAPRLLIY	GNS	NRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYC	QSYDSSLSGPNY	VFGTGTKVTVL	100
XPA.15.207	Ab060	QAVLTQPASLSASPGESARLTCTLP	SDINVRYYN	IYWYQQKPGSPPRYLLY	YYSDSNK	DQGSGVPSRFSGSKDVSTNTGILVISGLQSEDEAEYYC	MTWSSNGSG	VFGGGTQLTVL	101
XPA.15.208		QAVLTQPASLSASPGESARLTCTLP	SDINVRYHN	IYWYQEKPGSPPRYLLY	YYSDSSK	GQGSGVPSRFSGSKDVSTNTGILVISGLQSEDEAEYYC	MTWSSNGSG	VFGGGTKLTVL	102
XPA.15.209	Ab061	QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLS	SGSVSTGYS	PGWYQQTPGQAPRTLVY	NTN	TRSSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYC	ALYMGSGTY	VFGGGTKLTVL	103
XPA.15.211	Ab062	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGS	SSNIGAGYD	VHWYQQLPGTAPKLLIY	GNS	NRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYC	QSYDSSLSGSG	VFGGGTKVTVL	104
XPA.15.212	Ab063	SSELTQPPSVSVAPGKTATITCGGD	NIASKS	VHWYQQKPGQAPVLVLY	DDS	VRPSDIPERFSGSNSANTATLTLTRVEAGDEGEYYC	QVWDVRSDHP	FFGPGTKVTVL	105
XPA.15.213	Ab064	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASS	TGAVTSGYY	PNWFQQKPGQAPRALIY	STS	NKHSWTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC	LLYYGGAQFW	VFGGGTQLTVL	106
XPA.15.214	Ab065	QAGLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGD	NNIVGDQG	AAWLQQHQGHPPKLLSF	RNN	SRPSGISERFSASRSRNTASLTITRLQPEDAADYYC	SAWDSFLSAW	VFGGGTKLTVL	107
XPA.15.215	Ab066	SSELTQDPAVSVAVGQSVRITCQGD	SLKNFY	ATWYQQRPGQAPLLVIF	GKN	NRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTVTGAQADDEADYYC	NSPDSSNKLV	VFGGGTKLTVL	108
XPA.15.216	Ab067	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAS	QSVSSSY	LAWYQQKPGQAPRLLIY	GAS	SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYGSSL	GTFGQGTKLEIK	109
XPA.15.217	Ab068	DVVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKAS	QSLLYTNGDTY	VSWYVQKPGQAPQLLFS	DVS	SRFFGVPDRFSASGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC	VQAMYLP	LVFGQGTKVEIK	110
XPA.15.218		SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGD	SLRSYY	ASWYQQKPGQAPVLVIY	GKN	NRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYC	NSRDSSGNHL	MFGGGTQLTVL	111
XPA.15.219	Ab086	QSALTQPASVSGSLGQSITISCTGT	SSDIGLYKF	VSWYQQHPGKAPKLMIY	DVS	YRPSGVSNRFSGSSSGNTASLTISGLQAEDEADYYC	NSYTSSSTLV	VFGGGTKLTVL	112
XPA.15.220		SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGD	SLRNYY	ASWYQQKPGQAPLLVMY	DRN	SRPSGIPDRFSGSRSGNTASLTITGAQAEDEADYYC	NSRDSSGNHA	VFGGGTQLTVL	113
XPA.15.221		SYELMQPPSVSVAPGQTATITCGGN	NIGTKS	VHWYQQKTGQAPVLVVY	DDS	DRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRLEAGDEADYYC	QVWDRSSEHH	VFGGGTQLTVL	114
XPA.15.222	Ab069	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGD	SLRSYY	ASWYQQKPGQAPVLVIY	GKN	NRPSGIPDRFSGSRSGNTASLTITGAQAEDEADYYC	NSRDSSGNHV	VFGGGTKVTVL	115
XPA.15.223		SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGD	SLRSYS	VAWYQQKPGQAPLLVIY	GNT	NRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYC	NSRASSGFSW	VFGGGTKVTVL	116
XPA.15.224		SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGD	SLRSYY	ASWYQQKPGQAPVLVIY	GKN	NRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYC	NSRDSSGNHA	VFGGGTQLTVLG	117
XPA.15.225		SYELMQPPSVSVAPGQTATITCGGN	NIGTKS	VHWYQQKTGQAPVLVVY	DDS	DRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRLEAGDEADYYC	QVWDRSSEHH	VFGGGTQLTVL	118
XPA.15.226	Ab070	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGD	SLRSYY	TSWYQQKPGQAPVLVIF	GKN	NRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYC	NSRDSSGNYA	VFGGGTQLTVL	119

XPA.15.227	Ab071	SSELTQDPAVSVALGQTV RITCQGD	SLRSYY	ASWYQQKPGQAPVLVFY	GKN	NRPSGIPGRFSGSKSGNTASLTITGAQAEDEADYYC	NSRDSS GNHW	VFGGGTKLTVL	120
XPA.15.228	Ab072	SYVLTQPPSASGTPGQRV TISCSGS	NSNIGSNF	VTWYQQLPGAAPKLLIY	TNS	QRPSGVPDRFSGSRSGTSASLAISGLQSEDEADYFC	AAWDDS LNGP	VFGGGTQLTVL	121
XPA.15.229	Ab073	QSVLTQPPSVSAAAGQKV TISCSGS	SSNIGNNY	VTWYQHVPGTAPKLLIF	DND	KRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYC	GTWDSS LNP	LFGGSTQLTVL	122
XPA.15.230	Ab074	SSELTQDPAVSVALGQTV RITCQGD	SLRSYY	ASWYQQKPGQAPVLVIY	GKN	NRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYC	SSRDSS GDQW	VFGGGTKLTVL	123
XPA.15.231		SSELTQNPAVSVALGQTV RITCQGD	SLRNYY	ASWYQQKPGQAPLLVMY	DRN	SRPSGIPDRFSGSRSGNTASLTITGAQAEDEADYYC	NSRDSS GNHA	VFGGGTQLTVL	124
XPA.15.232	Ab075	QSVLTQPPSVSAAPGQKV TISCSGS	SSNIGNNY	VTWYQHVPGTAPKLLIF	DND	KRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYC	GTWDSS LNP	LFGGGTQLTVL	125
XPA.15.233		QSVLTQPPSVSAAAGQKV TISCSGS	SSNIGNNY	VTWYQHVPGTAPKLLIF	DND	KRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYC	GTWDSS LNP	LFGGGTQLTVL	126
XPA.15.234		QSVLTQPPSVSAAAGQKV TISCSGS	SSNIGNNY	VTWYQHVPGTAPKLLIF	DND	KRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYC	GTWDSS LNP	LFGGGTQLTVL	127
XPA.15.235		DVVMTQSPLSLPVTLGQP ASISCRSS	QSLVYSDGN TY	LNWFQQRPGQSPRRLIY	KVS	NRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC	MQGTH	WSFGQGTRLEIK	128
XPA.15.236		EIVLTQSPDFQSVTPKEK VTITCRAS	QSIGSS	LHWYQQKPDQSPKLLIK	YAS	QSISGVPSRFSGSGSGTDFTLTTNSLEAEDAATYYC	HQSSSL P	WTFGQGTKVEIK	129
XPA.15.237		DIQLTQSPSSLSASVGDR VTITCRAS	QGISNS	LAWYQQKPGKAPKLLLY	AAS	RLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC	QQYYST L	LTFGGGTKVDIK	130
XPA.15.238		EIVLTQSPGTLSLSPGER ATLSCRAS	QSVSSSY	LAWYQRKPGRAPRLLIY	GAS	SRATGIPNRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYGSS P	PTFGQGTKLEIK	131
XPA.15.239		DIVMTQSPLSLPVTPGEP ASISCRSS	QSLLHSNGY NY	LDWYLQKPGQSPQLLIY	LGS	NRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC	MQALQT P	HTFGQGTKLEIK	132
XPA.15.241	Ab076	EIVMTQSPATLSVSPGER ATLSCRAS	QSISTN	LAWYQQKPGQTPRLLIY	GAS	TRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC	QQYNSE	ISFGQGTRLEIK	133
XPA.15.242		DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRAS	QGISNS	LAWYQQKPGKAPKLLLY	ATS	RLETGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFASYYC	QQFYSN	PSFGQGTKVEIK	134
XPA.15.243	Ab077	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRAS	QGISSW	LAWYQQKPGKAPKLLIY	AAS	SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQANSF P	ITFGQGTRLEIK	135
XPA.15.244	Ab078	DIQLTQSPSSLSASVGDR VTITCRAS	QGISSA	LAWYQQKPGKAPKVLIY	DAS	SLERGVPSRFSGSGTGTDFTLTISSLQPEDFASYYC	HQFNSY P	DTFGQGTRLEIK	136
XPA.15.245	Ab079	AIRMTQSPSTLSASVGDR VTITCRAS	QSISTW	LAWYQQKPGKAPKLLIY	TTS	TLESGVPSRFSGSRSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC	QQYNSY P	LTFGGGTKVEIK	137
XPA.15.246	Ab080	EIVLTQSPGTLSLSPGER ATLSCRAS	QSLSSSF	LAWYQQKPGQAPRLLIY	GAG	SRATGVPDRFSGSGYGTDFSLTISRLELEDFAVYYC	QQYDRS Q	ITFGQGTRLEIK	138
XPA.15.247	Ab081	DVVMTQSPLSLSVTLGQP ASISCRSS	LSLVYGDEN TY	LNWFQQRPGQSPRRLLY	KVS	DRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADDVGVYYC	MQGTHW P	YTFGQGTKLEIK	139
XPA.15.248	Ab082	EIVLTQSPDFQSVTPKET VTISCRAS	QNIGVS	LHWYQQKPDQSPKVLIK	YAS	QSLSGVPSRFSGTGSGTDFTLTIKSLEAEDAATYYC	LQTSSL P	WTFGQGTKVEIK	140
XPA.15.249	Ab083	AIQLTQSPSSLSASVGDR VTISCRAS	QSITSY	LNWYQQKPGKAPNLLIY	AAS	SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIAGLQPEDFATYYC	QQFDSY P	FTFGGGTKLEIK	141
XPA.15.250	Ab084	AIRMTQSPSTLSASVGDR VTITCRAS	QSISSW	LAWYQQTPGKAPKLLIY	AAS	NLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQSYNT P	LTFGGGTKVEIK	142
XPA.15.272		QSALTQPASVSGSPGQSI TISCLGT	INDVGLYNL	VSWYQQHPGKAPKLMIY	EVS	KRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEAVYYC	NSYTSS SNFW	VFGGGTQLTVLG	143
XPA.15.275	Ab085	QTVVTQEPSFSVSPGGTV TLTCGLT	SGSVSTRNF	PGWYQQTPGQTLRTLIY	NTN	TRSSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYC	VLYMTG DIW	VFGGGTKVTVLG	144
XPA.15.282		QSVLTQPPSVSAAAGQKV TISCSGS	SSNIGNNY	VTWYQHVPGTAPKLLIF	DND	KRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYC	GTWDSS LNP	LFGGGTQLTVLG	145
XPA.15.284		QSVLTQPPSVSAAAGQKV TISCSGS	SSNIGNNY	VTWYQHVPGTAPKLLIF	DND	KRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYC	GTWDSS LNP	LFGGGTQLTVLG	146
XPA.15.293		DIVMTQTPLSLPVTPGEP ASISCRSS	QSLLDSDDG NTY	LDWYVQKPGQSPQLLMY	SLS	YRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC	MQRIEF P	YTFGQGTKLEIKR	147
XPA.15.110		QSVLTQPPSASGTPGQRV TISCSGS	SSNIGRNP	ISWYQQLPGTAPKLLIY	NND	QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS LNGPVW	VFGGGTKLTVLG	148
XPA.15.120		QSVLTQPPSASGTPGQRV TISCSGS	SSNIGNNY	VSWYQQLPGTAPKLLIY	GNS	NRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDS LSAV	VFGGGTKLTVLG	149
XPA.15.163		QSVLTQPPSASGTPGLRV IISCAGS	SSNIGAGYD	VHWYHQLPGTAPKLLIY	GNS	NQPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	TSYTGN NQFV	IFGGGTKLTVLG	150

Таблица 2

Последовательности тяжелой цепи

Название	Ab #	H-FR1	H-CDR1	H-FR2	H-CDR2	H-FR3	H-CDR3	H-FR4	SEQ ID NO:
XPA.015.172_VH		QVQLQQSEAELVK PGASVKISCKAS	GYTFSSYW	MSWVKQRPGKGLEWIGQ	IYPGDGDT--	NYNGKFKGKATLTADKSSGTAYMQLSSLTSEDSAVYFC	ARGVS-GYGAMDY	WGQGTSVTVSS	151
XPA.015.173_VH	Ab087	EVQLVESGGGLVK PGGSLKLSCAAS	GFTFSNYA	MSWVRQTPEKRLEWVAT	IS--DGGHYI	DYPDNVKGRFTISRDNAKNNLYLQMSHLRSEDSAMYYC	ARA-----TNFAY	WGQGTLVTVSA	169
XPA.015.174_VH		QVQLQQSGPELVK PGASVKLSCKAS	GYTFTSYD	INWVKQRPGQGLEWIGW	IYPRDGST--	KSNEKFKGKATLTVDTSSSTAYMELHSLTSEDSAVYFC	AR-------EFDY	WGQGTLVTVSA	170
XPA.015.175_VH	Ab019	QVQLQQSEAELVK PGASVKISCKAS	GYTFSNYW	MNWVKQRPGKGLEWIGQ	IYPGDGDT--	NYNGKFKGKATLIADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFC	ARGVS-GYGAMDY	WGQGTSVTVSS	160
XPA.015.176_VH	Ab088	QVQLQQSEAELVK PGASVKISCKAS	GYTFSSYW	MSWVKQRPGKGLEWIGQ	IYPGDGDT--	NYNGKFKGKATLTADKSSGTAYMQLSSLTSEDSAVYFC	ARGVS-GYGAMDY	WGQGTSVTVSS	153
XPA.015.177_VH		QVQLQQSEAELVK PGASVKISCKAS	GYTFSNYW	MNWVKQRPGKGLEWIGQ	IYPGDGDT--	NYNGKFKGEATLIADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFC	ARGVS-GYGAMDY	WGQGTSVTVSS	159
XPA.015.178_VH	Ab089	QVQLQQSEAELVK PGASVKISCKAS	GYTFSSYW	MNWVKQRPGKGLEWIGQ	IYPGDGDT--	NYNVKFKGKATLTADKSSGTAYMQLSSLTSEDSAVYFC	ARGVS-GYGAMDY	WGQGTSVTVSS	154
XPA.015.179_VH		EVQLQQSVAELVK PGASVKISCKAS	GYTFSNYW	MNWVKQRPGKGLEWIGQ	IYPGDGDT--	NYNGRFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFC	ARGVS-GYGAMDY	WGQGTSVTVSS	161
XPA.015.181_VH	Ab010*	EVQLQQSGPVLVK PGASVKMSCKAA	GYTFTDSY	MNWVKQSHGKSLEWIGD	INPYNGGT--	SYNQHFKGKATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYC	AR-----RRGAMDY	WGQGTSVTVSS	163
XPA.015.182_VH		EIQLQQSGPVLVK PGASVKMSCKAA	GYTFTDSY	MNWVKQSHGKSLEWIGD	INPYNGGT--	SYNQHFKGKATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYC	AR-----RRGAMDY	WGQGTSVTVSS	164
XPA.015.183_VH	Ab020	QVQLQQSEAELVK PGASVKISCKAS	GYTFSSYW	MNWVKQRPGKGLEWIGQ	IYPGDGDT--	NYNVKFKGKATLTADKSSGTAYMQLSSLTSEDSAVYFC	ARGVS-GYGAMDY	WGQGTSVTVSS	155
XPA.015.184_VH		EVQLQQSVAELVK PGASVKISCKAS	GYTFSNYW	MNWVKQRPGKGLEWIGQ	IYPGDGDT--	NYNGRFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFC	ARGVS-GYGAMDY	WGQGTSVTVSS	162
XPA.015.185_VH	Ab003	EVQLQQSGPELVK PGASVKISCKAS	GYTFTDSY	MNWVKQSHGKSLKWIGD	INPNNGGS--	NYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYC	AR-----RRGAMDY	WGQGTSVTVSS	157
XPA.015.186_VH		QVQLQQSRAELVK PGASVKLSCKAS	GYTFTRYW	MHWVKQRPGQGLEWIGM	IHPNSGGT--	NYNEKFRSKATLTGDKSSSTAYMQLNSLTSDDSAVYYC	ARWDYGSAS YFDF	WGQGTTLIVSS	165
XPA.015.187_VH		EVQLQQSGAELVK PGASVKISCKAS	GYTFSNYW	MNWVKQRPGKGLEWIGQ	IYPGDGDT--	NYNGKFKGKATLTADKSSGTAYMQLSSLTSEDSADYFC	ARGVS-GYGAVDH	WGQGTSVTVSS	166
XPA.015.188_VH	Ab008	EVQLQQSGPELVK PGASVKISCKAS	GYTFTDSY	MNWVKQSHGKSLEWIGD	INPNNGGT--	NYNQKFKDKATLTVDKSSSSAFMELRSLTSEDSAVYYC	AR-----RRGAMDY	WGQGTSVTVSS	156
XPA.015.189_VH		EVQLQQSVAELVK PGASVKISCKAS	GYAFSSYW	MNWVKQRPGKGLEWIGQ	IYPGDGDT--	NYNGKFKGKATLTADKSSGTAYMQLSSLTSEDSAVYFC	ARGVS-GYGAMDY	WGQGTSVTVSS	152
XPA.015.190_VH	Ab002	EVKLVESEEGLVK PGGSLKLSCAAS	GFTFSNYA	MSWVRQTPEKRLEWVAT	IS--DGGHYT	YYSDTIKGRFTISRDNAKNNLFLQLSHLKSEDTAIYYC	ARG-----TVFDY	WGQGTTLTVSS	167
XPA.015.191_VH		QVQLQQPGAELVK PGASVKLSCKAS	GYIFTNYW	MHGVKQRPGQGLEWIGM	IHPNSGGT--	SYNEKFKTKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC	ARGYGSTYW YFDV	WGTGTTVTVSS	168
XPA.015.192_VH		EVQLQQSGPELVK PGASVKISCKAS	GYTFTDSY	MNWVKQSHGKSLEWIGD	INPNNGDT--	NYNQKFKDKATLTVDKSSSSAFMELRSLTSEDSAVYYC	AR-----RRGAMDY	WGQGTSVTVSS	158

XPA.15.006	Ab021	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYE	MNWVRQAPGKGLEWVSA	ISGSGGST	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ARATGIGGYHFDY	WGQGTLVTVSQ	288
XPA.15.009	Ab022	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYW	MHWVRQAPGKGLEWVSG	INNSGGTT	FYADAVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ARDRRFLEWTFDY	WGQGTLVTVSQ	289
XPA.15.019		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSNAW	MSWVRQAPGKGLEWVSA	IGTGGGT	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	AKSRWLPYFDY	WGQGTLVTVSQ	290
XPA.15.043		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSDHY	MDWVRQAPGKGLEWVSA	ISGSGGST	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	AKEIPGRWLQLGGFDY	WGQGTLVTVRL	291
XPA.15.062		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSNYV	ISWVRQAPGKGLEWVSA	ISGSGGST	FYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYC	ARVGLSGWYYFDY	WGQGTLVTVSS	292
XPA.15.085	Ab011	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSNYA	MGWVRQAPGKGLEWVSS	ISGSGGTT	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ARHKGLQPLDY	WGQGTLVTVSF	293
XPA.15.099		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSNYA	MGWVRQAPGKGLEWVSS	ISGSGGTT	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ARHKGLQPLDY	WGQGTLVTVSQ	294
XPA.15.141		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFDDYG	MNWVRQAPGKGLEWVSG	VSWNGSRT	HYAYSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ARRSPLKDGFDI	WGLGTLVTVTQ	295
XPA.15.142		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFNKFA	VHWVRQAPGKGLEWVSA	ISGSGGST	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ASDVEGGYFHNSGFDY	WGQGTLVTVSS	296
XPA.15.144	Ab033	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFTNYN	MIWVRQAPGKGLEWVSG	VSWNGSRT	HYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ARERGSWDTTGYYNYYYYGMDV	WGQGTLVTVSS	297
XPA.15.146		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSNYW	MSWVRQAPGKGLEWVST	VSATGPHT	YYADSAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ARQVGGGPFDI	WGQGTLVTVSS	298
XPA.15.154		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSNY	MSWVRQAPGKGLEWVSA	ISGSGGST	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ARVGSSGWYYFDY	WGQGTLVTVSS	299
XPA.15.155		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSNY	MSWVRQAPGKGLEWVSA	ISGSGGST	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ARVGSSGWYYFDY	WGQGTLVTVSS	300
XPA.15.158	Ab014	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSNAW	MSWVRQAPGKGLEWVSA	ISGSGGST	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	AAPTVPYYYYGMDV	WGQGTLVTVSS	301
XPA.15.165	Ab049	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSNY	MSWVRQAPGKGLEWVSS	ISGGST	YYADSRKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ARLDWSSGAFDI	WGQGTLVTVSS	302
XPA.15.193	Ab050	QVQLVQSGAELKKPGATVKISCKVS	GYTFGDYH	MHWVKQAPGKGLEWMGL	VDPENGET	EYGEKFQDRITMAADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYC	ARSPSSSGYFRVDGFDI	WGQGTMVTVSS	226
XPA.15.194	Ab051	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS	GGTFSSYA	ISWVRQAPGQGLEWMGG	IIPIFGTA	NYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC	AGKLYSRDYWYFDL	WGRGTLVTVSS	227
XPA.15.195	Ab052	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GYRFTSYW	IGWVRQMPGRGLEWMGI	IYPGDSDT	RYSPSFQGQVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYC	ATHHASGRGLDF	WGQGTLVTVSS	228
XPA.15.196	Ab053	QVQVVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	GYTFTGHY	MHWVRQAPGQGLEWMGW	INPNSGGT	NYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYC	ARGSSSSWPVYFYYMDV	WGKGSTVTVSS	229
XPA.15.	Ab054	QVQLVQSGAEVKK	GYTFTGHY	MHWVRQAPGQGLEWMGW	INPNSGG	NYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYC	ARGSSSSWP	WGKGTTVTVSS	230
197		PGASVKVSCKAS			T		VYFYYMDV		
XPA.15.198	Ab055	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS	GGTFSSYA	ISWVRQAPGQGLEWMGG	IIPIFGTA	NYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC	ARGQGWLRFYGMDV	WGQGTTVTVSS	231
XPA.15.199	Ab056	QVQLVQSGSEVKKPGASVKVSCKAS	GYTFTNSY	MHWVRQAPGQGLEWMGI	INPSAGT	SYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLKSEDTAVYYC	ARDVGWLPGDY	WGQGTLVTVSS	232
XPA.15.200	Ab057	QMQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGY	GYRFSDNW	IGWVRQMPGRGLEWMGI	IYPGDSET	RYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYC	ARHAPLAVAGMALGD	WGQGTLVTVSS	233
XPA.15.202	Ab058	QLQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY	SGSFSGYY	YSWIRQSPGRGLEWIGD	ISHTGST	DYNPSLKTRVTISVDTSKNQFSLNLNSVTAADTAVYYC	ARDAPKGGSGLYLFDY	WGQGTLVTVSS	234
XPA.15.203		QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS	GGTFSSYA	ISWVRQAPGQGLEWMGR	IIPILGIA	NYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC	ARDSYSSGWYSHGPEYFQH	WGQGTLVTVSS	235
XPA.15.204	Ab059	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS	GGTFSSYA	ISWVRQAPGQGLEWMGR	IIPIFGIA	NYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC	AREPDYDFWNDAFDI	WGQGTMVTVSS	236
XPA.15.205		QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS	GYTFSSYA	ISWVRQAPGQGLEWMGG	IIPIFGTA	NYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC	ASHYYDFWSGYQYYYGMDV	WGQGTTVTVSS	237
XPA.15.206		QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	GYTFTSYA	MHWVRQAPGQRLEWMGW	INAGNGNT	RYSQKFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYC	ARYTSGSFDY	WGQGTLVTVSS	238
XPA.15.207	Ab060	QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS	GGTFSSYA	ISWVRQAPGQGLEWMGI	INPSGGST	SYAQKFQGRVTMTRDRSTSTVYMELSSLTSEDTAVYYC	VRDNHGWSFDY	WGQGTLVTVSS	239
XPA.15.208		QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS	CGTFSSYA	ISWVRQAPGQGLEWMGG	IIPIFGTA	NYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC	ATKGSDFWSGYYYYYYYMDV	WGKGTTVTVSS	240
XPA.15.209	Ab061	QMQLVQSGAEVKKPGESLKISCQGY	GYRFTDNW	IGWVRQMPGRGLEWMGI	IYPGDSET	RYSPSFQGQVTISADKSISTAYLEWSSLKASDTAMYYC	ARHAPLAVAGMALGD	WGQGTLVTVSS	241
XPA.15.210		QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS	GGTFSSYA	ISWVRQAPGQGLEWMGG	IIPIFGTA	NYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC	ARGLPPKPYYDFWSGYWGYYYYGMDV	WGQGTTVTVSS	242
XPA.15.211	Ab062	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY	GGSFSGYY	WSWIRQPPGKGLEWIGE	INHSGST	NYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC	ARGPSGWYIREFDY	WGQGTLVTVSS	243
XPA.15.212	Ab063	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS	GDSVSSNSAA	WNWIRQSPSRGLEWLGR	TYYRSKWYT	DYALSVKSRITINPDTSKNQFSLHLNSVTPEDTAVYYC	AREGWLGYFDF	WGQGTLVTVSS	244
XPA.15.213	Ab064	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GFSFPSYW	IGWVRQMPGKGLELVGI	IYPGDSDI	RYSPSFQGQVTISADTSISTVYLQWSSLQTTDTATYYC	ARGGFNWFDP	WGQGTLVTVSS	245
XPA.15.214	Ab065	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GYSFTSYW	IGWVRQMPGKGLEWMGI	IYPGDSDT	RYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYC	ARHELGIDY	WGQGTLVTVSS	246
XPA.15.215	Ab066	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS	GGTFSSYA	ISWVRQAPGQGLEWMGG	IIPIFGTA	NYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSRLRSDDTAVYYC	ARDASYGGNSEGFDY	WGQGTLVTVSS	247
XPA.15.216	Ab067	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS	GGTFSSYA	ISWVRQAPGQGLEWMGG	IIPIFGTA	NYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC	ARASGDYDFWSGYYGAEYFQH	WGQGTLVTVSS	248
XPA.15.217	Ab068	EVQLVQSGAEVKQPGSSVKVSCKAS	GGSFNSYT	FSWVRQAPGQGLEWMGW	ISAYNGGTNYFA	NYALKFQGRVTMTTDTSTGTAYMELRSLRSDDTAVYYC	ARVRDSWSHEDYSYYYYMDV	WGKGTTVTVSS	249
XPA.15.218		QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYA	MSWVRQAPGKGLEWVSA	ISGSGGST	YYADSVKGRFTISRDNSKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ARERVFPDYYDSIASNYPLDDI	WGQGTMVTVSS	250
XPA.15.219	Ab086	EVQLVETGGGVVRPGGSLRLSCAAS	GFTFGDYG	MSWVRQAPGKGLEWVSG	INWNGGST	GYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYC	ARDILGVEFDY	WGQGTLVTVSS	251
XPA.15.220		EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GYSFTSYW	IGWVRQMPGKGLEWMGI	IYPGDSDT	RYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYC	ARLGSGSYSFDY	WGQGTLVTVSS	252
XPA.15.221		EVQLVESGGGVVQPGMSLRLSCAAS	GFTFDDYA	MHWVRQAPGKGLEWVSS	ISWNSANI	VYADSVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRADDMALYYC	VKGDTTMIYYAMAV	WGQGTTVTVSS	253
XPA.15.222	Ab069	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GYSFTSYW	IGWVRQMPGKGLEWMGI	IYPGDSDT	RYSPSFQGQVTISADKSISIAYLQWSSLKASDTAMYYC	ARLGRGYYGMDV	WGQGTTVTVSS	254
XPA.15.223		QMQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GYSFTSYW	IGWVRQMPGKGLEWMGI	IYPGDSDT	RYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYC	ARWGPDAFDI	WGQGTMVTVSS	255
XPA.15.224		EVQLVESGGSVVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSDYY	MSWIRQAPGKGLEWVSA	ISGSGGST	YYADSVKGRFTISRDNSENTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	AKDDYDFWSGYYDPYYYGMDV	WGQGTTVTVSS	256
XPA.15.225		EVQLLESGGGLVQPGMSLRLSCAAS	GFTFDDYA	MHWVRQAPGKGLEWVSS	ISWNSANI	VYADSVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRADDMALYYC	VKGDTTMIYYAMAV	WGQGTTVTVSS	257
XPA.15.226	Ab070	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GYSFTSYW	IGWVRQMPGKGLEWMGI	IYPGDSDT	RYSPSFQGQVTISADKSISTSYLQWSSLRASDTAMYYC	ARLGSGWYGNDY	WGQGTLVTVSS	258
XPA.15.227	Ab071	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GYSFTSYW	IGWVRQMPGKGLEWMGI	IYPGDSDT	RYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYC	ARWDAGYSP	WGQGTLVTVSS	259
XPA.15.228	Ab072	QMQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GYSFTGYW	IGWVRQMPGKGLEWMGI	IYPGDSDT	RYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKVSDTAMYYC	GRISTPYAFDI	WGQGTMVTVSS	260
XPA.15.229	Ab073	QVQLQESGPGLVKPSGTLSLTCAVS	GGSISSSNW	WSWVRQPPGKGLEWIGE	IYHSGST	NYNPSLKSRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC	ARVGAAAAWFDP	WGQGTLVTVSS	261
XPA.15.230	Ab074	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GYSFTSYW	IGWVRQMPGKGLEWMGI	IYPGDSDT	RYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYC	ARWDAGYSP	WGQGTLVTVSS	262
XPA.15.231		QMQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GYSFSSSW	IGWVRQMPGKGLEWMGI	IYPGDSDT	RYSPSFQGQVTISADRSISTAYLQWSSLKASDTAMYYC	ARVGASGWTFDY	WGQGTLVTVSS	263
XPA.15.232	Ab075	EVQLVETGGGVVQPGRSLRLSCAAS	GFSFSSYD	MYWVRQAPGKGLEWVAV	ISYDGNDK	QYADSVKGRFTISRDNSKRTLYLQMDSLRTEDTATYYC	TREGNGREIDY	WGPGTLVTVSS	264
XPA.15.233		QVQLVQSGAEVRRPGASVKVSCEAS	GYTFHSYD	INWVRQATGQGLEWVGW	MNPNSGNT	DFAQKFQGRVTMTRNTSINTAYMELSSLRSDDTAVYYC	ARVNWNYGGTSDS	WGQGTLVTVSS	265

XPA.15.234		QVQLQESGPGLVKPSGTLSLTCAVS	GGSISSSNW	WSWVRQPPGKGLEWIGE	IYHSGST	NYNPSLKSRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC	ARVGVAAFDY	WGQGTLVTVSS	266
XPA.15.235		EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	GFTFSSYA	MHWVRQAPGKGLEWVAV	ISYDGSNK	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLCLQMNSLRAEDTAVYYC	AREEAYGDAFDI	WGQGTMVTVSS	267
XPA.15.236		QMQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GYSFTSYW	IGWVRQMPGKGLEWMGI	IYPGDSDT	RYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYC	ARWGPDAFDI	WGQGTMVTVSS	268
XPA.15.237		EVQLVETGGGVVRPGRSLRLSCAAS	GFTFEDYA	MHWVRQGPGKGLEWVSS	ISWNGGFI	GYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLSAEDTALYYC	AKGASYDSYAAMDV	WGQGTTVTVSS	269
XPA.15.238		EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYA	MSWVRQAPGKGLEWVSA	ISGSGGST	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	AKDPRVVHRFDI	WGQGTMVTVSS	270
XPA.15.239		QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS	GGSFSTYY	WSWVRQAPGKGLEWIGN	IYYSGKT	NYNPSLESRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTTADTAVYYC	ARDSFYFESSRSWNDLFDI	WGQGTMVTVSS	271
XPA.15.240		QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS	GGSFSTYY	WSWVRQAPGKGLEWIGN	IYYSGKT	NYNPSLGSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC	ARDSFYFESSRSWNDLFDI	WGQGTMVTVSS	272
XPA.15.241	Ab076	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS	GFTFDDYA	MHWVRQAPGKGLEWVSL	ISWDGGST	YYADSVKGRFTISRDNSKNSLYLQMNSLRAEDTALYYC	AKARGVVIIDY	WGQGTLVTVSS	273
XPA.15.242		QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS	GGSFSTYY	WSWIRQAPGKGLEWIGN	IYYSGKT	NYNPSLESRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC	ARDSFYFESSRSWNDLFDI	WGQGTMVTVSS	274
XPA.15.243	Ab077	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYW	MTWVRQAPGKGLEWVAN	INQDGSEK	HYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRGEDTAVYYC	ARGRGAWAFDY	WGQGTLVTVSS	275
XPA.15.244	Ab078	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYS	MNWVRQAPGKGLEWVSS	ISSSSSYI	YYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ARDQGGELLGFTGYFDY	WGQGTLVTVSS	276
XPA.15.245	Ab079	QMQLVQSGAEMKKPGASVKVSCKAS	GYSFSDYG	ITWVRQAPGQGPEWMGW	ISGYNGNT	NYAQKFQDRVTMTTDTSTSTAYMELRSLKSDDTAVYFC	ARARGVWMFDN	WGQGTLVTVSS	277
XPA.15.246	Ab080	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS	GFTFDDYA	MHWVRQAPGKGLEWVSL	ISWDGGST	YYADSVKGRFTISRDNSKNSLYLQMNSLRAEDTALYYC	AKARGVVIIDY	WGQGTLVTVSS	278
XPA.15.247	Ab081	EVQLVETGGGVVQPGRSLRLSCAAS	GFTFSSYA	MHWVRQAPGKGLEWVAV	ISYDGSNK	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ARHEWGFGMDV	WGQGTTVTVSS	279
XPA.15.248	Ab082	QMQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS	GYSFTSYW	IGWVRQMPGKGLEWMGI	IYPGDSDT	RYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYC	ARWGPDAFDI	WGQGTMVTVSS	280
XPA.15.249	Ab083	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYA	MSWVRQAPGKGLEWVSA	ISGSGGST	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	AKDRVGAANGWFDP	WGQGTLVTVSS	281
XPA.15.250	Ab084	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFKNYW	MTWVRQAPGKGLEWVAD	IKGDGSRQ	HYADSVKGRFTISRDNARNSLFLQMNSLRVEDTALYYC	ATDPPWDRDAFDL	WGQGTMVTVSS	282
XPA.15.272		QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFGGYW	MSWVRQAPGKGLEWVSN	IKQDGSEQ	YYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAIYYC	ARDRMDYIFDI	WGRGTLVTVSS	283
XPA.15.	Ab085	EVQLVESGGGVVQ	GFIFSSYG	MHWVRQVPDKGLEWVAG	ISLRGSD	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNNLRPDDTAVYYC	ARGFRWPVT	WGQGTLVTVSS	284
275		PGRSLRLSCAAS			N		PFDH		
XPA.15.282		QVQLQESGPGLVKPSGTLSLTCAVS	GGSISSSNW	WSWVRQPPGKGLEWIGE	IYHSGST	NYNPSLKSRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC	ARPDYSNYGGAFDY	WGQGTLVTVSS	285
XPA.15.284		QVQLQESGPGLVKPSGTLSLTCAVS	GGSISSSNW	WSWVRQPPGKGLEWIGE	IYHSGST	NYNPSLKSRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC	ARVGAAAAWFDP	WGQGTLVTVSS	286
XPA.15.293		QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS	GGSFSTYY	WSWVRQAPGKGLEWIGN	IYYSGKT	NYNPSLESRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC	ARDSFYFESSRSWNDLFDI	WGQGTMVTVSS	287
XPA-15-007_VH_	Ab029	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSS-YG	MHWVRQAPGKGLEWVSA	ISGSGGST	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----ARDRYSSGWYW-----SDY------	WGQGTLVTVSS	221
XPA-15-013_VH_	Ab006	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSN-YA	MGWVRQAPGKGLEWVSS	ISGSGGTT	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----AR---HKGLQ---PLDY--------	WGQGTLVTVSS	179
XPA-15-017_VH_	Ab017	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSS-YS	MNWVRQAPGKGLEWVSV	IY-SGDST	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----ARQV-RDGDY--GDWFDP------	WGQGTLVTVSS	216
XPA-15-020_VH		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSS-YS	MNWVRQAPGKGLEWVSL	IYRDGST-	TYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----ARES-TR------LRGSYYYGMDV	WGQGTLVTVSS	215
XPA-15-021_VH_	Ab023	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSN-AW	MSWVRQAPGKGLEWVSA	IGTGGGT-	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----AK---SRWLP---YFDY--------	WGQGTLVTVSS	193
XPA-15-022_VH_	Ab024	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSD-YY	MSWIRRAPGKGLEWVSR	ISWNSGSI	GYADSLKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----ARER-G-------YGYDY------	WGQGTLVTVSS	192
XPA-15-023_VH_	Ab025	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSNY-	MSWVRQAPGKGLEWVSG	ISGSGGST	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----ARVG-SSGWYY------FDY------	WGQGTLVTVSS	171
XPA-15-026_VH_	Ab026	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSN-YV	ISWVRQAPGKGLEWVSA	ISGSGGST	FYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYC	----ARVG-LSGWYY------FDY------	WGQGTLVTVSS	194
XPA-15-033_VH_		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSD-YY	MSWVRQAPGKGLEWVAV	ISYDGSNK	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	------AR--GS------SSFDY------	WGQGTLVTVSS	217
XPA-15-036_VH_	Ab030	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSS-YS	MNWVRQAPGKGLEWVSA	ISGSGGST	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----ARD-----SWELLGYDAFDI------	WGQGTLVTVSS	220
XPA-15-037_VH_	Ab031	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSNY-	MSWVRQAPGKGLEWVSS	I--SGGST	YYADSRKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----ARL-----DWS---SGAFDI------	WGQGTLVTVSS	218
XPA-15-042_VH_	Ab027	EVQLLESGGGLVQPGGSLGLSCAAS	GFTFNN-YW	MSWVRQAPGKGLEWVSY	ISGSGRTI	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----ARVG-SSGWYY------FDY------	WGQGTLVTVSS	219
XPA-15-047_VH_	Ab036	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSN-YA	MGWVRQAPGKGLEWVSS	ISGSGGTT	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----AR---HKGLQ---PLDY--------	WGQGTLVTVSS	180
XPA-15-048_VH_	Ab037	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSS-YE	MNWVRQAPGKGLEWVSS	ISSSSRYA	DVANSVVGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----AR---GEWLD---HFDY--------	WGQGTLVTVSS	195
XPA-15-059_VH_	Ab028	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFRN-YW	MTWVRQAPGKGLEWVAN	IKQDGSEK	YYVDSVKGRSTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----AKQV-G------GGFFDI------	WGQGTLVTVSS	191
XPA-15-064_VH_		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSD-YY	MNWVRQAPGKGLEWVAL	ISYDGSNK	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTALYYC	----AS---------QSTAFDI--------	WGQGTLVTVSS	196
XPA-15-065_VH_	Ab038	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSN-YA	MTWVRQAPGKGLEWVSY	IHAGGGT-	HYANSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----ARDL---HWEG------WGLGFDY--	WGQGTLVTVSS	183
XPA-15-066_VH_	Ab004	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFRN-FA	MMWVRQAPGKGLEWVSG	ISWNSGSI	GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----ARPS--GAYPT------PFDN------	WGQGTLVTVSS	223

XPA-15-068_VH_	Ab013	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSNY-	MSWVRQAPGKGLEWVSG	ISGSGGST	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----ARVG-SSGWYY-------FDY--------	WGQGTLVTVSS	172
XPA-15-074_VH_	Ab039	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSS-YW	MSWVRQAPGKGLEWVSG	ISGSGGYT	SYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----AKDS-SDWY-------INS--------	WGQGTLVTVSS	222
XPA-15-075_VH_	Ab009	EVQLLESGGGLVQPWGSLRLSCAAS	GFTFSN-YA	MGWVRQAPGKGLEWVSS	ISGSGGTT	YYADSVKGRFTISRDNSKNTPYLQMNSLRAEDTAVYYC	----AR-----HKGLQ-------PLDY--------	WGQGTLVTVSS	181
XPA-15-077_VH_	Ab040	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSS-YW	MSWVRQAPGKGLEWVAV	ISKDGSST	DYAHSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----ARDR--DWIP-------GDV--------	WGQGTLVTVSS	197
XPA-15-080_VH_		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSS-YS	MNWVRQAPGKGLEWVSA	ISGSGGRT	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----ARDG--IWSA-------MDV--------	WGQGTLVTVSS	224
XPA-15-081_VH_		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSNY-	MSWVRQAPGKGLEWVSG	ISGSGGST	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----ARVG-SSGWYY-------FDY--------	WGQGTLVTVSS	173
XPA-15-082_VH_	Ab041	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSN-YA	MTWVRQAPGKGLEWVSY	IHAGGGT-	HYANSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	ARDL--HWEG-------WGLGFDY--	WGQGTLVTVSS	186
XPA-15-086_VH_	Ab042	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSN-YA	MTWVRQAPGKGLEWVSY	IHAGGGT-	HYANSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----ARDL--HWEG-------WGLGFDY--	WGQGTLVTVSS	184
XPA-15-088_VH_		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSN-YN	MQWVRQAPGKGLEWVSG	VSWNGSRT	HYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----ARER-GSWDTT-GYYNYYYYGMDV	WGQGTLVTVSS	187
XPA-15-093_VH_	Ab032	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSN-YA	MGWVRQAPGKGLEWVSS	ISGSGGTT	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----AR-----HKGLQ-------PLDY--------	WGQGTLVTVSS	177
XPA-15-094_VH_	Ab043	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSN-YA	MGWVRQAPGKGLEWVSS	ISGSGGTT	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----AR-----HKGLQ-------PLDY--------	WGQGTLVTVSS	178
XPA-15-096_VH_		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSS-YS	MNWVRQAPGKGLEWVAN	IKQDGRET	YYVDSVTGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYC	----TTDL--GRYYDILTGYYAPNY--------	WGQGTLVTVSS	198
XPA-15-100_VH_		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSN-YN	MQWVRQAPGKGLEWVSG	VSWNGSRT	HYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----ARER-GSWDTT-GYYNYYYYGMDV	WGQGTLVTVSS	188
XPA-15-102_VH_	Ab044	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSNY-	MSWVRQAPGKGLEWVSG	ISGSGGST	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----ARVG-SSGWYY-------FDY--------	WGQGTLVTVSS	176
XPA-15-105_VH_		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSN-YA	MGWVRQAPGKGLEWVSS	ISGSGGTT	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----ARDH--SSSW-------AFDY--------	WGQGTLVTVSS	199
XPA-15-106_VH_		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSN-YA	MTWVRQAPGKGLEWVSY	IHAGGGT-	HYANSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----ARDL--HWEG-------WGLGFDY--	WGQGTLVTVSS	185
XPA-15-110_VH_		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSS-YT	MDWVRQAPGKGLEWVSG	INWNGGST	GYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----ARVK--GYCSST-SCYFDYYYGMDV	WGQGTLVTVSS	200
XPA-15-111_VH_	Ab045	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSS-YW	MSWVRQAPGKGLEWVSG	ISGSGGST	DYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----AREL--PAFWS-------AFDY--------	WGQGTLVTVSF	225
XPA-15-115_VH_	Ab046	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSN-YA	MGWVRQAPGKGLEWVSS	ISGSGGTT	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----AR-----HKGLQ-------PLDY--------	WGQGTLVTVSS	182
XPA-15-120_VH_		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSS-YW	MSWVRQAPGKGLEWVAN	IKQDGSEK	YYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----ARQV--G------GGPFDI--------	WGQGTLVTVSS	190
XPA-15-121_VH_	Ab047	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSS-YA	MSWVRQAPGKGLEWVSS	I--SGGST	YYADSRKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----ARH--ADQWP-------GSWFDP--------	WGQGTLVTVSS	202
XPA-15-122_VH_		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFRN-YA	MSWVRQAPGKGLEWVSS	I--SGGST	YYADSRKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----AR-------GGV--------GDWFDP--------	WGQGTLVTVSS	203
XPA-15-124_VH_		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFST-YV	MTWVRQAPGKGLEWVSV	IY-SGGST	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----ARI--NWND-------GGNFDY--------	WGQGTLVTVSS	201
XPA-15-125_VH_		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSD-YY	MSWIRQAPGKGLEWVSA	ISGSGGST	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----ARG--PVGI-------SGNYDY--------	WGQGTLVTVSS	205
XPA-15-127_VH_		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFNK-FA	VHWVRQAPGKGLEWVSA	ISGSGGST	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----ASDV--E------GGYFHNSGPDH-	WGQGTLVTVSS	204
XPA-15-133_VH_		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSS-YE	MNWVRQAPGKGLEWVAL	ISYDGSNK	DYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTALYYC	--AADLGI--GS------GYFDY--------	WGQGTLVTVSS	206
XPA-15-135_VH_		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSN-AW	MSWVRQAPGKGLEWVSA	ISGSGGST	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----ARD-----PGGI-------YDYFDY--------	WGQGTLVTVSS	207
XPA-15-138_VH_	Ab001	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSS-YE	MNWVRQAPGKGLEWVSS	ISSSSSYI	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----ARV-----RWYK-------DSDAFDI--------	WGQGTLVTVSS	209
XPA-15-139_VH_	Ab018	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSS-YW	MSWVRQAPGKGLEWVSG	ISGSGGYI	HYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----AREG--SGWL-------VDQ--------	WGQGTLVTVSS	208
XPA-15-140_VH_		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSS-YT	MDWVRQAPGKGLEWVSS	ISSSSSYI	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	VREAWREN--NDWYE-------LDY--------	WGQGTLVTVSS	212

XPA-15-143_VH_		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSN-YA	MNWVRQAPGKGLEWVAH	INQDGSEK	YYVESVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----GKLR--GG------AYNDY---------	WGQGTLVTVSS	210
XPA-15-145_VH_		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSN-YA	MTWVRQSPGKGLEWVSV	ISGSGGTT	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----AKAK--GS------QVFDY---------	WGQGTLVTVSS	211
XPA-15-159_VH_	Ab015	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSNY-	MSWVRQAPGKGLEWVSG	ISGSGGST	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----ARVG-SSGWYY------FDY---------	WGQGTLVTVSS	174
XPA-15-163_VH_		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFTN-YN	MIWVRQAPGKGLEWVSG	VSWNGSRT	HYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----ARER--GSWDTT-GYYNYYYYGMDV	WGQGTLVTVSS	189
XPA-15-167_VH_		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFDD-YG	MSWVRQAPGKGLEWVSF	ISGSGGST	NYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----ARVG-SSGWYY------FDY---------	WGQGTLVTVSS	213
XPA-15-169_VH_	Ab034	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSS-YW	MSWVRQAPGKGLEWVSS	I--SGGST	YYADSRKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----AREV--EYSS-SWGAFDI---------	WGQGTLVTVSS	214
XPA-15-171_VH_	Ab016	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSD-YY	MSWIRQAPGKGLEWVSA	ISGSGGGT	YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	----ARVG-SSGWYY------FDY---------	WGQGTLVTVSS	175
XPA.15.196	Ab053	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	GYTFTGHY	MHWVRQAPGQGLEWMGW	INPNSGGT	NYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYC	ARGSSSSWPVYFYYMDV	WGKGSTVTVSS	303

Таблица 3

Клон №	Антитело №	Легкая цепь SEQ ID No:	Тяжелая цепь SEQ ID No:
XPA.015.172		20	151
XPA.015.173	Ab087	18	169
XPA.015.174		19	170
XPA.015.175	Ab019	1	160
XPA.015.176	Ab088	2	153
XPA.015.177		3	159
XPA.015.178	Ab089	4	154
XPA.015.179		5	161
XPA.015.181	Ab010*	6	163
XPA.015.182		7	164
XPA.015.183	Ab020	8	155
XPA.015.184		9	162
XPA.015.185	Ab003	10	157
XPA.015.186		11	165
XPA.015.187		12	166
XPA.015.188	Ab008	13	156
XPA.015.189		14	152
XPA.015.190	Ab002	15	167
XPA.015.191		16	168
XPA.015.192		17	158
XPA.015.006	Ab021	74	288
XPA.015.007	Ab029	52	221
XPA.015.009	Ab022	46	289
XPA.015.013	Ab006	43	179
XPA.015.017	Ab017	45	216
XPA.015.019		72	290
XPA.015.020		44	215
XPA.015.021	Ab023	73	193
XPA.015.022	Ab024	71	192
XPA.015.023	Ab025	70	171
XPA.015.026	Ab026	75	194
XPA.015.033		47	217
XPA.015.036	Ab030	50	220
XPA.015.037	Ab031	48	218
XPA.015.042	Ab027	49	219
XPA.015.043		76	291
XPA.015.047	Ab036	51	180
XPA.015.048	Ab037	77	195
XPA.015.059	Ab028	79	191
XPA.015.062		78	292
XPA.015.064		80	196
XPA.015.065	Ab038	83	183
XPA.015.066	Ab004	57	223
XPA.015.068	Ab013	81	172
XPA.015.074	Ab039	53	222
XPA.015.075	Ab009	55	181
XPA.015.077	Ab040	84	197

XPA.015.080		58	224
XPA.015.081		82	173
XPA.015.082	Ab041	56	186
XPA.015.085	Ab011	54	293
XPA.015.086	Ab042	85	184
XPA.015.088		86	187
XPA.015.093	Ab032	21	177
XPA.015.094	Ab043	23	178
XPA.015.096		22	198
XPA.015.099		59	294
XPA.015.100		26	188
XPA.015.102	Ab044	60	176
XPA.015.105		97	199
XPA.015.106		24	185
XPA.015.110		148	200
XPA.015.111	Ab045	62	225
XPA.015.115	Ab046	61	182
XPA.015.120		149	190
XPA.015.121	Ab047	28	202
XPA.015.122		29	203
XPA.015.124		27	201
XPA.015.125		31	205
XPA.015.127		30	204
XPA.015.133		32	206
XPA.015.135		33	207
XPA.015.138	Ab001	35	209
XPA.015.139	Ab018	34	208
XPA.015.140		39	212
XPA.015.141		37	295
XPA.015.142		63	296
XPA.015.143		36	210
XPA.015.144	Ab033	65	297
XPA.015.145		38	211
XPA.015.146		64	298
XPA.015.154		66	299
XPA.015.155		68	300
XPA.015.158	Ab014	67	301
XPA.015.159	Ab015	40	174
XPA.015.163		150	189
XPA.015.165	Ab049	69	302
XPA.015.167		41	213
XPA.015.169	Ab034	42	214
XPA.015.171	Ab016	151	175
XPA.015.193	Ab050	87	226
XPA.015.194	Ab051	88	227
XPA.015.195	Ab052	89	228
XPA.015.196	Ab053	90	229 (303)
XPA.015.197	Ab054	91	230
XPA.015.198	Ab055	92	231
XPA.015.199	Ab056	93	232

XPA.015.200	Ab057	94	233
XPA.015.201		95	---
XPA.015.202	Ab058	96	234
XPA.015.203		97	235
XPA.015.204	Ab059	98	236
XPA.015.205		99	237
XPA.015.206		100	238
XPA.015.207	Ab060	101	239
XPA.015.208		102	240
XPA.015.209	Ab061	103	241
XPA.015.210		---	242
XPA.015.211	Ab062	104	243
XPA.015.212	Ab063	105	244
XPA.015.213	Ab064	106	245
XPA.015.214	Ab065	107	246
XPA.015.215	Ab066	108	247
XPA.015.216	Ab067	109	248
XPA.015.217	Ab068	110	249
XPA.015.218		111	250
XPA.015.219	Ab086	112	251
XPA.015.220		113	252
XPA.015.221		114	253
XPA.015.222	Ab069	115	254
XPA.015.223		116	255
XPA.015.224		117	256
XPA.015.225		118	257
XPA.015.226	Ab070	119	258
XPA.015.227	Ab071	120	259
XPA.015.228	Ab072	121	260
XPA.015.229	Ab073	122	261
XPA.015.230	Ab074	123	262
XPA.015.231		124	263
XPA.015.232	Ab075	125	264
XPA.015.233		126	265
XPA.015.234		127	266
XPA.015.235		128	267
XPA.015.236		129	268
XPA.015.237		130	269
XPA.015.238		131	270
XPA.015.239		132	271
XPA.015.240		---	272
XPA.015.241	Ab076	133	273
XPA.015.242		134	274
XPA.015.243	Ab077	135	275
XPA.015.244	Ab078	136	276
XPA.015.245	Ab079	137	277
XPA.015.246	Ab080	138	278
XPA.015.247	Ab081	139	279
XPA.015.248	Ab082	140	280
XPA.015.249	Ab083	141	281
XPA.015.250	Ab084	142	282
XPA.015.272		143	283
XPA.015.275	Ab085	144	284
XPA.015.282		145	285
XPA.015.284		146	286
XPA.015.293		147	287

Фиг. 54