

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 033604

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2019.11.08

(21) Номер заявки

201691541

(22) Дата подачи заявки

2015.01.30

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

(54) МОЛЕКУЛА АНТИ-BAFF АНТИТЕЛА, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ,
СОДЕРЖАЩАЯ ЭТУ МОЛЕКУЛУ, СПОСОБЫ ЕЕ ПРИМЕНЕНИЯ И КОДИРУЮЩИЙ
ЕЕ ИЗОЛИРОВАННЫЙ ПОЛИНУКЛЕОТИД

(31) 61/934,124

(32) 2014.01.31

(33) US

(43) 2016.12.30

(86) PCT/US2015/013711

(87) WO 2016/039801 2016.03.17

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:

Бродюр Скотт Роналд, Кэнеда Кейт,
Гупта Панкай, Николетти Эми
Мари, Пань Ци, Сингх Санджая,
Дзигелевски Майкл, Горман Филип
Николас, Кхалил Ашраф, Мицлиетта
Джон, Прески Дэвид, Ву Тао, Сяо
Хайгун (US)

(74) Представитель:

Веселицкая И.А., Веселицкий М.Б.,
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)

(56) MANETTA JOSEPH ET AL.: "Generation and characterization of tabalumab, a human monoclonal antibody that neutralizes both soluble and membrane-bound B-cell activating factor", JOURNAL OF INFLAMMATION RESEARCH, 1 August 2014 (2014-08-01), page 121, XP055174727, ISSN: 1178-7031, DOI: 10.2147/JIR.S67751, abstract, figures

HSU HAILING ET AL.: "A novel modality of BAFF-specific inhibitor AMG623 peptibody reduces B-cell number and improves outcomes in murine models of autoimmune disease", CLINICAL AND EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY, 2012 MAR-APR, vol. 30, no. 2, March 2012 (2012-03), pages 197-201, XP009186073, ISSN: 0392-856X, abstract

US-A1-2005070694

MACKAY FABIENNE ET AL.: "Cracking the BAFF code", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, NATURE PUB. GROUP, GB, vol. 179, no. 7, 1 July 2009 (2009-07-01), pages 491-502, XP009154275, ISSN: 1474-1733, DOI: 10.1038/NRI2572, abstract, figures, pages 500-501

ZHENG LIU ET AL.: "BAFF inhibition: A new class of drugs for the treatment of autoimmunity", EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, ACADEMIC PRESS, US, vol. 317, no. 9, 9 February 2011 (2011-02-09), pages 1270-1277, XP028205665, ISSN: 0014-4827, DOI: 10.1016/j.yexcr.2011.02.005 [retrieved on 2011-02-17], abstract, figures 1-2, pages 1273-1275

WILLIAM STOHL ET AL.: "Treatment of systemic lupus erythematosus patients with the BAFF antagonist "peptibody" blisibimod (AMG 623/A-623): results from randomized, double-blind phase 1a and phase 1b trials", ARTHRITIS RESEARCH & THERAPY, vol. 6, no. 1, 1 August 2015 (2015-08-01), page 5537, XP055213755, DOI: 10.1186/s13075-015-0741-z, abstract

US-A1-2015218267

(57) Изобретение относится к молекулам анти-BAFF антитела, которые включают новые гуманизированные анти-BAFF антитела, к фармацевтическим композициям, содержащим эти молекулы, а также к терапевтическим способам с ее использованием, а именно к способу лечения субъекта, который имеет ассоциированное с BAFF расстройство; к способу лечения воспалительного заболевания, аутоиммунного заболевания, респираторного заболевания, метаболического расстройства или рака и к способу ингибирования связывания BAFF с одним или более рецепторами BAFF на клетке млекопитающих, а также к изолированному полинуклеотиду, включающему последовательность, кодирующую вариабельный участок легкой цепи последовательности и вариабельный участок тяжелой цепи последовательности этой молекулы.

B1

033604

033604 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение в общем случае относится к анти-BAFF антителам для диагностического и терапевтического применения. В частности, раскрываются анти-BAFF антитела и способы для лечения различных заболеваний и расстройств. Также раскрываются фармацевтические композиции и наборы, включающие такие соединения.

Предпосылки создания изобретения

Фактор активации В-клеток (BAFF) представляет собой цитокин, который принадлежит к суперсемейству лигандов фактора некроза опухолей (ФНО) и действует в качестве лиганда для рецепторов BAFF-R (BR3), TACI (трансмембранный активатор и партнер кальциевого модулятора и лиганда циклофилина) и BCMA (антителен созревания В-клеток). Взаимодействие между BAFF и его рецепторами инициирует сигналы, существенные для формирования и поддержания В-клеток, которые, в свою очередь, синтезируют иммуноглобулины в ответ на инвазию чужеродным веществом. Соответствующие уровни BAFF пациента помогают поддерживать нормальные уровни иммунитета, тогда как недостаточные уровни могут приводить к иммунодефициту, а избыточные уровни могут вызывать аномально высокую выработку антител.

Когда пациент демонстрирует аутоиммунитет, он вырабатывает антитела против тканей или органов своего собственного тела. Аутоиммунные заболевания, в том числе волчанка и ревматоидный артрит, являются результатом избыточных уровней BAFF в организме. Таким образом, является важным модулировать выработку BAFF для лечения пациентов, страдающих этими заболеваниями.

BAFF может существовать в трех формах: в связанной с мембраной форме (mbBAFF), растворимого тримерного BAFF (sBAFF) и в виде мультимерной формы, состоящей из 60 мономеров BAFF. Относительная важность различных форм BAFF при нормальной физиологии и при болезни не очень понятна. Как отмечается, BAFF связывается с тремя рецепторами, BAFFR (BR3), TACI и BCMA. Индуцирующий пролиферацию лиганд (APRIL), родственный член семейства лигандов рецептора ФНО, с высокой аффинностью связывается с TACI и BCMA. В противовес высокой аффинности взаимодействие APRIL:BCMA, взаимодействие BAFF:BCMA имеет низкую аффинность (1-2 мкМ) и не играет важную роль *in vivo* (Bossen и Schneider, 2006).

Растворимый BAFF экспрессируется на высоком уровне у индивидуумов с системной красной волчанкой (СКВ) и в воспаленных органах-мишениях, таких как почки. Растворимый BAFF служит важным фактором для поддержания гомеостаза и выживаемости В-клеток (Kalled и др., 2005; Маккей и др., 2003; Smith, 2003 Сансто; Paikе и др., 2004). Образование аутоантител зависимыми от BAFF В-клетками приводит к гломеруллярному отложению IC первоначально на клубочковой базальной мембране (GBM), мезангии и интерстициальной ткани в проксимальных тубулярных эпителиальных клетках (PTEC). Эти отложения IC приводят к фиксации комплемента и активации нейтрофилов, что приводит к локальному повреждению почек. Медиаторы воспаления (например, IL6, IL8, MCP-1), вырабатываемые поврежденными клетками почек (MC, PTEC, почечными фибробластами, эндотелиальными клетками), запускают воспалительный цикл за счет повышения инфильтрации иммунных клеток (например, В-клеток, Т-клеток, дендритных клеток, нейтрофилов и макрофагов).

Направленное против BAFF моноклональное антитело белимумаб ((Benlysta®) продемонстрировало активность при лечении системной красной волчанки (СКВ), а также обладает способностью уменьшать образование аутоантител. Белимумаб в настоящее время одобрен для лечения активной СКВ без поражения почек. Однако не сообщалось о том, что белимумаб связывается с mbBAFF. Только ингибирование sBAFF, таким образом, представляет собой реальный путь для лечения избыточных уровней BAFF и увеличения выработки антител. В отличие от этого, сообщалось, что анти-BAFF пептидное близибимод (A-623) и анти-BAFF моноклональное антитело табалумаб (LY2127399), как было продемонстрировано, связывают как sBAFF, так и mbBAFF (2010 пресс-релиз Anthera и 2012 пресс-релиз Lilly). Учитывая неопределенность роли различных форм BAFF в заболевании, антагонисты молекул sBAFF и mbBAFF с полезными фармакологическими свойствами могут обладать дополнительным преимуществом при лечении иммунологических и аутоиммунных заболеваний у людей.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к новой молекуле анти-BAFF антитела, которая включает вариабельный домен легкой цепи, включающий CDR1 последовательности SEQ ID NO: 5, CDR2 последовательности SEQ ID NO: 8 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 9; и вариабельный домен тяжелой цепи, включающий CDR1 последовательности SEQ ID NO: 28, CDR2 последовательности SEQ ID NO: 29 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 30.

В другом варианте эта молекула анти-BAFF антитела включает вариабельный домен легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 93 и вариабельный домен тяжелой цепи последовательностей SEQ ID NO: 114.

Причем в предпочтительном варианте осуществления изобретения предложенная молекула анти-BAFF нейтрализует все три формы человеческого BAFF, а именно формы, которые включают связанный с мембраной (mbBAFF), растворимый тримерный BAFF и растворимый 60-мерный BAFF, в самом предпочтительном варианте она нейтрализует только человеческий растворимый тримерный BAFF, или че-

ловеческий связанный с мембраной BAFF, или человеческий растворимый 60-мерный BAFF.

Эта молекула анти-BAFF в одном из вариантов включает:

а) гуманизированный вариабельный домен легкой цепи, включающий CDR последовательностей SEQ ID NO: 5, 8 и 9 и каркасные участки, имеющие аминокислотную последовательность, по крайней мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности каркасных участков вариабельного домена легкой цепи аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 93; и

б) гуманизированный вариабельный домен тяжелой цепи, который включает CDR последовательностей SEQ ID NO: 28, 29 и 30 и каркасные участки, имеющие аминокислотную последовательность, по крайней мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности каркасных участков аминокислотной последовательности вариабельного домена тяжелой цепи аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 114.

Такая молекула анти-BAFF антитела представляет собой моноклональное антитело или гуманизированное моноклональное антитело.

Еще одним объектом данного изобретения является фармацевтическая композиция для лечения субъекта, который имеет ассоциированное с BAFF расстройство, включающая описанную в документе молекулу анти-BAFF антитела и фармацевтически приемлемый носитель.

Третьим объектом данного изобретения является способ лечения субъекта, который имеет ассоциированное с BAFF расстройство, включающий введение такому субъекту молекулы анти-BAFF или фармацевтической композиции, включающей молекулу анти-BAFF антитела и фармацевтически приемлемый носитель.

Четвертым объектом данного изобретения является способ лечения воспалительного заболевания, аутоиммунного заболевания, респираторного заболевания, метаболического расстройства или рака, включающий введение субъекту, который в этом нуждается, эффективного количества молекулы анти-BAFF антитела или фармацевтической композиции, включающей молекулу анти-BAFF антитела и фармацевтически приемлемый носитель.

В предпочтительном варианте заболевание представляет собой системную красную волчанку, волчаночный нефрит или ревматоидный артрит.

Пятым объектом данного изобретения может служить способ ингибирования связывания BAFF с одним или более рецепторами BAFF на клетке млекопитающих, где BAFF рецептор представляет собой BAFF-R (BR3), TACI (трансмембранный активатор и партнер кальциевого модулятора и лиганда циклофилина) и/или BCMA (антителен созревания В-клеток), включающий введение в клетку молекулы анти-BAFF антитела.

И, наконец, последним объектом является изолированный полинуклеотид, включающий последовательность, кодирующую вариабельный участок легкой цепи последовательности SEQ ID NOS: 93 и вариабельный участок тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 114.

В предпочтительном варианте этого изолированного полинуклеотида вариабельный участок легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 394, а вариабельный участок тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 398.

Анти-BAFF антитела в соответствии с настоящим изобретением связываются с человеческим BAFF с высокой аффинностью, ингибируя, таким образом, патологическую продукцию иммуноглобулина.

Краткое описание фигур

Фиг. 1. Эффективность моноклонального анти-BAFF антитела против sBAFF:химерный HuIgG1 KO по сравнению с парентеральными мышиными моноклональными антителами.

Фиг. 2. Эффективность моноклонального анти-BAFF антитела против A mbBAFF:химерный HuIgG1 KO по сравнению с парентеральными мышиными моноклональными антителами.

Подробное описание

Исходные мышьные антитела могут происходить от мышьных гибридов. Иммунизацию мышей осуществляют при использовании различных способов. Например, антитела, которые являются специфическими для человеческого BAFF, могут быть индуцированными против иммуногенного антигена, такого как выделенный белок BAFF и/или любая его часть из упомянутых выше (в том числе синтетические пептиды). Получение иммуногенных антигенов и моноклональных антител может осуществляться при использовании любого подходящего способа, известного в данной области техники.

Исходные мышьные антитела были отобраны на основе их высокой аффинности к BAFF.

В соответствии с этим антитело связывается с человеческим BAFF с высокой степенью аффинности. Отобранные мышьные антитела были гуманизированы для получения гуманизированных антител. Гуманизированные антитела связываются с человеческим BAFF с высокой аффинностью. Заявленное антитело к BAFF имеет K_D менее чем 100 пМ. Антитело к BAFF может иметь K_D менее чем 10 пМ или K_D менее чем 1 пМ.

Гуманизированное моноклональное антитело к BAFF имеет предпочтительные биофизические свойства, например качество, стабильность или растворимость.

Антитело к BAFF узнает специфический или "BAFF эпитоп". Эпитопы могут быть определены с помощью различных методов, известных в данной области техники, таких как рентгеновская кристалло-

графия, масс-спектрометрия водородно-дейтериевого обмена (HXMS), сайт-направленный мутагенез, аланин-сканирующий мутагенез, а также методов пептидного скрининга.

Определения

Общая структура антител или иммуноглобулинов хорошо известна специалистам в данной области техники. Эти молекулы представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины, как правило, с молекулярной массой 150000 Да, состоящие из двух идентичных легких цепей (L) и двух идентичных тяжелых цепей (H), и обычно именуются как полноразмерные антитела. Каждая легкая цепь ковалентно связана с тяжелой цепью дисульфидной связью с образованием гетеродимера, а гетеротетрамерная молекула образуется при ковалентном связывании дисульфидной связью двух идентичных тяжелых цепей таких гетеродимеров. Несмотря на то что легкие и тяжелые цепи связаны вместе одной дисульфидной связью, количество дисульфидных связей между двумя тяжелыми цепями варьирует в зависимости от изотипа иммуноглобулина. Каждая тяжелая и легкая цепи также содержит регулярно расположенные дисульфидные мостики внутри цепи. Каждая тяжелая цепь имеет на аминотерминальном конце вариабельный домен (V_H), за которым следуют три или четыре константных домена (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} и C_{H4}), а также шарнирную область между C_{H1} и C_{H2} . Каждая легкая цепь имеет два домена, аминотерминальный вариабельный домен (V_L) и карбокситерминальный константный домен (C_L). Домен V_L нековалентно связан с доменом V_H , в то время как домен C_L обычно ковалентно связан с доменом C_{H1} посредством дисульфидной связи. Считают, что определенные аминокислотные остатки образуют область раздела между вариабельными доменами легкой и тяжелой цепей (Chothia и др., 1985, J. Mol. Biol. 186:651-663). Вариабельные домены также называются в данном описании как вариабельные участки.

Определенные домены в пределах вариабельных участков значительно отличаются между различными антителами, т.е. являются "гипервариабельными". Эти гипервариабельные домены содержат остатки, которые непосредственно участвуют в связывании и определении специфичности каждого конкретного антитела в отношении его специфической антигенной детерминанты. Гипервариабельность в вариабельных областях обеих легкой и тяжелой цепей сконцентрирована в трех сегментах, известных как участки, определяющие комплементарность (CDR) или гипервариабельные петли (HVL).

CDR определяются путем сравнения последовательностей, как описано у Kabat и др., 1991, в "Sequences of proteins of immunological interest", 5-е изд. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, в то время как HVL (которые также называются в данном документе как CDR) в структурном отношении определяются по трехмерной структуре вариабельного домена, как описано Clothia и Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917. Эти два способа приводят к несколько различающимся идентификациям CDR. По определению Kabat, CDR-L1 находится примерно в остатках 24-34, CDR-L2 примерно в остатках 50-56 и CDR-L3 примерно в остатках 89-97 вариабельного домена легкой цепи; CDR-H1 находится примерно в остатках 31-35, CDR-H2 примерно в остатках 50-65 и CDR-L3 примерно в остатках 95-102 вариабельного домена тяжелой цепи.

Точное количество остатков, которые охватывают конкретный CDR, будет варьировать в зависимости от последовательности и размера CDR. Специалист в данной области техники может обычным образом определить, какие остатки включает конкретный CDR с учетом аминокислотной последовательности вариабельного участка антитела. Таким образом, CDR1, CDR2, CDR3 тяжелых и легких цепей определяют уникальные и функциональные свойства, специфические для данного антитела.

Три CDR в пределах каждой из тяжелой и легкой цепей разделены каркасными участками (FR), которые содержат последовательности с тенденцией к меньшей вариабельности. От аминотерминального конца к карбокситерминальному концу вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей FR и CDR расположены в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. В основном конфигурация β -складки FR содержит каждую из цепей в непосредственной близости друг к другу, а также к CDR из другой цепи. Полученная конформация вносит свой вклад в антигенсвязывающий сайт (см. Kabat и др., 1991, NIH Publ. № 91-3242, том I, стр. 647-669), несмотря на то, что не все остатки CDR обязательно принимают непосредственное участие в связывании антигена.

Остатки FR и константные участки Ig не принимают непосредственного участия в связывании антигена, но вносят свой вклад в связывание антигена и/или опосредуют эффекторную функцию антитела. Некоторые остатки FR могут оказывать существенное влияние на связывание антигена по меньшей мере тремя путями: нековалентное связывание непосредственно с эпитопом, взаимодействие с одним или более остатками CDR и влияние на поверхность раздела между тяжелой и легкой цепями. Константные домены непосредственно не участвуют в связывании антигена, но опосредуют различные эффекторные функции Ig, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), антителозависимом клеточном фагоцитозе (ADCP) и зависимом от комплемента цитотоксичности (CDC).

Легкие цепи иммуноглобулинов позвоночных относятся к одному из двух четко различающихся типов,kapпа (κ) и лямбда (λ), на основе аминокислотной последовательности константного участка. В качестве сравнения тяжелые цепи иммуноглобулинов млекопитающих относятся к одному из пяти основных классов в соответствии с последовательностью константных участков: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. IgG и IgA дополнительно подразделяются на подклассы (изотипы), например IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁

и IgA₂. Константные домены тяжелой цепи, которые относятся к различным классам иммуноглобулинов, называются α , δ , ϵ , γ и μ соответственно. Хорошо известны структуры субъединиц и трехмерные конфигурации классов нативных иммуноглобулинов.

Термины "антитело", "анти-BAFF антитело", "молекула анти-BAFF антитела" "гуманизированное анти-BAFF антитело" и "вариант гуманизированного анти-BAFF антитела" специфически охватывают моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, мультиспецифические антитела и фрагменты антител, такие как вариабельные домены и другие участки антител, которые проявляют желаемую биологическую активность, например связывание BAFF.

Термин "моноклональное антитело" (mAb) относится к антителу, которое является высокоспецифичным и непосредственно направленным против одной антигенной детерминанты, "эпитопа". Таким образом, определение "моноклональные" указывает на антитела, направленные на идентичный эпитоп, и это не следует истолковывать так, что необходимо получать антитела каким-либо определенным способом. Следует понимать, что моноклональные антитела можно получить при использовании любого способа или методики, известной в данной области техники; включая, например, гибридомный метод, впервые описанный Köhler и др., 1975, Nature 256:495, или методы на основе рекомбинантной ДНК, известные в данной области техники (см., например, патент США № 4816567), или методы изоляции рекомбинантно полученного моноклонального антитела при использовании фаговой библиотеки антител с помощью способов, описанных Clackson и др., 1991, Nature, 352:624-628 и Marks и др., 1991, J. Mol. Biol. 222:581-597.

Термин "мономер" относится к гомогенной форме антитела. Например, для полноразмерного антитела термин "мономер" означает мономерное антитело, которое имеет две идентичные тяжелые цепи и две идентичные легкие цепи.

Химерные антитела состоят из вариабельных участков легкой и тяжелой цепей антитела из одного вида (например, млекопитающего, отличного от человека, такого, как мышь), а константные участки легкой и тяжелой цепей антитела - из других видов (например, человека) и могут быть получены путем связывания последовательностей ДНК, которые кодируют вариабельные участки антитела из первого вида (например, мыши), с последовательностями ДНК константных участков антитела из второго вида (например, человека) и трансформации хозяина при использовании экспрессионного вектора, содержащего связанные последовательности, для того чтобы позволить им продуцировать химерное антитело. Альтернативно, химерное антитело может быть таким, в котором один или более участков или доменов тяжелых и/или легких цепей являются идентичными, гомологичными или представляют собой вариант соответствующей последовательности в моноклональном антителе из другого класса или изотипа иммуноглобулинов. Химерные антитела могут включать фрагменты таких антител при условии, что фрагмент антитела проявляет желаемую биологическую активность исходного для него антитела, например, в отношении связывания с тем же эпитопом (см., например, патент США № 4816567 и Morrison и др., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855).

Термины "фрагмент антитела", "фрагмент анти-BAFF антитела", "молекула анти-BAFF антитела", "фрагмент анти-BAFF - эпитоп антитела", "фрагмент гуманизированного анти-BAFF антитела", "фрагмент гуманизированного анти-BAFF - эпитоп антитела" относятся к части полноразмерного анти-BAFF антитела, у которого сохраняется вариабельный участок или функциональная способность, например, к специальному связыванию с эпитопом BAFF. Примеры фрагментов антитела включают, но не ограничиваются такими, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, scFv и scFv-Fc, диатело, линейное антитело, одноцепочечное антитело, мини-тело, диатело, полученное из фрагментов антитела, и мультиспецифические антитела, полученные из фрагментов антитела.

Полноразмерные антитела могут подвергаться обработке с помощью фермента, такого как папаин или пепсин, для получения полезных фрагментов антитела. Переваривание папаином используется для получения двух идентичных антигенсвязывающих фрагментов антитела, которые называются фрагментами "Fab", каждый из которых содержит один антигенсвязывающий сайт и остаточный фрагмент "Fc". Fab-фрагмент также содержит константный участок легкой цепи и область C_{H1} тяжелой цепи. Обработка пепсином обеспечивает получение фрагмента F(ab')₂, который имеет два антигенсвязывающих сайта и все еще способен к перекрестному связыванию с антигеном.

Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов наличием нескольких дополнительных остатков на С-терминальном конце домена C_{H1}. Фрагменты F(ab')₂ антитела представляют пары Fab'-фрагментов, связанные остатками цистеина в шарнирном участке. Также известны другие химические сочетания фрагментов антител.

"Fv" фрагмент содержит полный сайт узнавания и связывания антигена, который состоит из димера вариабельного участка одной тяжелой и одной легкой цепи в тесной нековалентной ассоциации. В данной конфигурации три CDR каждого вариабельного участка взаимодействуют с образованием антигенсвязывающего сайта на поверхности димера V_H-V_L. В совокупности, шесть CDR придают антителу антигенсвязывающую специфичность.

"Одноцепочечный Fv" или "scFv"-фрагмент антитела представляет одноцепочечный вариант Fv, содержащий V_H и V_L домены антитела, где домены расположены в одной полипептидной цепи. Одноцепо-

чечный Fv способен распознавать антиген и связываться с ним. Полипептид scFv может также необязательно содержать полипептидный линкер, расположенный между доменами V_H и V_L, который способствует образованию трехмерной структуры для связывания антигена с помощью scFv (см., например, Pluckthun, 1994, в The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, том 113, Rosenburg и Moore ред., Springer-Verlag, New York, стр. 269-315).

Термин "диатело" относится к небольшим фрагментам антитела, содержащим два антигенсвязывающих сайта, при этом каждый фрагмент включает вариабельный домен тяжелой цепи (V_H), соединенный с вариабельным доменом легкой цепи (V_L) в той же полипептидной цепи (V_H-V_L или V_L-V_H). Более полно диатела описаны, например, Hollinger и др., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:644-6448.

Другие признанные фрагменты антител включают те, которые содержат пару тандема Fd сегментов (V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}) с образованием пары антигенсвязывающих участков. Эти линейные антитела могут быть биспецифическими или моноспецифическими, как описано, например, Zapata и др., 1995, Protein Eng. 8(10):1057-1062.

Гуманизированное антитело или фрагмент гуманизированного антитела представляет собой специфический тип химерного антитела, которое включает вариант аминокислотной последовательности иммуноглобулина или ее фрагмент, которые способны связываться с предварительно определенным антигеном и которые включают один или более FR, имеющих аминокислотную последовательность человеческого иммуноглобулина, и один или более CDR, имеющих аминокислотную последовательность, отличную от человеческого иммуноглобулина. Данная последовательность иммуноглобулина, отличного от человеческого, часто называется "импортной" последовательностью и типично взята из домена "импортного" антитела, в частности, вариабельного домена. В общем случае гуманизированное антитело включает по крайней мере CDR или HVL, отличную от человеческого антитела, встроенную между FR вариабельного домена человеческой тяжелой или легкой цепи. В изобретении описаны специфические BAFF антитела, которые содержат CDR, имеющие происхождение от мышиных моноклональных антител, или гуманизированные CDR, представленные в табл. 3 и 4, встроенные между FR последовательностями вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей эмбриональной линии человека. Итак, определенные мышьи остатки FR важны для функции гуманизированных антител и, таким образом, определенные остатки последовательности вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей эмбриональной линии человека модифицированы для того, чтобы быть такими же, как и те, которые содержатся в соответствующей мышьей последовательности.

В другом аспекте гуманизированное BAFF антитело содержит в основном все по меньшей мере из одного и, как правило, двух вариабельных доменов (такие, например, как во фрагментах Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc и Fv), в которых все или существенно все CDR соответствуют таковым иммуноглобулина, отличного от человеческого, и все или существенно все FR из консенсусной последовательности или эмбриональной последовательности человеческого иммуноглобулина. В другом аспекте гуманизированное анти-BAFF антитело также включает по крайней мере часть Fc-участка иммуноглобулина, как правило, человеческого иммуноглобулина. Обычно антитело будет включать как легкую цепь, так и, по крайней мере, вариабельный домен тяжелой цепи. Антитело также может включать один или более из следующих участков: C_{H1} шарнирный участок, C_{H2}, C_{H3} и/или C_{H4} участки тяжелой цепи.

Гуманизированное анти-BAFF антитело может быть выбрано из любого класса иммуноглобулинов, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изотипа, включая IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Например, константный домен может представлять связывающий комплемент константный участок, когда желательно, чтобы гуманизированное антитело проявляло цитотоксическую активность, а изотип, как правило, представляет IgG₁. В тех случаях, когда цитотоксическая активность не является желательной, то константный участок может принадлежать к другому изотипу, например IgG₂. Альтернативное гуманизированное анти-BAFF антитело может включать последовательности более чем из одного класса или изотипа иммуноглобулинов, и выбор конкретных константных участков для оптимизации желаемых эффекторных функций находится в компетенции специалистов в данной области техники. Антитела могут представлять собой IgG1 антитела, и, в частности, они являются IgG1 антителами, в которых существует нокаут эффекторных функций.

Не требуется, чтобы FR и CDR или HVL гуманизированного анти-BAFF антитела точно соответствовали исходным последовательностям. Например, один или более остатков в "импортном" CDR или HVL, или консенсусной последовательности FR, или таковой эмбриональной линии могут быть изменены (например, подвергнуты мутагенезу) путем замены, вставки или делеции, так что полученный аминокислотный остаток более не будет идентичен исходному остатку в соответствующем положении в любой исходной последовательности, но антитело, тем не менее, сохраняет функцию связывания с BAFF. Такое изменение, как правило, не будет значительным и будет представлять собой консервативное изменение. Как правило, по меньшей мере 75% остатков гуманизированного антитела будет соответствовать таковым в исходных консенсусных FR или FR эмбриональной линии и "импортных" CDR последовательностях, чаще по меньшей мере 90% и наиболее часто более чем 95%, или более чем 98%, или более чем 99%.

Остатки иммуноглобулина, которые оказывают влияние на поверхность раздела между вариабельными участками тяжелой и легкой цепей ("поверхность раздела V_H-V_L"), представляют собой такие, которые оказывают влияние на близость или ориентацию двух цепей по отношению друг к другу. Определенные остатки, которые могут участвовать во взаимодействиях между цепями, включают остатки V_L 34, 36, 38, 44, 46, 87, 89, 91, 96 и 98 и остатки V_H 35, 37, 39, 45, 47, 91, 93, 95, 100 и 103 (при использовании системы нумерации, представленной Kabat и др. "Sequences of proteins of immunological interest" (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987). В патенте США № 6407213 также обсуждается, что остатки, такие как остатки V_L 43 и 85 и остатки V_H 43 и 60, также могут быть вовлечены в это взаимодействие. Несмотря на то что данные остатки указаны только для человеческого IgG, они применимы и для других видов. Остатки "импортного" антитела, которые принимают участие во взаимодействиях цепей, выбирают для осуществления замены в консенсусной последовательности.

Термины "консенсусная последовательность" и "консенсусное антитело" относятся к аминокислотной последовательности, которая содержит наиболее часто встречаемый аминокислотный остаток в каждом положении во всех иммуноглобулинах любого конкретного класса, изотипа или структуры субъединиц, например в вариабельном участке человеческого иммуноглобулина. Консенсусная последовательность может основываться на иммуноглобулинах определенного вида или многих видов. Термин "консенсусная" последовательность, структура или антитело охватывает консенсусную последовательность человека и относится к аминокислотной последовательности, которая включает наиболее часто встречающиеся аминокислотные остатки в каждом положении во всех человеческих иммуноглобулинах любого конкретного класса, изотипа или структуры субъединиц. Таким образом, консенсусная последовательность включает аминокислотную последовательность, имеющую, по крайней мере, в каждом положении аминокислоту, которая находится в одном или более известном иммуноглобулине, но которая может не точно соответствовать полной аминокислотной последовательности любого одного иммуноглобулина. Консенсусную последовательность вариабельного участка не получают из любого естественно продуцированного антитела или иммуноглобулина. Kabat и др., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е изд. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. FR консенсусных последовательностей тяжелой и легкой цепей и их варианты являются полезными последовательностями для получения гуманизированных анти-BAFF антител (см. например, патенты США № 6037454 и 6054297).

Последовательности эмбриональной линии человека встречаются в природе в человеческой популяции. Сочетание этих эмбриональных генов порождает разнообразие антител. Эмбриональные последовательности антител для легкой цепи антитела происходят от консервативных эмбриональных v-генов и j-генов каппа или лямбда человека. Подобно этому, последовательности тяжелой цепи происходят от эмбриональных v-, d- и j-генов (LeFranc, M.-P., и LeFranc, G., "The Immunoglobulin Facts Book", Academic Press, 2001).

Как используется в данном описании, термины "вариант", "вариант анти-BAFF антитела", "вариант гуманизированного анти-BAFF антитела" или "вариант гуманизированного анти-BAFF антитела", каждый, относятся к гуманизированному анти-BAFF антителу, имеющему, по крайней мере, мышний CDR вариабельного участка легкой цепи из любой последовательности, как представлено в табл. 1, или последовательность мышного CDR тяжелой цепи, которая получена из мышного моноклонального антитела, как представлено в табл. 2. Варианты включают такие, которые имеют одну или более замен аминокислот в вариабельных участках одной или обеих легкой или тяжелой цепях при условии, что изменение аминокислоты не оказывает существенного влияния на связывание антитела с BAFF.

"Изолированное" антитело представляет такое, которое было идентифицировано и выделено из и/или отделено от компонента его природной среды. Загрязняющие компоненты природной среды антитела представляют такие вещества, которые могут мешать диагностическому или терапевтическому применению антитела, и они могут представлять собой ферменты, гормоны или другие белковые или небелковые растворенные вещества. Антитело может иметь большую степень очистки, по меньшей мере 95% от веса антитела.

"Изолированное" антитело включает антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, в которых онорабатывается, поскольку в данном случае не присутствует даже по меньшей один компонент природного окружения антитела. Однако обычно изолированное антитело получают при использовании по меньшей мере одного этапа очистки, при котором удаляется рекомбинантный клеточный материал.

Термин "молекула антитела" относится к любому из определений, описанных выше, или к его антигенсвязывающему фрагменту.

Термин "функциональная способность антитела" относится к факторам, которые вносят свой вклад в распознавание антителом антигена или эффективность антитела в условиях *in vivo*. Изменения аминокислотной последовательности антитела могут оказывать влияние на свойства антитела, такие как сборка, и могут влиять на физические факторы, такие как первоначальная скорость связывания антитела с антигеном (k_a), константа диссоциации антитела и антигена (k_d), константа аффинности антитела в отношении антигена (K_d), конформация антитела, стабильность белка и период полураспада антитела.

Термин "нейтрализует" в общем случае относится к обеспечению инактивации путем ингибирава-

ния биоактивности. Термин "ингибиование" в общем случае относится к ситуации, когда молекула является не способной выполнять свою функцию. В химии или биологии термин "ингибировать" означает ограничивать, предотвращать или блокировать действие или функцию, т.е. ингибировать фермент или ингибировать химическую реакцию. IC₅₀ представляет собой концентрацию лекарственного средства, которая является необходимой для 50% ингибиования *in vitro*, а IC₉₀ представляет собой концентрацию лекарственного средства, которая является необходимой для 90% ингибиования *in vitro*.

Термин "меченный эпитоп" при использовании в данном описании относится к анти-BAFF антителу, слитому с "эпитопом-меткой". "Эпитоп-метка" представляет полипептид, содержащий достаточное количество аминокислот и сконструированный таким образом, что он не оказывает отрицательного влияния на желаемую активность гуманизированного анти-BAFF антитела. Как правило, эпитоп-метка является в достаточной мере уникальной, так что антитело, которое вырабатывается к эпитопу-метке, в основном не будет реагировать перекрестно с другими эпитопами. Приемлемые полипептиды для метки обычно содержат по меньшей мере 6 аминокислотных остатков и обычно содержат 8-50 аминокислотных остатков или примерно 9-30 остатков. Примеры эпитопов-меток и антитела, которое связывается с таким эпитопом, включают флуоресцентный полипептид-метку НА и его антитело 12CA5 (Field и др., 1988, Mol. Cell Biol. 8:2159-2165); с-пульс метку и 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 и 9E10 антитела к ней (Evan и др., Mol. Cell Biol. 5(12):3610-3616); а также гликопротеин D вируса простого герпеса (gD) и антитело к нему (Paborsky и др., 1990, Protein Engineering, 3(6):547-553). Эпитоп-метка может представлять собой "эпитоп связывания рецептора реутилизации". Как используется в данном описании, термин "эпитоп связывания рецептора реутилизации" относится к эпитопу Fc-участка молекулы IgG (такой как IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄), который является ответственным за увеличение периода полураспада в сыворотке крови молекулы IgG.

Антитела могут быть конъюгированы с цитотоксическим агентом. Такой агент представляет собой любое вещество, которое ингибирует или предотвращает функцию клеток и/или вызывает разрушение клеток. Термин предназначается для включения радиоактивных изотопов (таких как ¹³¹I, ¹²⁵I, ⁹⁰Y и ¹⁸⁶Re), химиотерапевтических препаратов и токсинов, таких как ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения и их фрагменты. Такие цитотоксические агенты можно сливать с антителом, например, гуманизированными антителами, при использовании стандартных методов и применять, например, для лечения пациента, которому показано лечение с использованием антитела.

"Химиотерапевтический агент" представляет собой химическое соединение, пригодное для лечения рака. Существуют многочисленные примеры химиотерапевтических агентов, которые могут быть конъюгированы с терапевтическими антителами. Примеры таких химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импрусульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, тритиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилоломеламин; ацетогенины (в частности, буллатацин и буллатацион); камптотецин (включая синтетические аналоги топотекана); бриостатин; каллистатин; СС-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин, ауристатины (включая аналоги монометил-ауристатин Е и монометил-ауристатин F); дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и CBI-TMI); элейтеробин; панкратистатин; саркодикитин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстромустин, ифосфамид, меклоретамин, меклоретамин оксид гидрохлорид, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин; трофосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как карmustин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как антибиотики на основе энедиинов например, калихеамицин, в частности, калихемицин гамма II и калихемицин phiII (см., например, Agnew, Chem. Int'l. Ed. Engl. 33:183-186); динемицин, включая динемицин A; бифосфонаты, такие как клодронат; эсперамицин, а также неокарциностатиновыей хромофор и родственные антибиотические хромомофоры на основе хромопротеина энедиина, аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин (Адриамицин™) (включая морфолино-доксорубицин, цианоморфолино-доксорубицин, 2-пирролинодоксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марселломицин, митомицины, такие как митомицин С, микоферонольная кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пуромицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозозин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пуринов, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиrimидинов, такие как анцитабин, азасидидин, 6-азауридин, кармофур, цитарabin, дидезоксиуридин, доксифлурин, эноцитабин, флоксурин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпитеостанол, мепитиостан, тестолактон; антиадреналовые препараты, такие как аминоглутетимид, митотан, трилостан; компенсаторы фолиевой кислоты, такие как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамид гликозид; аминолевулиновая

кислота; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бизантрен; эдатраксат; дефофамин; демо колцин; диазик-вон; элфорнитин; эллиптиний ацетат; эпотилон; этоглюцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидамин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и анзамитоцины; митогуазон; митоксанtron; мопидамол; нитакрин; пентостатин; фенамет; пиарубицин; лозоксанtron; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK®; разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновая кислота; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецины (в частности, токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангидин); уретан; винdezин; дакарбазин; манномустин; митабронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ara-C"); циклофосфамид; тиотепа; таксоиды, например, паклитаксел (ТАКСОЛ®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NY) и доксетаксел (ТАКСОТЕРЕТ™, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Франция); хлорамбуцил; гемцитабин (Gemzar™); 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винblastин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксанtron; винクリстин; винорелбин (НАВЕЛБИН™); новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; СРТ-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифтометилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из перечисленных препаратов. Также в данное определение входят антигормональные препараты, которые функционируют для регуляции или подавления действия гормонов на опухоли, такие как антиэстрогены и избирательные модуляторы рецепторов эстрогенов (SERM), включая, например, тамокси芬 (в том числе Нолвадекс™), ралокси芬, дролокси芬, 4-гидроксигамокси芬, триокси芬, кеокси芬, LY117018, онапристон и торими芬 (Fareston™); ингибиторы ароматазы, которые ингибируют фермент ароматазу, которая регулирует продукцию эстрогенов в надпочечниках, такие, например, как 4(5)-имидазолы, аминоглутетимид, меgeстрол ацетат (Megace™), эксеместан, форместан, фадрозол, ворозол (Rivisor™), летрозол (Femara™) и анастрозол (Arimidex™) и антиандрогены, такие как флутамид, нильтамид, бикалутамид, лейпролид и госсерелин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из перечисленных препаратов. Какой-либо один или более из этих агентов могут быть конъюгированы с гуманизированными антителами для лечения разнообразных расстройств.

Антитела также могут быть конъюгированы с пролекарственными средствами. Термин "пролекарственное средство" представляет собой форму предшественника или производной фармацевтически активного соединения, которая является менее цитотоксичной для опухолевых клеток по сравнению с исходным препаратом и способным активироваться или превращаться ферментативным путем в более активную форму (см. например, Wilman, 1986, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy", в Biochemical Society Transactions, 14, стр. 375-382, 61st Meeting Belfast and Stella и др., 1985, "Prodrugs: a chemical approach to targeted drug delivery", в "Directed Drug Delivery", Borchardt и др. (ред.), стр. 247-267, Humana Press). Пригодные пролекарственные средства включают, но не ограничиваются, фосфатсодержащие пролекарственные средства, тиофосфатсодержащие пролекарственные средства, сульфатсодержащие пролекарственные средства, пептидсодержащие пролекарственные средства, модифицированные D-аминокислотой пролекарственные средства, гликозилированные пролекарственные средства, β-лактасодержащие пролекарственные средства, необязательно замещенные феноксиацетамидсодержащие пролекарственные средства и необязательно замещенные фенилацетамидсодержащие пролекарственные средства, пролекарственные средства на основе 5-фторцитозина и другие пролекарственные средства на основе 5-фторуридина, которые могут превращаться в более активный цитотоксический свободный препарат. Примеры цитотоксических препаратов, которые могут быть дериватизированы в пролекарственные средства, включают, но не ограничиваются, химиотерапевтические препараты, описанные выше. Для диагностики, а также для целей терапевтического мониторинга антитела также могут быть конъюгированы только с меткой или с меткой и дополнительным вторым агентом (пролекарственным средством, химиотерапевтическим агентом и подобными им). Метка, в отличие от второго агента, представляет собой способное к определению соединение или композицию, которые могут быть непосредственно или опосредованно конъюгированы с гуманизированным антителом. Метка может быть способна к определению сама по себе (например, радиоизотопные метки или флуоресцентные метки) или в случае ферментативной метки может катализировать химическое изменение субстратного соединения или композиции. Меченое гуманизированное анти-BAFF антитело можно получить и использовать в различных применениях, включая диагностику в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Антитела могут быть рецептированы в виде части препарата липосомы для того, чтобы обеспечить их доставку *in vivo*. "Липосома" представляет собой небольшую везикулу, которая состоит из различных типов липидов, фосфолипидов и/или поверхностно-активного вещества. Липосомы полезны для доставки млекопитающему соединения или композиции, такой как гуманизированное анти-BAFF антитело, как раскрыто в данном документе, необязательно соединенное или в комбинации с одним или более фармацевтически активными препаратами. Компоненты липосомы обычно располагаются в виде двуслойного образования, аналогично расположению липидов в биологических мембранах.

Термин "изолированная" молекула нукleinовой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая идентифицирована и отделена по меньшей мере от одной загрязняющей молекулы

нуклеиновой кислоты, с которой она обычно ассоциирована в природном источнике нуклеиновой кислоты антитела. Молекула изолированной нуклеиновой кислоты отличается от молекулы нуклеиновой кислоты в том виде, в котором она существует в клетках, существующих в природе.

Итак, один или более доменов гуманизированных антител могут экспрессироваться рекомбинантно. Такая рекомбинантная экспрессия может использовать одну или более регуляторных последовательностей, т.е. полинуклеотидных последовательностей, которые являются необходимыми для экспрессии, функционально связанной с кодирующей последовательностью в определенном организме-хозяине. Регуляторные последовательности, подходящие для применения в прокариотических клетках, включают, например, последовательности промотора, оператора и сайта связывания с рибосомой. Эукариотические регуляторные последовательности включают, но не ограничиваются, промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры. Данные регуляторные последовательности можно использовать для экспрессии и продукции гуманизированного анти-BAFF антитела в прокариотических и эукариотических клетках-хозяевах.

Последовательность является "функционально связанной" тогда, когда ее помещают в функциональную связь с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, препоследовательность нуклеиновой кислоты или секреторная лидерная последовательность является функционально связанной с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, если он экспрессируется в виде пробелка, который принимает участие в секреции полипептида; промотор или энхансер является функционально связанным с кодирующей последовательностью, если они оказывают влияние на транскрипцию последовательности; или сайт связывания рибосомы является функционально связанным с кодирующей последовательностью, если он расположен таким образом, что облегчает трансляцию. Как правило, "функционально связанный" означает, что связанные последовательности ДНК являются непрерывными и, в случае секреторной лидерной последовательности, являются непрерывными и находятся в рамке считывания. Однако энхансеры необязательно являются непрерывными. Сочетанное связывание может осуществляться путем лигирования в соответствующих сайтах рестрикции. Если такие сайты отсутствуют, то можно использовать синтетические олигонуклеотидные адаптеры или линкеры.

В данном изобретении выражения "клетка", "линия клеток" и "культура клеток" используются взаимозаменяющими, и все эти определения включают их потомство. Таким образом, "трансформанты" и "трансформированные клетки" включают первичную клетку и культуры, полученные из нее, без учета числа пассажей.

Термин "млекопитающее" для целей лечения относится к любому животному, которое классифицируется как млекопитающее, включая людей, домашних и сельскохозяйственных животных, и также животных из зоопарка, спортивных или комнатных животных, таких как собаки, лошади, кошки, коровы и тому подобное. Предпочтительно млекопитающее представляет собой человека.

"Расстройство", как используется в данном описании, представляет собой любое состояние, которое подвергается лечению с помощью гуманизированного анти-BAFF антитела, описанного в данном документе. Оно включает хронические и острые расстройства или заболевания, в том числе патологические состояния, которые обеспечивают предрасположенность млекопитающего к данному нарушению. Неограничивающие примеры заболеваний или расстройств, которые подвергаются лечению, включают воспалительные, ангиогенные, аутоиммунные и иммунологические расстройства, респираторные расстройства, рак, гематологические злокачественные заболевания, доброкачественные и злокачественные опухоли, лейкемии и лимфоидные злокачественные образования.

Термины "рак" и "раковый" относятся или описывают физиологическое состояние у млекопитающего, которое, как правило, характеризуется неконтролируемым ростом клеток. Примеры рака включают, но не ограничиваются, такие как карцинома, лимфома, бластома, саркома и лейкемия.

Как используется в данном описании, термин "ассоциированное с BAFF расстройство" или "ассоциированное с BAFF заболевание" относится к состоянию, при котором активность BAFF осуществляет свой вклад в заболевание, и типично где BAFF подвергается экспрессии на патологическом уровне. Ассоциированное с BAFF расстройство включает заболевания и расстройства иммунной системы, такие как аутоиммунные расстройства и воспалительные расстройства. Такие состояния включают, но не ограничиваются, ревматоидный артрит (RA), системную эритематозную волчанку (SLE), склеродермию, синдром Шегрена, рассеянный склероз, псориаз, псориатический артрит, воспалительные заболевания кишечника (например, неспецифический язвенный колит и болезнь Крона), воспаление легких, астму, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпур (ITP) и анкилозирующий спондилит.

Термин "внутривенная инфузия" относится к введению агента в вену животного или человека-пациента в течение периода времени более чем примерно 15 мин, как правило, в течение примерно от 30 до 90 мин.

Термин "внутривенный болюс" или "внутривенное струйное введение" относится к введению лекарственного препарата в вену животного или человека таким образом, что в организм препарат поступает в течение примерно 15 мин или менее, как правило, в течение 5 мин или менее.

Термин "под кожное введение" относится к введению препарата под кожу животного или человека-пациента, предпочтительно в "карман" между кожей и расположенной ниже тканью, посредством мед-

ленной, непрерывной доставки из резервуара препарата. Сдавливание или оттягивание кожи вверх и в сторону от расположенной ниже ткани может создать "карман".

Термин "подкожная инфузия" относится к введению препарата под кожу животного или человека-пациента, предпочтительно в "карман" между кожей и расположенной ниже тканью, посредством медленной, непрерывной доставки из резервуара препарата в течение периода времени, включая, но без ограничения, 30 мин или менее или 90 мин или менее. Необязательно инфузию можно осуществлять путем подкожной имплантации насоса для доставки лекарственного препарата, где насос доставляет заранее определенное количество лекарственного препарата в течение заранее определенного периода времени, например, в течение 30 мин, 90 мин или периода времени, составляющего продолжительность схемы лечения.

Термин "подкожный болюс" относится к введению лекарственного препарата под кожу животного или человека-пациента, где доставка болюса лекарственного препарата составляет менее чем примерно 15 мин; в другом аспекте менее чем примерно 5 мин и в еще одном аспекте менее чем примерно 60 с. Введение осуществляют в "карман" между кожей и расположенной ниже тканью, где "карман" создают путем сдавливания или оттягивания кожи вверх и в сторону от расположенной ниже ткани.

Термин "терапевтически эффективное количество" используется по отношению к количеству активного агента, которое устраняет или ослабляет один или более симптомов расстройства, которое подвергается лечению. В другом аспекте терапевтически эффективное количество относится к целевой концентрации в сыворотке крови, которая, как было установлено, является эффективной, например, для замедления прогрессирования заболевания. Эффективность может быть измерена различными путями в зависимости от состояния, которое подвергается лечению.

Термины "лечение" и "терапия" и подобные им, как используется в данном описании, понимаются как такие, которые включают терапевтические, а также профилактические или подавляющие мероприятия в отношении заболевания или расстройства, приводящие к любому клинически желаемому или лечебному эффекту, включая, но не ограничиваясь, такие как ослабление или облегчение одного или более симптомов, регрессия, замедление или остановка прогрессирования заболевания или расстройства. Таким образом, например, термин "лечение" включает введение препарата до или после начала развития симптома заболевания или расстройства, для предотвращения или устранения, таким образом, одного или более симптомов заболевания или расстройства. В качестве другого примера термин включает введение препарата после клинического проявления заболевания для устранения симптомов заболевания. Кроме того, введение агента после начала развития и после появления клинических симптомов, где введение оказывает влияние на клинические параметры заболевания или расстройства так, что степень повреждения ткани, или количество, или степень метастазирования, независимо от того приводит ли лечение к ослаблению заболевания или нет, включает "лечение" и "терапию" в том смысле, в котором они используются в данном изобретении. Более того, поскольку композиции, либо отдельно, либо в комбинации с другим терапевтическим агентом, облегчают или ослабляют по крайней мере один симптом расстройства, которое подвергается лечению, по сравнению с таковым симптомом при отсутствии применения композиции гуманизированного анти-BAFF антитела, результат будет считаться эффективным лечением подвергающегося лечению расстройства, несмотря на то, ослабляются ли все симптомы расстройства или нет.

Термин "вкладыш в упаковке" используется для обозначения инструкций, которые обычно включаются в промышленно доступные упаковки терапевтических продуктов, содержащие информацию о показаниях, применении, введении, противопоказаниях и/или предостережениях, касающихся использования таких терапевтических продуктов.

Антитела.

В одном аспекте описываются и раскрываются анти-BAFF антитела. Особое значение для лечения аутоиммунного заболевания у человека представляют гуманизированные анти-BAFF антитела и композиции, раскрытые в данном описании. Также описываются связующие агенты, которые включают антигенсвязывающий фрагмент анти-BAFF антитела, в частности гуманизированного анти-BAFF антитела. Гуманизированные анти-BAFF антитела и связующие агенты могут ингибировать продукцию ассоциированных с BAFF цитокинов, которые способствуют хроническим аутоиммунным и воспалительным заболеваниям. Гуманизированное анти-BAFF антитела и связующие агенты, таким образом, могут быть использованы при лечении различных заболеваний или расстройств. Гуманизированное анти-BAFF антитело и агент, связывающий BAFF, каждый, включают в себя по крайней мере часть, которая специфически распознает BAFF эпигоп (т.е. антигенсвязывающий фрагмент).

При начальной характеристике мышиные антитела были выбраны на основе характеристики связывания рецептора BAFF.

В соответствии с одним аспектом антитело может иметь значение K_D BAFF, в частности человеческого BAFF, менее чем 100 пМ. В другом аспекте антитело может иметь значение K_D менее чем 10 пМ. или же значение K_D менее чем 1 пМ.

CDR легких и тяжелых цепей различных антител против BAFF представлены в табл. 3 и 4 соответственно. Табл. 3 и 4 также показывают пять CDR легкой цепи и один CDR тяжелой цепи, которые были

получены либо из 1A4, либо 5B9 мышиных антител с помощью процесса гуманизации.

Таблица 1

Анти-BAFF мыши - последовательности Vκ

Обозначение	Последовательность
206G9A10	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACAAACAGTAGGGAGACAGGGTCAGC ATCACCTGCAAGGCCAGTCAGAAATGCGGGTGCCTGCTGAGCCTGGTTCAACAGAAAACCAG GACAATCTCTAAACTACTGATTTACTCAGCATCCAATCGGTATACTGGAGTCCCTGATCG CTTCACAGGCAGTGGATCGGGGACAGATTTCACTCTCACCATTAGCAATGTGCAGTCTGAGG GACCTGGCAGATTATATCTGTCAACAATACAGAAGCTATCCTCGGACGTTCGGAGGAGGCA CCAAGCTGGAATCAA (SEQ ID NO: 40)
	DIVMTQSQKFMSTTVGDRVSITKASQNAGAAVAWFQQKPGQSPKLLIYSASNRYTGPDRFT GSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYICQQYRSFPRTFGGGTLEIK (SEQ ID NO: 41)
227D5A7	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACAAACAGTAGGGAGACAGGGTCAGC ATCACCTGCAAGGCCAGTCAGAAATGCGGGTGCCTGCTGAGCCTGGTTCAACAGAAAACCAG GACAATCTCTAAATTACTGATTTACTCAGCATCCAATCGGTATACTGGAGTCCCTGATCG CTTCACAGGCAGTGGATCGGGGACAGATTTCACTCTCACCATTAGCAATGTGCAGTCTGAGG ACCTGGCAGATTATATCTGTCAACAATACAGAAGCTTCCTCGGACGTTCGGAGGAGGCA CAAGCTGGAATCAA (SEQ ID NO: 42)
	DIVMTQSQKFMSTTVGDRVSITKASQNAGAAVAWFQQKPGQSPKLLIYSASNRYTGPDRFT GSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYICQQYRSFPRTFGGGTLEIK (SEQ ID NO: 43)
250E5A11	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACAAACAGTAGGGAGACAGGGTCAGC ATCACCTGCAAGGCCAGTCAGAAATGCGGGTGCCTGCTGAGCCTGGTTCAACAGAAAACCAG GACAATCTCTAAACTACTGATTTACTCAGCATCCAATCGGTATACTGGAGTCCCTGATCG CTTCACAGGCAGTGGATCGGGGACAGATTTCACTCTCACCATTAGCAATGTGCAGTCTGAG GACCTGGCAGATTATATCTGTCAACAATACAGAAGCTTCCTCGGACGTTCGGAGGAGGCA CTAAGCTGGAATCAA (SEQ ID NO: 44)
	DIVMTQSQKFMSTTVGDRVSITKASQNAGAAVAWFQQKPGQSPKLLIYSASNRYTGPDRFT GSGSGTDFTLTITNVQSEDLADYICQQYRSFPRTFGGGTLEIK (SEQ ID NO: 45)

227D3B11	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATCATGTCCACAAACAGTGGGAGACAGGGTCAGC ATCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATCGGGTATTGATGTAGCCTGGTTCAACAGAAACCAA GACAATCTCTAAACTACTGATTTCTCAACATCCAATCGATATACTGGAGTCCCAGATCG CTTCGCAGGCAGTGGATCGGGGACAGATTCACTCTCACCATTACAATGTGCAGTCTGAA GACCTGGCAGATTATTCTGTCGAATATAGAAGTTATCCTCGGACGTTGGAGGGGGAA CCAAGCTGAAATAAAA (SEQ ID NO: 46)
	DIVMTQSQKIMSTTVGDRVSITCKASQNAgidVAWFQQKPRQSPKLLIFSTSNSRVTGPDRFAG SGSGTDFTLTIYNVQSEDLADYFCLQYRSYPRTFGGTKLEIK (SEQ ID NO: 47)
235F5B9	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATCATGTCCACAAACAGTGGGAGACAGGGTCAGC ATCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATCGGGTATTGATGTAGCCTGGTTCAACAGAAACCAA GACAATCTCTAAACTACTGATTTCTCAAAATCCAATCGATATACTGGAGTCCCAGATCG CTTCGCAGGCAGTGGATCGGGGACAGATTCACTCTCACCATTACAATGTGCAGTCTGAA GACCTGGCAGATTATTCTGTCGAATATAGAAGTTATCCTCGGACGTTGGAGGGAGGCA CCAAGCTGAAATCAA (SEQ ID NO: 48)
	DIVMTQSQKIMSTTVGDRVSITCKASQNAgidVAWFQQKPRQSPKLLIFSKSNRVTGPDRFAG SGSGTDFTLTIYNVQSEDLADYFCLQYRSYPRTFGGTKLEIK (SEQ ID NO: 49)
217H12A7	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCACTGTCCACAAACAGTAGGGAGACAGGGTCAGC ATCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATCGGGTACTGCTGTAGCCTGGTTCAACAGAAACCAAG GACAATCTCTAAACTACTGATTTACTCAGCATTAACTCGTATACTGGAGTCCCTGATCGC TTCACAGGCAGTGGATCGGGACAGATTCACTCTCACCATTAGCAATATGCAGTCTGAAG ACCTGGCAGATTATCTGTCACAAATATAGAAGCTATCCTCGGACGTTGGAGGGAGGCAC CAAGCTGAAATCAA (SEQ ID NO: 50)
	DIVMTQSQKFMSTTVGDRVSITCKASQNAgTAVAWFQQKPGQSPKLLIYSAFNRTGPDRFT GSGSGTDFTLTISNMQSEDLADYICQQYRSYPRTFGGTKLEIK (SEQ ID NO: 51)
210D9B8	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCTGTTGTCACAAACACTAGGGGACAGGGTCAGCA TCACCTGCAAGGCCAGTCAGAGCTGGGTATTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAAG ACATTCTCTAACCTACTGATTTCTCAACATCCAATCGTCAACTGGAGTCCCTGATCGCT TCACAGGCAGCGGATCTGGGACAGATTCACTCTCACCATTAGCGATGTGCAGTCTGAAGA CCTGGCAGATTATTCTGTCAGCAATATAGCAGGTATCCTCGGACGTTGGAGGGACC AAGCTGGAGATCAA (SEQ ID NO: 52)
	DIVMTQSQKFVSTTLGDRVSITCKASQSVGIAVAWYQQKPGHSPNLLIFSTSNSRVTGPDRFTG SGSGTDFTLTISDMQSEDLADYFCQQYRSYPRTFGGTKLEIK (SEQ ID NO: 53)
214G4B7	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCACTGTCCACAAACAGTAGGGAGACAGGGTCAGC ATCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATCGGGTACTGCTGTAGCCTGGTTCAACAGAAACCAAG GACAATCTCTAAACTACTGATTTCTCAACATCCAATCGTATACTGGAGTCCCTGATCGC TTCACAGGCAGTGGATCGGGACAGATTCACTCTCACCATTAGCAATATGCAGTCTGAAG ACCTGGCAGATTATTCTGTCGAATATAGAAGCTATCCTCGGACGTTGGAGGGAGGCAC CAAGCTGAAATCAA (SEQ ID NO: 54)
	DIVMTQSQKFMSTTVGDRVSITCKASQNAgTAVAWFQQKPGQSPKLLIFSTSNSRVTGPDRFT GSGSGTDFTLTISNMQSEDLADYFCLQYRSYPRTFGGTKLEIK (SEQ ID NO: 55)
13J018-1A4	GACATCCAGATGACCCAGTCTCATTATCTGCCTCTGGGAGAAAGAGTCAGTC TCACTTGTGGGCAAGTCAGAACATTGTAATAGGTTAAACTGGCTTCAGCAGGAACCAAGA TGGAACATTAAACGCCATCTACGCCACATCCAGTTAGATTCTGGTGTCCCCAAAAGG TTCAGTGGCAGTAGGTCTGGTGGATTATTCTCTCACCATTAGCAGCCTTGAGTCTGAAG ATTGTAGACTATTACTGTCTACAATATGCTAGTTCTCATTACGTTGGCACGGGACA AAATTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 56)
	DIQMTQSPSSLASLGERVSLTCRASQDIGNRLNWLQQEPDGTIKRLIYATSSLDSGVPKRFSGS RSGSDYSLTISSLESEDVDYYCLQYASSPFTFGTGTLEIK (SEQ ID NO: 57)

1002E8A6	GACATCAAATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGACTCACTA TCACTTGCAGGCAGTCAGGACATTAATAGCTATTAACTGGTCCAGCAGAAACCAGG GAAATCTCTGAGACCTGATCTATCGTCAAACAGATTGGTATCTGGGTCATCAAGG TTCAGTGGCAGTGGATCTGGCAAGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCTGGAATATGAAG ATATGGGAATTATTCTGTCTACAGTATGAGTGGTACACGTTCCGTACACGTCGGAGGGGGAC CAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 118)
	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLWFFQQKPGKSPETLIYRANRLVSGVPSRSGS GSGQDYSLTISSLEYEDMGIYSCLQYDEFPYTFGGGTKEIK (SEQ ID NO: 119)
1070A6B7	GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTGGAGATCAAGCCTCCAT CTCTGCAGATGTAGTCAGAGCCTGTACACAGTAATGAAACACGTATTACATTGGTAC CTGCAGAACGCCAGGCCAGTCTCCAAGCTCTGATCTACAAAGTTCCGACCGATTCTG GGGTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAGGATCAGCA GAGTGGAGGCTGACGATCTGGGAGTTATTCTGCTCTAAAGTACACATGTTCCGCTCAC GTTCGGTCTGGACCAAGCTGGAGCTGAAA (SEQ ID NO: 120)
	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRCSQSLVHSNGNTYHLWYLQKPGQSPKLLIYKVSDRFSGP DRFSGSGSGTDFTLRISRVEADDLGVYFCQSSTHVPLTFGAGTKLEK (SEQ ID NO: 121)
1094C4E6	GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCTAGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCACCA TCACCTGCAGGCCAGTCAGGATGTGGCTACTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGG GCAATCTCTAAACTACTAATTTACTGGGCATCCACCCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGC TTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATAGCAATGTGCACTGAAAG ACTTGCACAAATTCTGTCAAGCAATATAGCAACTATCCGTACACGTTGGAGGGGGAC CACGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 122)
	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVTITCKASQDVATAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDFR TGSGSGTDFLTISNVQSEDANYFCQQYSNYPYTFGGTTLEIK (SEQ ID NO: 123)
27I21-3C7	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTTATCTGCCTCTCTGGAGAAAGAGTCAGTC TCACTTGTGGCAAGTCAGGACATTGTAATAGGTTAAACTGGCTTCAGCAGGCCAGAG TGGAACATTAAACGCCCTGATCTACGCCACATCCAGTTAGATTCTGGTCCCCAAAAGG TTCACTGGCAGTGGCTGGTCAGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTGAATCTGAAG ATTTCAGTGGCAACTATTACTGTCTACAATATGCTAGTTATCCATTACGTTGGCACGGGACA AAATTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 124)
	DIQMTQSPSSLASLGERVSLTCRASQDIGNRLNWLQQAPDGTIKRLIYATSSLDSGVPKRSGS RSGSDYSLTISSLESEDVDYYCLQYASYPFTFGTGTKEIK (SEQ ID NO: 125)
317H2A6	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTTCCTGTCACAAACAAATAGGAGACAGGGTCAGCA TCACCTGCAGGCCAGTCAGAATGTGGGTTCTGCTGTAGTCTGGTATCAACAGAAACCAGG CCAACCTCTAAACTACTGATTACCTCAGCATCCAATCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGC TTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTACCCTTAGCAATGTGCACTGTTAG ACCTGGCAGATTATTCTGTCAACAATATAGCAACTATCCTCTCACGTTGGTCTGGGACC AAGCTGGAGCTGAAA (SEQ ID NO: 126)
	DIVMTQSQKFLSTTIGDRVTSITCKASQNVGSAVVWYQQKPGQPPKLLITSASNRYSGVPDRFTG SGSGTDFLTLSNVQSVLADYFCQQYSNYPFTFGTGTKEIK (SEQ ID NO: 127)
319B8A12	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTTCCTGTCACAAACAAATAGGAGACAGGGTCAGCA TCACCTGCAGGCCAGTCAGAATGTGGGCTGCTGTAGTCTGGTATCAACAGAAATCAGG CCAACCTCTAAACTACTGATTAGGTCAAGCATCCAATCGGTACATTGGAGTCCCTGATCGC TTCACAGGCAGTGGCTGGGACAGATTCACTCTACCCTTAGCAATGTGCACTGTTAG ACCTGGCAGATTATTCTGTCAAGCAATATAGCAACTATCCTCTCACGTTGGTCTGGGACC AAGCTGGACTGACACGGGCTGAT (SEQ ID NO: 128)

	DIVMTQSQKFVSTRVGDVRVSITCKASQNVGAAVVWYQQKSGQPPKLLIRSASNRYIGVPDRFT GSGSGTDFLTVDVQSGDLADYFCQQYSNYPLTFGAGTKLELTRAD (SEQ ID NO: 129)
320F9C5	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCTATGCCACAAACAGTAGGGAGACAGGGTCAGC ATCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTAGTGTGAGCCTGGTATCAACAGAGACCAG GACAATCTCCTACACTACTGATTACTCAGCATCCAATCGGTACACTGGAGTCCCTGATCG CTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCTACCTCACCATTAGCAATATGCAGTCTACGTTGG GACCTGGCAGATTATTCTGTCAAGCAATATAGCAGCTATCCTCTACGTTGGTCTGGGAA CCAAGCTGGAGCTGAAA (SEQ ID NO: 130)
	DIVMTQSQKFVSTRVGDVRVSITCKASQNVGSVVAWYQQRPGQSPTLLIYSASNRYIGVPDRFT GSGSGTDFLTISNMQSEDLADYFCQQYSNYPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 131)
323E9D1	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTGTGTCGACAAGAGTTGGAGACAGGGTCAGCA TCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGCGCTGCTGTAGCTGGTATCAACAGAAATCAGG CCAACCTCTAAACTACTGATTAGGTCACTCCATCGGTACATTGGAGTCCCTGATCGC TTCACAGGCAGTGGGCTCTGGGACAGATTCACTCTACCCTAGCGATGTGCACTGGAG ACCTGGCAGATTATTCTGTCAAGCAATATAGTAACATCCTCTACGTTGGTCTGGGACC AAGCTGGAAGTGACA (SEQ ID NO: 132)
	DIVMTQSQKFVSTRVGDVRVSITCKASQNVGAAVVWYQQKSGQPPKLLIRSASNRYIGVPDRFT GSGSGTDFLTVDVQSGDLADYFCQQYSNYPLTFGAGTKLELT (SEQ ID NO: 133)
332C1B12	GACATTGTGCTGACACAGTCTCCCTGCTTCTTACCTGTTCTGGGGCAGAGGGCACCAC CTCCTGCAGGGCCAGCAAAGGTGTCAGTACATCTAGCTATACTTCATCTGGTACCAA CAGAACCTGGACAGCCGCCAAACTCTCATCAAGTATGCATCCAACCTAGAACATCTGGG TCCCTGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAACATCCATCCTGT GGAGGAGGAGATGTTCAACATATTACTGTCAAGCAGTAGGGAGTTCTCGGACGTT GGTGGAGGACCAAGCTGAAATCAA (SEQ ID NO: 134)
	DIVLTQSPASLPVSLGQRATISCRASKGVSTSSYTFIHWWYQQKPGQPPKLLIKYASNLESGV PAR FSGSGSGTDFLTNIHPVEEDDVATYYCQHSREFPRTFGGGTKEIK (SEQ ID NO: 135)
344B9D9	GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGAGAAACTGTCACCA TCACATGTCGAGCAAGTGGATATTCAACATTATTAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGG AAAATCTCCTCAGCTCTGGTCTATAGTCAATAACCTAGCAGATGGTGCCATCAAGG TTCACTGGCAGTGGATCAGAAACACAATTCTCTCAAGATCAACAGCCTGCAGCCTGAAG ATTITGGGATTATTACTGTCAACATTGGAAACTCCGTACACGTTGGAGGGGGACC AAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 136)
	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNINYLAWYQQKQGKSPQLLVYSAITLADGVPSRFSG SGSETQFSLKINSLQPEDFGIYYCQHFNTPYTFGGGTKEIK (SEQ ID NO: 137)
348A6C1	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTATGTCCACAAACAGTTGGAGACAGGGTCAGCA TCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTCTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGG CCAACCTCTAAACTACTGATTAGGTCACTCCATCGGTACATTGGAGTCCCTGATCGC TTCACAGGCAGTGGGCTCTGGGACAGATTCACTCTACCCTAGCGATGTGCACTGTAG ACCTGGCAGATTATTCTGTCAAGCAATATAGCAACTATCCTCTACGTTGGTCTGGGACC AAGCTGGAAGTGACACGGGCTGAT (SEQ ID NO: 138)
	DIVMTQSQKFVSTRVGDVRVSITCKASQNVGAAVWYQQKPGQPPKLLIRSASNRYIGVPDRFT GSGSGTDFLTVDVQSVLADYFCQQYSNYPLTFGAGTKLELTRAD (SEQ ID NO: 139)

352G11A10	GACATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATATATGCATCTCTAGGAGAGAGACTCACTA TCACTTGCAAGGCAGTCAGGACATTCAAGCTATTAAAGTGGTCCAGCAGAAACCAGG GAAATCTCTTAAGACCTGTATCGTACAATAGATTGGTAGATGGGTCCCCTCAAGG TTCAGTGGCAGTGGATCTGGCAAGATTATTCTCTCACCATCAGGAGCTGGAAATATGAAG ATATGGGAAATTATTATTGTCTACAGTATGATGAATTCCGTACACGTTGGCGGGGGGC CAAGTTGGAAGTAAAA (SEQ ID NO: 140)
	DIKMTQSPPSIYASLGERVTITCKASQDIHSYLSWFQQKPGKSPKTLMYRTNRLVDGVPSRFSG SGSGQDYSLTIRSLEYEDMGNYYCLQYDEFPYTFGGGAKLEVK (SEQ ID NO: 141)
363D4A10	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCACTGTCCACAAACAGTAGGAGAGCAGGGTCACCA TCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGTAGTGTGCTGTAGCTGGTATCAACAGAAACCAGG ACAATCTCTTAACTACTGATTTCTCAGCATCCAATCGGTACACTGGAGTCCCTGATCGCA TCACAGGCAGTGGCTGGGCAAGATTACTCTCACCATAGCAGTGTGCAAGTCTGAAGA CCTGGCAGAATATTCTGTCAAGCAATATAGCAGCTACCTCTCACGTTGGTCTGGGACC AAGCTGGAGCTGAAA (SEQ ID NO: 142)
	DIVMTQSQFMSTTVGDRVTITCKASQNVGSAVVWYQQKPGQSPILLIFSASNRYTGVPDFITG SGSGAEFTLISSVQSEDLAEYFCQQYSSYPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 143)
381A6A9	GACATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATATATGCATCTCTAGGAGAGAGACTCACTA TCACTTGCAAGGCAGTCAGGACATTAAAGCTATTAAAGCTGGTCCAGCAGAAACCAGG GAAATCTCTTAAGACCTGTATCGTCAAACAGATTGGTAGATGGGTCCCCTCAAGG TTCAGTGGCAGTGGATCTGGCAAGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCTGGAAATATGAAG ATATGGGAAATTATTATTGTCTACAGTATGATGAGTTCCGTACACGTTGGAGGGGGGC CAAGCTGGAAATTTAAA (SEQ ID NO: 144)
	DIKMTQSPPSIYASLGERVTITCKASQDIHSYLSWFQQKPGKSPKTLMYRANRLVDGVPSRFSG SGSGQDYSLTISSELEYEDMGNYYCLQYDEFPYTFGGGAKLEIK (SEQ ID NO: 145)
384D5A2	GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGTATCTGTGGAGAAAATCTGACCCA TCACATGTCGATCAAGTGAGAATATTACAGTAGTTAGCATGGTATCAACAGAAACAGGG AAAATCTCTCAGCTCTGGTCTATGCTCAACAAACTAGCAGAAAGGTGTGCCGTCAAGG TTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAGTATTCCCTCAAGATCAACAGCCTACAGTCTGAAG ATTTTGGAGTTATTCTGTCAACATTTGGGGTAGTCCATTGGCTCGGCTCGGGACAC AAGTTGGAAATTTAAA (SEQ ID NO: 146)
	DIQMTQSPLSVSGETVTITCRSENIIYSSLAWYQQKQGKSPQLLVYAAATNLAKGVPSRFSG SGSGTQYSLKINSLQSEDFGSYFCQHFWGSPFAFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 147)
394F5A5	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTATGTCCACAAACAAATAGGAGAGCAGGGTCAGCA TCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGTTCTGCTGTGGCTGGTATCAACAGAAACCAGG ACAACCTCCAAACTACTGATTTACTCAACATCCAATCGGTACACTGGAGTCCCTGATCGC TTCACAGGCAGTAGATCTGGACAGATTCACTCTCACCGTTAGCAATATGCAGTCTGAAG ACCTGGCAGATTATTCTGTCAAGCAATATGCCAGTATCTCTCACATTGGTACTGGGACC AAGCTGGAGCTGAAA (SEQ ID NO: 148)
	DIVMTQSQFMSTTIGDRVSITCKASQNVGSAVAWYQQKPGQPKLIYSTSNRYTGVPDFITG GSRSGTDFTLTVSNMQSEDLADYFCQQYASYPLTFGTGTLELK (SEQ ID NO: 149)
409F12A11	GACATTGTGCTGACACAGTCTCTGCTTCTTAGCTTATCTGTGGGCAGAGGGCACCAC CTCATGCAGGGCCACCAAAGGGTCACTAAATCTGGCTATAGTTATATGCACTGGTACCAA CAGAAACCAGGGCAGCCACCCAAACTCTCATCTATCTGCATCCAACCTAGAACATGGGG TCCCTGCCAGGTTCACTGGCAGTGGTAGTGGCTGGGACAGACTTCACCCCTCAATATCCATCTGT GGAGGAGGAGGATGTTGCAACCTATTACTGTCAAGCACAGTAGGGAGCTCCGCTACGTT GGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA (SEQ ID NO: 150)

	DIVLTQSPASLALSLGQRATISCRATKGVSKGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPA RFSGSGSTDFTLNIHPVEEEDVATYYCQHSRELPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 151)
418F6D9	ATTGTGCTGACCCAATCTTCAGCTTGGCTGTCTCTAGGGCAGAGGGCACCATATC CTGCAGAGGCCAGTGAAAGTGTGATAGTTATGCCAATAGTCTTATGCACTGGTACCGAG AAACCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATATTGCATCCAACCTAGAACATCTGGGTCC CTGCCAGGTTCACTGGCAGTGGCTAGGACAGACTTCACCCACCATTGATCTGGA GGCTGATGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAATAGTGAGGATCCTCGGACGTTGGT GGAGGCACCAAGCTGAAATCAA (SEQ ID NO: 152)
	IVLTQSSASLA VSLGQRATISCRASESVD SYGNLSMHWYQQKPGQPPKLLIYIASNLESGVPARF SGSGSRTDFLTIDPVEADDAATYYCQQNSED PRTFGGGT KLEIK (SEQ ID NO: 153)
431G5A3	AAAAATTGTGCTGACCCAATCTTCAGCTTGGCTGTCTCTAGGGCAGAGGGCACCA TATCCTGCAGAGGCCAGTGAAAGTGTGATCGTTATGCCAATAGTCTTATGCACTGGTACCA GCAGAAAACCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATATTGCATCCAACCTAGAACATCTGG GTCCCTGCAGGTTCACTGGCAGTGGCTAGGACAGACTTCACCCACCATTGATCTGG TGGAGGCTGATGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAATATGAGGATCCTCGGACGTT CGGTGGAGGCACCAAGCTGAAATCAA (SEQ ID NO: 154)
	KIVLTQSSASLA VSLGQRATISCRASESVD RYGNLSMHWYQQKPGQPPKLLIYIASNLESGVPA RFSGSGSRTDFLTIDPVEADDAATYYCQQNNE D PRTFGGGT KLEIK (SEQ ID NO: 155)
435A6B3	GACATCAAGATGACCCCGTCTCCTCTTCCATGTATGCATCTCGGAGAGAGAGTCACTA TCACTTGCAAGGCAGTCAGGACATTAATAGATATTAAGCTGGTCCAGCAGAAACCAGG GAAATCTCTAAGACCTGATCTATCGTCAAATAGATTGTAGATGGGTCCCATCAAGG TTCAGTGGCAGTGGATCTGGCAAGATACTCTCACCATCAGCAGCTGGAGTATGAAG ATATGGGAATTATTATTGTCTACAGTATGATGAATTCTTACACGTTGGAGGGGGAC CAAGCTGAAATAAA (SEQ ID NO: 156)
	DIKMTPSPSSMYASLGERVTITCKASQDINRYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSG SGSGQDYSLTISSLEYDMIYYCLQYDEFPYT FGGGT KLEIK (SEQ ID NO: 157)
436H2C12	AACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTGGCTGTCTCTAGGGCAGAGGGCACCA TATCCTGCAGAGGCCAGTGAAAGTGTGATAATTATGCCAATAGTTTATGCACTGGTACCA GCAGAAAACCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTCTGCATCCAACCTAGAACATCTGG GTCCCTGCAGGTTCACTGGCAGTGGCTAGGACAGACTTCACCCACCATTGATCTGG TGGAGGCTGATGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAATATGAGGATCCTCGGACGTT CGGTGGAGGCACCAAGCTGAAATCAA (SEQ ID NO: 158)
	NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVD NYGNFSMHWYQQKPGQPPKLLISLASNLESGVPA RFSGSGSRTDFLTIDPVEADDAATYYCQQNNE D PRTFGGGT KLEIK (SEQ ID NO: 159)
436H6A9	GACATTGTGCTGACACAGTCTCTGCTTCTTAAGGTGATCTCTGGGGCAGAGGGCACCA TCTCTGCAGGGCCACCAAGGGTCACTAAATCTGGTATAGTTATATTCACTGGTACCA ACAGAAAACCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATCTGCATCCAACCTACAATCTGG GTCCCTGCAGGTTCACTGGCAGTGGCTGGACAGACTTCACCCCAACATCCATCCGG TGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACAGTAGGGAGCTCCGTCACGTT CGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA (SEQ ID NO: 160)
	DIVLTQSPASLGVSLGQRATISCRATKGVTKGYSYIH WYQQKPGQPPKLLIYLASNLSNL QSGVPA RFSGSGSTDFTLNIHPVEEED AATYYCQHSRELPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 161)

440E9D12	AACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTGCGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCACCAT GTCCTGCAGAGCCAGTAAAGTGTGATAGTTATGGCACTAGTTTATGCACTGGTACCAA CACAGACCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTCTTGCACTCCAAACCTAGAACATCTGGGG TCCCTGCCAGGTTCACTGGCAGTGGCTAGGACAGACTTCACCCCTACCATTGATCCTGT GGAGGCTGATGATGCTGCAACCTATTACTGTCAACAAAATAATGAGGATCCTCGGACGTT GGTGGAGGCACCACGCTGAAATCAA (SEQ ID NO: 162)
	NIVLTQSPASLPVSLGQRATMSCRASKSVD SYGTSFMHWYQHRPGQPKLLISLASNLESGVP RFSGSGSRDFTLTIDPVEPDDAATYYCQQNNEDPRTFGGGTLEIK (SEQ ID NO: 163)
441E6F2	AACATTGTGTTGACCCAATCTCCAGCTTCTTGCGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCACCAT ATCCTGCAGAACCACTGGCAGTAAAGTGTGATAGTTATGGCAATAGTTTATGTTCTGGTCCAG CAGAAACCAAGGACAGGCACCCAAACTCCTCATCTTGCACTCCAAACCTCGAACATCTGGGG TCCCTGCCAGGTTCACTGGCAGTGGCTAGGACAGACTTCACCCCTACCATTGATCCTGT GGAGGCTGATGATGCTGCAACCTATTACTGTCAACAGAACATGAGGATCCTCGGACGTT GGTGGAGGCACCACGCTGAAATCAA (SEQ ID NO: 164)
	NIVLTQSPASLA VSLGQRATISCRTEVD SYGNSFMFWFQQKPGQAPKLLIFLTSNLESGVP AR FSGSGSRDFTLTIDPVEADDAATYYCQQSNEDPRTFGGGTLEIK (SEQ ID NO: 165)
443C11A12	GACATCAAGATGACCCCGTCTCCTTCCATGTATGCATCTCGGAGAGAGAGTCACTA TCACCTGCAAGGCAGGACATTAATAGCTATTAAAGTTAGGTCCAGCAGAAACCAAGG GAAATCTCTAAAGACCCCTGATCTATCGTCAATAGTAGTTAGGTAGATGGGTCCATCAAGG TTCAGTGGCAGTGGATCTGGCAAGATTACTCTCTCACCATCAGCAGCCTGGAATATGAAG ATATGGGAATTATTATTGTCTACAGTATGATGAATTCTTACACGTCGGAGGGGGAC CAAGCTGAAATAAG (SEQ ID NO: 166)
	DIKMTPS PSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLYRANRLVDGVPSRFSGS GSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPYTSGGTLEIK (SEQ ID NO: 167)
444G1A10	AACATTGTGTTGACCCAATCTCCAGCTTCTTGCGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCACCAT ATCCTGCAGAGCCAGTAAAGTGTGATAGTTATGGCAATAGTTTATGTTCTGGTCCAG CAGAAACCAAGGACAGGCACCCAAACTCCTCATCTTGCACTCCAAACCTCGAACATCTGGGG TCCCTGCCAGGTTCACTGGCAGTGGCTAGGACAGACTTCACCCCTACCATTGATCCTGT GGAGGCTGATGATGCTGCAACCTATTACTGTCAACAGAACATGAGGATCCTCGGACGTT GGTGGAGGCACCACGCTGAAATCAA (SEQ ID NO: 168)
	NIVLTQSPASLA VSLGQRATISCRASEVDSYGNNSFMFWFQQKPGQAPKLLIFLTSNLESGVP AR FSGSGSRDFTLTIDRVEADDAATYYCQQSNEDPRTFGGGTLEIK (SEQ ID NO: 169)
450A2A7	ATTGTGCTGACCCAATCTCAGCTTCTTGCGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCACCATATC CTGCAGAGCCAGTGAAGTGTGATCGTTATGGCAATAGTCTTATGCACTGGTACCAAGCAG AAACCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATATTGCATCCAACCTAGAACATCTGGGTCC CTGCCAGGTTCACTGGCAGTGGCTAGGACAGACTTCACCCCTACCATTGATCCTGTGGA GGCTGATGATGCTGCAACCTATTACTGTCAACAGAACATGAGGATCCTCGGACGTTGGT GGAGGCACCACGCTGAAATCAA (SEQ ID NO: 170)
	IVLTQSSASLA VSLGQRATISCRASEVDRYGNNSLMHWYQQKPGQPKLLIYIASNLESGVP AR FSGSGSRDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNNEDPRTFGGGTLEIK (SEQ ID NO: 171)

456H11B7	AACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTGCGCTGTCTAGGGCAGAGGGCACCAT GTCCTGCAGAGCCAGTAAAGTGTGATAGTTATGCCACTAGTTATGCACTGGTACCAA CACAGACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTCTTGCACTCAACCTAGAATCTGGG TCCCTGGCAGGTTCACTGGCAGTGGCTAGGACAGACTCACCTCACCATGATCCTGT GGAGCCTGATGATGCTGCAACCTATTACTGTCAACAAAATAATGAGGATCCTCGGACGTT GGTGGAGGCACCACGCTGAAATCAAA (SEQ ID NO: 172)
	NIVLTQSPASLPVSLGQRATMSCRASKVDSYGTFSFMHWYQQHRPGQPPKLLISASNLESGVP RFSGSGSRDFTLTIDPVEPDDAATYYCQQNNEDPRTFGGGTLEIK (SEQ ID NO: 173)
537G7A6	GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCTTGCGCTGTCTAGGGCAGAGGGCACCG TATCCTGCAGAGTCAGTGAAGTGTGATAGATATGCCATAGTTTATGCACTGGTACCA GCAGAAACAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTATCTTGCACTCAACCTAGAATCTGGG GTCCCCTGCCAGGTTCACTGGCAGTGGCTAGGACAGACTCACCTCACCATGATCCTG TGGAGGCTGATGATGCTGCAACCTATTACTGTCAACAAAATAAGAGGATCCGTACACGTT CGGAGGGGGGACCAAGCTGAACTAAA (SEQ ID NO: 174)
	DIVLTQSPASLAvgQRATVSCRVSESVDRYADSFMFHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVP ARFSGSGSRDFTLTIDPVEADDAAATYYCQQNKEDPYTFGGGTLEIK (SEQ ID NO: 175)
551H4D6	GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTGCGCTGTCTAGGGCAGAGGGCACCA TGTCTGCAGAGCCAGTGAAGTGTGATAGTTATGCCATAGTTTATACACTGGTACCA GCAGAAACAGGACAGCCACCCAGACTCCTCATCTATCTTGCACTCAACCTAAATTCTGGG ATCCCCTGCCAGGTTCACTGGCAGTGGCTAGGACAGACTCACCTCACCATGATCTG TGGAGGCTGATGATGCTGCAACCTATTACTGTCAACAAAATAATGAGGATCCTCGGACGTT CGGTGGAGGCACCAAGCTGAAATCAAA (SEQ ID NO: 176)
	DIVLTQSPASLAvgQRATMSCRASESVDSDYGNFIHWYQQKPGQPPRLIYRASNLSGIPA RFSGSGSRDFTLTISSVADDVATYYCHQNNEDPRTFGGGTLEIK (SEQ ID NO: 177)
560H2A7	GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTGCGCTGTCTAGGGCAGAGGGCACCA TCTCCTGCAGAGCCAGCGAAAGTATTGATAATTATGGCCTTATTCTATGAGCTGGTCCAA CAGAAACAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTATCTTGCACTCAACCGAGGATCCGGG GTCCCCTGCCAGGTTAGTGGCAGTGGCTGGACAGACTCACGCTAACATCCATCCTA TGGAGGAGGATGATACTGCAATGTATTCTGTCAAGCAAAGTAAGGAGGTTCCGTGACGTT CGGTGGAGGCACCAAGCTGAACTAAA (SEQ ID NO: 178)
	DIVLTQSPASLAvgQRATISCRASESIDNYGLIFMSWFQQKPGQPPKLLIYAASNRGSGVPAR FSGSGSGTDFLNIPMEEDDTAMYFCQQSKEVWTFGGGTLEVK (SEQ ID NO: 179)
606H7F8	GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAAAATGTCACCA TCACATGTCAGCAAGTGGAAATTACAATTATTCAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGG AAAATCTCCTCAGCTCTGGTCTATAATGCAAAAACCTTAGCAGATGGTGTGCCATCAAGG TTCACTGGCAGTGGATCAGGAACACAATTCTCTCAAGATCAACAGCCTGCAGCCTGAAG ATTTCGGAGGTTATTACTGTCAACATTGGAGTACTCCGTACAGTTGGAGGGGAC CAAGCTGAAATAAAA (SEQ ID NO: 180)
	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNINYLAWYQQKQGKSPQLLVYNAKTLADGVPSRFS GSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYYCQHFSTPYTFGGGTLEIK (SEQ ID NO: 181)

Таблица 2

Анти-BAFF мыши - последовательности V_H

Обозначение	Последовательность
206G9A10	CAGGTCCAAC TG CAG CAG CTC TGG GCT GAG CTT GT GAAG CCT TGG GCT TCA GT GAAG CTG TCC TGC AAG GCT TCG CT ACAC CCT CA GT AT CT CT GT TA TA CA CT GG GT GC AAC AG AG GC
	CTGGACGAGGCCCTGAGTGGATTGAAGGATGATCCTAGTAGTGTTGGTACTAAGTACA ATGAGAAGTTCGAGAGCAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCGTCCAGCACAGCCTACA TGCAGCTCAGCAGCCTGACACCTGAGGACTCTCGGGTCTATTATTGTGCAAGAGGGGAGG ATT TATTAGTACGGACGGATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTC CTCA (SEQ ID NO: 58)
	QVQLQQPGAE LVKPGASV KLSCK ASGYTFSI FCIH WVQ QRPGRGLE WIGRIDPSSGGTKYNEK FESKA TLTV DKSS STAYM QLSS LT PEDA VYY CARGED LLVR TDAM DYWG QGTS TVSS (SEQ ID NO: 59)
227D5A7	CAGGTCCAAC TG CAG CAG CTC TGG GCT GAG CTT GT GAAG CCT TGG GCT TCA GT GAAG CTG TCC TGC AAG GCT TCG CT ACAC CCT CA GT AT CT CT GT TA CA CT GG GT GC AAC AG AG GC CTGGACGAGGCCCTGAGTGGATTGAAGGATGATCCTAGTAGTGTTGGTACTAAGTACA ATGAGAAGTTCGAGAGCAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCGTCCAGCACAGCCTACA TGCAGCTCAGCAGCCTGACACCTGAGGACTCTCGGGTCTATTATTGTGCAAGAGGGGAGG ATT TATTAGTACGGACGGATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTC CTCA (SEQ ID NO: 60)
	QVQLQQPGAE LVKPGASV KLSCK ASGYTFSI FCIH WVQ QRPGRGLE WIGRIDPSSGGTKYNEK FESKA TLTV DKSS STAYM QLSS LT PEDA VYY CARGED LLVR TDAM DYWG QGTS TVSS (SEQ ID NO: 61)
250E5A11	CAGGTCCAAC TG CAG CAG CTC TGG GCT GAG CTT GT GAAG CCT TGG GCT TCA GT GAAG CTG TCC TGC AAG GCT TCG CT ACAC CCT CA GT AT CT CT GT TA AC ACT GG GT GC AAC AG AG GC CTGGACGAGGCCCTGAGTGGATTGAAGGATGATCCTA AT AGTGG GT TACTA AGTACA ATGAGAGTTGCAAAA ACAAGGCCACACTGACTGTAGACAAACCTCCAGCACAGCCTACA TGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTCGGGTCTATTATTGTGCAAGAGGGGAGG ATT TATTAGTACGGACGGATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTC CTCA (SEQ ID NO: 62)
	QVQLQQPGAE LVKPGASV KLSCK ASGYTFSI FCIH WVQ QRPGRGLE WIGRIDPSSGGTKYNEK FENKA TLTV DKSS STAYM QLSS LT PEDA VYY CARGED LLVR TDAM DYWG QGTS TVSS (SEQ ID NO: 63)
227D3B11	CAGGTCCAAC TG CAG CAG CTC TGG GCT GAG CTT GT GAAG CCT TGG GCT TCA GT GAAG CTG TCC TGT AAG GCT TCG CT ACCT CCT CA GC AC CT TT TA AC ACT GG AT AC AG CAG AG GC CTGGCGAGGCCCTGAGTGGATTGAAGGATGATCCTA AT AGTGG GT TACTA AGTACA ATGAGAAGTTCGAGAGTAAGGCCACACTGACTGTGACAAACCTCCAGTACAGCCTACA TGCACCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTCGGGTCTATTATTGTGCAAGAGGGGAGG ATT TATTGATA CGGACGGATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTC CTCA (SEQ ID NO: 64)
	QVQLQQPGAE LVKPGASV KLSCK ASGYSFSTFIH WIQ QRPGRGLE WIGRIDPNSGGTKYNEK FESKA TLTV DKPS STAYM HLSS LT PEDA VYY CARGED LLIR TDAM DYWG QGTS TVSS (SEQ ID NO: 65)
235F5B9	CAGGTCCAAC TG CAG CAG CTC TGG GCT GAG CTT GT GAAG CCT TGG GCT TCA GT GAAG CTG TCC TGC AAG GCT TCG CT ACCT CCT CA GT AC CT TT TA AC ACT GG AT AC AG CAG AG GC CTGGCGAGGCCCTGAGTGGATTGAAGGATGATCCTA AT AGTGG GT TACTA AGTACA ATGAGAAGTTCGAGAGTAAGGCCACACTGACTGTGACAAACCTCCAGTACAGCCTACA TGCACCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTCGGGTCTATTATTGTGCAAGAGGGGAGG ATT TATTGATT CGGACGGATGCTCTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTC CTCA (SEQ ID NO: 66)
	QVQLQQPGAE LVKPGASV KLSCK ASGYSFSTFIH WIQ QRPGRGLE WIGRIDPNSGAT KYNEK FESKA TLTV DKPS STAYM HLSS LT PEDA VYY CARGED LLIR TDAL DYWG QGTS TVSS (SEQ ID NO: 67)
217H12A7	CAGGTCCAAC TG CAG CAG CTC TGG GCT GAG CTT GT GAAG CCT TGG GCT TCA GT GAAG CTG TCC TGC AAG GCT TCG CT ACAC CCT CA GT AC CT TT TA AC ACT GG GT GC AG CAG AG GC CTGGACGAGGCCCTGAGTGGATTGAAGGATGATCCTA AT AGTGG GT TACTA AGTACA ATGAGAAGTTCGAGAGGAAGGCCACACTGACTGTAGACAAACCTCCAGCACAGCCTACA

	TGCAGCTAGCAGCCTGACATCTGAGGA C TCGGGTCTATTATTGTGCAAGAGGGGAGG ATT TATTACTACGGACGGATGCTATGGACTACTGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTC CTCA (SEQ ID NO: 68)
	QVQLQQPGAEVVKPGASVKSCKASGYTFSTFLIHVVQQRGRGLEWIGRIDPNSGGTKYNEK FERKVTLTVDKPSSTAYMQLSSLSEDAVYYCARGEDLLRTDAMDYWQGQTSVTVSS (SEQ ID NO: 69)
210D9B8	CAGGTCCA ACTGCAGCAGCCTGGGACTGAATTGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTG TCCTGCGAGGCTCTGGCTACACCTTCATCACCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGC CTGGACAGGCCCTTGAGTGGATTGGAGGGATGATCCTAATAGTGGTGTATTAAAGTACA ATGAGAAGTTCAAGAGTAAGGCCACACTGACTGTAGACAAACCCCTCAGCACAGCCTACA TGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGA C TCGGGTCTACTATTGTGCAAGAGGGGAGG ATT TATTAAACGGACGGATGCTATGGACTACTGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTC CTCA (SEQ ID NO: 70)
	QVQLQQPGTEFVKPGASVKSCEASGYTFITYWMHWVKQRGRGLEWIGRIDPNSGVIKYNE KFKSKATLTVDKPSSTAYMQLSSLSEDAVYYCARGEDLLRTDAMDYWQGQTSVTVSS (SEQ ID NO: 71)
214G4B7	CAGGTCCA ACTGCAGCAGCCTGGGCTGAGTTGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTG TCCTGCAAGGCTCTGGCTACTCCTTCAGTACCTCTGTATACTACACTGGGTGAGCAGAGGC CTGGCGAGGCCCTTGAGTGGATTGGAGGGATGATCCTAATAGTGGTGTACTAAATACA ATGAGAAGTTCAAGAGTAAGGCCACACTGACTATAGACAAACCCCTCAGTACAGCCTACG TGCACCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGA C TCGGGTCTATTATTGTGCAAGAGGGGAGG ATT TATTGATA CGGACGGATGCTATGGACTACTGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTC CTCA (SEQ ID NO: 72)
	QVQLQQPGAEVVKPGASVKSCKASGYSFSTFCIHVVQQRGRGLEWIGRIDPNSGGTKYNEK FESKATLTIDKPSSTAYVHLSSLSEDAVYYCARGEDLLRTDAMDYWQGQTSVTVSS (SEQ ID NO: 73)
13J018-1A4	CAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGGTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATA TCCTGCAAGGCTCTGACCATATTTCAGTATCCACTGGATGCACTGGTAAGACAGAGGC CTGGACGGCCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTCTGTGAAGTGGTACTACTGATTATAA TGAGAAATTCAAGGCCAACAGTGACGGTAGATAGAGGCTCAGGTACGCTACAT GCAGTTCAACAGCCTGACATCTGAGGA C TCGGGTCTATTCTGTGCAAGCGGAGCCTT GACTACTGGGCCAACGACCACCTCACAGTCTCTCA (SEQ ID NO: 74)
	QVQLQQSGPEVVRPGASVKISCKAPDHIFSIIHWQM沃VQRPGPLEWIGEIFPGSGTTDYNEK FKGKATVTVDRGSRSAYMQFNSLTSEDAVYFCASGAFDYWGQGTTLVSS (SEQ ID NO: 75)
1002E8A6	GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATG TCCTGCAAGGCTCTGGATACACAATCACTAGTTATGCACTGGGTGAAGCAGAAC CTGGCGAGGCCCTTGAGTGGATTGGATATATTAACTCTAACATGATGGCACTAAAGTACA ATGAGAAGTTCAAGGCCAACACTGACTTCAGACAAATCTCCACACAGCCTACA TGGAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGA C TCGGGTCTATTATTGTGCAAGAGGGGACTA TAGTAACACTTACTGGTACTTCGATGTCGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCC TCA (SEQ ID NO: 182)
	EVQLQQSGPELVKPGASVKSCKASGYTITSYVMHWVKQPGQGLEWIGYINPNNDGKYN EKFKGKATLTSOKSSNTAYMELSSLSEDAVYYCARGDYSNYFYWYFDVVGAGTTTVSS (SEQ ID NO: 183)
1070A6B7	CAGGTCCCCTGCAGCAGCCTGGGCTGAGATGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGGTT TCCTGTAAGGCTCTGGCTACACCTCCCCGGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGC CTAGACAAGGCCCTTGAGTGGATTGCTAAGATTGATCCCTGTAGTGAAGAAACTCACTACAA TCAAAACCTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACAAATATTCCAACACAGTCTACAT GCAGCTCAACAGCCTGACATCTGAGACTCTGGTCTATTACTGTGCAAACAGGAGGGTTG GGACAGCCTTACGAAAGTCTGGTTGGTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCT

	GCA (SEQ ID NO: 184)
	QVPLQQPGAEVRPGASMRSLCKASGYTFPGYWMHWVKQRPRQGLEWIAKIDPSDSETHYN QNFKDKATLTVKDYSNTVYMQLNLSLTSEDAVYYCANEGWDSLTKVWFHWWGQGTLVTVA A (SEQ ID NO: 185)
1094C4E6	GAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGCTGAGCTTGAGGCCAGGGCCTCAGTCAGTTG TCC TGCAAGCTCTGGCTTAACATTAAGACACTATATGCAGTGGTGAAGCAGACGC CTGAACAGGGCCTGGAGTGGAGGTGATGCGTATGGTAATGGTAAGTATG TCCCAGGTTCAAGGACAAGGCCACTATACTCAGCACACATCCTCAAACACAGCTACC TGCAGCTCAGCAGCTGACATCTGAGGACACTGCCGTATTACTGTCTGGACTACTGGGCTCAAGGAACCTCAGTCACCGTC TCCTCA (SEQ ID NO: 186)
	EVQLQQSGAELVRPGASVKSCTASGFNIKDDYMHWVKQTPEQGLEWIGRIDPAYGNKYVP KFQDKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCARRYYAVSSVDYALDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 187)
27I21-3C7	CAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAGGCCCTGGGACTTCAGTGAAGATA TCC TGCAAGGCTCTGGCTATATCTCACCAAGCCACTGGATGCGTGGTAAGACAGAGG CCTGGACAGGGCCTTGAGTGGAGTGGAGACATTTCCTGGAAGCGGTACTACTGATTATA ATGAGAAAGTCAAGGACAAGGCCACAGTGACGGTAGACAGATCCTCAGTTCAAGCTTACA TGCAGTTCAACAGCCTGACATCTGAGGACTCTCGGGTCTATTCTGTCAAGCGGAGCCTT TGACTACTGGGCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 188)
	QVQLQQSGPELVRPGTSVKISCKAPGYIFTSHWMQWVQRPGQGLEWIGDIFPGSGTTDYNEK FKDKATVTVDRSSSSAYMQFNSLTSEDSAVYFCASGAFDYWGQGTTLVSS (SEQ ID NO: 189)
317H2A6	CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGATATTGCAGCCCTCCCAGACCCTCAGTCTGA CTTGTCCCTCTCTGGTTTCACTGAGGACTTTGGCATGGGTGAGGCTGGATTCTGTCA CCTTCAGGGAAGGGCTGGAGTGGCTGGCACACATTGGGAATGGTATAAATACTAT GACCCAGCCCTGAAGAGTCGGCTACAATTCCAAGGATACTCCGAAAACCGGGTATT CTCAATATGCCAATGTGGACACTACAGATACTGCCCTACTACTGTGTTCAATTGGT CTTCTATTACTACGGTAGCAGAGGGATTGCTACTGGGCAAGGGACTCTGGTACTGT CTCTGCA (SEQ ID NO: 190)
	QVTLKESGPGILQPSQTLSLCSFGSLSRTFGMGVGWIRQPSGKGLEWLAHIWWNGDKYYDP ALKSRLTISKDTSENRVFLIANVDTTDATPYCVRIGPSITVAEGFAYWGQGTLVTVA (SEQ ID NO: 191)
319B8A12	AAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGATATTGCAGCCCTCCCAGACCCTCAGTCTGA CTTGTCCCTCTCTGGATTTCACTGAGGACTTTGGATGGGTGAGGCTGGATTCTGTCA CCTTCAGGGAAGGGCTGGAGTGGCTGGCACACATTGGGAATGGTATAAATACTAT AATCCAGACCTGAAGAGTCGGCTCACAGTTCCAAGGATCCTCCAAAACCGGGTATT TCACGATGCCAATGTGGACACTTCAGATACTGCCCTACTACTGTACTCGAGTTGGCC TTCTATTCTACGGTGAGAGGGATTCTACTGGGCAAGGGACTCTGGTACTGT CTCTGCA (SEQ ID NO: 192)
	KVTLKESGPGILQPSQTLSLCSFGSLSRTFGMGVGWIRQPSGKGLEWLAHIWWNDEKYYNP DLKSRLTVSKDSSKNQVFLIANVDTDTAPYYCTRVGPSITVAEGFPYWGQGTLVTVA (SEQ ID NO: 193)
320F9C5	CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGATATTGCAGCCCTCCCAGACCCTCAGTCTGA CTTGTCCCTCTCTGGTTTCACTGAGGACCTTGGATGGGTGAGGCTGGATTCTGTCAA CCTTCAGGGAAGGGCTGGAGTGGCTGGCACACATTGGGAATGGTATAAATCTCTC ACCCAGCCCTGAAGAGTCGTCTACAATCTCCAAAACCGGGTATT CTCTGCA (SEQ ID NO: 194)

	CAAGATGCCAATGGGACACTGCAGAAAAGTCCCACATATTGTGTCGAATAGGTCTCTCAATTACTACGGTTGCAGAGGGTTGCTTACTGGGCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 194)
	QVTLKESGPGILQSSQLSLTCSFSGFSLRTFGMGVGWIRQPSGKGLEWLAHIWWNDKSHPALKSRLTISKDTSKNQVFLKIANVDTAETATYYCVRIGPSITTVAEGFAYWGQGTLTVSA (SEQ ID NO: 195)
323E9D1	CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGATATTGCAGCCCTCCAGACCCTCAGTCTGACTTGTCCCTCTGGATTTCATGAGGACTTTGGATGGGTGAGGCTGGATTCTGAGCCTCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGCTGGCACACATTGGGAATGAGAAATACTATAAATCCAGACCTGAAGAGTCGGCTCACAGTTCCAAGGATTCCCTCAAAAACCAGGTATTCTCACGATGCCAATGTGGACACTTCAGATACTGCCCATACTACTGTACTCGAGTTGGCTTTCTATTCTACGATTGCAGAGGGATTCCTACTGGGCAAGGGACTCTGGTCACTGTCCTGCA (SEQ ID NO: 196)
	QVTLKESGPGILQPSQLSLTCSFSGFSMRTFGMGVGWIRQPSGKGLEWLAHIWWNDEKYYNPDLKSRLLTVSKDSSKNQVFLTIANVDTSDTAPYYCTRVPISIATIAGFPYWGQGTLTVSA (SEQ ID NO: 197)
332C1B12	CAGGTCCAAC TG CAG CAG C CT GGG GCT GAATGGTGAAGCCTGGGCTTCA GT GAAGCTGTCCTGCAAGGCTCTGGCTACATTCA CCA AC GACA ATT ACT GGATGA CT GGATGAAACAGAGGCTGGACGAGGCCTCGAGTGGATTGAAAGGATTCTGCTCTGATAGTGAACACTACTACAATCA AAA ATT CACGAACAAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATCCA ACTCAGCAGCCTGACATCTGGACTCTGGCTATTATTGTGCAAGATCTGGGAAGATTATTACTACGATCGATGGAGGACTACTTGACTACTGGGCAAGGCACCCTCTCACAGTCTCTCA (SEQ ID NO: 198)
	QVQLQQPGAEVLVKPGASVKSCKASGYFTNDYWWMNWMKQRPGRGLWIGRIRPSDSETHYNQKFTNKATLTVDKSSSTAYIQLSSLTSVDSA VYYCARSWE DLLRSMEDYFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 199)
344B9D9	GAGTTCCAAC TG CAG CAG TCTGGACCTGAGCTGGGGAGCCTGGCGCTTCA GT GAAGCTCCTGCAAGGCTCTGGTTCTCATTCA GT GA CT ACA AC AT TGGGTGAAGCAGAGCAATGGAAAGAGTCTTGAGTGGATTGGAAAAGTCTCATCTTAAGGATGGTACTGCTACCTACAATCAGAACCTCAGGACAAGGCCACATTGACTCTAGACCACTCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTCTCCGCTACTATGATCCCTGACAAAATTGTTGCTTATTGGGCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 200)
	EFLQQSGPELGEPGASVKSCKASGFSFS DYN IN WVKQSNGKSLEWIGKVHPKDGTATYNQKFQDKATLTDQSSSTAYMQLSSLTSEDASVYYCLPLYDLSLT KILFAYWGQGTLTVSA (SEQ ID NO: 201)
348A6C1	CAGGTTACTCTGAGAGAGTCTGGCCTGGATATTGCAGCCCTCCAGACCCTCAGTCTGACTTGTCCCTCTGGGTTTCACTGAGGACCTTGGATGGGTGAGGCTGGATTCTGAGCCTCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGCTGGCACACATCTGGGAATGATGAGAAATATTATAACCCAGCCCTGAAGAGTCGGCTCACAGTTCCAAGGATCCCTCGAAAACCAGGTATTCTCAAGATGCCAATGTGGACACTACAGATACTGCCCATACTACTGTGCTCGACTTGGCTTCTATTACTACGGTGCAGAGGGATTCCTACTGGGCAAGGGACTCTGGTCACTGTCCTGCA (SEQ ID NO: 202)
	QVTLRESGPGILQPSQLSLTCSFSGFSLRTFGMGVGWIRQPSGKGLEWLAHIWWNDEKYYNPALKSRLTISKDTSKNQVFLKIANVDTDAPYYCARLGPSSITTVAEGFAYWGQGTLTVSA (SEQ ID NO: 203)

352G11A10	CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAGCCCCGGGGTTCACTGAGGATA TCC TGCAAGGCTCTGGTTACAGCCTCAT AAGCTACTATATACACTGGGTGAAACAGAGGC CGGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGACTTTCTGGAAGTGGTAATTCTAAGTTCAT TGAGAAGTCAGGGCAAGGCCACACTGACGGCAGACACATCCTAACACTGCCTACAT ACAGCTCAGCAGTCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGGGGGACTTC GGTAACTACCTTGCTACTGGTACTTCGATGTC TGGGACAGGGACCACGGTCACCGTCT CCTCA (SEQ ID NO: 204)
	QVQLQQSGPELVKPGGSVRISCKASGYSLISYYIHVKQRPGQGLEWIGLTFPGSGNSKFIEKF KGKATLTADTSNTAYIQLSSLTSEDSAVYYCTRGDFGNLAYWYFDVWGTGTTVSS (SEQ ID NO: 205)
363D4A10	CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGATATTGCA GTCTCCAGACCCCTCAGTCTGA CTT GTTCTTCTCTGGTTTCACTGAAGACCTTGGTATGGTGTGGCTGGATT CGTCAG CCTCAGGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTGGTGGAAATGATGATAAATTCTATC ACCCAGCCCTGAAGAGTGGCTCACAACTCCAAGGATA CCTCCAAAACCAGGTATTCC TCAAGATGCCAATGTGGACACTGCAGAAACTGCCACATACTACTGTGTCGAATTGGTCC TTCAATTACTACGGTAGCAGAGGGTTTGCTACTGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTC TCTGCA (SEQ ID NO: 206)
	QVTLKESGPGILQSSQTLSTCSFGSLSKTFGMGVGVWIOPSGKGLEWLAIWWNDKFYHP ÅLKSR LTISKDTSKNQVFLKIANVDTAETATYYCVRIGPSITVAEGFAYWGQGLTVSA (SEQ ID NO: 207)
381A6A9	CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAGCCCCGGGGTTCACTGAAAGATA TCC TGCAAGGCTGCTGGTACAGCCTACAAGCTACTATATACACTGGGTGAAAGCAGAGG CGGGACAGGGACTTGAGTGGATTGATTTCTGGAAGTGGTAATTCTAAGTACA TTGAGAAGTCAGGGCAAGGCCACACTGACGGCGGACACATCCTAACACTGCCTACA TGCAGCTCAGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTATGTACAAGGGGGACTT CGGTAACTACCTGCTACTGGTACTTCGATGTC TGGGACAGGGACCACGGTCACCGTC TCCTCA (SEQ ID NO: 208)
	QVQLQQSGPELVKPGGSVKISCKAAGYSLTSYYIHVKQRPGQGLEWIGLIFPGSGNSKYIEKF KGKATLTADTSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRGDFGNLAYWYFDVWGTGTTVSS (SEQ ID NO: 209)
384D5A2	CAGGTCACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGATATTGCA GCCCCTCCAGACCCCTCAGTCTGA CTT GTTCTTCTCTGGTTTCACTGAACACTATGGTATGGTGTGGTTGGATT CGTCAG CCTCAGGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTGGTGGAAATGATGATAAGTACTAT AACTCAGCCCTGAAGAGCCGGCTCGCAATCTCAAAGATGCCAACAGCCAGGTATT CTCAAGATCTCAGTGGACACTACAGATACTGCCACATACTACTGTGCTCAAGTAGCCG CTACTATAGTAACACTGACGGGCTGGTTGCTACTGGGCCAAGGGACTCTGGTCAC TGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 210)
	QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFGSLNTYGMGVGVWIOPSGKGLEWLANIWWNDKYYN SALKSRLAISKDASNSQVFLKISSVTTDTATYYCAQVAIVTTYGAWFAYWGQGLTVSA (SEQ ID NO: 211)
394F5A5	GTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGATATTGCA GCCCCTCCAGACCCCTCAGTCTGACTT GTT CTTCTCTGGTTTCACTGAGGACTTTGGTATGGTGTGGATT CGTCAGCCT TCAGGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTGGTGGAAATGATGAGAAATATTATAAT CCAACCCCTGAAGAGTGGCTCACAACTTCAAAGGATA CCTCCAAAACCAGGTATTCTCA GGATGCCAATGTGGACACTGCAGTTACTGCCGCAACTACTGTGCTGAATAGGTCTTC TATTACTACGGTAGTAGAGGGATTCCCTACTGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCT GCA (SEQ ID NO: 212)
	VTLKESGPGILQPSQTLSTCSFGSLSRTFGMGVGWIOPSGKGLEWLAIWWNDEKYYNPT LKSRLTISKDTSKNQVFLRIANVDTAVTAAYCARI GPSITVVEGFPYWGQGLTVSA (SEQ

	ID NO: 213)
409F12A11	ATCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAGCCTGGGCTTCAATGAAGATATCG TGCAAGGGCTTCTGGCTACACCTTCACTGACAAGTATAACTGGGTGAAGCAGAGGCCT GGACAGGGACTTGAGTGGATGGATTATCCTGGAAAGCGTAATACTAAGTACAAT GAGAACGTTCAAGGGCATGCCACATTGACTGTAGACACATCCTCCAATACAGCCTATATA CATCTCAGCAGCCTGACCTGAGGACTCTCGGGCTATTCTGTGCAAGGAGAATTATT ATTACTACGATGGTCATACCCCTATGCTTGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCAC CGTCCTCA (SEQ ID NO: 214)
	IQLQQSGPELVKPGASMKSCKASGYTFTDKYINWVKQRPGQGLEWIGWIYPGSNTKYNEKF KGMAATLTVDTSSNTAYIHLSSLTSEDSAVYFCARGIIYYDGSYPLYALDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 215)
418F6D9	CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAACCTGGTAAGCCTGGAGCTTCAGTGAAGTTG TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTGACTATAGTATACTGGGTGAAGCAGAGTC CTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTATCCTGGAAAGTGGTAATACTAAGTACA ATGACAAGTTCAAGGGCAAGGCCACAATGACTGCAGACAAATCCTCCAGAACAGCTACA TGCAAGCTCAGCAGCCTGACGTGAGGAGTCTCGGGCTATTCTGTGCAAGGAGACTACCG GCATACTATGCTATAGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 216)
	QVQLQQSGPELVKPGASVLSCKASGYTFTDYSIHWVKQSPGQGLEWIGWIYPGSNTKYND KFKGKATMTADKSSRTVYMQLSSLTSEESAVYFCARDYRRYYAIDYWQGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 217)
431G5A3	CAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAGCCTGGAGCTTCAGTGAAGCTGCTCTGC AAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTGACTATAGTATACTGGGTAAACAGAGTCCTGGAC AGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTATCCTGGAAAGTATAACTAAGTACAATGACA AGTTCAAGGGCAAGGCCACAATGACTGCAGACAAATCCTCCAGAACAGCTACATGCACC TCAGCAGCCTGACGTGAGGAACTCTCGGGCTATTCTGTGCAAGGAGACTACCGGGGTA CTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 218)
	QLQQSGPELVKPGASVLSCKASGYTFTDYSIHWVKQSPGQGLEWIGWIYPGSNTKYNDKF KGKASMTADKSSRTVYMHLSLTSEESAVYFCARDYRRYYAIDYWQGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 219)
435A6B3	GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAGCCTGGGCTTCAATGAAGATG TCCGTCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTGACTATGTTATGCACTGGATGAAGCAGAACG CTGGGCAAGGGCTTGAGTGGATTGGATATCTTAATCTAACATGATGGTACTAAGTACAA TGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACAATGACTTCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACAT GGAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTCGGGCTATTACTGTGCAAGGGGGACTA TAGTAATTACTTCACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCTCCGTCTCC TCA (SEQ ID NO: 220)
	EVQLQQSGPELVKPGASMKMSCKASGYTFTSYVMHWMKQPKPGQGLEWIGYLNPNNNDGTY NEFKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGDYSNYFYWYFDVWGAGTTVS (SEQ ID NO: 221)
436H2C12	CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAGCCTGGAGCTTCAGTGAAGCTG TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTGACTATAGTATACTGGGTGAAGCAGAGTC CTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTACCTGGAAAGGGGTAACTAAGTACA ATGACAAGTTCAAGGGCAAGGCCACAATGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACA TGCAAGCTCAGCAGCCTGACGTGAGGAACTCTCGGGCTATTCTGTGCAAGGAGACTACCG GCGGTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 222)

	QVQLQQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTFSDYTIHWVKQSPGQGLEWIGWIYPGRGNTKYND KFKGKATMTADKSSTAYMQLSSLTEESAVYFCARDYRYYYAMDYWGGTSVTVSS (SEQ ID NO: 223)
436H6A9	CAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGC AAGGCTCTGGCTACACCTTCACTGACAACTTATAAACTGGGTGAAACAGAGGCCCTGGA CAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTCTCTGGAAAGCGGTAAATCTAAGAACATGAG AAGTTCAAGGGCAAGGCCACAGTGACTGTAGACACATCTCCAGCACAGCCTACATGCAG CTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTCTGTGACGGAGGAATTATTATT ATTATGATGGTACCTACCCCTATGCTCTGGACTACTGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGT CTCCCTCA (SEQ ID NO: 224)
	QLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYFTDNFINWVKQRPQGLEWIGWISPGSGNTKNNEKF GKATVTVDTSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGIYYYDGTPYALDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 225)
440E9D12	CAGGTGCGGCTGAGGGAGTCAGGACCTGGCTGGTGGCCCCCTCCAGAACCTGTTCATC ACATGCACCGTCTCAGGTTCTCATTAAC TGACTATGAAATAAACTGGGTTGCCAGCCTC CAGGAAAGAATCTGGAGTGGCTGGAGTGATTTGGACTGGTGGAGGGACAAAATATAATT CAGTTCTCATATCCAGACTGAACATCAGCAAAGACAATTCCAAGAGACAAAGGTTCTTAA AATGACCATGCTCCAGACTGATGACACAGCCATATAATTACTGTGTAAGAGAGGGGAGGAG ATACTATGCTATGGACTACTGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCCTCA (SEQ ID NO: 226)
	QVRLRESPGPLVAPSQNLFITCTVSGFSLTDYEINWVRQPPGKLNELWGLVIWTGGTKYNSVL ISRLNISKDNNSKRQVFHKMDSLQDDTAIYYCVREGRRYYAMDYWGGTSVTVSS (SEQ ID NO: 227)
441E6F2	CGGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCTGGTGGCCCCCTCACAGAGCCTGTTCATC ACATGCACCGTCTCAGGTTCTCATTAACCACCTATGAAATAAACTGGGTTGCCAGTCTC CAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGAGTGATATGGACTGGTGGACCACAAAATATAATT CAGCTTCATATCCAGACTGAGCATCACCAAAGACAACTCCAAGAGCCTCGTTCTTAA AATGAGCAGTCTGCAAAC TGATGACACAGCCATATAATTACTGTGTAAGAGAGGGGAGGAG GTACTATGCTATGGACTACTGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCCTCA (SEQ ID NO: 228)
	RVQLKESGPGLVAPSQSLFITCTVSGFSLTTYEINWVRQSPGKGLEWLGVWTGGTKYNSAFI SRLSITKDNNSKSLVFLKMSSLQDDTAIYYCVREGRRYYAMDYWGGTSVTVSS (SEQ ID NO: 229)
443C11A12	GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATG TCCTGCACGGCTTCTGGATACACATTCACTAGCTATGTTACACTGGATGAAGCAGAACG CTGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATCTCATGTAACAATGATGGTACTAAGTACAA TGAGAAGTCAGGCAACTGACTCAGACGAATCTCCAACACAGCCTACAT GGAACTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGGGGGACTA TAGTAATTACTCTACTGGTACTTCGATGTCTGGGCGCAGGGACTACGGTCTCCGTCTCC TCA (SEQ ID NO: 230)
	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCTASGYFTSYVIHWMKQKPGQGLEWIGYLHRNNNDGTKYN EFKVKATLTSDESSNTAYMELSSLTSEDAVYYCARGDYSNYFYWYFDVWGAGTVS (SEQ ID NO: 231)
444G1A10	CGGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCTGGTGGCCCCCTCACAGAGCCTGTTCATC ACATGCACCGTCTCAGGTTCTCATTAACCACCTATGAAATAAACTGGGTTGCCAGTCTC CAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGAGTGATATGGACTGGTGGACCACAAAATATAATT CAGCTTCATATCCAGACTGAGCATCACCAAAGACAACTCCAAGAGCCTCGTTCTTAA AATGAGCAGTCTGCAAAC TGATGACACAGCCATATAATTACTGTGTAAGAGAGGGGAGGAG GTACTATGCTATGGACTACTGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCCTCA (SEQ ID NO: 232)

	RVQLKESGPGLVAPSQSLFITCTVSGFSLTTYEINWVRQSPGKGLEWLGVIWWTGTTKYNSAFI SRLSITKDNSKSLVFLKMSSLQTDATIYYCVREGRRYYAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 233)
450A2A7	CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAACGCCCTGGAGCTTCAGTGAAGCTG TCCTGCAAGGCTTCTGGTACACCTTCACTGACTATAGTATACACTGGGTGAAACAGAGTC CTGGACAGGGACTTGAGTGGATTATCCTGGAAGTGATAATACTAAGTACA ATGACAAGTTCAAGGGCAAGGCCTCAATGACTGCAGACAAATCCTCAGAACAGTCTACA TGCACCTCAGCAGCTGACGCTGAGGAATCTCGGGTCTATTCTGTCAAGAGAGACTACCG GCGGTACTATGCTATGGACTACTGGGTCAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 236)
	QVQLQQSGPVELKPGASVKSCKASGYTFTDYSIHVKQSPGQGLEWIGWIYPGSDNTKYND KFKGKASMTADKSSRTVYMHLSLTSEESAVYFCARDYRYYAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 235)
456H11B7a	CAGGTGCGGCTGAGGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCCCTCCCAGAACCTGTTCATC ACATGCAACGGTCTCAGGTTCTCATTAAC TGACTGAAATAACTGGGTTGCCAGCCTC CAGGAAAAGAATCTGGAGTGGCTGGAGTGATTGGACTGGTGGAGGCACAAAATAATT CAGTTCTCATATCCAGACTGAACATCAGCAAAGACAATTCCAAGAGAGACAAGTTCTTAA AATGACCAGTCTCCAGACTGATGACACAGCCATATATTACTGTGTAAGAGAGGGGAGGAG ATACTATGCTATGGACTACTGGGTCAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 237)
	QVRLRESPGPLVAPSQNLFITCTVSGFSLTDYEINWVRQPPGKNEWLGVIWWTGGTKYNSVL ISRLNISKDN SKRQVFFKMTSLQTDATIYYCVREGRRYYAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 238)
456H11B7b	CAGGTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGATATTG CAGCCCTCCCAGACCCTCAGTGA CTTGTCTTTCTCTGGGTTTCACTGAGCACTTGGTATGGGTGAGGCTGGATTCTGTCAG CCTTCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTGGGGATGATGATAAGTACTAT AACCCAGCCCTGAAGAGTCGGCTACAATCTCCAAGGATACCTCCAAAAAACAGTATT CTCAAGATCGCCAATGGACACTGCAGATACTGCCACATACTACTGTGCTCGAATAGAG GGCCCTACTACTGGTACTTCGATGTCTGGGCACAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 239)
	QVTLKESGPILQPSQTLSTCSFGSLSTFGMGVWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDDKYYNP ALKSLRTISKDTSKNQVFLKIANVDTADTATYYCARIEGPYYWYFDVWGTGTTVTVSS (SEQ ID NO: 240)
537G7A6	CAGGTGAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCACCCCTCACAGAGCCTGTCATC ACATGCAACGGTCTCTGGTTCTCATTAAC TGAGTATAGTGACACTGGATTCTGTCAGTCTCC AGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGGGGGTGGAAACACAGACTACAATT CAGGTCTCAAATCCAGACTGAGCATCAGCAAGGACAACCTCAAGAGCCAAGTTCTTAA AAATGAACAGTCTGGAAAATGATGACACAGCCATGTATTACTGTGCCAGCCCTCCCTCTA TTATTATGATGTTGCCCTGGTTCTTACTGGGCCAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 241)
	QVQLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLRSYSHVIRQSPGKGLEWLGMIWGGGNTDYNGL KSRLSISKDN SKSQVFLKMNSLENDTAMYCAPSLYYDVAWFPYWGQGLTVSA (SEQ ID NO: 242)
551H4D6	GAGGTTAGCTGCAGCAGTCTGGGCTGAGCTTGAGGCCAGGGCCCTCAGTCAGTTG TCCTGCACAGCTCTGGCTTAATATTAACAGACTATTGCACTGGGTGAAGCAGAGGC CTGAACAGGGCCTGGAAATGGATTGGATGGATTCCCGCAATGATAAGACTAAGTATG CCCCGAAGTCCAGGACAAGGCCACTATAACTGCAGACCCATCCTCAACACAGCCTACC

	TGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTACTAGAGTTGGGT TCAGGATGGTACTACGTTAGGGACTTGACTACTGGGCCAGGGACCACTCTCACAGTC TCCTCA (SEQ ID NO: 243)
	EVQLQQSAGELVRPGASVELSCTASGFNIKNDYLHWVKQRPEQGLEWIGWIDSANDKTYAP KFQDKATITADPSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCTRVGVQDGYYVRFDYWGQGTTLVSS (SEQ ID NO: 244)
560H2A7	GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGTTCTGTAGCTCTC TCCTGTGCAGGTCTGGATTACCTTCAGTATTACTACATGAGCTGGTCCGCCAGCCTC CAGGGAAGGCACCTGAGTGGTTGGCTTGATTAGAAACAAAGCTCCTGGTACACACAG AATACAGTGCATCTGTGAAGGGTCGTTACCATCTCCAGAGATAATCCCAAAGCATCCT CTATCTCAAATGAATGCCCTGAGACCTGAGGACAGTGCACCTATTACTGTGCAAGAGTC TTACGACGGGCAGACTGCTTAGACTACTGGGCCAAGGCACCGCTCACAGTCCCTCA (SEQ ID NO: 245)
	EVKLVESGGGLVQPGGSLSLSCAGSGFTFSDDYYMSWVRQPPGKALEWLALIRNKAPGYTTEY SASVKGRFTISRDNSQSLYLMQNALRPEDSATYYCARVLRRADCLDYWGQGTALT VSS (SEQ ID NO: 246)
606H7F8	GTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGCCCTGAAACTCTCC TGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTTAGCATGCTTGGGTTGCCAGACTCCAG AGAAGAGGCTGGAGTGGTCGCGAGCCATTAAAGTTATGGTGTAAACACCTACTATCCAG ACACTGTGAAGGACCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCCTGTACCTGC AAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACAGCCTGTATTACTGTGCAAGACTTTAATTGG GCCTTATTACTATGCTATGGACTACTGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCCCTCA (SEQ ID NO: 247)
	VQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVAAINS YGVNTYYYPDT VKDRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRSEDTALYYCARLLIGPYYAMDYWGQGTS TVSS (SEQ ID NO: 248)

Таблица 3

Последовательности CDR Vκ

Обозначение	Последовательность
VLCDR1 9A10	KASQNAGAAVA (SEQ ID NO: 1)
VLCDR2 9A10	SASNRYT (SEQ ID NO: 2)
VLCDR3 9A10	QQYRSYPRT (SEQ ID NO: 3)
VLCDR1 5A7	KASQNAGAAVA (SEQ ID NO: 1)
VLCDR2 5A7	SASNRYT (SEQ ID NO: 2)
VLCDR3 5A7	QQYRSFPRT (SEQ ID NO: 4)
VLCDR1 5A11	KASQNAGAAVA (SEQ ID NO: 1)
VLCDR2 5A11	SASNRYT (SEQ ID NO: 2)
VLCDR3 5A11	QQYRSFPRT (SEQ ID NO: 4)
VLCDR1 3B11	KASQNAGIDVA (SEQ ID NO: 5)
VLCDR2 3B11	STSNRYT (SEQ ID NO: 6)
VLCDR3 3B11	LQYRSYPRT (SEQ ID NO: 7)
VLCDR1 5B9	KASQNAGIDVA (SEQ ID NO: 5)
VLCDR2 5B9	SKSNRYT (SEQ ID NO: 8)
VLCDR3 5B9	LQYRSYPRT (SEQ ID NO: 9)

VLCDR1 12A7	KASQNAGTAVA (SEQ ID NO: 10)
VLCDR2 12A7	SAFNRYT (SEQ ID NO: 11)
VLCDR3 12A7	QQYRSYPRT (SEQ ID NO: 12)
VLCDR1 9B8	KASQSVGIAVA (SEQ ID NO: 13)
VLCDR2 9B8	STSNRYT (SEQ ID NO: 6)
VLCDR3 9B8	QQYSRYPRT (SEQ ID NO: 14)
VLCDR1 4B7	KASQNAGTAVA (SEQ ID NO: 10)
VLCDR2 4B7	STSNRYT (SEQ ID NO: 6)
VLCDR3 4B7	LQYRSYPRT (SEQ ID NO: 7)
VLCDR1 1A4	RASQDIGNRLN (SEQ ID NO: 15)
VLCDR2 1A4	ATSSLDS (SEQ ID NO: 16)
VLCDR3 1A4	LQYASSPFT (SEQ ID NO: 17)
VLCDR1 c04	RASQDIGNRLS (SEQ ID NO: 76)
VLCDR2 c04	ATSSLDS (SEQ ID NO: 16)
VLCDR3 c04	LQYASSPFT (SEQ ID NO: 17)
VLCDR1 c68	RASQDIGNRLH (SEQ ID NO: 77)
VLCDR2 c68	ATSSLDS (SEQ ID NO: 16)
VLCDR3 c68	LQYASSPFT (SEQ ID NO: 17)
VLCDR1 c44	RASQDIGNRLP (SEQ ID NO: 78)
VLCDR2 c44	ATSSLDS (SEQ ID NO: 16)
VLCDR3 c44	LQYASSPFT (SEQ ID NO: 17)
VLCDR1 c03	RASQDIGNRLR (SEQ ID NO: 79)
VLCDR2 c03	ATSSLDS (SEQ ID NO: 16)
VLCDR3 c03	LQYASSPFT (SEQ ID NO: 17)
VLCDR1 c10	RASQDIGNRLM (SEQ ID NO: 80)
VLCDR2 c10	ATSSLDS (SEQ ID NO: 16)
VLCDR3 c10	LQYASSPFT (SEQ ID NO: 17)
VLCDR1 c10.1	RASESVDSYGNIFMH (SEQ ID NO: 249)
VLCDR2 c10.1	LASNLES (SEQ ID NO: 276)
VLCDR3 c10.1	QQNNEAPWT (SEQ ID NO: 293)
VLCDR1 c10.2	RASKSVSTSGYSYM (SEQ ID NO: 250)
VLCDR2 c10.2	LASNLES (SEQ ID NO: 276)
VLCDR3 c10.2	QQNNEAPWT (SEQ ID NO: 293)
VLCDR1 8A6	KASQDINSYLT (SEQ ID NO: 251)
VLCDR2 8A6	RANRLVS (SEQ ID NO: 277)
VLCDR3 8A6	LQYDEFPYT (SEQ ID NO: 294)
VLCDR1 6B7	RCSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID NO: 252)
VLCDR2 6B7	KVSDRFS (SEQ ID NO: 278)
VLCDR3 6B7	SQSTHVPLT (SEQ ID NO: 295)
VLCDR1 4E6	KASQDVATAVA (SEQ ID NO: 253)
VLCDR2 4E6	WASTRHT (SEQ ID NO: 279)
VLCDR3 4E6	QQYSNYPYT (SEQ ID NO: 296)
VLCDR1 3C7	RASQDIGNRLN (SEQ ID NO: 15)
VLCDR2 3C7	ATSSLDS (SEQ ID NO: 16)
VLCDR3 3C7	LQYASYPFT (SEQ ID NO: 297)

VLCDR1 2A6	KASQNVGSAVV (SEQ ID NO: 254)
VLCDR2 2A6	SASNRYS (SEQ ID NO: 280)
VLCDR3 2A6	QQYSNYPLT (SEQ ID NO: 298)
VLCDR1 8A12	KASQNVGAADV (SEQ ID NO: 255)
VLCDR2 8A12	SASNRYI (SEQ ID NO: 281)
VLCDR3 8A12	QQYSNYPLT (SEQ ID NO: 298)
VLCDR1 9C5	KASQNVGSVVA (SEQ ID NO: 256)
VLCDR2 9C5	SASNRYT (SEQ ID NO: 2)
VLCDR3 9C5	QQYSSYPLT (SEQ ID NO: 299)
VLCDR1 1B12	RASKGVSTSSYTFIH (SEQ ID NO: 257)
VLCDR2 1B12	YASNLES (SEQ ID NO: 282)
VLCDR3 1B12	QHSREFPRT (SEQ ID NO: 300)
VLCDR1 9D9	RASGNIHNLYA (SEQ ID NO: 258)
VLCDR2 9D9	SAITLAD (SEQ ID NO: 283)
VLCDR3 9D9	QHFWNTPYT (SEQ ID NO: 301)
VLCDR1 6C1	KASQNVGAAVA (SEQ ID NO: 259)
VLCDR2 6C1	SASNRYI (SEQ ID NO: 281)
VLCDR3 6C1	QQYSNYPLT (SEQ ID NO: 298)
VLCDR1 11A10	KASQDIHSYLS (SEQ ID NO: 260)
VLCDR2 11A10	RTNRLVD (SEQ ID NO: 284)
VLCDR3 11A10	LQYDEFPYT (SEQ ID NO: 294)
VLCDR1 4A10	KASQNVGSAVV (SEQ ID NO: 254)
VLCDR2 4A10	SASNRYT (SEQ ID NO: 2)
VLCDR3 4A10	QQYSSYPLT (SEQ ID NO: 299)
VLCDR1 6A9	KASQDINSYLS (SEQ ID NO: 261)
VLCDR2 6A9	RANRLVD (SEQ ID NO: 285)
VLCDR3 6A9	LQYDEFPYT (SEQ ID NO: 294)
VLCDR1 5A2	RSSENIYSSLA (SEQ ID NO: 262)
VLCDR2 5A2	AATNLAK (SEQ ID NO: 286)
VLCDR3 5A2	QHFWGSPFA (SEQ ID NO: 302)
VLCDR1 5A5	KASQNVGSAVA (SEQ ID NO: 263)
VLCDR2 5A5	STSNRYT (SEQ ID NO: 6)
VLCDR3 5A5	QQYASYPLT (SEQ ID NO: 303)
VLCDR1 12A11	RATKGVSKSGYSYMH (SEQ ID NO: 264)
VLCDR2 12A11	IASNLES (SEQ ID NO: 276)
VLCDR3 12A11	QHSRELPLT (SEQ ID NO: 304)
VLCDR1 6D9	RASESVDSYGNSLMH (SEQ ID NO: 265)
VLCDR2 6D9	IASNLES (SEQ ID NO: 287)
VLCDR3 6D9	QQNSEDPRT (SEQ ID NO: 305)
VLCDR1 5A3	RASESVDRYGNSLMH (SEQ ID NO: 266)
VLCDR2 5A3	IASNLES (SEQ ID NO: 287)
VLCDR3 5A3	QQNNEDPRT (SEQ ID NO: 306)
VLCDR1 6B3	KASQDINRYLS (SEQ ID NO: 267)
VLCDR2 6B3	RANRLVD (SEQ ID NO: 285)
VLCDR3 6B3	LQYDEFPYT (SEQ ID NO: 294)

VLCDR1 2C12	RASESVDNYGNSFMH (SEQ ID NO: 268)
VLCDR2 2C12	LASNLES (SEQ ID NO: 276)
VLCDR3 2C12	QQNNEDPRT (SEQ ID NO: 306)
VLCDR1 H6A9	RATKGVTKSGYSYIH (SEQ ID NO: 269)
VLCDR2 H6A9	LASNQSQ (SEQ ID NO: 288)
VLCDR3 H6A9	QHSRELPLT (SEQ ID NO: 304)
VLCDR1 9D12	RASKSVDSYGTGNSFMH (SEQ ID NO: 270)
VLCDR2 9D12	LASNLES (SEQ ID NO: 276)
VLCDR3 9D12	QQNNEDPRT (SEQ ID NO: 306)
VLCDR1 6F2	RTSESVDSYGNNSMF (SEQ ID NO: 271)
VLCDR2 6F2	LTSNLES (SEQ ID NO: 289)
VLCDR3 6F2	QQSNEDPRT (SEQ ID NO: 307)
VLCDR1 1A10	RASESVDNYGNSFMF (SEQ ID NO: 272)
VLCDR2 1A10	LTSNLES (SEQ ID NO: 289)
VLCDR3 1A10	QQSNEDPRT (SEQ ID NO: 307)
VLCDR1 2A7	RASESVDRYGNNSLMH (SEQ ID NO: 266)
VLCDR2 2A7	IASNLES (SEQ ID NO: 287)
VLCDR3 2A7	QQNNEDPRT (SEQ ID NO: 306)
VLCDR1 11B7_a	RASKSVDSYGTGNSFMH (SEQ ID NO: 270)
VLCDR2 11B7_a	LASNLES (SEQ ID NO: 276)
VLCDR3 11B7_a	QQNNEDPRT (SEQ ID NO: 306)
VLCDR1 11B7_b	RASKSVDSYGTGNSFMH (SEQ ID NO: 270)
VLCDR2 11B7_b	LASNLES (SEQ ID NO: 276)
VLCDR3 11B7_b	QQNNEDPRT (SEQ ID NO: 306)
VLCDR1 7A6	RVSESVDRYADSFMH (SEQ ID NO: 273)
VLCDR2 7A6	LASNLES (SEQ ID NO: 276)
VLCDR3 7A6	QQNKEDPYT (SEQ ID NO: 308)
VLCDR1 4D6	RASESVDSYGNNSFIH (SEQ ID NO: 274)
VLCDR2 4D6	RASNLNS (SEQ ID NO: 290)
VLCDR3 4D6	HQNNEDPRT (SEQ ID NO: 309)
VLCDR1 H2A7	RASESIDNYGLIFMS (SEQ ID NO: 275)
VLCDR2 H2A7	AASNRGS (SEQ ID NO: 291)
VLCDR3 H2A7	QQSK EVPWT (SEQ ID NO: 310)
VLCDR1 7F8	RASGNIHNLYA (SEQ ID NO: 258)
VLCDR2 7F8	NAKTLAD (SEQ ID NO: 292)
VLCDR3 7F8	QHFWSTPYT (SEQ ID NO: 311)

Таблица 4
Последовательности CDR V_H

Обозначение	Последовательность
VHCDR1 9A10	GYTFSIFCIH (SEQ ID NO: 18)
VHCDR2 9A10	RIDPSSGGTKYNEKFES (SEQ ID NO: 19)
VHCDR3 9A10	GEDLLVRTDAMDY (SEQ ID NO: 20)
VHCDR1 5A7	GYTFSIFCVH (SEQ ID NO: 21)
VHCDR2 5A7	RIDPSSGGTKYNEKFES (SEQ ID NO: 19)
VHCDR3 5A7	GEDLLVRTDALDY (SEQ ID NO: 22)
VHCDR1 5A11	GYTFSIFCIH (SEQ ID NO: 23)
VHCDR2 5A11	RIDPSSGGTKYNERFEN (SEQ ID NO: 24)
VHCDR3 5A11	GEDLLVRTDAMDY (SEQ ID NO: 20)
VHCDR1 3B11	GYSFSTFFIH (SEQ ID NO: 25)
VHCDR2 3B11	RIDPNSGGTKYNEKFES (SEQ ID NO: 26)
VHCDR3 3B11	GEDLLIRTDAMDY (SEQ ID NO: 27)
VHCDR1 5B9	GYSFSTFFIH (SEQ ID NO: 28)
VHCDR2 5B9	RIDPNSGATKYNEKFES (SEQ ID NO: 29)
VHCDR3 5B9	GEDLLIRTDALDY (SEQ ID NO: 30)
VHCDR1 12A7	GYTFSTFLIH (SEQ ID NO: 31)
VHCDR2 12A7	RIDPNSGGTKYNEKFER (SEQ ID NO: 32)
VHCDR3 12A7	GEDLLIRTDAMDY (SEQ ID NO: 33)
VHCDR1 9B8	GYTFITYWMH (SEQ ID NO: 34)
VHCDR2 9B8	GIDPNSGVIKYNEKFKS (SEQ ID NO: 35)
VHCDR3 9B8	GEDLLIRTDAMDY (SEQ ID NO: 27)
VHCDR1 4B7	GYSFSTFCIH (SEQ ID NO: 36)
VHCDR2 4B7	RIDPNSGGTKYNEKFES (SEQ ID NO: 26)
VHCDR3 4B7	GEDLLIRTDAMDY (SEQ ID NO: 27)
VHCDR1 1A4	DHIFSIHWMQ (SEQ ID NO: 37)
VHCDR2 1A4	EIFPGSGTTDYNEKFKG (SEQ ID NO: 38)
VHCDR3 1A4	GAFDY (SEQ ID NO: 39)
VHCDR1 5B9AS	ASGYSFSTFFIH (SEQ ID NO: 81)
VHCDR2 5B9AS	RIDPNSGATKYNEKFES (SEQ ID NO: 29)
VHCDR3 5B9AS	GEDLLIRTDALDY (SEQ ID NO: 30)
VHCDR1 c04	DHIFSIHWMQ (SEQ ID NO: 37)
VHCDR2 c04	EIFPGSGTTDYNEKFKG (SEQ ID NO: 38)
VHCDR3 c04	GAFDY (SEQ ID NO: 39)
VHCDR1 c68	DHIFSIHWMQ (SEQ ID NO: 37)
VHCDR2 c68	EIFPGSGTTDYNEKFKG (SEQ ID NO: 38)
VHCDR3 c68	GAFDY (SEQ ID NO: 39)
VHCDR1 c44	DHIFSIHWMQ (SEQ ID NO: 37)
VHCDR2 c44	EIFPGSGTTDYNEKFKG (SEQ ID NO: 38)
VHCDR3 c44	GAFDY (SEQ ID NO: 39)
VHCDR1 c03	DHIFSIHWMQ (SEQ ID NO: 37)
VHCDR2 c03	EIFPGSGTTDYNEKFKG (SEQ ID NO: 38)
VHCDR3 c03	GAFDY (SEQ ID NO: 39)
VHCDR1 c10	DHIFSIHWMQ (SEQ ID NO: 37)
VHCDR2 c10	EIFPGSGTTDYNEKFKG (SEQ ID NO: 38)
VHCDR3 c10	GAFDY (SEQ ID NO: 39)
VHCDR1 c10.1	GYTFTSDDIN (SEQ ID NO: 312)
VHCDR2 c10.1	WIYPRDGRTKYNEKFKG (SEQ ID NO: 337)
VHCDR3 c10.1	SRRVYAMDY (SEQ ID NO: 368)
VHCDR1 c10.2	GYTFTSDDIN (SEQ ID NO: 312)
VHCDR2 c10.2	WIYPRDGRTKYNEKFKG (SEQ ID NO: 337)

VHCDR3 c10.2	SRRVYAMDY (SEQ ID NO: 368)
VHCDR1 8A6	GYTITSYVMH (SEQ ID NO: 313)
VHCDR2 8A6	YINPNNDGTYNEKFKG (SEQ ID NO: 338)
VHCDR3 8A6	GDYSNYFYWYFDV (SEQ ID NO: 369)
VHCDR1 6B7	GYTFPGYWMH (SEQ ID NO: 314)
VHCDR2 6B7	KIDPSDSETHYNQNFKD (SEQ ID NO: 339)
VHCDR3 6B7	EGWDSDLTKVWFGW (SEQ ID NO: 370)
VHCDR1 4E6	GFNIKDDYMH (SEQ ID NO: 315)
VHCDR2 4E6	RIDPAYGNGKYVPKFQD (SEQ ID NO: 340)
VHCDR3 4E6	RYYAVSSVDYALDY (SEQ ID NO: 371)
VHCDR1 3C7	GYIFTSHWMQ (SEQ ID NO: 316)
VHCDR2 3C7	DIFPGSGTTDYNEKFKD (SEQ ID NO: 341)
VHCDR3 3C7	GAFDY (SEQ ID NO: 39)
VHCDR1 2A6	GFSLRTFGMVG (SEQ ID NO: 317)
VHCDR2 2A6	HIWWNGDKYYDPALKS (SEQ ID NO: 342)
VHCDR3 2A6	IGPSITTVAEGFAY (SEQ ID NO: 372)
VHCDR1 8A12	GFSLRTFGMVG (SEQ ID NO: 317)
VHCDR2 8A12	HIWWNDEKYYNPDLKS (SEQ ID NO: 343)
VHCDR3 8A12	VGPSISTVAEGFPY (SEQ ID NO: 373)
VHCDR1 9C5	GFSLRTFGMVG (SEQ ID NO: 317)
VHCDR2 9C5	HIWWNDDKSSHALKS (SEQ ID NO: 344)
VHCDR3 9C5	IGPSITTVAEGFAY (SEQ ID NO: 372)
VHCDR1 9D1	GFSMRTFGMVG (SEQ ID NO: 318)
VHCDR2 9D1	HIWWNDEKYYNPDLKS (SEQ ID NO: 343)
VHCDR3 9D1	VGPSISTIAEGFPY (SEQ ID NO: 374)
VHCDR1 1B12	GYTFTNDNYWMN (SEQ ID NO: 319)
VHCDR2 1B12	RIRPSDSETHYNQKFTN (SEQ ID NO: 345)
VHCDR3 1B12	SWEDLLLRSMEDYFDY (SEQ ID NO: 375)
VHCDR1 9D9	GFSFSDYNIN (SEQ ID NO: 320)
VHCDR2 9D9	KVHPKDGTATYNQKFQD (SEQ ID NO: 346)
VHCDR3 9D9	LYYDSLTKILFAY (SEQ ID NO: 376)
VHCDR1 6C1	GFSLRTFGMVG (SEQ ID NO: 317)
VHCDR2 6C1	HIWWNDEKYYNPALKS (SEQ ID NO: 347)
VHCDR3 6C1	LGPSITTVAEGFPY (SEQ ID NO: 377)
VHCDR1 11A10	GYSLISYYIH (SEQ ID NO: 321)
VHCDR2 11A10	LTFPGSGNSKIEKFKG (SEQ ID NO: 348)
VHCDR3 11A10	GDFGNYLAYWYFDV (SEQ ID NO: 378)
VHCDR1 4A10	GFSLKTFGMVG (SEQ ID NO: 322)
VHCDR2 4A10	HIWWNDDKFYHPALKS (SEQ ID NO: 349)
VHCDR3 4A10	IGPSITTVAEGFAY (SEQ ID NO: 372)
VHCDR1 6A9	GYSLTSYYIH (SEQ ID NO: 323)
VHCDR2 6A9	LIFPGSGNSKYIEKFKG (SEQ ID NO: 350)
VHCDR3 6A9	GDFGNYLAYWYFDV (SEQ ID NO: 378)
VHCDR1 5A2	GFSLNTYGMVG (SEQ ID NO: 324)
VHCDR2 5A2	NIWWNDDKYYNSALKS (SEQ ID NO: 351)

VHCDR3 5A2	VAATIVTTYGAWFAY (SEQ ID NO: 379)
VHCDR1 5A5	GFSLRTFGMGVG (SEQ ID NO: 317)
VHCDR2 5A5	HIWWNDEKYYNPTLKS (SEQ ID NO: 352)
VHCDR3 5A5	IGPSITTVVEGFPY (SEQ ID NO: 380)
VHCDR1 12A11	GYTFTDKYIN (SEQ ID NO: 325)
VHCDR2 12A11	WIYPGSGNTKYNEKFKG (SEQ ID NO: 353)
VHCDR3 12A11	GIYYYDGSPYALDY (SEQ ID NO: 381)
VHCDR1 6D9	GYTFTDYSIH (SEQ ID NO: 326)
VHCDR2 6D9	WIYPGSGNTKYNDKFKG (SEQ ID NO: 354)
VHCDR3 6D9	DYRRYYAIDY (SEQ ID NO: 382)
VHCDR1 5A3	GYTFTDYSIH (SEQ ID NO: 326)
VHCDR2 5A3	WIYPGSDNTKYNDKFKG (SEQ ID NO: 355)
VHCDR3 5A3	DYRRYYAMDY (SEQ ID NO: 383)
VHCDR1 6B3	GYTFTSYVMH (SEQ ID NO: 327)
VHCDR2 6B3	YLNPNNNDGTYNEKFKG (SEQ ID NO: 356)
VHCDR3 6B3	GDYSNYFYWYFDV (SEQ ID NO: 369)
VHCDR1 2C12	GYTFSDYTIH (SEQ ID NO: 328)
VHCDR2 2C12	WIYPGRGNTKYNDKFKG (SEQ ID NO: 357)
VHCDR3 2C12	DYRRYYAMDY (SEQ ID NO: 383)
VHCDR1 H6A9	GYTFTDNFIN (SEQ ID NO: 329)
VHCDR2 H6A9	WISPGSGNTKNNEKFKG (SEQ ID NO: 358)
VHCDR3 H6A9	GIYYYDGTYPYALDY (SEQ ID NO: 384)
VHCDR1 9D12	GFSLTDYEIN (SEQ ID NO: 330)
VHCDR2 9D12	VIWTGGGTCKYNSVLIS (SEQ ID NO: 359)
VHCDR3 9D12	EGRRYYAMDY (SEQ ID NO: 385)
VHCDR1 6F2	GFSLTTYEIN (SEQ ID NO: 331)
VHCDR2 6F2	VIWTGGTTKYNASFIS (SEQ ID NO: 360)
VHCDR3 6F2	EGRRYYAMDY (SEQ ID NO: 385)
VHCDR1 11A12	GYTFTSYVIH (SEQ ID NO: 332)
VHCDR2 11A12	YLHRNNNDGTYNEKFKV (SEQ ID NO: 361)
VHCDR3 11A12	GDYSNYFYWYFDV (SEQ ID NO: 386)
VHCDR1 1A10	GFSLTTYEIN (SEQ ID NO: 331)
VHCDR2 1A10	VIWTGGTTKYNASFIS (SEQ ID NO: 362)
VHCDR3 1A10	EGRRYYAMDY (SEQ ID NO: 385)
VHCDR1 2A7	GYTFTDYSIH (SEQ ID NO: 326)
VHCDR2 2A7	WIYPGSDNTKYNDKFKG (SEQ ID NO: 355)
VHCDR3 2A7	DYRRYYAMDY (SEQ ID NO: 383)
VHCDR1 11B7_a	GFSLTDYEIN (SEQ ID NO: 330)
VHCDR2 11B7_a	VIWTGGGTCKYNSVLIS (SEQ ID NO: 359)
VHCDR3 11B7_a	EGRRYYAMDY (SEQ ID NO: 385)
VHCDR1 11B7_b	GFSLSTFGMGVG (SEQ ID NO: 392)
VHCDR2 11B7_b	HIWWDDDKYYNPALKS (SEQ ID NO: 363)
VHCDR3 11B7_b	IEGPYYWYFDV (SEQ ID NO: 387)
VHCDR1 7A6	GFSLSRYSVH (SEQ ID NO: 333)
VHCDR2 7A6	MIWGGGNTDYNGLKS (SEQ ID NO: 364)
VHCDR3 7A6	PSLYYYDVAWFPY (SEQ ID NO: 388)
VHCDR1 4D6	GFKNIKNDYLH (SEQ ID NO: 334)
VHCDR2 4D6	WIDSANDKTYAPKFQD (SEQ ID NO: 365)
VHCDR3 4D6	VGVQDGYYVRDFDY (SEQ ID NO: 389)
VHCDR1 H2A7	GFTFSDYYMS (SEQ ID NO: 335)
VHCDR2 H2A7	LIRNKAPGYTTEYSASVKG (SEQ ID NO: 366)
VHCDR3 H2A7	VLRRADCLDY (SEQ ID NO: 390)
VHCDR1 H7F8	GFTFSSYDMS (SEQ ID NO: 336)
VHCDR2 H7F8	AINSYGVNTPYDPTVKD (SEQ ID NO: 367)
VHCDR3 H7F8	LLIGPYYYAMDY (SEQ ID NO: 391)

CDR, которые приведены в табл. 3 и 4, определяли при помощи системы нумерации по Chothia (Al-Lazikani и др., JMB, 273, 927-948, (1997)) или системы нумерации IMGT (Lefranc, M.-P. и др., Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)). Алгоритм IgAligner IMGT представлял собой такой от Chemical Computing Group (CCG).

Fab, которые продемонстрировали лучшее или эквивалентное связывание по сравнению с химерным исходным Fab, отбирали для превращения в IgG. Превращение осуществляли в IgG1KO формате. IgG1KO (knock-out/нокаут эффекторных функций) имел две мутации в участке Fc region, Leu234Ala и Leu235Ala, которые снижают эффекторную функцию, такую как FcγR, и связывание комплемента. IgG формат описывается в литературе (см., например, Hezareh и др. (2001), Journal of Virology, 75:12161-12168). Пример 2 описывает процесс гуманизации более подробно. Результаты такой гуманизации при-

водили к получению последовательности гуманизированного антитела. Репрезентативное количество гуманизированных вариабельных участков легкой цепи и тяжелой цепи мышиных антител 5B9 и 1A4, обеспечивается и представлено в табл. 5 и 6.

Таблица 5

Гуманизированные последовательности Vκ 5B9 и 1A4

Обознач.	Последовательность
148c04VK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDIGNRLSWLQQEPGKAPKR _L IYATSSLDSGVPSRFSG SRSGTEFTLTISSLQPEDFV _T YYCLQYASSPFTFGQT _K LEIK (SEQ ID NO: 82)
	GACATCCAGATGACCCAGAGCCAAGCAGCCTGAGGCCAGCGCGTGAC CATCACCTGCCGCCAGCAGGACATCGGC _A CCGCC _T GTCGTGGCTGAGCAGGAGC CAGGCAAGGCCAAAGC _G CCTGATCTACGCCACCAGCAGCCTGGACAGCGGTGTCCA AGCGCTTCAGCGCAGCGCACGGAGTT _C ACCC _T GACC _A TAGCAGCCTGCA ACCAGAGGACTTCGTACCTACTACTGCC _T GAATACGCCAGCAGCCCATTACCTCGG CCAGGGC _A CCAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 234)
148c18VK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDIGNRLNW _L QQEPGKAPKR _L IYATSSLDSGVPKRFS SRSGTEFTLTISSLQPEDFV _D YYCLQYASSPFTFGT _G T _K LEIK (SEQ ID NO: 83)
148c19VK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDIGNRLNWYQQEPGKAPKR _L IYATSSLDSGVPKRFS GSRS _G TEFTLTISSLQPEDFV _D YYCLQYASSPFTFGT _G T _K LEIK (SEQ ID NO: 84)
148c68VK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDIGNRLWYQQKPGKAPKR _L IYATSSLDSGVPKRFS GSRS _G TEFTLTISSLQPEDFV _T YYCLQYASSPFTFGQ _G T _K LEIK (SEQ ID NO: 85)
148c77VK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDIGNRLNWYQQKPGKAPKR _L IYATSSLDSGVPKRFS GSRS _G TEFTLTISSLQPEDFV _D YYCLQYASSPFTFGT _G T _K LEIK (SEQ ID NO: 86)
148c92VK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDIGNRLNWYQQKPGKAPKR _L IYATSSLDSGVPSRF _S GSRS _G TEFTLTISSLQPEDFV _D YYCLQYASSPFTFGT _G T _K LEIK (SEQ ID NO: 87)
160c16VK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDIGNRLNWYQQKPGKAPKR _L IYATSSLDSGVPSRF _S GSRS _G TEFTLTISSLQPEDFV _T YYCLQYASSPFTFGQ _G T _K LEIK (SEQ ID NO: 88)
	GACATCCAGATGACCCAGAGCCAAGCAGCCTGAGGCCAGCGCGTGAC CATCACCTGCCGCCAGCAGGACATCGGC _A CCGCC _T GACTGGTACCCAGCAGAAGC CAGGCAAGGCCAAAGC _G CCTGATCTACGCCACCAGCAGCCTGGACAGCGGTGTCCA AGCGCTTCAGCGCAGCGCACGGAGTT _C ACCC _T GACC _A TAGCAGCCTGCA ACCAGAGGACTTCGTACCTACTACTGCC _T GAATACGCCAGCAGCCCATTACCTCGG CCAGGGC _A CCAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 393)
148c44VK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDIGNRLPWLQQKPGKAPKR _L IYATSSLDSGVPSRFSG SGSGTEFTLTISSLQPEDFV _D YYCLQYASSPFTFGT _G T _K LEIK (SEQ ID NO: 89)
148c03VK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDIGNRLRWYQQKPGKAPKR _L IYATSSLDSGVPSRF _S GSRS _G TEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYASSPFTFGQ _G T _K LEIK (SEQ ID NO: 90)
148c10VK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDIGNRLMWYQQKPGKAPKR _L IYATSSLDSGVPSRF _S GSRS _G TEFTLTISSLQPEDFV _T YYCLQYASSPFTFGT _G T _K LEIK (SEQ ID NO: 91)
145c02VK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCKASQNAGIDVAWFQQKPGKAPKL _L IYSKS _N R _Y TGVPSRF _S GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYRSYPRTFGQ _G T _K LEIK (SEQ ID NO: 92)
145c08VK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCKASQNAGIDVAWFQQKPGKAPKL _L IYSKS _N R _Y TGVPSRF _S GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYRSYPRTFGQ _G T _K LEIK (SEQ ID NO: 93)
	GACATCCAGATGACCCAGAGCCAAGCAGCCTGAGGCCAGCGCGTGAG CATCACCTGCAAGGCCAGCAGAACGCCGGCATCGACGTGGCTGGTCCAGCAGAAGC CTGGCAAGGCCAAAGCTGCTGACTCTACAGCAGAGCAACCGCTACACGGCGTGCAA GCCGCTTCAGCGCAGCGCACGGCACCAGACTTACCC _T GACC _A TAGCAGCAGCTCCAGC CAGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCC _T AGTACCGCAGCTACCCACCCACCTTCGCC AGGGC _A CCAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 394)
145c15VK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCKASQNAGIDVAWFQQKPGKAPKL _L IYSKS _N R _Y TGVPSRF _S GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYRSYPRTFGQ _G T _K LEIK (SEQ ID NO: 94)
	GACATCCAGATGACCCAGAGCCAAGCAGCCTGAGGCCAGCGCGTGAG CATCACCTGCAAGGCCAGCAGAACGCCGGCATCGACGTGGCTGGTCCAGCAGAAGC TGGCAAGGCCAAAGCTGCTGACTCTACAGCAGAGCAACCGCTACACCGCGTGCAA GCCGCTTCAGCGCAGCGCACGGCACCAGACTTACCC _T GACC _A TAGCAGCAGCTCCAGC CAGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCC _T AGTACCGCAGCTACCCACCCACCTTCGCC CGGGC _A CCAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 395)
145c18VK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCKASQNAGIDVAWFQQKPGKAPKL _L IFSKS _N R _Y TGPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYRSYPRTFGQ _G T _K LEIK (SEQ ID NO: 95)
145c28VK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCKASQNAGIDVAWFQQKPGKAPKL _L IFSKS _N R _Y TGVPSRF _S GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYRSYPRTFGQ _G T _K LEIK (SEQ ID NO: 96)
145c36VK	DIVMTQSPSSLSASVGDRVITCKASQNAGIDVAWFQQKPGKAPKL _L IYSKS _N R _Y TGPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYRSYPRTFGQ _G T _K LEIK (SEQ ID NO: 97)
Reference 1	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSRYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN _R ATGIPARFSG SGSGTDSTLTISSLQPEDFAVYYCQQRSNW _P RTFGQ _G T _K VEIKRTVAAPS _V IFPPSDEQLKSG TASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST _S TL _S TL _K ADYEKH K _V YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 98)
Reference 2	SSEL _T QDPAVSVALGQT _V R _T CQGD _S LS _Y ASWYQQKPGQAPVLVIY _G NNRPSGIPDRFS GSSSGNTASL _T ITGAQAEDADYYCSSRDSSGNH _W F _{GG} TEL _V L _G QPKAAPSV _T L _F PPSSE ELQANKATLVCLISDFY _P GA _T V _A WKADSSPV _K AG _V ETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQW KSHRSYSCQVTHEGST _V E _K T _V APTECS (SEQ ID NO: 99)

Таблица 6

Гуманизированные последовательности V_H 5B9 и 1A4

Обозначен.	Последовательность
148c04VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAPDHIFSIHWQMWRQRPGQGLEWIGEIFPGSGTTDYNE KFKGKVITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCASGAFDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 100)
148c18VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAPDHIFSIHWQMWRQRPGQGLEWIGEIFPGSGTTDYNE EKFKGKVITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCASGAFDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 101)
	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGCCGAGGTGAAGAAGCCAGGCAGCGTGAAAGGT CAGCTGCAAGGCCCGACCATCTTCAGCATCCACTGGATCGAGCTGGTCCGCCAACG CCCAGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGCGAGATTCCCAGGCAGCGGCCACCACCGACT ACAACGAGAAGTCAAGGGCAAGGTGACCATCACCCTGCAAGAGCACGACCACGCC TACATGGAGCTGAGCAGCCTGCAGCAGGAGACACCAGCGCTACTACTGCGCCAGCG CGCCTCGACTACTGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC (SEQ ID NO: 396)
148c19VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKISCKAPDHIFSIHWQMWRQRPGQGLEWIGEIFPGSGTTDYNE KFKGKVTVTDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCASGAFDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 102)
148c68VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKISCKASDHIFSIHWQMWRQRPGQGLEWIGEIFPGSGTTDYNE KFKGKVTVTDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARGAFDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 103)
148c75VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAPDHIFSIHWQMWRQRPGQGLEWIGEIFPGSGTTDYNE EKFKGKVTVTDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCASGAFDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 104)
148c77VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKISCKASDHIFSIHWQMWRQRPGQGLEWIGEIFPGSGTTDYNE EKFKGKVTVTDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCASGAFDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 105)
148c92VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAPDHIFSIHWQMWRQRPGQGLEWIGEIFPGSGTTDYNE KFKGRATVTDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCASGAFDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 106)
161c01VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASDHIFSIHWQMWRQRPGQGLEWIGEIFPGSGTTDYNE EKFKGKVITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARGAFDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 107)
148c03VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKISCKAPDHIFSIHWQMWRQRPGQGLEWIGEIFPGSGTTDYNE KFKGKVTVTDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCASGAFDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 108)
148c10VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKISCKASDHIFSIHWQMWRQRPGQGLEWIGEIFPGSGTTDYNE KFKGKVITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCASGAFDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 109)
145c02VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSTFFIWIQQRPGQGLEWMGRIDPNSGATKYN EKFESRVMTDRTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARGEDLLIRTDALDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 110)
145c08VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSTFFIWIQQRPGQGLEWMGRIDPNSGATKYN EKFESVTLTVDRTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARGEDLLIRTDALDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 111)
145c15VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSTFFIHWVRQRPGQGLEWIGRIDPNSGATKYNE KFESVTLTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARGEDLLIRTDALDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 112)
	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGCCGCTGAGGTGAAGAAGCCAGCGCCAGCGTGAAAGGT GAGCTGCAAGGCCAGCGCTACAGCTTCAGCACCTTCTCATCCACTGGTCCGCCAACG CCCAGGCCAGGGCCTGGAGTGGATCGCCGATCGACCCAAACAGCGCCGACCCAAGT ACAACGAGAAGTCAAGAGCAAGGTCACCCCTGACCCGCGACACCAGCATCAGCACGCC TACATGGAGCTGAGCCTGCAGCAGCACCCGCTACTACTGCGCCGCGC GAGGACCTGCTGATCCGACCGACGCCCTGGATTACTGGGTCAGGGTACTAGCGTAC GTGAGCAGC (SEQ ID NO: 397)
145c18VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSTFFIHWVRQRPGQGLEWIGRIDPNSGATKYN EKFESVTLTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARGEDLLIRTDALDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 113)
145c28VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSTFFIHWVRQRPGQGLEWIGRIDPNSGATKYNE KFESRVMTDRTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARGEDLLIRTDALDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 114)
	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGCCGCTGAGGTGAAGAAGCCAGCGCCAGCGTGAAAGGT GAGCTGCAAGGCCAGCGCTACAGCTTCAGCACCTTCTCATCCACTGGTCCGCCAACG CCCAGGCCAGGGCCTGGAGTGGATCGCCGATCGACCCAAACAGCGCCGACCCAAGT ACAACGAGAAGTCAAGAGCGCCGCTACCATGACCCGCGACACCAGCATCAGCACGCC TACATGGAGCTGAGCCTGCAGCAGCACCCGCTACTACTGCGCCGCGC GAGGACCTGCTGATCCGACCGACGCCCTGGATTACTGGGTCAGGGTACTAGCGTAC GTGAGCAGC (SEQ ID NO: 398)
145c36VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSTFFIHWVRQRPGQGLEWIGRIDPNSGATKYN EKFESRVTLTVDRTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARGEDLLIRTDALDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 115)
Reference 1	QVQLQQWAGALLKPSETLSLTCAVYGGSGFSGYYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHGSTNYPNS LKSRTVISVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARRYDILTYYYYYFDYWQGTLVTVSSA STKGPSVPLAPCSRSTSEESTAALGCLVKDYPFPEPVTVWSNWSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTPVSSSLGTKTVCNDHKPSNTVKDVRVESKYGPCCPCPAEFLGGPSVFLFPKPK DTLmisrtpevtcvvvdvsqedpevqfnwyvdgvevhnaktpreeqfnstyrvsvltvl HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIETKISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCSVMHEALH NYHTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 116)
Reference 2	QVQLQQSGAEVKKPGSSVRVSCKASGGTFNNNAIWVRQAPGQGLEWMGGIIPMFGTAKYS QNFQGRVIAITADESTGTASMEMLSSLRSEDTAVYFCARSRDLLLPHHALSPWGRGTMVTVSS ASTKGPSVPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYPFPEPVTVWSNWSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS SLSSVVTPVSSSLGTQTYICVNWKPSNTVKDVKVEPKSCDKTHTCPCCPAEFLGGPSVFLFPKPK PKPKDtlmisrtpevtcvvvdvschedpevfkfnwyvdgvevhnaktpreeqfnstyrvsv LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKISKAKGQPREPQVYTLPPSRELTKNQVSLTCLVKG LVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCSVMHEALH NYHTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 117)

Гуманизированные анти-BAFF антитела необязательно содержали специфические аминокислотные замены в консенсусных или эмбриональных каркасных участках. Специфические замены аминокислотных участков в этих положениях каркасных участков улучшают различные аспекты поведения антитела, включая связывающую аффинность и/или стабильность, кроме того, было продемонстрировано, что гуманизированные антитела формировались путем "прямого обмена" CDR или HVL в эмбриональных каркасных участках человека.

В изобретении описаны моноклональные антитела с вариабельным участком легкой цепи, которые имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 175, 177, 179 или 181, а также другие моноклональные антитела с вариабельным участком тяжелой цепи, которые имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 183, 185, 187, 189, 191, 193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227, 229, 231, 233, 235, 238, 240, 242, 244, 246 или 248 (см. табл. 1 и 2, как представлено выше). CDR последовательности этих мышиных антител представлены в табл. 3 и 4. Помещение таких CDR в FR вариабельных доменов консенсусной тяжелой и легкой цепи человека обеспечивает получение полезных гуманизированных антител в соответствии с настоящим изобретением.

Возможно получение моноклональных антител с комбинациями вариабельных участков легкой и тяжелой цепей SEQ ID NO: 41/59, 43/61, 45/63, 47/65, 49/67, 51/69, 53/71, 55/73, 57/75, 119/183, 121/185, 123/187, 125/189, 127/191, 129/193, 131/195, 133/197, 135/199, 137/201, 139/203, 141/205, 143/207, 145/209, 147/211, 149/213, 151/215, 153/217, 155/219, 157/221, 159/223, 161/225, 163/227, 165/229, 167/231, 169/233, 171/235, 173/238, 173/240, 175/242, 177/244, 179/246 или 181/248. Такие вариабельные участки могут сочетаться с константными участками человека.

Кроме того, описаны гуманизированные антитела с последовательностями вариабельного участка легкой цепи, которые имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 82-97, а также другие гуманизированные антитела с последовательностями вариабельного участка тяжелой цепи, которые имеют аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 100-115 (см. табл. 5 и 6 выше). CDR последовательности этих антител представлены в табл. 3 и 4. Такие вариабельные участки могут сочетаться с константными участками человека.

Гуманизированные анти-BAFF антитела, раскрытые в данном изобретении, могут включать, по меньшей мере, вариабельный домен тяжелой или легкой цепи, включающий CDR или HVL мышиных моноклональных антител или гуманизированных антител, как представлено в табл. 1-6, приведенных выше, и FR вариабельных доменов эмбриональных тяжелой и легкой цепей человека.

CDR указанных последовательностей представлены в табл. 3 и 4. Возможно получение молекулы анти-BAFF антитела, включающей легкую цепь вариабельного домена с

CDR1, выбранного из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 250, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 252, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 254, SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 256, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 258, SEQ ID NO: 259, SEQ ID NO: 260, SEQ ID NO: 261, SEQ ID NO: 262, SEQ ID NO: 263, SEQ ID NO: 264, SEQ ID NO: 265, SEQ ID NO: 266, SEQ ID NO: 267, SEQ ID NO: 268, SEQ ID NO: 269, SEQ ID NO: 270, SEQ ID NO: 271, SEQ ID NO: 272, SEQ ID NO: 273, SEQ ID NO: 274 и SEQ ID NO: 275;

CDR2, выбранного из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 276, SEQ ID NO: 277, SEQ ID NO: 278, SEQ ID NO: 279, SEQ ID NO: 280, SEQ ID NO: 281, SEQ ID NO: 282, SEQ ID NO: 283, SEQ ID NO: 284, SEQ ID NO: 285, SEQ ID NO: 286, SEQ ID NO: 287, SEQ ID NO: 288, SEQ ID NO: 289, SEQ ID NO: 290, SEQ ID NO: 291 и SEQ ID NO: 292; и

CDR3, выбранного из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 293, SEQ ID NO: 294, SEQ ID NO: 295, SEQ ID NO: 296, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 298, SEQ ID NO: 299, SEQ ID NO: 300, SEQ ID NO: 301, SEQ ID NO: 302, SEQ ID NO: 303, SEQ ID NO: 304, SEQ ID NO: 305, SEQ ID NO: 306, SEQ ID NO: 307, SEQ ID NO: 308, SEQ ID NO: 309, SEQ ID NO: 310 и SEQ ID NO: 311; и

вариабельный домен тяжелой цепи с CDR1, выбранного из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 312, SEQ ID NO: 313, SEQ ID NO: 314, SEQ ID NO: 315, SEQ ID NO: 316, SEQ ID NO: 317, SEQ ID NO: 318, SEQ ID NO: 319, SEQ ID NO: 320, SEQ ID NO: 321, SEQ ID NO: 322, SEQ ID NO: 323, SEQ ID NO: 324, SEQ ID NO: 325, SEQ ID NO: 326, SEQ ID NO: 327, SEQ ID NO: 328, SEQ ID NO: 329, SEQ ID NO: 330, SEQ ID NO: 331, SEQ ID NO: 332, SEQ ID NO: 392, SEQ ID NO: 333, SEQ ID NO: 334, SEQ ID NO: 335 и SEQ ID NO: 336;

CDR2, выбранного из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 337, SEQ ID NO: 338, SEQ ID NO: 339, SEQ ID NO: 340, SEQ ID NO: 341, SEQ ID NO: 342, SEQ ID NO: 343, SEQ ID NO: 344,

стей SEQ ID NO: 100-115. Возможно получение моноклональных антител с комбинациями вариабельных участков легкой и тяжелой цепей SEQ ID NO: 82/101, 88/101, 94/112 или 93/114. Такие вариабельные участки могут сочетаться с константными участками человека.

Молекула анти-BAFF антитела может нейтрализовать все три формы человеческого BAFF, формы, которые включают связанный с мембраной BAFF (mbBAFF), растворимый тримерный BAFF и растворимый 60-мерный BAFF. В частности, молекула анти-BAFF антитела может нейтрализовать человеческий растворимый 60-мерный BAFF. Кроме того, молекула анти-BAFF антитела может нейтрализовать человеческий растворимый тримерный BAFF. В завершение, молекула анти-BAFF антитела может нейтрализовать человеческий связанный с мембраной BAFF.

Кроме того, молекула анти-BAFF антитела может включать гуманизированный вариабельный домен легкой цепи, включающий CDR последовательности SEQ ID NO: 76, 16 и 17 и каркасные участки, имеющие аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную, по меньшей мере на 93% идентичную или по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотной последовательности каркасных участков вариабельного домена легкой цепи аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 82, и гуманизированный вариабельный домен тяжелой цепи, который включает CDR последовательности SEQ ID NO: 37, 38 и 39 и каркасные участки, имеющие аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную, по меньшей мере на 93% идентичную или по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотной последовательности каркасных участков аминокислотной последовательности вариабельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 101. Такая молекула анти-BAFF антитела может представлять собой гуманизированное моноклональное антитело.

Молекула анти-BAFF антитела может содержать гуманизированный вариабельный домен легкой цепи, включающий CDR последовательности SEQ ID NO: 15, 16 и 17 и каркасные участки, имеющие аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную, по меньшей мере на 93% идентичную или по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотной последовательности каркасных участков вариабельного домена легкой цепи аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 88, и гуманизированный вариабельный домен тяжелой цепи, который включает CDR последовательности SEQ ID NO: 37, 38 и 39 и каркасные участки, имеющие аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную, по меньшей мере на 93% идентичную или по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотной последовательности каркасных участков аминокислотной последовательности вариабельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 101. Такая молекула анти-BAFF антитела может представлять собой гуманизированное моноклональное антитело.

Молекула анти-BAFF антитела может содержать гуманизированный вариабельный домен легкой цепи, включающий CDR последовательности SEQ ID NO: 5, 8 и 9 и каркасные участки, имеющие аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную, по меньшей мере на 93% идентичную или по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотной последовательности каркасных участков вариабельного домена легкой цепи аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 94, и гуманизированный вариабельный домен тяжелой цепи, который включает CDR последовательности SEQ ID NO: 81, 29 и 30 и каркасные участки, имеющие аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную, по меньшей мере на 93% идентичную или по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотной последовательности каркасных участков вариабельного домена тяжелой цепи аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 112. Такая молекула анти-BAFF антитела может представлять собой гуманизированное моноклональное антитело.

Молекула анти-BAFF антитела может содержать гуманизированный вариабельный домен легкой цепи, включающий CDR последовательности SEQ ID NO: 5, 8 и 9, и каркасные участки, имеющие аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную, по меньшей мере на 93% идентичную или по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотной последовательности каркасных участков вариабельного домена легкой цепи аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 93, и гуманизированный вариабельный домен тяжелой цепи, который включает CDR последовательности SEQ ID NO: 81, 29 и 30 и каркасные участки, имеющие аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную, по меньшей мере на 93% идентичную или по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотной последовательности каркасных участков вариабельного домена тяжелой цепи аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 114. Такая молекула анти-BAFF антитела может представлять собой гуманизированное моноклональное антитело.

Возможно также получение химерных антител с переключаемыми CDR участками (т.е. например, маневрирование одного или двух CDR одного из мышиных антител или гуманизированного антитела, которое происходит от них, с аналогичными CDR из другого мышного антитела или гуманизированного антитела, которое происходит от них). Это тоже может приводить к получению полезных антител.

Гуманизированное анти-BAFF антитело может представлять собой фрагмент антитела. Различные фрагменты антител в общем случае обсуждались выше, и были разработаны различные способы получения фрагментов антител. Фрагменты можно получить посредством протеолитического расщепления интактных антител (см., например, Morimoto и др., 1992, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 и Brennan и др., 1985, Science, 229:81). Альтернативно, фрагменты можно получить непосред-

ственno в рекомбинантных клетках-хозяевах. Например, Fab'-SH-фрагменты можно непосредственно выделить из E.coli и химически сочетать с F(ab')₂ фрагментами (см., например, Carter и др., 1992, Bio/Technology 10:163-167). При другом подходе F(ab')₂ фрагменты можно выделить непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Другие методики получения фрагментов антител известны специалистам в данной области техники. В соответствии с этим фрагменты антитела, включающие CDR, тоже описаны в данном документе, в частности комбинации L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3, H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3. Фрагменты антител могут включать вариабельные участки, описанные в данном документе, например одну из комбинаций вариабельных участков легкой цепи и вариабельных участков тяжелой цепи, описанных в данном документе.

Антитело или фрагмент антитела может содержать константный участок, который опосредует эффекторную функцию. Константный участок может обеспечить зависимую от антитела клеточную цитотоксичность (ADCC), антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) и зависимую от комплемента цитотоксичность (CDC) в отношении клеток-мишней, экспрессирующих BAFF. Эффекторный(ые) домен(ы) может(могут) представлять собой, например, Fc-участок молекулы Ig.

Эффекторный участок антитела может иметь происхождение от любого подходящего вида позвоночных и представлять собой любой изотип. Изотипы различных видов животных различаются по их способности опосредовать эффекторные функции. Например, способность человеческого иммуноглобулина опосредовать CDC и ADCC/ADCP обычно соответственно находится в следующем порядке IgM≈IgG₁≈IgG₃>IgG₂>IgG₄ и IgG₁≈IgG₃>IgG₂/IgM>IgG₄. Мышиные иммуноглобулины опосредуют CDC и ADCC/ADCP в основном соответственно в следующем порядке: IgM≈IgG₃>IgG_{2b}>IgG_{2a}>>IgG₁ и IgG_{2b}≈IgG_{2a}>IgG₁>>IgG₃. В одном примере мышиный IgG_{2a} опосредует ADCC, в то время как оба мышиных IgG_{2a} и IgM опосредуют CDC.

Модификации антитела.

Гуманизированные анти-BAFF антитела и агенты могут включать модификации гуманизированного анти-BAFF антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Например, можно модифицировать антитело в отношении проявления эффекторной функции, например, для повышения эффективности антитела при лечении рака. Одной из таких модификаций является введение остатка(ов) цистеина в Fc-участок, посредством чего происходит образование дисульфидных связей между цепями в данном участке. Полученное таким образом гомодимерное антитело может обладать повышенной способностью к internalизации и/или повышенной опосредуемой комплементом способностью приводить к гибели клеток и/или антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). См., например, Caron и др., 1992, J. Exp. Med. 176:1191-1195 и Shopes, 1992, J. Immunol. 148:2918-2922. Гомодимерные антитела, обладающие повышенной противоопухолевой активностью, также можно получить при использовании гетеробифункциональных перекрестных линкеров, описанных Wolff и др., 1993, Cancer Research, 53:2560-2565. Альтернативно, можно сконструировать антитело с включением двойных Fc-областей, повышая, таким образом, способность антитела к лизису комплемента и ADCC (см. Stevenson и др., 1989, Anti-Cancer Drug Design, 3:219-230).

Были получены антитела с повышенной способностью поддерживать ADCC посредством модификации характера гликозилирования их Fc-участков. Это возможно, поскольку гликозилирование антитела по остатку аспарagina, N297 в домене C_{H2} вовлечено во взаимодействие между IgG и рецепторами Fc_γ, которое необходимо в качестве предварительного условия для протекания ADCC. Были созданы линии клеток-хозяев для экспрессии антител с измененным гликозилированием, так, например, с повышенным расщеплением N-ацетилглюкозамина или пониженным содержанием фукозы. Снижение уровня фукозы обеспечивает существенное усиление активности ADCC по сравнению с повышением расщепления N-ацетилглюкозамина. Более того, усиление ADCC под действием антител с низким уровнем фукозы не зависит от полиморфизма Fc_γRIIIa V/F.

Модификация аминокислотной последовательности Fc-участка антитела является альтернативой гликозилирования с целью повышения ADCC. Исследовали сайт связывания в человеческом IgG₁ для рецепторов Fc_γ с помощью экстенсивного мутационного анализа. Это приводило к получению гуманизированных IgG₁-антител с мутациями в Fc, которые повышали аффинность связывания Fc_γRIIIa и усиливали ADCC в условиях *in vitro*. Дополнительно были получены варианты Fc со многими различными пермутациями в отношении связывающих свойств, например, с повышенным связыванием со специфическими рецепторами Fc_γR при неизменном или пониженном связывании с рецепторами Fc_γR.

Можно получать иммуноконъюгаты, содержащие гуманизированное антитело или его фрагменты, конъюгированные с цитотоксическим агентом, таким как химиотерапевтический препарат, токсин (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или его фрагмент) или радиоактивным изотопом (т.е. радиоактивный конъюгат).

Химиотерапевтические агенты, пригодные для получения таких иммуноконъюгатов, были описаны выше. Ферментативно активные токсины и их фрагменты, которые можно использовать для получения пригодных иммуноконъюгатов, включают цепь A токсина возбудителя дифтерии, не связывающие активные фрагменты токсина возбудителя дифтерии, цепь A экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), цепь

Арицина, цепь А абрина, цепь А модецина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантинов, белки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Sapaponaria officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин, трикотецины и т.п. Кроме того, промышленно доступны различные радионуклиды для получения радиоконъюгированных гуманизированных анти-BAFF антител. Примеры включают ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y и ^{186}Re .

Конъюгаты гуманизированного анти-BAFF антитела и цитотоксического или химиотерапевтического агента могут быть получены известными способами при использовании различных бифункциональных агентов для связывания белков, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол)пропионат (SPDP), иминотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCl), активные эфиры (такие как дисукцинимидлусберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидопроизводные (такие, как бис-(ω -азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(ω -диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие, как толуол 2,6-диизоцианат) и бис-активные фторсодержащие соединения (такие, как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин рицин может быть получен так, как описано Vitetta и др., 1987, Science, 238:1098. Меченная ^{14}C 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) представляет собой типичный хелатирующий агент для конъюгации радионуклида с антителом. Также можно получить конъюгаты со способным к расщеплению линкером.

Гуманизированные анти-BAFF антитела, раскрытые в данном описании, можно рецептировать в виде иммунолипосом. Липосомы, содержащие антитело, получают при использовании способов, известных в данной области техники, таких как те, что описаны Epstein и др., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688; Hwang и др., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 и в патентах США № 4485045 и 4544545. Липосомы с повышенным временем нахождения в кровотоке раскрыты, например, в патенте США № 5013556.

Особенно пригодные липосомы можно получить методом выпаривания с обратной фазой при использовании липидного состава из фосфатидилхолина, холестерина и ПЭГ-дериватизированного фосфатидилэтаноламина (ПЭГ-РЕ). Липосомы экструдируют через фильтры с определенным размером пор для получения липосом желаемого диаметра. Fab'-фрагменты антитела, раскрытоого в данном описании, можно конъюгировать с липосомами, как описано Martin и др., 1982, J. Biol. Chem. 257:286-288, посредством реакции обмена дисульфидов. В липосоме необязательно находится химиотерапевтический агент (такой как доксорубицин). См., например, Gabizon и др., 1989, J. National Cancer. Inst. 81(19): 1484.

Антитела, описанные и раскрытые в данном документе, также можно использовать в способах ADEPT (направленной на антитела ферментно-пролекарственной терапии) посредством конъюгации антитела с активирующим пролекарственным ферментом, который превращает пролекарственный агент (например, пептидиловый химиотерапевтический препарат) в активный противоопухолевый препарат (см. например, WO 81/01145, WO 88/07378 и патент США № 4975278). Ферментный компонент иммуноконъюгата, пригодный для ADEPT, представляет собой фермент, способный активироваться на молекуле пролекарственного средства таким образом, что он превращает его в более активную, цитотоксическую форму. Специфические ферменты, которые пригодны для ADEPT, включают, но не ограничиваются, такие как щелочная фосфатаза для превращения фосфатсодержащих пролекарственных средств в свободные препараты; арилсульфатаза для превращения сульфатсодержащих пролекарственных средств в свободные препараты; цитозиндезаминаза для превращения нетоксичного 5-фторцитозина в противоопухолевый препарат, 5-фторурацил; протеазы, такие как протеаза серратия, термолизин, субтилизин, карбоксипептидазы и катепсины (такие, как катепсины B и L) для превращения пептид содержащих пролекарственных средств в свободные препараты; D-аланилкарбоксипептидаза для превращения пролекарственных средств, содержащих D-аминокислоты в качестве заместителей; расщепляющие углеводы ферменты, такие как β -галактозидаза и нейраминидаза, для превращения гликозилированных пролекарственных средств в свободные препараты; β -лактамаза для превращения лекарственных препаратов, дериватизированных β -лактамами, в свободные препараты; и пенициллинамидазы, такие как пенициллинамидаза V или пенициллинамидаза G, для превращения лекарственных препаратов, дериватизированных по атомам азота их аминогрупп, соответственно, феноксиацетильной или фенилацетильной группами, в свободные препараты. Альтернативно можно использовать антитела с ферментативной активностью ("абзимы") для превращения пролекарственных средств в свободные активные препараты (см., например, Massey, 1987, Nature, 328:457-458). Конъюгаты антитело-абзим можно получить известными способами для доставки абзима к популяции опухолевых клеток, например, путем ковалентного связывания фермента с гуманизированным анти-BAFF антителом/гетеробифункциональными "сшивающими" реагентами, как обсуждалось выше. Альтернативно, можно сконструировать гибридные белки, содержащие по меньшей мере одну антигенсвязывающую область антитела, раскрытоого в данном описании, связанную, по крайней мере, с функционально активным участком описанного выше фермента, с использованием методов рекомбинантной ДНК (см., например, Neuberger и др., 1984, Nature, 312:604-608).

Иногда желательно использовать фрагмент гуманизированного анти-BAFF антитела, предпочтительнее, чем интактное антитело, например, для повышения проникновения в опухоль. Можно модифи-

цировать фрагмент антитела для повышения периода полураспада в сыворотке крови. Этого можно достичь, например, путем включения эпитопа связывания рецептора реутилизации во фрагмент антитела. Одновременно можно изменить соответствующий участок фрагмента антитела (например, подвергнуть мутации), и эпитоп можно включить в пептид-метку, который затем подвергают гибридизации с фрагментом антитела на одном конце или в середине, например, с помощью синтеза ДНК или пептида. См., например, WO 96/32478.

Ковалентные модификации включают модификацию остатков цистеинила, остатков гистидила, остатков лизинила и аминотерминальных остатков, остатков аргинила, остатков тирозила, карбоксильных боковых групп (аспартил или глутамил), остатков глутаминила и аспарагинила или серила или остатков треонила. Другой тип ковалентной модификации включает химическое или ферментативное слияние гликозидов с антителом. Такие модификации можно осуществлять путем химического синтеза или ферментативным или химическим расщеплением антитела, если это является приемлемым. Другие типы ковалентных модификаций антитела могут быть введены в молекулу путем реакции нацеленных аминокислотных остатков с органическим дериватизирующим агентом, который способен взаимодействовать с выбранными боковыми цепями или амино- или карбокситерминальными остатками.

Удаление любых углеводных групп, присутствующих в антителе, можно осуществить химическим или ферментативным путем. Химическое дегликозилирование описано Hakimuddin и др., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 и Edge и др., 1981, Anal. Biochem. 118:131. Можно осуществлять ферментативное расщепление углеводных остатков в антителах при использовании различных эндо- и экзогликозидаз, как описано Thotakura и др., 1987, Meth. Enzymol. 138:350.

Другой тип полезной ковалентной модификации включает связывание антитела с одним из различных небелковых полимеров, например полиэтиленгликолем, пропиленгликолем или полиоксиалкиленами, с помощью способов, описанных в одном или более из следующих источников: патент США № 4640835, патент США № 4496689, патент США № 4301144, патент США № 4670417, патент США № 4791192 и патент США № 4179337.

Гуманизация и варианты аминокислотной последовательности.

Варианты аминокислотных последовательностей анти-BAFF антитела можно получить путем введения соответствующих замен нуклеотидов в ДНК анти-BAFF антитела или путем пептидного синтеза. Такие варианты включают, например, делеции, и/или инсерции, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях анти-BAFF антител в соответствии с примерами, приведенными ниже. Проводят любую комбинацию делеций, инсерций и замен для получения заключительной конструкции при условии, что заключительная конструкция обладает желаемыми характеристиками. Аминокислотные замены могут также изменить посттрансляционный процессинг гуманизированного анти-BAFF антитела или его варианта, например изменить число или положения сайтов гликозилирования.

Полезный способ для идентификации определенных остатков или участков анти-BAFF антитела, которые представляют собой предпочтительные положения для мутагенеза, называется "аланин сканирующим мутагенезом", который описан Cunningham и Wells (Science, 244:1081-1085 (1989)). В данном случае идентифицируют остаток или группу остатков-мишеней (например, заряженные остатки, такие как arg, asp, his, lys и glu) и замещают их на нейтральную или отрицательно заряженную аминокислоту (как правило, аланин) для обеспечения влияния на взаимодействие аминокислот с антигеном BAFF. Даные аминокислотные положения, проявляющие функциональную чувствительность к заменам, затем удаляют введением дополнительных или других вариантов в сайты замещения или для сайтов замещения. Таким образом, несмотря на то, что сайт введения варианта аминокислотной последовательности определен заранее, природа мутации сама по себе не определяется заранее. Например, для анализа проведения мутации в данном сайте проводят аланин сканирующий или произвольный мутагенез в целевом кодоне или участке, и экспрессированные варианты анти-BAFF антитела подвергают скринингу на желаемую активность.

Инсерции аминокислотной последовательности включают амино- и/или карбокситерминальные слияния, которые колеблются по длине от одного остатка до полипептидов, содержащих сотню или более остатков, так же, как инсерции внутри последовательности одного или множества аминокислотных остатков. Примеры терминальных инсерций включают антитело к BAFF, слитое с эпитопом-меткой. Другие инсерционные варианты молекулы анти-BAFF антитела включают слияние с N- или C-терминальным концом анти-BAFF антитела фермента или пептида, которые повышают период полу-распада антитела в сыворотке крови.

Другим типом варианта является вариант аминокислотной замены. Данные варианты имеют по меньшей мере один аминокислотный остаток в молекуле анти-BAFF антитела, который удален и на его место вставлен другой остаток. Сайты, которые представляют наибольший интерес для заместительного мутагенеза, включают гипервариабельные участки, но изменения FR также предусматриваются. Консервативные замены представлены ниже под заголовком "Предпочтительные замены". Если такие замены приводят к изменению биологической активности, то можно ввести более существенные замены, которые обозначаются как "Типичные замены" или как дополнительно описано ниже со ссылкой на классы аминокислот, и продукты подвергнуть скринингу.

Исходный остаток замены	Типичные замены	Предпочтительные замены
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	arg; asn; gln; lys;	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; норлейцин	leu
Leu (L)	ile; норлейцин; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	tyr; leu; val; ile; ala;	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	phe; trp; thr; ser	phe
Val (V)	leu; ile; met; phe ala; норлейцин;	leu

В белковой химии в общем случае приемлемо, чтобы биологические свойства антитела были изменены путем выбора замен, которые значительно различаются по их влиянию на поддержание (a) структуры скелета полипептида в области замены, например, в виде складчатой или спиральной конформации, (b) заряда или гидрофобности молекулы в целевом сайте или (c) размера боковой цепи. Природные остатки подразделяются на группы на основе общих свойств боковой цепи:

- (1) гидрофобные: норлейцин, met, ala, val, leu, ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: cys, ser, thr;
- (3) кислые: asp, glu;
- (4) основные: asn, gln, lys, arg;
- (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: gly, pro; и
- (6) ароматические: trp, tyr, phe.

Неконсервативные замены будут включать замену члена одного из этих классов на другой класс.

Любой остаток цистеина, не вовлеченный в поддержании правильной конформации гуманизированного анти-BAFF антитела или вариантного анти-BAFF антитела, также может быть замещен, как правило, на серин для повышения стабильности молекулы к окислению, предотвращения аберрантного перекрестного связывания или обеспечения установленных точек конъюгации с цитотоксическим или цитостатическим соединением. В противоположность этому, цистеиновая(ые) связь(и) может быть добавлена к антителу для повышения его стабильности (в частности, в тех случаях, когда антитело представляет собой фрагмент антитела, такой как Fv фрагмент).

Тип заместительного варианта включает замещение одного или более остатков гипервариабельного участка исходного антитела (например, гуманизированного или человеческого антитела). В общем случае полученный(ые) вариант(ы), выбранный(е) для последующей разработки, будет(ут) обладать улучшенными биологическими свойствами по сравнению с исходным антителом, из которого они получены. Удобным способом получения таких заместительных вариантов является созревание аффинности при использовании фагового дисплея. Вкратце, несколько сайтов гипервариабельного участка (например, 6-7 сайтов) подвергают мутации для получения всех возможных замен аминокислот в каждом сайте. Полученные таким образом варианты антител просматривают моновалентным образом на частицах нитчатого фага в виде гибридных конструкций с продуктом гена III M13, упакованного в каждой частице. Затем расположенные на фаге варианты подвергают скринингу на их биологическую активность (например, на аффинность связывания). Для идентификации кандидатов сайтов для модификации гипервариабельного участка можно осуществлять аланин-сканирующий мутагенез для установления остатков гипервариабельного участка, которые вносят существенный вклад в связывание антигена. Альтернативно или дополнительно к этому полезно проанализировать кристаллическую структуру комплекса антиген-антитело для идентификации точек контакта между антителом и человеческим BAFF. Такие остатки для контакта и соседние остатки являются кандидатами для замещения. После получения таких вариантов панель вариантов подвергают скринингу, как описано в данном изобретении, и антитела с наилучшими свойствами, которые они проявляют в одном или более соответствующих тестах, могут быть отобраны для дальнейшего усовершенствования.

Другой тип аминокислотного варианта антитела изменяет первоначальный характер гликозилирования антитела. Под "изменением" понимается делеция одной или более углеводных групп, обнаружен-

ных в антителе, и/или добавление одного или более сайтов гликозилирования, которые отсутствуют в антителе.

Иногда желательно модифицировать антитела для добавления сайтов гликозилирования. Гликозилирование антител, как правило, является N-связанным или O-связанным. N-связанное гликозилирование относится к присоединению углеводородной группы к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X- треонин, где X представляет любую аминокислоту, за исключением пролина, являются последовательностями распознавания для ферментативного присоединения углеводной группы к боковой цепи остатка аспарагина. Таким образом, присутствие любой из данных трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров, N-галактозамина, галактозы или ксилозы, к оксиаминокислоте, чаще всего к серину или треонину, хотя также можно использовать 5-оксипролин или 5-оксилизин.

Таким образом, для того чтобы гликозилировать данный белок, например антитело, осуществляют конструирование аминокислотной последовательности для того, чтобы она содержала одну или более представленных выше трипептидных последовательностей (для сайтов N-связанного гликозилирования). Можно также осуществлять изменение добавлением или заменой одного или более остатков серина или треонина в последовательности исходного антитела (для сайтов O-связанного гликозилирования).

Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие варианты аминокислотных последовательностей анти-BAFF антитела, получают различными методами, известными в данной области техники. Данные методы включают, но не ограничены такими, выделение из природного источника, (в случае существующих в природе вариантов аминокислотной последовательности) или получение с помощью олигонуклеотид-опосредованного (или сайт-направленного) мутагенеза, ПЦР-мутагенеза или кассетного мутагенеза ранее полученного варианта или невариантной версии анти-BAFF антитела.

Полинуклеотиды, векторы, клетки-хозяева и способы рекомбинации.

Изолированные полинуклеотиды могут кодировать любую желаемую форму анти-BAFF антитела, включая, например, полноразмерные моно克лональные антитела, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, диатела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител и мультиспецифические антитела, полученные из фрагментов антител.

Изолированные полинуклеотиды могут включать комбинации вариабельных участков легкой и тяжелой цепей SEQ ID NO: 40/58, 42/60, 44/62, 46/64, 48/66, 50/68, 52/70, 54/72, 56/74, 118/182, 120/184, 122/186, 124/188, 126/190, 128/192, 130/194, 132/196, 134/198, 136/200, 138/202, 140/204, 142/206, 144/208, 146/210, 148/212, 150/214, 152/216, 154/218, 156/220, 158/222, 160/224, 162/226, 164/228, 166/230, 168/232, 170/236, 172/237, 172/239, 174/241, 176/243, 178/245 или 180/247.

Они также могут содержать последовательности, которые кодируют антитело или фрагмент антитела, имеющего аминокислотную последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96 или 97. Типичные полинуклеотидные последовательности, которые кодируют такие аминокислотные последовательности, представляют собой SEQ ID NO: 234, 392, 393 и 394. Изолированные полинуклеотиды включают последовательности, которые кодируют вариабельный участок тяжелой цепи антитела или фрагмента антитела, которые имеют аминокислотную последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114 или 115. Типичные полинуклеотидные последовательности, которые кодируют такие аминокислотные последовательности, представляют собой SEQ ID NO: 395, 396 и 397.

Изолированный полинуклеотид может включать вариабельный участок легкой цепи, который представляет собой SEQ ID NO: 234, и вариабельный участок тяжелой цепи, который представляет собой SEQ ID NO: 396, вариабельный участок легкой цепи, который представляет собой SEQ ID NO: 393, и вариабельный участок тяжелой цепи, который представляет собой SEQ ID NO: 396, вариабельный участок легкой цепи, который представляет собой SEQ ID NO: 395, и вариабельный участок тяжелой цепи, который представляет собой SEQ ID NO: 397, или вариабельный участок легкой цепи, который представляет собой SEQ ID NO: 394, и вариабельный участок тяжелой, который представляет собой SEQ ID NO: 398.

Полинуклеотид(ы), который(е) включает(ют) последовательность, кодирующую гуманизированное анти-BAFF антитело или его фрагмент или цепь, можно сливать с одной или более регуляторной или контрольной последовательностью, известной в данной области техники, и можно помешать в подходящие экспрессирующие векторы или клетки-хозяева, известные в данной области техники. Каждую из полинуклеотидных молекул, кодирующих вариабельные участки тяжелой или легкой цепей, можно независимо сливать с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей константный участок, такой как человеческий константный участок, что позволяет осуществлять продукцию интактных антител. Альтернативно, полинуклеотиды или их участки можно сливать вместе с обеспечением матрицы для получения одноцепочечного антитела.

Для рекомбинантного получения полинуклеотид, кодирующий антитело, встраивают в вектор, способный к репликации, с последующим клонированием (амплификацией ДНК) или экспрессией. Доступны многочисленные подходящие векторы для экспрессии рекомбинантного антитела. Компоненты век-

торов, как правило, включают, но не ограничиваются такими, один или более следующих компонентов: сигнальная последовательность, точка начала репликации, один или более генов-маркеров, энхансер, промотор и последовательность терминации транскрипции.

Гуманизированные анти-BAFF антитела можно также получить в виде гибридных полипептидов, в которых антитело слито с гетерологичным полипептидом, таким как сигнальная последовательность, или другим полипептидом, обладающим специфическим сайтом расщепления на аминотерминальном конце зрелого белка или полипептида. Выбранная гетерологичная сигнальная последовательность, как правило, распознается и процессируется (т.е. расщепляется сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. Для прокариотических клеток-хозяев, которые не распознают и не процессируют сигнальную последовательность гуманизированного анти-BAFF антитела, сигнальную последовательность можно заменить на прокариотическую сигнальную последовательность. Сигнальная последовательность может представлять собой, например, щелочную фосфатазу, пенициллину, липопротеин, лидерные последовательности устойчивого к нагреванию энтеротоксина II и тому подобное. Для секреции у дрожжей природная сигнальная последовательность может быть заменена, например, на лидерную последовательность, полученную из дрожжевого α -фактора инвертазы (включая лидерные последовательности α -фактора *Saccharomyces* и *Kluuyveromyces*), лидерные последовательности кислой фосфатазы, глюкоамилазы *C. albicans* или сигнальную последовательность, описанную в WO 09/13646. В клетках млекопитающих можно использовать сигнальные последовательности млекопитающих, а также вирусные секреторные лидерные последовательности, например сигнал gD вируса простого герпеса. ДНК для такого участка лигируют в рамке считывания с ДНК, кодирующую гуманизированное анти-BAFF антитело.

Экспрессионный и клонирующий векторы содержат последовательность нуклеиновой кислоты, которая обеспечивает репликацию вектора в одной или более клетках-хозяевах. Как правило, в клонирующих векторах данная последовательность способствует репликации вектора независимо от хромосомной ДНК хозяина, и включает точки начала репликации или автономно реплицирующиеся последовательности. Такие последовательности хорошо известны для различных бактерий, дрожжей и вирусов. Точка начала репликации из плазиды pBR322 подходит для большинства грамотрицательных бактерий, точка начала репликации плазиды 2- ω пригодна для дрожжей, а различные вирусные точки начала репликации (SV40, полиомы, аденоизура, VSV или BPV) пригодны для клонирующих векторов в клетках млекопитающих. Обычно точка начала репликации не является необходимой для экспрессионных векторов млекопитающих (как правило, можно использовать точку начала репликации SV40 только потому, что она включает ранний промотор).

Экспрессионные и клонирующий векторы могут содержать ген, который кодирует селективный маркер, для того, чтобы способствовать идентификации экспрессии. Обычные гены селективного маркера кодируют белки, которые а) придают резистентность к антибиотикам или другим токсинам, например, ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину, б) дополняют ауксотрофную недостаточность или с) поставляют важные питательные вещества, отсутствующие в сложных средах, например ген, кодирующий рацемазу D-аланина для *Bacilli*.

Для отбора используется препарат для остановки роста клетки-хозяина. Данные клетки, которые с успехом трансформируются гетерологичным геном, производят белок, придающий резистентность к препаратору, и, таким образом, выживают в этой схеме отбора. В примерах такой доминантной селекции используются препараты неомицина, мифофенольной кислоты и гигромицина.

Традиционными селективными маркерами для клеток млекопитающих являются те, с помощью которых можно идентифицировать клетки, компетентные для "приема" нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизированное анти-BAFF антитело, такие как DHFR (дигидрофолатредуктаза), тимидинкиназа, металлотионеин-I и -II (такие как гены металлотионеина приматов), аденоиндезаминаза, орнитиндекарбоксилаза и т.д. Клетки, трансформированные с помощью DHFR селективного гена, сначала идентифицируют при культивировании всех трансформантов в культуральной среде, содержащей метотрексат (Mtx), конкурентный антагонист DHFR. Подходящей клеткой-хозяином в случае, когда применяется DHFR дикого типа, является линия клеток яичника китайского хомячка (CHO) с недостаточной активностью DHFR (например, DG44).

Альтернативно, можно отбирать клетки-хозяева (в частности, хозяева дикого типа, которые содержат эндогенную DHFR), трансформированные или совместно трансформированные с помощью ДНК-последовательностей, кодирующих гуманизированное анти-BAFF антитело, белка DHFR дикого типа и других селективных маркеров, таких как аминогликозид-3'-фосфотрансфераза (APN), при культивировании клеток в среде, содержащей селективный агент для селективного маркера, такой как антибиотик аминогликозидного ряда, например канамицин, неомицин или G418 (см., например, патент США № 4965199).

Если рекомбинантную продукцию осуществляют в дрожжевых клетках в качестве клеток-хозяев, то ген TRP1 присутствует в дрожжевой плазмиде YRp7 (Stinchcomb и др., Nature, 282:39 (1979)). Ген TRP1 обеспечивает селективный маркер для мутантного штамма дрожжей с отсутствием способности расти в среде при наличии триптофана, например ATCC № 44076 или PEP4-1 (Jones, 1977, Genetics, 1977, 85:12).

Присутствие участка TRP1 в геноме дрожжевой клетки-хозяина, таким образом, обеспечивает эффективную среду для определения трансформации в процессе культивирования при отсутствии триптофана. Аналогично, штаммы дрожжей, дефектные по Leu2, такие как ATCC 20622 или 38626, дополняются известными плазмидами, имеющими ген LEU2.

Кроме того, векторы, полученные из 1,6 мкм кольцевой плазмиды pKD1, можно использовать для трансформации дрожжей *Kluyveromyces*. Альтернативно, имеются сообщения об экспрессионной системе для получения рекомбинантного бычьего химозина на основе *K. lactis* в промышленном масштабе (Van den Berg, 1990, Bio/Technology, 8:135). Также раскрыты стабильные мультикопийные экспрессионные векторы для секреции зрелого человеческого сывороточного альбумина промышленными штаммами *Kluyveromyces* (Fleer и др., 1991, Bio/Technology, 9:968-975).

Экспрессионные и клонирующие векторы, как правило, содержат промотор, который распознается организмом-хозяином и является функционально связанным с молекулой нукleinовой кислоты, кодирующей анти-BAFF антитело или его полипептид. Подходящие промоторы для применения с прокариотическими хозяевами включают промотор phoA, промоторные системы β -лактамазы и лактозы, щелочной фосфатазы, триптофановую (trp) промоторную систему и гибридные промоторы, такие как lacZ-промотор. Другие известные бактериальные промоторы также являются приемлемыми. Промоторы для применения в бактериальных системах будут содержать последовательность Шайна-Дальгарно (S.D.), функционально связанную с ДНК, кодирующую анти-BAFF антитело.

Известны многочисленные промоторные последовательности эукариот. Фактически все гены эукариот содержат обогащенный АТ участок, расположенный примерно на 25-30 оснований слева от сайта начала транскрипция. Другой последовательностью, обнаруженной на 70-90 оснований слева от начала транскрипции многих генов, является область СНСААТ, где N может быть любым нуклеотидом. На 3'-конце большинства генов эукариот находится последовательность ААТААА, которая может быть сигнальной для добавления поли-А-хвоста к 3'-концу кодирующей последовательности. Все эти последовательности соответственно встраивают в эукариотические экспрессионные векторы.

Примеры подходящих промоторных последовательностей для применения в случае применения клеток дрожжей в качестве хозяев включают промоторы для 3-фосфоглицераткиназы или других гликолитических ферментов, таких как энолаза, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, гексокиназа, пируватдекарбоксилаза, фософруктокиназа, глюкозо-6-фосфатизомераза, 3'-фосфоглицератмутаза, пируваткиназа, триозефосфатизомераза, фосфоглюкозоизомераза и глюкокиназа.

Индукционные промоторы обладают дополнительным преимуществом транскрипции, которая контролируется условиями роста. Они включают промоторные участки алкогольдегидрогеназы 2, изоцитохрома С, кислой фосфатазы, ферментов, связанных с метаболизмом азота, металлотионеина, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и ферментов, ответственных за утилизацию мальтозы и галактозы. Подходящие векторы и промоторы для применения при экспрессии в дрожжах дополнительно описаны в EP73657. Дрожжевые энхансеры также преимущественно используются с дрожжевыми промоторами.

Транскрипция гуманизированного анти-BAFF антитела из векторов в клетках-хозяев млекопитающих регулируется, например, с помощью промоторов, полученных из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус птичьей оспы, адено-вирус (такой как адено-вирус 2), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус птичьей саркомы, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и наиболее предпочтительно обезьяний вирус 40 (SV40), гетерологичными промоторами млекопитающих, например промотором актина или промотором иммуноглобулина, а также промоторами белков теплового шока при условии, что такие промоторы совместимы с системами клеток-хозяев.

Ранние и поздние промоторы вируса SV40 соответствующим образом получают в виде фрагмента рестрикции SV40, который содержит точку начала репликации вируса SV40. Немедленно-ранний промотор цитомегаловируса человека соответственно получают из фрагмента рестрикции HindIII E. Система для экспрессии ДНК в клетках млекопитающих в качестве хозяев при использовании вируса папилломы крупного рогатого скота в качестве вектора раскрывается в патенте США № 4419446. Модификация данной системы раскрыта в патенте США № 4601978; см. также Reyes и др., 1982, Nature, 297:598-601, которые описывают экспрессию кДНК человеческого β -интерферона в мышиных клетках под контролем промотора тимидинкиназы вируса простого герпеса. Альтернативно, длинный концевой повтор вируса саркомы Рауса можно использовать в качестве промотора.

Другой полезный элемент, который может использоваться в рекомбинантном экспрессионном векторе, представляет собой энхансерную последовательность, которая используется для повышения транскрипции ДНК, кодирующей гуманизированное анти-BAFF антитело, раскрытое в данном описании, у высших эукариот. В настоящее время известно много энхансерных последовательностей генов млекопитающих (глобина, эластазы, альбумина, α -фетопротеина и инсулина). Однако, как правило, используют энхансер вируса эукариотических клеток. Примеры включают энхансер SV40 на поздней стороне точки начала репликации (100-270 п.н.), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы на поздней стороне точки начала репликации и энхансеры адено-вируса. В Yaniv, 1982, Nature 297:17-18 описаны энхансерные элементы для активации промоторов эукариотов. Энхансер может быть сплайси-

рован в вектор в положении 5' или 3' по отношению к кодирующей последовательности гуманизированного анти-BAFF антитела, но предпочтительно он располагается в 5'-сайте от промотора.

Экспрессионные векторы, которые используются в эукариотических клетках-хозяевах (дрожжей, грибов, насекомых, растений, животных, человека или ядерных клетках других многоклеточных организмов), также могут содержать последовательности, необходимые для терминации транскрипции и для стабилизации мРНК. Обычно такие последовательности размещаются с 5'-конца, в некоторых случаях с 3'-конца, нетранслируемых участков эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Данные участки содержат нуклеотидные сегменты, транскрибируемые в виде полиаденилированных фрагментов в нетранслируемом участке мРНК, кодирующей анти-BAFF антитело. Один полезный компонент терминации транскрипции представляет собой участок полиаденилирования бычьего гормона роста. См. WO 94/11026 и экспрессионный вектор, раскрытий в данном документе. Гуманизированные анти-BAFF антитела можно экспрессировать при использовании системы CHEF (см., например, патент США № 5888809, раскрытие которого включено в данное описание в качестве ссылки).

Приемлемые клетки-хозяева для клонирования или экспрессии ДНК в векторах, описанных в данном изобретении, представляют собой прокариотические, дрожжевые или высшие эукариотические клетки, описанные выше. Приемлемые прокариоты для этой цели включают эубактерии, такие как грамотрицательные или грамположительные микроорганизмы, 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 41P, раскрытый в DD 266710, опубликованном 12 апреля 1989 г.), Pseudomonas, такие как P. aeruginosa, и Streptomyces. Одним предпочтительным хозяином из E. coli для клонирования является E. coli 294 (ATCC 31 446), хотя приемлемыми являются также другие штаммы, такие как E. coli B, E. coli X1776 (ATCC 31537) и E. coli W3110 (ATCC 27325). В дополнении к прокариотам, эукариотические микроорганизмы, такие как нитчатые грибы или дрожжи, подходят в качестве хозяев для клонирования или экспрессии кодирующих гуманизированное анти-BAFF антитело векторов. Saccharomyces cerevisiae или обычные пекарские дрожжи представляют собой наиболее часто используемые хозяева среди низших эукариотических микроорганизмов-хозяев. Однако существует и пригодны ряд других родов, видов и штаммов, таких как Schizosaccharomyces pombe; хозяева на основе Kluyveromyces, например, такие как K. lactis, K. fragilis (ATCC 12424), K. bulgaricus (ATCC 16045), K. wickeramii (ATCC 24178), K. waltii (ATCC 56500), K. drosophilae (ATCC 36906), K. thermotolerans и K. marxianus; Yarrowia (EP 402226); Pichia pastoris (EP 183070); Candida; Trichoderma reesiae (EP 244234); Neurospora crassa; Schwanniomyces, такие как Schwanniomyces occidentalis, и нитчатые грибы, такие как, например, Neurospora, Penicillium, Tolypocladium и Aspergillus, такие как A. nidulans и A. niger.

Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированного гуманизированного анти-BAFF антитела получают из многоклеточных организмов. Примеры клеток позвоночных включают клетки растений и насекомых, в том числе, например, многочисленные штаммы и варианты бакуловирусов, и соответствующие пермиссивные клетки-хозяева из насекомых таких хозяев, как Spodoptera frugiperda (бабочка-совка), Aedes aegypti (комары), Aedes melanogaster (комары), Drosophila melanogaster (дрозофилы) и Bombyx mori (тутовый шелкопряд). Широко известны различные вирусные штаммы для трансфекции, например, вариант L-1 Autographa californica NPV и штамм Bm-5 Bombyx mori NPV, и такие вирусы могут использовать в данном изобретении, в частности, для трансфекции клеток Spodoptera frugiperda.

Также можно использовать культуры растительных клеток хлопчатника, кукурузы, картофеля, сои, петунии, томатов и табака в качестве хозяев.

В другом аспекте экспрессию гуманизированного анти-BAFF антитела осуществляют в клетках позвоночных. Размножение клеток позвоночных в культуре (культуре ткани) стало обычной процедурой, и соответствующие методы являются широко доступными. Примеры пригодных линий клеток-хозяев млекопитающих представляют собой линию клеток почек обезьяны, трансформированную с помощью SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линию человеческих эмбриональных клеток почки (293 или клетки 293, субклонированные для культивирования в суспензионной культуре, Graham и др., 1977, J. Gen. Virol., 36:59); клетки почек молодых хомячков (BHK, ATCC CCL 10); клетки яичников китайских хомяков/DHFR⁻ (CHO, Urlaub и др., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216, например, DG44); мышиные клетки Сертоли (TM4, Mather, 1980, Biol Reprod., 23:243-251); клетки почек обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почек африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL2); клетки почек собаки MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крысы (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легких человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Нер G2, HB 8065); клетки опухоли молочной железы мышей (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки TRI (Mather и др., 1982, Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68); клетки MRC 5; клетки FS4 и линия клеток человеческой гепатомы (Нер G2).

Клетки-хозяева трансформируют при использовании вышеописанных экспрессионных или клонирующих векторов для получения гуманизированного анти-BAFF антитела и культивируют в обычных питательных средах, модифицированных соответствующим образом для индукции промоторов, отбора

трансформантов или амплификации генов, кодирующих желаемые последовательности.

Клетки-хозяева, используемые для продукции гуманизированного анти-BAFF антитела, описанного в данном документе, можно культивировать в различных средах. Подходящими для культивирования клеток-хозяев являются различные промышленно доступные среды, такие как среда Ham's F10 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO), минимальная эссенциальная среда (MEM) (Sigma-Aldrich Co.), RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Co.) и среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко (DMEM) (Sigma-Aldrich Co.). Кроме того, можно использовать любую среду, описанную, например, Нам и др., 1979, Meth. Enz. 58:44; Barnes и др., 1980, Anal. Biohem., 102:255; в патентах США № 4767704; 4657866; 4927762; 4560655; 5122469; WO 90/103430 и WO 87/00195, в качестве культуральной среды для клеток-хозяев. Любая из указанных сред может быть дополнена, если это является необходимым, гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, кальций, магний и фосфат), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденоzin или тимидин), антибиотиками (такими как гентамицин), микроэлементами (определяются как неорганические соединения, которые обычно присутствуют в конечных концентрациях на микромолярном уровне), и глюкозой или равноценным источником энергии. Можно также включить другие добавки в подходящих концентрациях, которые известны специалистам в данной области техники. Условия культивирования, такие как температура, pH и т.п., ранее использовались для клеток-хозяев, выбранных для экспрессии, и они очевидны специалистам в данной области техники.

При использовании рекомбинантных методик антитело можно получить внутриклеточно, в периплазматическом пространстве или непосредственно секретировать в среду. Если антитело продуцируется внутри клетки, то в качестве первой стадии клетки могут быть разрушены для высвобождения белка. Дебрис из частичек либо клетки-хозяина, либо лизированных фрагментов удаляют, например, путем центрифугирования или ультрафильтрования. Carter и др., 1992, Bio/Technology, 10:163-167 описывают методику выделения антител, которые секретируются в периплазматическое пространство E. coli. Вкратце, клеточную массу размораживают в присутствии ацетата натрия (pH 3,5), ЭДТА и фенилметилсульфонилфторида (PMSF) в течение примерно 30 мин. Клеточный дебрис может быть удален путем центрифугирования. Когда антитело секретируется в среду, то супернатанты из таких экспрессионных систем обычно вначале концентрируют при использовании промышленно доступного фильтра для концентрирования белка, например, блок для ультрафильтрования Amicon или Millipore Pellicon. Можно вносить ингибитор протеазы, такой как PMSF, на любой из описанных выше стадий для ингибирования протеолиза, а также можно добавить антибиотики для предотвращения роста случайных контаминаントов. Можно использовать различные способы для выделения антитела из клетки-хозяина.

Композицию антитела, полученную из клеток, можно очистить при использовании, например, хроматографии на гидроксилапатите, гель-электрофореза,odializa и аффинной хроматографии, при этом аффинная хроматография является типичным методом очистки. Применимость протеина A в качестве аффинного лиганда зависит от вида и изотипа Fc-домена любого иммуноглобулина, который присутствует в антителе. Протеин A можно использовать для очистки антител на основе человеческих тяжелых цепей гамма 1, гамма 2 или гамма 4 (см., например, Lindmark и др., 1983, J. Immunol. Meth., 62:1-13). Протеин G рекомендуется использовать для всех мышиных изотипов и для человеческого гамма 3 (см., например, Guss и др., 1986, EMBO J., 5:1567-1575). Матрикс, с которым связан аффинный лиганд, наиболее часто представляет собой агарозу, но другие матриксы также являются доступными. Можно использовать механически стабильные матриксы, такие как стекло с контролируемыми порами или поли(стиролдивинил)бензол для обеспечения более быстрой скорости потока и уменьшения времени обработки по сравнению с теми же показателями при использовании агарозы. В тех случаях, когда антитело содержит домен C_{H3}, пригодной для очистки является смола Bakerbond ABX™ (J.T. Baker, Phillipsburg, NY). Существуют также другие методики для очистки белка, такие как фракционирование на колонке с ионно-обменной смолой, осаждение этанолом, ВЭЖХ с обратной фазой, хроматография на силикагеле, хроматография на гепарин-Сефароз™, хроматография на анион- или катионобменной смоле (такая как на колонке с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, SDS-ПАГЭ и осаждение сульфатом аммония, в зависимости от антитела, которое выделяют.

После проведения любой предварительной(ых) стадии(й) очистки смесь, содержащую антитело, которое представляет интерес, и примеси можно подвергать гидрофобной хроматографии в условиях с низким значением pH при использовании буфера для элюирования при значении pH в пределах примерно от 2,5 до 4,5, которую, как правило, осуществляют при низких концентрациях солей (например, приблизительно 0-0,25 M соли).

Нуклеиновые кислоты могут гибридизоваться в условиях низкой, средней и высокой жесткости, как определено в данном описании, с целой или участком (например, участком, кодирующим вариабельную область) нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 17 или комплементарной к ней последовательностью или SEQ ID NO: 20 или комплементарной к ней последовательностью. Гибридизующийся участок нукleinовой кислоты, которую подвергают гибридизации, как правило, имеет длину по меньшей мере 15 (например, 20, 25, 30 или 50) нуклеотидов. Гибридизующийся участок нукleinо-

вой кислоты, которую подвергают гибридизации, по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 98% идентичен последовательности участка или всей нуклеиновой кислоте, кодирующей полипептид анти-BAFF антитела (например, вариабельному участку тяжелой цепи или легкой цепи), или ее комплементарной последовательности. Нуклеиновые кислоты, которые подвергаются гибридизации, описанного в данном документе типа можно использовать, например, в виде зонда для клонирования, праймера, например праймера для ПЦР, или диагностического зонда.

Некоторые изолированные полинуклеотиды содержат последовательности, которые кодируют антитело или фрагмент антитела, имеющий аминокислотную последовательность любой из 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114 или 115 и, таким образом, являются по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичными полинуклеотидной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 234, 393, 394, 395, 396, 397 или 398.

Как используется в данном описании, термины "идентичные" или "процент идентичности" в отношении двух или более нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей относится к двум или более последовательностям или субпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент нуклеотидов или аминокислотных остатков, которые являются одинаковыми, при сравнении и выравнивании на максимальное соответствие. Для определения процента идентичности последовательности выравнивают в целях оптимального сравнения (например, можно вводить гэпы в последовательности первой аминокислотной или нуклеиново-кислотной последовательности для оптимального выравнивания со второй аминокислотной последовательностью или последовательностью нуклеиновой кислоты). Затем сравнивают аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих аминокислотных положениях или нуклеотидных положениях. В том случае, если положение в первой последовательности занято тем же аминокислотным остатком или нуклеотидом, что и соответствующее положение во второй последовательности, молекулы являются идентичными по данному положению. Процент идентичности между двумя последовательностями представляет собой функцию количества идентичных положений в двух последовательностях (т.е. % идентичности = # идентичных положений/общее # количества положений (например, перекрывающихся положений) × 100). Иногда две последовательности, которые сравнивают между собой, имеют одинаковую длину после введения гэпов в последовательности, там, где это является приемлемым (например, исключая дополнительную последовательность, выходящую за пределы последовательностей, которые подвергают сравнению). Например, когда сравнивают последовательности вариабельных участков, то не учитывают лидерные последовательности и/или последовательности константных участков. Для сравнения последовательностей между двумя последовательностями "соответствующий" CDR относится к CDR в том же положении в обеих последовательностях (например, CDR-H1 в каждой последовательности).

Определение процента идентичности или процента гомологии между двумя последовательностями можно осуществлять при использовании математического алгоритма. Предпочтительным, но не ограничивающим примером математического алгоритма, применяемого для сравнения двух последовательностей, является алгоритм Karlin и Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:2264-2268 в модификации Karlin и Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-5877. Такой алгоритм включают в программы NBLAST и XBLAST Altschul и др., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410. Поиск нуклеотидов BLAST можно осуществлять при использовании программы NBLAST, баллы = 100, длина слов = 12 с получением нуклеотидных последовательностей, гомологичных нукleinовой кислоте, кодирующей интересующий белок. Поиск белков BLAST можно осуществить при использовании программы XBLAST, баллы = 50, длина слов = 3 с получением аминокислотных последовательностей, гомологичных белку, который представляет интерес. Для получения сопоставлений с гэпами в целях сравнения можно использовать программу Gapped BLAST, описанную Altschul и др., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. Альтернативно, можно использовать PSI-BLAST для осуществления повторного поиска, с помощью которого можно определять дальние связи между молекулами (тот же источник). При использовании программ BLAST, Gapped BLAST и PSI-BLAST можно применить параметры по умолчанию для соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). Другим предпочтительным, но не ограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм Myers и Miller, CABIOS (1989). Такой алгоритм включают в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью программного обеспечения по сопоставлению последовательностей GCG. При использовании программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей можно использовать таблицу веса остатков PAM120, пенальти за длину гэпа 12 и пенальти за гэп 4. В данной области техники известны дополнительные алгоритмы для анализа последовательностей, и они включают ADVANCE и ADAM, описанные Torellis и Robotti, 1994, Comput. Appl. Biosci. 10:3-5; а также FASTA, описанную Pearson и Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:2444-8. В программе FASTA ktup представляет собой контрольную опцию, которая устанавливает чувствительность и скорость поиска. Если ktup = 2, то аналогичные области в двух последовательностях, которые сравниваются, устанавливают путем поиска пар сопоставляемых остатков; если ktup = 1, то исследуются единичные сопоставляемые аминокислоты. Зна-

чение ktip можно установить на уровне 2 или 1 для белковых последовательностей или от 1 до 6 для последовательностей ДНК. Значение по умолчанию, если не указано ktip, составляет 2 для белков и 6 для ДНК. Альтернативно, сопоставление белковых последовательностей можно осуществлять при использовании алгоритма CLUSTAL W, как описано Higgins и др., 1996, Methods Enzymol. 266:383-402.

Нетерапевтическое применение.

Антитела, описанные в данном документе, пригодны в качестве агентов для аффинной очистки. В данном способе антитела иммобилизуют на твердой фазе, такой как смола на основе протеина A, при использовании методов, хорошо известных в данной области техники. Иммобилизованное антитело подвергают взаимодействию с зондом, содержащим белок BAFF (или его фрагмент), для очистки и затем подложку промывают приемлемым растворителем, который будет удалять в основном все вещества в образце, за исключением BAFF белка, который связан с иммобилизованным антителом. В завершение, подложку промывают другим приемлемым растворителем, который будет высвобождать BAFF белок из антитела.

Анти-BAFF антитела, например гуманизированные анти-BAFF антитела, также полезны в диагностических анализах для определения и/или количественной оценки белка BAFF, например определения экспрессии BAFF в специфических клетках, тканях или сыворотке. Анти-BAFF антитела могут использоваться с диагностической целью, например для мониторинга развития или прогрессирования заболевания как часть процедуры клинического исследования, например, для определения эффективности данного способа лечения и/или режима предотвращения. Определение может быть улучшено путем слияния анти-BAFF антитела с веществом, способным к определению. Примеры способных к определению веществ включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, биолюминесцентные материалы, радиоактивные материалы, излучающие позитроны металлы при использовании различных способов позитронно-эмиссионной томографии и ионов нерадиоактивных парамагнитных металлов. В патенте США № 4741900 описано применение ионов металлов, которые могут быть конъюгированы с антителами для применения в способах диагностики.

Анти-BAFF антитела могут использоваться для диагностики расстройства, ассоциированного с BAFF (например, расстройства, которое характеризуется патологической экспрессией BAFF) или для определения, имеет ли субъект повышенный риск развития расстройства, ассоциированного с BAFF. Такие способы включают контакт биологического образца, полученного от субъекта, с антителом к BAFF и определение связывания антитела с BAFF. Под "биологическим образцом" понимают любой биологический образец, полученный от индивидуума, линии клеток, тканевой культуры или другого источника клеток, который потенциально экспрессирует BAFF. Способы получения биопсии тканей и жидкостей организма от млекопитающих хорошо известны в области техники.

В некоторых воплощениях способ может дополнительно включать сравнение уровня BAFF в образце пациента с контрольным образцом (например, образцом, полученным от субъекта, который не имеет расстройства, ассоциированного с BAFF) для определения, имеет ли пациент расстройство, ассоциированное с BAFF, или риск развития расстройства, ассоциированного с BAFF.

Предпочтительно, например, для диагностических целей метить антитело с помощью детектируемой группы. Многочисленны детектируемые метки доступны, включая радиоизотопы, флуоресцентные метки, метки ферментного субстрата и т.п. Метка может быть опосредованно конъюгирована с антителом при использовании различных известных методов. Например, антитело может быть конъюгировано с биотином, и любая из трех широких категорий меток, упомянутых выше, может быть конъюгирована с avidином, или наоборот. Биотин селективно связывается с avidином, и, таким образом, метка может быть конъюгирована с антителом таким опосредованным образом. В качестве альтернативы для достижения опосредованной конъюгации метки с антителом антитело может быть конъюгировано с небольшим гаптеном (например, дигоксином) и одну из различных типов меток, указанных выше, конъюгируют с антителом к гаптену (например, антителом к дигоксину). Таким образом, может быть достигнута опосредованная конъюгация метки с антителом.

Типичные радиоизотопные метки включают ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H и ^{131}I . Антитело можно пометить радиоизотопом при использовании методов, описанных, например, в Current Protocols in Immunology, тома 1 и 2, 1991, Coligen и др., Wiley-Interscience, New York, Pubs. Радиоактивность можно определять при использовании сцинтилляционного счетчика.

Типичные флуоресцентные метки включают метки, которые получены из хелатов редкоземельных металлов (хелаты европия) или флуоресцеина и его производных, родамина и его производных, дансила, лиссамина, фикоэритрина и тексасского красного. Флуоресцентные метки можно конъюгировать с антителом при использовании известных методов, например, таких, которые раскрыты в Current Protocols in Immunology, как указано выше. Флуоресценцию можно определять при использовании флуориметра.

В этой области техники существуют разнообразные хорошо описанные фермент-субстратные метки (см., например, патент США № 4275149), где приводится обзор по некоторым из них. Фермент, как правило, катализирует химическое изменение хромогенного субстрата, которое можно определить при использовании различных методик. Например, фермент может катализировать изменение цвета субстрата, которое можно определить спектрофотометрически. Альтернативно, фермент может изменить флуорес-

ценцию или хемилюминесценцию субстрата. Методики для количественного определения изменения флуоресценции описаны выше. Хемилюминесцентный субстрат становится электронно-возбужденным в результате химической реакции и затем может испускать свет, который можно определить, например, при использовании хемилюминометра, или может передавать энергию акцептору флуоресценции.

Примеры ферментных методов включают люциферазы, такие как люцифераза светлячков и бактериальная люцифераза (патент США № 4737456), люциферин, 2,3-дигидрофталазиндионы, малатдегидрогеназу, уреазу, пероксидазу, такую как пероксидаза хрена (HRPO), щелочную фосфатазу, β -галактозидазу, глюкоамилазу, лизоцим, сахаридоксидазы (такие как глюкозооксидаза, галактозооксидаза и глюкоза-6-фосфатдегидрогеназа), оксидазы гетероциклических соединений (такие как уриказа и ксантинооксидаза), лактопероксидазу, микропероксидазу и т.п. Методы конъюгирования ферментов с антителами описаны, например, у O'Sullivan и др., 1981, Methods for Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, в Methods in Enzym. (J. Langone и H. Van Vunakis, ред.), Academic Press, N.Y., 73:147-166.

Примеры комбинаций фермент-субстрат, например, включают пероксидазу хрена (HRPO) с перекисью водорода в качестве субстрата, где пероксидаза окисляет предшественник краски, такой как ортофенилендиамин (OPD) или 3,3',5,5'-тетраметилбензидин гидрохлорид (TMB); щелочную фосфатазу (AP) с паранитрофенилфосфатом в качестве хромогенного субстрата и β -D-галактозидазу (β -D-Gal) с хромогенным субстратом, таким как α -нитрофенил- β -D-галактозидаза, или флюорогенным субстратом, таким как 4-метиллонбелиферил- β -D-галактозидаза.

Специалистам в данной области техники известны многочисленные другие комбинации фермент-субстрат. Общий обзор по ним см. в патентах США № 4275149 и 4318980.

В другом варианте реализации гуманизированное анти-BAFF антитело используется немеченным и определяется с помощью меченого антитела, которое связывает гуманизированное анти-BAFF антитело.

Антитела можно использовать в любом известном тесте, таком как тесты конкурентного связывания, прямой и непрямой сэндвич-анализ и тесты иммунопреципитации(см., например, Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, стр. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

Антитело к BAFF или его антигенсвязывающий фрагмент могут использоваться для ингибиования связывания BAFF с одним из рецепторов BAFF. Такие способы включают введение анти-BAFF антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в клетку (например, клетку млекопитающего) или клеточное окружение, посредством чего ингибируется передача сигнала, опосредованная рецептором BAFF. Эти способы могут осуществляться *in vitro* или *in vivo*. Под "клеточным окружением" понимают ткань, среду, внеклеточный матрикс, который окружает клетку. Антитело к BAFF или его антигенсвязывающий фрагмент вводятся в клеточное окружение клетки таким образом, что антитело или фрагмент способен к связыванию с молекулами BAFF за пределами и в клеточном окружении, предотвращая, таким образом, связывание BAFF с его рецептором.

Диагностические наборы.

Антитело к BAFF может быть использовано в диагностическом наборе, т.е. упакованной комбинации реагентов, находящихся в заранее определенных количествах, с инструкциями по постановке диагностического анализа. В тех случаях, когда антитело метят ферментом, набор может включать субстраты и кофакторы, необходимые для фермента, такие как предшественник субстрата, который обеспечивает детектируемый хромофор или флуорофор. Кроме того, можно включать другие добавки, такие как стабилизаторы, буферы (например, блокирующий буфер или буфер для лизиса) и т.п. Относительные количества различных реагентов могут варьировать в широких пределах для обеспечения концентраций реагентов в растворе, которые существенно оптимизирует чувствительность теста. Реагенты могут находиться в виде сухих порошков, обычно в виде лиофилизованных порошков, включая наполнители, которые при растворении будут обеспечивать раствор реагента с соответствующей концентрацией.

Терапевтическое применение.

Гуманизированное анти-BAFF антитело, раскрытое в данном описании, пригодно для лечения различных нарушений, ассоциированных с экспрессией BAFF, как описано в данном документе. Способы лечения расстройства, ассоциированного с BAFF, включают введение терапевтически эффективного количества гуманизированного анти-BAFF антитела субъекту, который в этом нуждается.

Гуманизированное анти-BAFF антитело или агент можно вводить любыми подходящими способами, включая парентеральный, подкожный, внутрибрюшинный, ингаляционный и интраназальный, и, если желательно для местной иммуносупрессорной обработки, можно также вводить в область поражения (в том числе путем перфузии или иного контакта трансплантата с антителом перед трансплантацией). Гуманизированное анти-BAFF антитело или агент можно вводить, например, в виде инфузии или болюса. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, интраперитонеальное или подкожное введение. Кроме того, гуманизированное анти-BAFF антитело приемлемо для пульсирующей инфузии, в частности, со снижением доз антитела. Введение осуществляют с помощью инъекций, наиболее предпочтительно внутривенной или подкожной инъекций, частично в зависимости от того, является ли введение кратковременным или длительным.

Для профилактики или лечения заболевания соответствующая дозировка антитела будет зависеть от различных факторов, таких как тип заболевания, которое подвергается лечению, как определено выше, тяжести и течения заболевания, от того, вводят ли антитело для профилактических или терапевтических целей, предшествующего лечения, анамнеза у пациента и ответной реакции на антитело и с учетом мнения лечащего врача. Антитело соответственно вводят пациенту однократно или несколько раз.

В зависимости от типа и тяжести заболевания доза в пределах примерно от 1 до 20 мкг/кг (например, 0,1-15 мг/кг) антитела представляют собой начальную возможную дозу для введения пациенту, например в виде одного или более отдельных введений, или продолжительной инфузии. Типичная суточная доза может находиться в пределах примерно от 1 до 100 мг/кг в зависимости от факторов, указанных выше. При повторных введениях в течение нескольких дней или более, в зависимости от состояния, лечение продолжают до желаемого подавления симптомов заболевания. Однако пригодны и другие схемы введения. Результативность данного способа лечения легко подвергается мониторингу при использовании обычных методов и тестов. Примерная схема введения раскрыта в WO 94/04188.

Термин "супрессия" используется в том же контексте, что и "улучшение" и "облегчение" для понимания ослабления одной или более характеристик заболевания.

Композицию антитела рецептируют, дозируют и вводят согласно обычной медицинской практике. Учитываемые факторы в данном контексте включают конкретное расстройство, которое подвергается лечению, конкретного млекопитающего, которое подвергается лечению, клиническое состояние отдельного пациента, течение заболевания, место доставки средства, способ введения, схемы введения и другие факторы, известные практикующим врачам. Термин "терапевтически эффективное количество" антитела, которое вводится, будет регулироваться такими факторами, и оно представляет собой минимальное количество, необходимое для профилактики, ослабления или лечения расстройства, связанного с экспрессией BAFF.

Антитело может не быть, но необязательно, рецептировано с одним или несколькими агентами, используемыми в настоящее время для предотвращения или лечения рассматриваемого расстройства. Эффективное количество таких других агентов зависит от количества гуманизированного анти-BAFF антитела, присутствующего в композиции, типа расстройства или лечения и других факторов, указанных выше. Такие агенты, как правило, используются в тех же дозах при использовании тех же путей введения, как использовалось ранее, или приблизительно от 1 до 99% от используемых до настоящего времени дозировок.

Расстройства, ассоциированные с BAFF.

Анти-BAFF антитела или агенты могут быть использованы для лечения или профилактики иммунологических нарушений, характеризующихся патологической экспрессией BAFF. Анти-BAFF антитела или их антигенсвязывающие фрагменты также находят свое применение в лечении или профилактике респираторных расстройств, нарушений обмена веществ, например сахарного диабета, и некоторых видов рака. Лечение или профилактика иммунологического расстройства, респираторного расстройства, нарушения обмена веществ или рака в соответствии с описанными способами достигается путем введения субъекту, нуждающемуся в таком лечении или профилактике, эффективного количества анти-BAFF антитела или агента, в результате чего антитело снижает активность болезненного состояния, ассоциированного с BAFF.

Иммунологические заболевания, которые характеризуются неприемлемой активацией иммунных клеток и которые могут подвергаться лечению или предотвращаться с помощью способов, описанных в данном документе, могут быть классифицированы, например, по типу(ам) реакции(й) гиперчувствительности, лежащих в основе расстройства. Эти реакции, как правило, подразделяются на четыре типа: анафилактические реакции, цитотоксические (цитолитические) реакции, комплексные иммунные реакции или реакции опосредованного клетками иммунитета (СМИ) (также упоминаются как реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) (см., например, Fundamental Immunology, William E. Paul ред., Raven Press, N.Y., 3-е изд. 1993). Иммунологические заболевания включают воспалительные заболевания и аутоиммунные заболевания.

Конкретные примеры таких иммунологических заболеваний включают следующие: ревматоидный артрит, аутоиммунные демиелинизирующие заболевания (например, рассеянный склероз, аллергический энцефаломиелит), эндокринные офтальмопатии,uveoretинит, системную эритематозную волчанку, миастению, болезнь Грейва, гломерулонефрит, аутоиммунное гепатологическое расстройство, воспалительное заболевание кишечника (например, болезнь Крона или язвенный колит), анафилактический шок, аллергические реакции, синдром Шегрена, сахарный диабет типа I, первичный билиарный цирроз, гранулематоз Вегенера, фибромиалгия, полимиозит, дерматомиозит, воспалительный миозит, множественную эндокринную недостаточность, синдром Шмидта, аутоиммунныйuveит, болезнь Адисона, воспаление надпочечников, тиреоидит, тиреоидит Хашимото, аутоиммунное заболевание щитовидной железы, пернициозную анемию, атрофию желудка, хронический гепатит, волчаночный гепатит, атеросклероз, подострую кожную красную волчанку, гипопаратиреоз, синдром Дресслера, аутоиммунную тромбоцитопению, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуро, гемолитическую анемию, пузырчатку обыкновенную, пузырчатку, герпестiformный дерматит, алопецию Арката, пемфигоид, склеродермию, про-

грессирующий системный склероз, синдром CREST (кальциноз, синдром Рейно, дискинезию пищевода, склеродактилию и телеангиэктазию), мужское и женское аутоиммунное бесплодие, анкилозирующий спондилит, язвенный колит, смешанное заболевание соединительной ткани, нодозный полиартрит, системный некротизирующий васкулит, атопический дерматит, атопический ринит, синдром Гудпасчера, болезнь Чагаса, саркоидоз, ревматизм, астму, рецидивирующий аборт, антифосфолипидный синдром, экзогенный аллергический альвеолит, полиморфную эритему, посткардиотомический синдром, синдром Кушинга, аутоиммунный хронический активный гепатит, легочную аллергию птицеводов, токсический эпидермальный некролиз, синдром Альпорта, альвеолит, аллергический альвеолит, фиброзирующий альвеолит, интерстициальную болезнь легких, эритему, гангренозную пиодермию, реакцию на переливание крови, артерит Такаясу, ревматическую полимиалгию, височный артерит, шистосомоз, гигантоклеточный артерит, аскаридоз, аспергиллез, синдром Самптера, экзему, лимфоматозный грануломатоз, болезнь Бехчета, синдром Каплана, болезнь Кавасаки, лихорадку денге, энцефаломиелит, эндокардит, эндошикардиальный фиброз, эндофтальмит, эритему, псориаз, псориатический артрит, эритробластоз плода, эозинофильный фациит, синдром Шульмана, синдром Фелти, филяриоз, циклит, хронический циклит, гетерохронный циклит, циклит Фукса, IgA нефропатию, пурпуре Геноха, заболевание трансплантат против хозяина, васкулит, ассоциированный с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (ANCA), отторжение трансплантата, кардиомиопатию, синдром Итона-Ламберта, рецидивирующий полихондрит, криоглобулинемию, макроглобулинемию Вальденстрема, синдром Эванса, острый респираторный дистресс-синдром, воспаление легких, остеопороз, гиперчувствительность замедленного типа и аутоиммунную недостаточность половой железы.

В другом аспекте анти-BAFF антитела и агенты, как описывается в данном документе, также являются полезными для лечения различных видов рака, при которых BAFF экспрессируется на патологическом уровне.

Виды рака, экспрессирующие BAFF, которые могут подвергаться лечению с помощью описанных способов включают, например, лейкемию, такую как острый лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, острый миелолейкоз (например, миелобластный, промиелоцитарный, миеломоцитарный, моноцитарный лейкоз или эритролейкоз), хронический лейкоз, хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, болезнь Ослера; лимфому (например, болезнь Ходжкина или неходжкинскую болезнь); множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема; болезнь тяжелой цепи; солидные опухоли, такие как саркомы и карциномы (например, фибросаркома, микросаркома, липосаркома, хондросаркома, остеогенная саркома, остеосаркома, хордома, ангiosаркома, эндотелиосаркома, лимфангиосаркома, лимфангиоэндотелиосаркома синовиома, мезотелиома, опухоль Юинга, лимносаркома, рабдомиосаркома, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичников, рак предстательной железы, плоскоклеточный рак, базально-клеточный рак,adenокарцинома, карцинома потовых желез, карцинома сальных желез, папиллярная карцинома, папиллярная аденокарцинома, цистаденокарцинома, медуллярный рак, бронхогенный рак, почечно-клеточный рак, гепатома, карцинома желчного протока, хориокарцинома, семинома, эмбриональная карцинома, опухоль Вильмса, рак шейки матки, рак матки, опухоль яичка, рак легких, мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, рак мочевого пузыря, эпителиальная карцинома, глиома, астроцитома, медуллобластома, краиноФарингиома, эпендимома, пинеалома, гемангиобластома, невринома слухового нерва, олигодендроглиома, менингиома, меланома, нейробластома, ретинобластома, карцинома носоглотки или рак пищевода).

Фармацевтические композиции и их введение.

Композицию, содержащую агент, который связывает BAFF (например, анти-BAFF антитело), можно вводить субъекту, имеющему иммунологическое заболевание, или респираторное заболевание, или рак или риск развития такого. Агент, связывающий BAFF (например, анти-BAFF антитела), можно применять в производстве лекарственного средства для профилактики или лечения рака, респираторного заболевания или иммунологического заболевания. Термин "субъект", как используется в данном описании, означает любого пациента-млекопитающего, которому можно вводить агент, связывающий BAFF, включая, например, людей и млекопитающих, отличных от человека, таких как приматы, грызуны и собаки. Антитела или агенты можно вводить отдельно или в комбинации с другими композициями для профилактики или лечения иммунологического расстройства, респираторного расстройства или рака. Такие композиции, которые могут быть введены в комбинации с антителами или агентами, включают метотрексат (MTX) и иммуномодуляторы, например антитела или малые молекулы.

Примеры антител для применения в таких фармацевтических композициях представляют собой те, которые включают гуманизированное антитело или фрагмент антитела, содержащий аминокислотную последовательность вариабельного участка легкой цепи любой из последовательностей SEQ ID NO: 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96 или 97. Примеры антител для применения в таких фармацевтических композициях представляют собой те, которые включают гуманизированное антитело или фрагмент антитела, содержащий аминокислотную последовательность вариабельного участка тяжелой цепи любой из последовательностей SEQ ID NO: 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114 или 115.

Известны различные системы доставки, и их можно использовать для введения агента, который связывает BAFF. Способы введения включают, но не ограничиваются такими, внутрикожный, внутримышечный, внутриперitoneальный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Связывающий BAFF агент можно вводить, например, путем инфузии, в виде болюса или инъекции, а также можно вводить вместе с другими биологически активными агентами, такими как химиотерапевтические агенты. Введение может быть системным или местным. Композиции для таких инъекций могут быть приготовлены, например, в виде предварительно наполненных шприцев, которые могут вводиться один раз в две недели.

Композиции связывающего BAFF агента водятся путем инъекции, с помощью катетера, при использовании суппозитория или с помощью имплантата, где имплантат является пористым, непористым или гелеобразным материалом, включающим мембрану, такую как силиконовая мембрана или волокно. Как правило, при введении композиции используют вещества, которые не абсорбируют анти-BAFF антитело или агент.

Анти-BAFF антитело или агент можно вводить с помощью системы с контролируемым высвобождением, также можно использовать насос (см., например, Langer, 1990, Science, 249:1527-1533; Sefton, 1989, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwald и др., 1980, Surgery, 88:507; Saudek и др., 1989, N. Engl. J. Med., 321:574), полимерные материалы (см., например, Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise ред., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1974; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball ред., Wiley, New York, 1984; Ranger и Peppas, 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; см. также Levy и др., 1985, Science, 228:190; During и др., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard и др., 1989, J. Neurosurg. 81:105). Другие контролируемые системы высвобождения обсуждаются, например, у Langer, как описано выше.

Связывающий BAFF агент (например, анти-BAFF антитело) может вводиться в виде фармацевтических композиций, содержащих терапевтически эффективное количество связывающего агента и один или более фармацевтически совместимых ингредиентов. Обычно фармацевтические композиции для введения путем инъекции представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. В случае необходимости фармацевтическая композиция может также включать солюбилизирующий агент и местный анестетик, такой как лидокаин, для ослабления боли в месте введения. Как правило, ингредиенты используются либо по отдельности, либо смешиваются вместе в форме единичной дозы, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или не содержащего воду концентрата в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества активного вещества. В тех случаях, когда фармацевтический препарат предназначен для введения путем инфузии, его можно разлить по флаконам для инфузий, содержащим стерильную воду или физиологический раствор фармацевтической степени чистоты. В тех случаях, когда фармацевтический препарат вводят с помощью инъекции, можно обеспечить ампулу со стерильной водой для инъекций или физиологическим раствором таким образом, чтобы ингредиенты смешивались перед введением.

Кроме того, фармацевтическую композицию можно включить в фармацевтический набор, включающий (а) контейнер, содержащий агент, который связывает BAFF (например, анти-BAFF антитело) в лиофилизированной форме, и (б) второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый растворитель (например, стерильную воду) для инъекций. Фармацевтически приемлемый растворитель можно использовать для восстановления или разведения лиофилизированного анти-BAFF антитела или агента. Необходимо, такой(ие) контейнер(ы) может(могут) содержать примечания в форме, утвержденной официальным агентством, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических препаратов или биологических продуктов, где в примечании отражается разрешение агентства на производство, применение или продажу для введения людям.

Количество связывающего BAFF агента (например, анти-BAFF антитела), которое является эффективным для лечения или профилактики иммунологического расстройства или рака, может быть определено при использовании обычных клинических методов. Кроме того, необязательно можно использовать анализы в условиях *in vitro*, результаты которых могут помочь в установлении пределов оптимальных доз. Точная дозировка для применения в композиции также будет зависеть от пути введения и стадии развития иммунологического расстройства или рака, и она будет определяться с учетом мнения лечащего врача и обстоятельств, присущих каждому пациенту. Эффективные дозы могут быть экстраполированы из кривых зависимости доза-эффект, полученных по результатам опытов в условиях *in vitro* или на модельных тест-системах на животных.

Как правило, доза анти-BAFF антитела или связывающего BAFF агента, вводимая пациенту с иммунологическим расстройством или раком, обычно составляет примерно от 0,1 до примерно 100 мг/кг массы тела субъекта. Доза, вводимая субъекту, составляет от приблизительно 0,1 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 15 мг/кг или от приблизительно 1 до приблизительно 10 мг/кг массы тела субъекта.

Типичные дозы включают, но не ограничиваются такими, как от 1 нг/кг до 100 мг/кг. Иногда доза может составлять приблизительно 0,5 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 2 мг/кг, приблизи-

тельно 3 мг/кг, приблизительно 4 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 6 мг/кг, приблизительно 7 мг/кг, приблизительно 8 мг/кг, приблизительно 9 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 11 мг/кг, приблизительно 12 мг/кг, приблизительно 13 мг/кг, приблизительно 14 мг/кг, приблизительно 15 мг/кг или приблизительно 16 мг/кг. Дозу можно вводить, например, каждый день, раз в неделю (каждую неделю), два раза в неделю, три раза в неделю, четыре раза в неделю, пять раз в неделю, шесть раз в неделю, раз в две недели или месяц. Доза может составлять приблизительно 0,5 мг/кг/неделю, приблизительно 1 мг/кг/неделю, приблизительно 2 мг/кг/неделю, приблизительно 3 мг/кг/неделю, приблизительно 4 мг/кг/неделю, приблизительно 5 мг/кг/неделю, приблизительно 6 мг/кг/неделю, приблизительно 7 мг/кг/неделю, приблизительно 8 мг/кг/неделю, приблизительно 9 мг/кг/неделю, приблизительно 10 мг/кг/неделю, приблизительно 11 мг/кг/неделю, приблизительно 12 мг/кг/неделю, приблизительно 13 мг/кг/неделю, приблизительно 14 мг/кг/неделю, приблизительно 15 мг/кг/неделю или приблизительно 16 мг/кг/неделю. В некоторых вариантах осуществления пределы доз находятся приблизительно от 1 до приблизительно 15 мг/кг/неделю.

Фармацевтические композиции, содержащие агент, который связывает BAFF, могут дополнительно включать терапевтический агент, конъюгированный или неконъюгированный со связывающим агентом. Анти-BAFF антитело или агент, который связывает BAFF, можно вводить совместно с одним или более терапевтическими препаратами, применяемыми для лечения или профилактики иммунологических расстройств или рака. Такое комбинированное введение может иметь аддитивный или синергетический эффект в отношении параметров заболевания (например, тяжести проявления симптома, количества симптомов или частоты рецидивов).

В отношении схем лечения при комбинированном введении, анти-BAFF антитело или агент, который связывает BAFF, вводят совместно с терапевтическим препаратом Терапевтический агент можно вводить до или после введения анти-BAFF антитела или агента, который связывает BAFF, по крайней мере в течение от 1 ч до нескольких месяцев, например по меньшей мере в течение 1, 5, 12 ч, суток, неделей, месяца или трех месяцев до или после введения анти-BAFF антитела или агента, который связывает BAFF.

Изделия промышленного изготовления.

Изделие промышленного изготовления включает контейнер и этикетку. Подходящие контейнеры включают, например, бутыли, флаконы, шприцы и пробирки. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит композицию, которая эффективна для лечения состояния, и может иметь отверстие для стерильного доступа. Например, контейнер может представлять собой пакет или флакон для внутривенного введения, имеющий запирающее устройство с инъекционной иглой для подкожного введения. Активное вещество в композиции представляет собой гуманизированное анти-BAFF антитело. На этикетке контейнера или на этикетке, ассоциированной с ним, указывается, что композиция используется для лечения выбранного состояния. Изделия промышленного изготовления могут дополнительно включать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстrozы. Он может дополнительно включать другие вещества, присутствие которых желательно с коммерческой и потребительской точки зрения, включая другие буфера, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши в упаковку с инструкциями по применению.

Изобретение дополнительно описывается в приведенных ниже примерах, которые не предназначены для ограничения объема изобретения.

Примеры

Пример 1. Получение мышиных антител.

Исходные мышиные антитела в соответствии с настоящим изобретением были получены из гибридом мыши. Различные линии мышей иммунизировали несколько раз в течение периода до 6 месяцев. Иммунизацию мышей проводили при использовании приемлемых методов, известных в данной области техники. Например, для получения специфического иммунного ответа были использованы различные варианты рекомбинантного растворимого человеческого белка BAFF (аминокислоты 72-285), в том числе слитые белки человеческого BAFF для антигенных вакцинаций. Кроме того, некоторых мышей иммунизировали при использовании клеточной линии мышей, трансфицированной для экспрессии человеческого BAFF на поверхности клеток. Получение иммуногенных антигенов, включение адьювантов и способы иммунизации могут также осуществляться при использовании приемлемых методов, известных в данной области техники. Титры связывания сыворотки соответствовали требованиям, и лимфоциты мышисливали при использовании различных способов, известных в области техники. Скрининг гибридом проводили с получением специфических антител с высокой аффинностью.

Пример 2. Получение Fab гуманизированных антител к BAFF.

Мышьные исходные антитела 13J018 и 235F5 превращали в химерное антитело, которое состоит из мышиных вариабельных доменов 1A4 и 5B9 соответственно и человеческого константного домена IgG₁KO. Мышьные антитела 1A4 и 5B9 представлены в табл. 3 и 4, приведенных выше. IgG₁KO (knock out/нокаут) имеет две мутации путем замены (Leu234Ala и Leu235Ala), которые устраняют ADCC и CDC активность путем снижения эффекторных функций, таких как FcγR, и связывание комплемента. Вари-

бельные домены мышного и химерного антител являются идентичными. Химерные антитела получают для подтверждения функции антитела и для обеспечения подтверждения получения правильной последовательности. Если были идентифицированы правильные последовательности, то мышные вариабельные домены использовали для получения химерного Fab, в котором мышные остатки Vk и Vh находились в рамке с человеческими Ck и Ch1 остатками соответственно. Эти химерные Fab использовали в качестве маркерных молекул для скрининга гуманизированных Fab в процессе проведения скрининга. После этого мышные вариабельные участки (Vk и Vh) подвергали гуманизации при использовании процесса конструирования и скрининга. Получали библиотеку, где человеческие и мышные остатки подвергали вариации таким образом, что в любом данном положении мог находиться либо мышний, либо человеческий остаток. Такую библиотеку получали для аминокислот, которые различаются между человеческим эмбриональным и мышным антителом. Отбирали только те клонды, которые сохраняли функцию исходного мышного антитела при использовании химерного Fab. Репрезентативные гуманизированные вариабельные участки для антител 1A4 (13 J018) и 5B9 (235F5) представлены в табл. 5 и 6.

Пример 3. Получение рекомбинантного растворимого тримерного белка человеческого BAFF.

Человеческий BAFF (72-285) с N-терминальной гистидиновой меткой (SEQ ID: 398) подвергали транзиентной экспрессии в HEK293-6E клетках с помощью трансфекции на основе липидов. Через 96 ч после трансфекции осаждали клетки и экспрессию белка в супернатанте проверяли с помощью анти 6xHis вестерн-блоттинга ("6xHis" раскрывается как SEQ ID NO: 407). Очистку супернатантов завершали при использовании аффинной хроматографии на основе Ni-сефарозы. Очищенный His-BAFF отщепляли при использовании меченой His фурипротеазы для получения C-терминального фрагмента (аминокислоты 134-285 последовательности SEQ ID: 399). Для удаления фрагмента и выщепления видов N-терминального фрагмента из образца образец общего белка пропускали через Ni/NTA капельную колонку и собирали продукт, прошедший через колонку. Человеческий BAFF с отщепленным фурином очищали с помощью гель-фильтрационной хроматографии. Тримерное состояние подтверждали с помощью анализа на основе аналитического центрифугирования.

Последовательность для меченого His человеческого BAFF (72-285):

```
HHHHHHENLYFQGLQGDLASLRAELQGHAEKLPAGAGAPKAGLEEPAAVT
AGLKIFEPPAPGEGNNSQNSRNKRAVQGPEETVTQDCLQLIADSETPTIQKGSYTFV
PWLLSFKRGSALEEKENKILVKETGYFFIYGQVLYTDKTYAMGHLIQRKKVHVFGD
ELSLVTLFRCIQNMPETLPNNSCYSAGIAKLEEGDELQLAIPRENAQISLDGDVTFFG
ALKLL (SEQ ID NO: 399)
```

Последовательность для человеческого BAFF с отщепленным фурином (134-285):

```
AVQGPEETVTQDCLQLIADSETPTIQKGSYTFVPWLLSFKRGSALEEKENKILV
KETGYFFIYGVLYTDKTYAMGHLIQRKKVHVFGDELSQLTLFRCIQNMPETLPNNS
CYSAGIAKLEEGDELQLAIPRENAQISLDGDVTFFGALKLL (SEQ ID NO: 400)
```

Пример 4. Связывание и данные по аффинности для анти-BAFF антитела (относится к табл. 7 и 8).

Видимые аффинности связывания оценивали с помощью поверхностного плазмонного резонанса, где антитела захватывали при различных поверхностных плотностях на поверхности белка A/G. Тримерный растворимый BAFF при различных концентрациях пропускали над зараженным антителом. Кинетические параметры получали из глобальной подгонки всех поверхностных плотностей при использовании 1:1 модели Ленгмюра, данные представлены в табл. 7 и 8. Клинические ссылки на антитела (Эталон 1, включающая SEQ ID NO: 98 и 116, и Эталон 2, включающая SEQ ID NO: 99 и 117), использовали для сравнения.

Таблица 7
Функциональное ингибирирование и определение аффинности
анти-BAFF антител

Обозначение	Растворимый тримерный человеческий BAFF (52 пМ) Нейтрализация	Растворимый 60- мерный человеческий BAFF (4,2 пМ) Нейтрализация	mbBAFF Нейтрализация	Кажущаяся аффинность
	IC90 (пМ) n=2	IC90 (пМ) n=2	IC90 (пМ) n=1	K _D (пМ)**
Эталон 1	290,0	21,0	1052	<10
Эталон 2	1000,0	93% @ 67 нМ	151000	22.2
206G9A10	35,1	0,2	ND*	<10
227D5A7	56,8	0,8	ND	<10
250E5A11	97,5	0,3	ND	<10
235F5B9	107,4	2,2	1050	<10
227D3B11	127,7	1,6	ND	<10
217H12A7	129,4	13,4	ND	<10
210D9B8	155,6	14,0	ND	<10
214G4B7	296,1	3,0	ND	<10
13J018-1A4	304,8	23,0	4650	<10
218H1C10,1	370	41	ND	ND
218H1C10,2	370	ND	ND	ND

* ND: не определяли.

** На уровне границы определения.

Таблица 8
Функциональное ингибиование и определение аффинности
анти-BAFF антител

Обозначение	Растворимый тримерный человеческий BAFF (50 нМ) Нейтрализация		Растворимый 60-мерный человеческий BAFF (4 нМ) Нейтрализация		Эффективность нейтрализации mbBAFF	
	IC90 (пМ)	IC50 (пМ)	IC90 (пМ)	IC50 (пМ)	IC90 (пМ)	IC50 (пМ)
Эталон 1	290		102	40	1052	177
Эталон 2	1000		197985	38298	151000	2180
1002E8A6	824	107	79	29	2087	141
1070A6B7	677	43	56	20	1065	147
1094C4E6	1099	384	20925	4048	175030	2561
27121-3C7	326	55	33	11	ND*	ND
317H2A6	327	97	13	4	ND	ND
319B8A12	331	91	24	8	ND	ND
320F9C5	3107	110	24	10	ND	ND
323E9D1	312	148	23	6	ND	ND
332C1B12	457	99	40	12	ND	ND
344B9D9	352	102	32	11	ND	ND
348A6C1	329	110	29	9	ND	ND
352G11A10	444	99	90	21	ND	ND
363D4A10	473	21	23	9	ND	ND
381A6A9	240	44	42	17	ND	ND
384D5A2	765	42	44	15	ND	ND
394F5A5	433	16	29	7	ND	ND
409F12A11	390	31	44	16	ND	ND
418F6D9	491	38	154	27	ND	ND
431G5A3	336	28	100	21	ND	ND
435A6B3	294	23	26	10	ND	ND
436H2C12	408	27	37	15	ND	ND
436H6A9	266	26	27	10	ND	ND
440E9D12	259	31	31	11	ND	ND
441E6F2	293	43	37	16	ND	ND
443C11A12	309	33	30	13	ND	ND
444G1A10	284	25	35	12	ND	ND
450A2A7	602	36	130	24	ND	ND
456H11B7	299	32	37	12	ND	ND
537G7A6	329	28	39	13	ND	ND
551H4D6	257	110	1979	234	ND	ND
560H2A7	324	35	30	13	ND	ND
606H7F8	378	29	44	12	ND	ND

* ND: не определяли.

Пример 5. Функциональное ингибиование антител к растворимому тримерному человеческому BAFF (ссылки в табл. 7 и 8 и фиг. 1).

Антитела оценивали на их способность нейтрализовать активацию растворимого тримерного BAFF человеческого рецептора BAFF (BAFFR). Определенную концентрацию тримерного BAFF (52 нМ) смешивали в аналитической среде с клетками CHO, которые экспрессируют рекомбинантный человеческий BAFFR и систему репортера люциферазы, и стимулировали в течение 24 ч в термостате при 37°C, 5% CO₂ в присутствии варьирующих доз анти-BAFF антител. Экспрессию люциферазы оценивали в конце периода инкубации для количественного определения уровня достигнутой нейтрализации. Значения IC₅₀ и IC₉₀ определяли из графиков результатов ингибиции люциферазы при титровании антитела. Клинические эталонные антитела (Эталон 1 и Эталон 2) использовали для сравнения.

Пример 6. Получение рекомбинантного растворимого 60-мерного человеческого белка BAFF.

Стабильные клетки HEK293F, которые экспрессируют человеческий BAFF (134-285) с N-терминальной гистидиновой меткой (SEQ ID NO: 401), получали при использовании лентивируса на основе методик от Clontech (pLVX-IRES-ZsGreen). Линию лентивируса получали при использовании стандартных прописей от Clontech и клетки с высокой экспрессией обогащали путем отбора клеток, которые экспрессируют зеленый флуоресцентный белок. Клетки HEK293F, которые экспрессируют BAFF (134-285), инкубировали в течение 96 ч перед тем, как клетки осаждали, и проверяли экспрессию супернатанта при использовании анти-6xHis вестерн-блоттинга ("6xHis" раскрывается в SEQ ID NO: 407). Очистку супернатантов завершали при использовании аффинной хроматографии на основе Ni-сефарозы в качестве первого этапа. Аффинно очищенный BAFF (134-285) подвергали доочистке с помощью гель-

фильтрационной хроматографии при использовании смолы Сефакрил S-400. 60-мерный BAFF элюировали в качестве основного пика, который отделяли как из более крупных агрегатов, так и из видов с меньшим молекулярным весом. Молекулярный вес 60-мерного BAFF подтверждали с помощью аналитического ультрацентрифугирования и системы определения на основе эксклюзионной хроматографии с детектированием рассеивания лазерного излучения с кратными углами.

Последовательность для His-HuBAFF (134-285):

```
HHHHHHENLYFQGAVQGPEETVTQDCLQLIADSETPTIQKGSYTFVPWLLSKF
RGSALLEKENKILVKETGYFFIVGVLYTDKTYAMGHЛИQRKKVHVFGDELSLVTLF
RCIQNMPETLPNNSCYSAGIAKLEEGDELQLAIPRENAQISLDGDVTFFGALKLL
(SEQ ID NO: 401)
```

Пример 7. Функциональное ингибиование антител к растворимому 60-мерному человеческому BAFF (ссылки на табл. 7 и 8).

Антитела оценивали на их способность нейтрализовать активацию растворимого 60-мерного BAFF рецептора BAFF человека (BAFFR). Определенную концентрацию тримерного BAFF (4,2 пМ) смешивали в аналитической среде с клетками CHO, которые экспрессируют рекомбинантный человеческий BAFFR и систему репортера люциферазы, и стимулировали в течение 24 ч в термостате при 37°C, 5% CO₂ в присутствии варьирующих доз анти-BAFF антител. Экспрессию люциферазы оценивали в конце периода инкубации для количественного определения уровня достигнутой нейтрализации. Значения IC₅₀ и IC₉₀ определяли из графиков результатов ингибиции люциферазы при титровании антитела. Клинические эталонные антитела (Эталон 1 и Эталон 2) использовали для сравнения.

Пример 8. Функциональное ингибиование антител к mbBAFF (ссылки на табл. 7 и 8 и фиг. 2).

Антитела оценивали на их способность нейтрализовать активацию человеческого связанного с мембранный BAFF (mbBAFF) рецептора BAFF человека (BAFFR). Вкратце, получали клетки яичника хомячка (CHO), которые сверхэкспрессируют последовательность рекомбинантного полноразмерного человеческого BAFF, в качестве источника ассоциированного с клеткой BAFF (mbBAFF). mbBAFF-CHO фиксировали на параформальдегиде при комнатной температуре в течение 1 ч при периодическом перемешивании. Фиксированные клетки промывали и ресуспензировали в полной среде для инкубации при 37°C и 5% CO₂ в течение ночи. На следующий день фиксированные mbBAFF клетки смешивали в аналитической среде при соотношении 1:3 с клетками CHO, экспрессирующими рекомбинантный человеческий BAFFR и репортерную систему люциферазы, и стимулировали в течение 24 ч в термостате при 37°C, 5% CO₂ в присутствии варьирующих доз анти-BAFF антител. Экспрессию люциферазы оценивали в конце периода инкубации для количественного определения уровня достигнутой нейтрализации. Значения IC₅₀ и IC₉₀ определяли из графиков результатов ингибиции люциферазы при титровании антитела. Клинические эталонные антитела (Эталон 1 и Эталон 2) использовали для сравнения.

BAFF может существовать в трех формах: связанной с мембранный (mbBAFF) форме, форме растворимого тримерного BAFF и растворимого 60-мерного BAFF. Относительная важность различных форм BAFF при нормальной физиологии и при физиологии заболевания не является хорошо понятной. В предыдущих исследованиях растворимый BAFF подвергали обработке как одну структуру (Manetta и др., Journal of Inflammation Research, 2014:7, 121-131). В настоящем изобретении белки растворимого тримерного и 60-мерного BAFF человека, а также человеческий mbBAFF получали непосредственно и подтверждали их полимерное состояние. В функциональных анализах новые анти-BAFF антитела, описанные в данном документе, продемонстрировали профили, которые отличаются от таких для двух эталонных антител (Эталон 1 и Эталон 2) в отношении их способности нейтрализовать активацию растворимого тримерного человеческого BAFF, растворимого 60-мерного человеческого BAFF и связанного с мембранный человеческого BAFF рецептора BAFF человека (BAFFR).

Пример 9. Картирование epitопов антител.

Водород/дейтерий обменную масс-спектрометрию (HXMS) использовали для картирования epitопов из IgG антител, включающих вариабельные участки мыши (табл. 1 и 2), связывания с BAFF человека (положения субпоследовательности аминокислот 134-285, лиганд фактора некроза опухоли суперсемейства 13b, растворимая форма). Этот способ определяется чувствительностью водородов амидного скелета BAFF к обмену с D₂O. Эксперимент проводили при использовании BAFF, взятого отдельно, и BAFF с добавлением антител (с дейтерием). Таким образом, были идентифицированы участки последовательности BAFF, которые демонстрируют значительную защиту от обмена благодаря связыванию антител. Разрешение этого способа определяли путем переваривания при использовании пепсина. Эти пептиды, имеющие происхождение от BAFF, были идентифицированы с помощью дополнительных контрольных экспериментов при использовании образцов без обмена с применением стандартных точных масс и технологии ВЭЖХ MC/MC.

Использовали рекомбинантный человеческий BAFF (SEQ ID NO: 401). Для каждого образца белок + антитело эквимолярное количество BAFF (0,48 мг/мл) и антитела инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Использовали LEAP HDX-PAL систему для обработки всех образцов. При использовании LEAP автоматической системы (планшет для обмена выдерживали при 25°C, планшет для остановки реакции выдерживали при 4°C), 8 мкл образца прибавляли к 80 мкл обменного

буфера (10 мМ NaH₂PO₄ в D₂O, pH 7,4 или 10 мМ NaH₂PO₄ в H₂O, pH 7,4), перемешивали и оставляли для обмена в течение различных периодов времени (60, 120 и 240 с). 80 мкл этого раствора потом переносили в 80 мкл буфера для остановки реакции (4 М гуанидин-HCl, 0,5 М ТСЕР-HCl), перемешивали и выдерживали при 4°C в течение 60 с. 60 мкл этого раствора потом вводили и пропускали через колонку с пепсином (2,1×30 мм, Applied Biosystems) и помещали на Michrom C18 картридж-ловушку. Картридж промывали с помощью H₂O + 0,1% муравьиная кислота в течение 2 мин при скорости 100 мкл/мин. Затем переключали клапан и картридж элюировали на колонку Phenomenex Jupiter C5, 1,0×50 мм, 5 мкм, 300 Å. Мобильная фаза А представляла собой смесь вода/ацетонитрил/муравьиная кислота (99/1/0,1), а мобильная фаза В представляла собой смесь ацетонитрил/вода/муравьиная кислота (95/5/0,1). Скорость истечения составляла 100 мкл/мин. Градиент: 0 мин (0% В), 6 мин (40% В), 7 мин (40% В), 8 мин (90% В), 10 мин (90% В), 11 мин (0% В). LEAP система предварительно охлаждала мобильную фазу до ~4°C. Масс-спектрометрию осуществляли на Thermo Orbitrap Velos (0900865). Для МС экспериментов (используемых для количественной замены на D₂O буфер) использовали метод однократного сканирования от 300-2000 в течение 14 мин при разрешении 60000. Для МС/МС экспериментов (используется для ID пептидов с H₂O обменным буфером) использовали способ с 7 сканами в течение 14 мин. Первый скан представлял собой функционально полный скан от 300 до 2000 при разрешении 60000. Последующие сканы представляли собой CID сканы 6 наиболее интенсивных ионов из скана #1. Ширина изоляции составляла 1,5 ед. ат. вес, энергия столкновений составляла 35 В, а время активации было 30 мс.

Данные МС/МС подвергали анализу при использовании программы Proteome Discoverer 1.3 (Thermo Scientific). Вкратце, программа использует точный молекулярный вес иона предшественника и данные фрагментации для ионов продукта для подбора участков последовательности белка. Из этого анализа идентифицировали пептиды, полученные при использовании пепсина. МС данные анализировали с помощью собственной программы BI-SHAFT. Вкратце, вводили перечень пепсиновых пептидов, а также состояние их заряда, время удержания и белковую последовательность. Потом программа осуществляла поиск на данные, которые соответствовали критерию точной массы, и подсчитывали средний молекулярный вес распределения изотопов. Данные проверяли для выявления ошибок и, в случае если возникали ошибки, осуществляли вычисления вручную с помощью Microsoft Excel, когда это было необходимо. Области защиты идентифицировали путем сравнения контрольных данных (только белок) с экспериментальными данными (белок с антителом). Участки защиты свидетельствовали о связывании.

Участки последовательности BAFF, которые демонстрируют значительную защиту от обмена благодаря связыванию антител (тяжелая/легкая цепи, включающие SEQ ID NO: 49/67, 57/75, 41/58, 43/61, 45/63, 47/65, 51/69 и 53/71), были идентифицированы как аминокислотные остатки от 17 до 31 (SEQ ID NO: 403), от 68 до 90 (SEQ ID NO: 404), от 126 до 137 (SEQ ID NO: 405) и от 137 до 145 (SEQ ID NO: 406).

Таблица 9

Картирование последовательности эпитопов

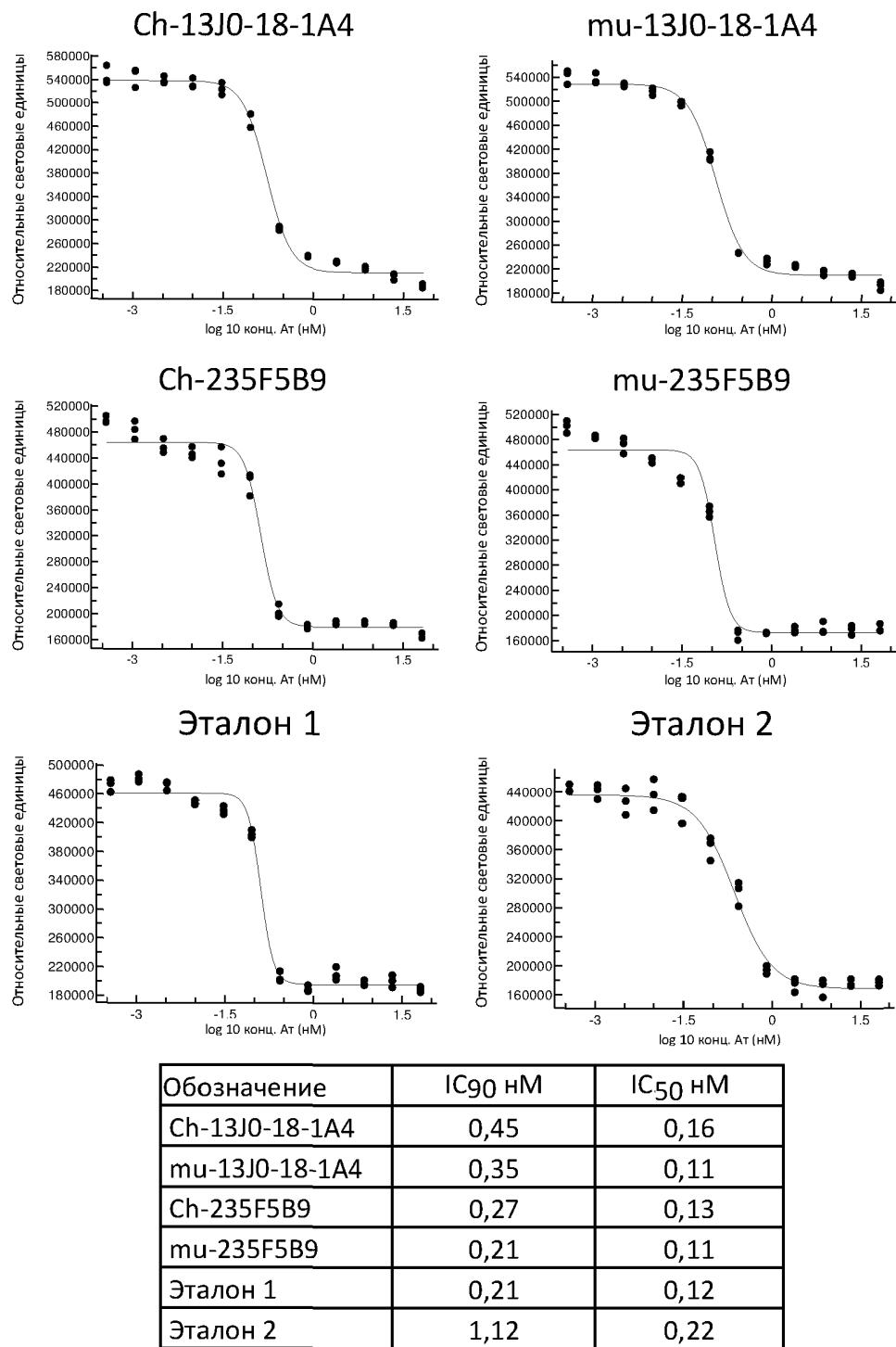
Наименование	Аминокислотная последовательность
Рекомбинантный человеческий BAFF	MAVQGPEETVTQDCLQLIADSETPTIQKGSYTFVPWLLSF KRGSALLEEKENKIVKETGYFFIYGQVLTYTDKTYAMGHLI QRKKVHVGDELSQLVTLFRCIQNMPETLPNNSCYSAGIAK LEEGDELQLAIPRENAQISLDGDVTFFGALKLL (SEQ ID NO: 402)
Аминокислотное положение 17-31*	IADSETPTIQKGSYT (SEQ ID NO: 403)
Аминокислотное положение 68-90*	YTDKTYAMGHLIQRKKVHVFGDE (SEQ ID NO: 404)
Аминокислотное положение 126-137*	LQLAIPRENAQI (SEQ ID NO: 405)
Аминокислотное положение 137-145*	ISLDGDVTF (SEQ ID NO: 406)

* Номер положения N-концевого метионина рекомбинантного человеческого BAFF не был учтен.

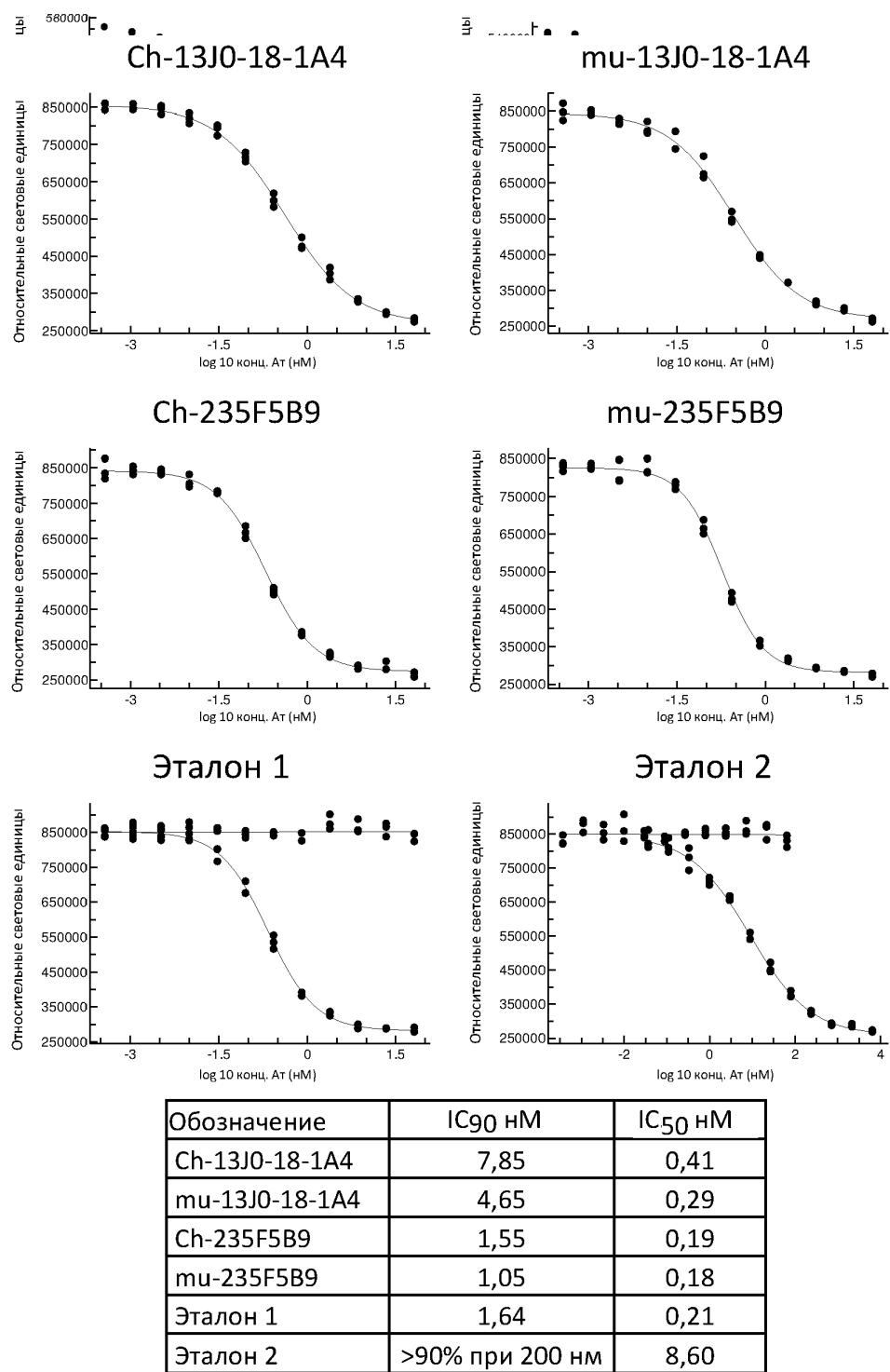
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула анти-BAFF антитела, которая включает вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1 SEQ ID NO: 5, CDR2 SEQ ID NO: 8 и CDR3 SEQ ID NO: 9; и вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1 SEQ ID NO: 28, CDR2 SEQ ID NO: 29 и CDR3 SEQ ID NO: 30.

2. Молекула анти-BAFF антитела, включающая вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO: 93 и вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 114.
3. Молекула анти-BAFF антитела по п.1, которая нейтрализует все три формы человеческого BAFF, включающие связанный с мембраной (mbBAFF), растворимый тримерный BAFF и растворимый 60-мерный BAFF.
4. Молекула анти-BAFF антитела по п.3, которая нейтрализует человеческий растворимый тримерный BAFF.
5. Молекула анти-BAFF антитела по п.3, которая нейтрализует человеческий связанный с мембранный BAFF.
6. Молекула анти-BAFF антитела по п.3, которая нейтрализует человеческий растворимый 60-мерный BAFF.
7. Молекула анти-BAFF антитела по п.1, которая включает:
 - а) гуманизированный вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR SEQ ID NO: 5, 8 и 9 и каркасные участки, имеющие аминокислотную последовательность, по крайней мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности каркасных участков вариабельного домена легкой цепи SEQ ID NO: 93; и
 - б) гуманизированный вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR SEQ ID NO: 28, 29 и 30 и каркасные участки, имеющие аминокислотную последовательность, по крайней мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности каркасных участков вариабельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 114.
8. Молекула анти-BAFF антитела по п.1, где антитело представляет собой моноклональное антитело.
9. Молекула анти-BAFF антитела по п.8, где моноклональное антитело представляет собой гуманизированное моноклональное антитело.
10. Фармацевтическая композиция для лечения субъекта, который имеет ассоциированное с BAFF расстройство, включающая молекулу анти-BAFF антитела по п.1 и фармацевтически приемлемый носитель.
11. Способ лечения субъекта, который имеет ассоциированное с BAFF расстройство, включающий введение такому субъекту молекулы анти-BAFF антитела по п.1 или фармацевтической композиции, включающей молекулу анти-BAFF антитела по п.1 и фармацевтически приемлемый носитель.
12. Способ лечения воспалительного заболевания, аутоиммунного заболевания, респираторного заболевания, метаболического расстройства или рака, включающий введение субъекту, который в этом нуждается, эффективного количества молекулы анти-BAFF антитела по п.1 или фармацевтической композиции, включающей молекулу анти-BAFF антитела по п.1 и фармацевтически приемлемый носитель.
13. Способ по п.12, где заболевание представляет собой системную красную волчанку, волчаночный нефрит или ревматоидный артрит.
14. Способ ингибирования связывания BAFF с одним или более рецепторами BAFF на клетке млекопитающего, где BAFF рецептор представляет собой BAFF-R (BR3), TACI (трансмембранный активатор и партнер кальциевого модулятора и лиганда циклофилина) и/или BCMA (антителен созревания В-клеток), включающий введение в клетку молекулы анти-BAFF антитела по п.1.
15. Изолированный полинуклеотид, включающий последовательность, кодирующую вариабельный участок легкой цепи с последовательностью SEQ ID NOS: 93 и вариабельный участок тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 114 антитела по пп.1-7.
16. Изолированный полинуклеотид по п.15, включающий последовательности SEQ ID NO: 394 и SEQ ID NO: 398.



Фиг. 1



Фиг. 2

