

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **027071**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2017.06.30

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) Номер заявки
201101571

(22) Дата подачи заявки
2010.04.23

(54) АНТИТЕЛО К ActRIIB И СОДЕРЖАЩАЯ ЕГО КОМПОЗИЦИЯ

(31) **61/173,004; 61/306,137**

(32) **2009.04.27; 2010.02.19**

(33) **US**

(43) **2012.05.30**

(86) **PCT/EP2010/055458**

(87) **WO 2010/125003 2010.11.04**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НОВАРТИС АГ (CH)

(72) Изобретатель:
**Бергер Катрин, Геррманн Тания (DE),
Лю Крис (CN), Шеппард Келли-
Энн (US), Трифилефф Эстелл (CH),
Урлинггер Штефани (DE)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н., Павловский А.Н. (RU)

(56) **US-B1-6656475**

LEE SE-JIN ET AL.: "Regulation of muscle growth by multiple ligands signaling through activin type II receptors". PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, 13 DEC 2005 LNKD- PUBMED: 16330774, vol. 102, no. 50, 13 December 2005 (2005-12-13), pages 18117-18122, XP002591054, ISSN: 0027-8424, e.g. page 18118, left-hand column, paragraph 1; page 18118, right-hand column, paragraph 1

US-A1-2005257278

WO-A2-2007109668

WO-A2-2008097541

BRADLEY L. ET AL.: "Myostatin as a therapeutic target for musculoskeletal disease", CMLS CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES, BIRKHÄUSER-VERLAG, BA, vol. 65, no. 14, 21 April 2008 (2008-04-21), pages 2119-2124, XP019619981, ISSN: 1420-9071, the whole document

(57) Изобретение относится к антителу к ActRIIB и его функциональному фрагменту. Изобретение также относится к выделенной полинуклеотидной последовательности, кодирующей антитело или его функциональный фрагмент, вектору, содержащему указанную полинуклеотидную последовательность, выделенной клетке-хозяину, продуцирующей указанное антитело, способу получения указанного антитела или функционального фрагмента и фармацевтической композиции для лечения мышечно-скелетного заболевания или нарушения, содержащей указанное антитело или его функциональный фрагмент.

B1**027071****027071****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к антителам к рецептору активина типа IIB (ActRIIB). В частности, оно относится к применению указанных антител для лечения мышечных нарушений, таких как мышечное истощение вследствие болезни или неупотребления.

Предпосылки создания изобретения

Активины представляют собой димерные факторы роста и дифференцировки, которые принадлежат к суперсемейству трансформирующего фактора роста бета (TGF-бета), включающему структурно родственные белки, участвующие в передаче сигналов. Активины передают сигнал через гетеродимерный комплекс рецепторных сериновых киназ, который включает по меньшей мере два типа I (I и IB) и два типа II (II и IIB, aka ACVR2A и ACVR2B) рецепторов. Все эти рецепторы представляют собой трансмембранные белки, состоящие из лигандсвязывающего внеклеточного домена с богатой цистеином областью, трансмембранного домена и цитоплазматического домена с предполагаемой серин/треониновой специфичностью. Рецепторы типа I играют решающее значение для передачи сигналов, а рецепторы типа II необходимы для связывания лигандов и для экспрессии рецепторов типа I. Рецепторы типа I и II образуют стабильный комплекс после связывания с лигандом, что приводит к фосфорилированию рецепторов типа I рецепторами типа II.

Активный рецептор IIB (ActRIIB) является рецептором миостатина. Взаимодействие между миостатином и этим рецептором регулирует ингибирование дифференцировки скелетной мышцы через Smad-зависимый путь. Таким образом, посредством ингибирования или предупреждения связывания миостатина с ActRIIB можно индуцировать образование скелетной мышцы.

Этот вопрос был изучен различными группами исследователей. Bogdanovich с соавторами (Nature, 420, 2002, с. 418-421) описали, что антитела к миостатину обладают способностью блокировать миостатин, что приводит к приросту мышечной массы на мышинной модели мышечной дистрофии Дюшенна. Bradley с соавторами (Cell Mol. Life Sci., 65, 2008, с. 2119-2124) обобщили сведения о различных известных подходах к модуляции взаимодействия миостатин/ActRIIB, включая применение вышеуказанных антител к миостатину, ингибирование высвобождение зрелого миостатина путем введения пропептида миостатина, введение фоллистатина для блокады рецептора миостатина, введение ингибиторов HDAC (гистондеацетилазы) для индукции производства фоллистатина, введение измененного пептида миостатина, который препятствует связыванию миостатина с рецептором, и введение растворимого рецептора "манка", "отвлекающего" миостатин.

Несмотря на возможность применения таких подходов в терапии, в настоящее время не имеется ни одного продукта, который можно было бы применять для лечения пациентов. Так, в настоящее время одна компания прекратила осуществление своего проекта, связанного с применением антитела к миостатину.

Таким образом, существует необходимость в разработке метода увеличения мышечной массы и силы мышц у пациента.

Описание изобретения

Установлено, что антитела к ActRIIB-рецептору могут препятствовать связыванию миостатина с рецептором, предупреждая тем самым ингибирование дифференцировки мышечных клеток посредством Smad-зависимого пути. Это приводит к увеличению мышечной массы и силы мышц у пациента.

Таким образом, одним из объектов изобретения является антитело к ActRIIB или функциональный белок, содержащий антигенсвязывающий участок указанного антитела. В одном из вариантов осуществления изобретения ActRIIB представляет собой человеческий ActRIIB. Полипептидная последовательность человеческого ActRIIB представлена в SEQ ID NO: 181 (AAC64515.1, GL3769443). В одном из вариантов осуществления изобретения антитело или функциональный белок получено/получен из организма млекопитающего, такого как человек или представители верблюжьих. Так, антитело может представлять собой химерное, человеческое или гуманизированное антитело. В конкретном варианте осуществления изобретения антитело к ActRIIB характеризуется наличием антигенсвязывающего участка, специфического для белка-мишени ActRIIB, и связывается с ActRIIB или фрагментом ActRIIB. Предпочтительно антитело пригодно для применения в терапии.

Настоящее изобретение относится к антителу к ActRIIB или его функциональному фрагменту, содержащим:

(a) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9; CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23; CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37; CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 51; CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 65; и CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 79, или

(b) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10; CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность,

тельность, представленную в SEQ ID NO: 24; CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38; CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52; CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 66; и CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 80.

Один из вариантов осуществления изобретения относится к антителу к ActRIIB или его функциональному фрагменту, содержащим:

(а) последовательность варибельной области легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 93, и последовательность варибельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 107; или

(б) последовательность варибельной области легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 94, и последовательность варибельной области тяжелой цепи, последовательность которой представлена в SEQ ID NO: 108.

Следующий вариант осуществления изобретения относится к антителу к ActRIIB или его функциональному фрагменту, содержащим:

(а) последовательность тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 146, и последовательность легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 141;

(б) последовательность тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 147, и последовательность легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 142.

Предпочтительным вариантом настоящего изобретения является антитело к ActRIIB согласно изобретению, относящееся к IgG1-изотипу.

Более предпочтительным вариантом заявленного изобретения является антитело к ActRIIB согласно изобретению, которое имеет измененную в результате мутации Fc-области эффекторную функцию, где указанная измененная эффекторная функция представляет собой "отключенную" активность антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

Настоящее изобретение также относится к выделенной полинуклеотидной последовательности, кодирующей антитело или его функциональный фрагмент согласно изобретению, содержащей:

(а) нуклеотидные последовательности, содержащие SEQ ID NO: 121 и 135, кодирующие варибельные домены легкой и тяжелой цепи, или

(б) нуклеотидные последовательности, содержащие SEQ ID NO: 122 и 136, кодирующие варибельные домены легкой и тяжелой цепи, или

(с) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 161 или 162, кодирующую легкую цепь, или

(д) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 166 или 167, кодирующую тяжелую цепь.

Настоящее изобретение также относится к клонирующему или экспрессионному вектору, содержащему одну или более выделенных полинуклеотидных последовательностей согласно изобретению.

Предпочтительным вариантом осуществления изобретения является вектор, где указанный вектор содержит нуклеотидные последовательности согласно изобретению или их фрагмент, кодирующий по меньшей мере один участок CDR.

Настоящее изобретение также относится к выделенной клетке-хозяину, продуцирующей антитело согласно изобретению, где указанная клетка-хозяин содержит один или более векторов согласно изобретению.

Дополнительно настоящее изобретение относится также к способу получения антитела или его функционального фрагмента согласно изобретению, содержащему культивирование клетки-хозяина согласно изобретению и выделение указанного антитела или его функционального фрагмента.

Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения мышечно-скелетного заболевания или нарушения, содержащей антитело или его функциональный фрагмент согласно изобретению.

В одном из вариантов осуществления изобретения фармацевтическая композиция также содержит фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

В следующем варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция может содержать также одно или более дополнительных действующих веществ, в которой указанное дополнительное действующее вещество выбрано из IGF-1, IGF-2 или вариантов IGF-1 или IGF-2, антитела к миостатину, пропептида миостатина, белка, "улавливающего" миостатина, который связывается с ActRIIB, но не активизирует его, агониста бета 2, агониста грелина, SARM, агонистов/миметиков GH или фоллистатина.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело кодируется плазмидным вектором pBW522 (DSM22873) или pBW524 (DSM22874).

В следующем варианте осуществления изобретения антитело к ActRIIB содержит (а) последовательность варибельной области легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 93, и (б) последовательность варибельной области тяжелой цепи, состоящую из аминокислот 1-115, содержащихся в последовательности тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 146.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитела, предлагаемые в изобретении, являются антагонистами ActRIIB и не обладают агонистической активностью или обладают слабой агонистической активностью. В другом варианте осуществления изобретения антитело или его функциональный фрагмент связывается с белком-мишенью ActRIIB и уменьшает связывание миостатина с ActRIIB до основного уровня. В одном из аспектов этого варианта осуществления изобретения антитело или его функциональный фрагмент снижает количество миостатина, связывающегося с ActRIIB. В другом аспекте этого варианта осуществления изобретения антитело или его функциональный фрагмент полностью препятствует связыванию миостатина с ActRIIB. В другом варианте осуществления изобретения антитело или его функциональный фрагмент ингибирует активацию Smad. В другом варианте осуществления изобретения антитело или его функциональный фрагмент ингибирует опосредуемое рецептором активина типа IIB индуцируемое миостатином ингибирование дифференцировки клеток скелетных мышц посредством Smad-зависимого пути.

Связывание можно определять с помощью одного или нескольких анализов, которые можно применять для оценки активности, такой как антагонистическая или агонистическая активность антитела. Предпочтительно анализы позволяют оценивать по меньшей мере один из видов активности антитела в отношении ActRIIB, включающих: ингибирование связывания миостатина с ActRIIB с помощью ELISA, ингибирование индуцируемой миостатином передачи сигналов (например, посредством анализа Smad-зависимого репортерного гена), ингибирование индуцируемого миостатином Smad-фосфорилирования (P-Smad-ELISA) и ингибирование индуцируемого миостатином ингибирования дифференцировки клеток скелетных мышц (например, посредством анализа креатинкиназы).

Одним из вариантов осуществления изобретения являются антитела, которые специфически связываются с миостатинсвязывающим участком (т.е. лигандсвязывающим доменом) ActRIIB. Указанный лигандсвязывающий домен состоит из аминокислот 19-134 SEQ ID NO: 181 и его последовательность обозначена в контексте настоящего описания как SEQ ID NO: 182.

В одном из вариантов осуществления изобретения связывание антител с ActRIIB характеризуется значением K_D , составляющим 100 нМ или менее, 10 нМ или менее, 1 нМ или менее. Предпочтительно связывание антител, предлагаемых в изобретении, с ActRIIB характеризуется аффинностью, составляющей 100 пМ или менее (т.е. 100, 50, 10, 1 пМ или менее). В одном из вариантов осуществления изобретения связывание антител с ActRIIB характеризуется аффинностью, составляющей от 10 до 20 пМ.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитела, предлагаемые в изобретении, не дают перекрестную реакцию с родственным ActRIIB белком и более предпочтительно не дают перекрестную реакцию с человеческим ActRIIA (NP_001607.1, GI:4501897).

В одном из вариантов осуществления изобретения антитела, предлагаемые в изобретении, связываются предпочтительно с ActRIIB, а не с ActRIIA. В одном из вариантов осуществления изобретения связывание антител, предлагаемых в изобретении, с ActRIIB характеризуется в 5 раз более высокой аффинностью, чем связывание с ActRIIA, более предпочтительно в 10 раз более высокой, еще более предпочтительно в 50 раз более высокой, еще более предпочтительно в 100 раз более высокой аффинностью.

В одном из вариантов осуществления изобретения связывание антител с ActRIIA характеризуется аффинностью 100 пМ или более (т.е. 250 пМ, 500 пМ, 1 нМ, 5 нМ или более).

В одном из вариантов осуществления изобретения антитела, предлагаемые в изобретении, относятся к IgG2-изотипу.

В другом варианте осуществления изобретения антитела, предлагаемые в изобретении, относятся к IgG1-изотипу. В другом варианте осуществления изобретения антитела, предлагаемые в изобретении, относятся к IgG1-изотипу и обладают измененной эффекторной функцией в результате созревания Fc-области. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная измененная эффекторная функция представляет собой пониженную ADCC- и CDC-активность. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная измененная эффекторная функция представляет собой "молчание" ADCC- и CDC-активности.

В другом родственном варианте осуществления изобретения антитела, предлагаемые в изобретении, представляют собой полностью человеческие или гуманизированные антитела IgG1-изотипа, которые не обладают ни антитело-обусловленной клеточно-зависимой цитотоксичностью (ADCC), ни CDC-активностью (комплементзависимая цитотоксичность) и связываются с областью ActRIIB, которая состоит из аминокислот 19-134 SEQ ID NO: 181.

В другом родственном варианте осуществления изобретения антитела, предлагаемые в изобретении, представляют собой полностью человеческие или гуманизированные антитела IgG1-изотипа, которые обладают пониженной антитело-обусловленной клеточно-зависимой цитотоксичностью (ADCC) или CDC-активностью и связываются с областью ActRIIB, которая состоит из аминокислот 19-134 SEQ ID NO: 181.

Настоящее изобретение относится к выделенным антителам, прежде всего человеческим или гуманизированным антителам, которые ингибируют связывание миостатина с ActRIIB и активируют дифференцировку клеток скелетных мышц *in vitro* и *in vivo*. В конкретных вариантах осуществления изобретения антитела, предлагаемые в изобретении, получают из конкретных последовательностей тяжелых и

легких цепей, и/или они содержат конкретные структурные особенности, такие как CDR-участки, которые содержат конкретные аминокислотные последовательности. Изобретение относится к выделенным антителам, способам получения указанных антител, иммуноконъюгатам и мультивалентным или мультиспецифическим молекулам, которые содержат указанные антитела, и к фармацевтическим композициям, которые содержат антитела, иммуноконъюгаты или биспецифические молекулы, предлагаемые в изобретении. Изобретение относится также к способам применения антител для ингибирования, т.е. антагонистического воздействия на функцию ActRIIB, для того, чтобы ингибировать активацию Smad и тем самым индуцировать дифференцировку клеток скелетных мышц, например, с целью лечения патологического нарушения.

Патологическое нарушение можно выбирать из мышечно-скелетного заболевания или нарушения, такого как мышечная атрофия. Известно много причин мышечной атрофии, в частности, она может возникать в результате лечения глюкокортикоидом, таким как кортизол, дексаметазон, бетаметазон, преднизон, метилпреднизолон или преднизолон. Мышечная атрофия может являться также результатом денервации вследствие травмы нерва или возникать в результате дегенеративной, метаболической или воспалительной невропатии (например, синдром Гийена-Барре, периферическая невропатия или экзогенное воздействие токсинов или лекарственных средств).

Кроме того, мышечная атрофия может являться результатом миопатии, такой как миотония; врожденная миопатия, включая немалиновую миопатию, мульти/мини-миопатию центральных стержней и миотубулярную (центронуклеарную) миопатию; митохондриальная миопатия; периодический семейный паралич (пароксизмальная семейная миоплегия); воспалительная миопатия; метаболическая миопатия, например, вызываемая болезнью накопления гликогена или липидов; дерматомиозита; полимиозита; миозита с включением телец; оссифицирующего миозита; рабдомиолиза (острый некроз скелетных мышц) и миоглобинурии.

Миопатия может вызываться синдромом мышечной дистрофии, например, дистрофия Дюшенна, Беккера, миотоническая, фасциальная лопаточно-плечевая, Эмери-Дрейфуса, окулофарингеальная, лопаточно-плечевая, пояса конечностей, Фукуямы, врожденная мышечная дистрофия или наследственная дистальная (поздняя) миопатия. Мышечно-скелетное заболевание может представлять собой также остеопороз, перелом кости, низкий рост или карликовость.

Кроме того, мышечная атрофия может являться результатом таких заболеваний, как болезнь моторных нейронов у взрослых, спинальная мышечная атрофия у детей, амиотрофический боковой склероз (ALS), юношеская спинальная мышечная атрофия, аутоиммунная моторная мультифокальная невропатия с блокадой проводимости, паралич в результате удара или повреждения спинного мозга, иммобилизация скелета вследствие травмы, пролонгированное пребывание в постели, добровольная пассивность, принудительная пассивность, метаболический стресс или недостаточность питательных веществ, рак, СПИД, голодание, нарушение щитовидной железы, диабет, доброкачественная врожденная гипотония, болезнь центрального стержня, связанное с ожогом повреждение, хроническое обструктивное легочное заболевание, болезни печени (такие, например, как фиброз, цирроз), сепсис, почечная недостаточность, застойная сердечная недостаточность, старение, полет в космос или пребывание в течение некоторого периода времени в условиях невесомости.

Примерами связанных с возрастом состояний, которые можно лечить, являются саркопения, атрофия кожи, мышечное истощение, атрофия головного мозга, атеросклероз, артериосклероз, эмфизема легкого, остеопороз, остеоартрит, иммунологическая недостаточность, высокое кровяное давление, деменции, болезнь Гентингтона, болезнь Альцгеймера, катаракты, возрастная дегенерация желтого пятна, рак предстательной железы, "удар", пониженная вероятность выживания, моральная неустойчивость, потеря памяти, морщины, нарушенная функция почек и возрастная потеря слуха; метаболические нарушения, включая диабет типа II, метаболический синдром, гиперглицемию и ожирение.

Другими состояниями, которые можно лечить с помощью антител, предлагаемых в изобретении, являются острое и/или хроническое заболевание почек или почечная недостаточность, фиброз или цирроз печени, рак, такой как рак молочной железы, болезнь Паркинсона; состояния, ассоциированные с гибелью нейронов, такие как ALS, атрофия головного мозга или деменция и анемия.

Другие состояния представляют собой кахексию, кахексию, ассоциированную с ревматоидным артритом, и кахексию, ассоциированную с раком.

В настоящее время известно очень небольшое количество надежных или эффективных терапий, разработанных для лечения указанных нарушений.

С учетом известных данных об участии активированных, связывающихся среди прочих рецепторов также и с ActRIIB (Werner и Alzheimer, Cytokine Growth Factors Rev, 17(3), 2006, с. 157-171), в развитии фиброза печени, почки и легкого и о роли миостатина, активированных или ActRIIB при различных видах рака (Tsuchida и др., Endo J, 55(1), 2008, с. 11-21) антитела, предлагаемые в изобретении, можно применять для лечения фиброза печени, почки и легкого и различных видов рака, таких, например, как (но, не ограничиваясь только ими) рабдомиосаркома, рак, вызывающий потерю костной ткани, гепатоклеточные карциномы, различные виды желудочно-кишечного рака.

Предупреждение может быть полным, например, можно достигать полного отсутствия связанного с

возрастом состояния или метаболического нарушения. Предупреждение может быть частичным, в результате чего вероятность появления связанного с возрастом состояния или метаболического нарушения у индивидуума уменьшается по сравнению с вероятностью его появления у индивидуума, который не получал антитело, предлагаемое в настоящем изобретении.

С целью лучшего понимания настоящего изобретения предварительно представлено определение некоторых понятий. Дополнительные понятия представлены в подробном описании изобретения.

Понятие "иммунный ответ" относится к действию (активности), например, лимфоцитов, антиген-презентирующих клеток, фагоцитов, гранулоцитов и растворимых макромолекул, которым обладают описанные выше клетки или печень (включая активность антител, цитокинов и комплемента), приводящему к избирательному повреждению, деструкции или элиминации из организма человека внедрившихся патогенов, клеток или тканей, зараженных патогенами, раковых клеток или в случае аутоиммунного или патологического воспаления, здоровых человеческих клеток или тканей.

Понятие "путь трансдукции сигнала" или "сигнальная активность" относится к биохимической причинной взаимосвязи, как правило, инициируемой белок-белковым взаимодействием, такой как связывание фактора роста с рецептором, приводящее к передаче сигнала от одной части клетки к другой части клетки. В целом, передача сигнала включает специфическое фосфорилирование одного или нескольких остатков тирозина, серина или треонина в одном или нескольких белках, участвующих в каскаде реакций, обуславливающих трансдукцию сигнала. Предпоследний процесс, как правило, включает связанные с ядром события, которые приводят к изменению генной экспрессии.

Понятие рецептор ActRIIB или Act IIB относится к человеческому ActRIIB, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 181 (AAC64515.1, GL3769443). Применяемые в исследовательских целях поликлональные и моноклональные антитела к ActRIIB известны в данной области, например, антитела, созданные на фирме R&D Systems®, шт. Миннесота, США. Терапевтические антитела к ActRIIB ранее не описаны. Естественно, можно получать антитела к ActRIIB из других видов и применять их для лечения патологических состояний у этих видов.

Понятие "антитело" в контексте настоящего описания включает полные антитела и любой антиген-связывающий фрагмент (т.е. "антигенсвязывающий участок") или их одноцепочечные варианты. Встречающееся в естественных условиях "антитело" представляет собой гликопротеин, который содержит по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой дисульфидными мостиками. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращенно обозначена в контексте настоящего описания как V_H) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов, т.е. CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращенно обозначена в контексте настоящего описания как V_L) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, т.е. CL. V_H - и V_L -области можно дополнительно подразделять на области гипервариабельности, которые называют гипервариабельными участками (CDR), которые перемежаются с более консервативными участками, которые называют каркасными участками (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, которые расположены в направлении от аминоконца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелых и легких цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, в том числе с различными клетками иммунной системы (например, эффекторными клетками) и первым компонентом (C1q) классической системы комплемента.

Понятие "антигенсвязывающий участок" антитела (или просто "антигенный центр" ("область детерминанты")) в контексте настоящего описания относится к полноразмерному антителу или одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, участком ActRIIB). Было установлено, что антигенсвязывающую функцию антитела можно осуществлять с помощью фрагментов полноразмерного антитела. Примерами связывающих фрагментов, подпадающих под понятие "антигенсвязывающий участок" антитела, являются Fab-фрагмент, одновалентный фрагмент, состоящий из V_L -, V_H -, C_L - и CH1-доменов; F(ab)₂-фрагмент, двухвалентный фрагмент, состоящий из двух Fab-фрагментов, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; Fd-фрагмент, состоящий из V_H - и CH1-доменов; Fv-фрагмент, состоящий из V_L - и V_H -доменов одного плеча антитела; dAb-фрагмент (Ward и др., Nature 341, 1989, с. 544-546), который состоит из V_H -домена; и выделенный гипервариабельный участок (CDR).

Кроме того, несмотря на то что два домена Fv-фрагмента, т.е. V_L и V_H , кодируются различными генами, их можно соединять с помощью методов рекомбинации синтетическим линкером, который позволяет создавать из них одну белковую цепь, в которой пара V_L - и V_H -областей формирует одновалентные молекулы (известные под названием одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv); см., например, Bird и др., Science 242, 1988, с. 423-426; и Huston и др., Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 1988, с. 5879-5883). Такие одноцепочечные антитела также подпадают под понятие "антигенсвязывающий участок" антитела. Указанные фрагменты антитела получают с помощью общепринятых методов, известных специалистам в данной области, и фрагменты подвергают скринингу в отношении возможности их применения, аналогичного

применению интактных антител.

Понятие "выделенное антитело" в контексте настоящего описания относится к антителу, которое практически свободно от других антител с другой антигенной специфичностью (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с ActRIIB, практически свободно от антител, которые специфически связываются с антигенами, отличными от ActRIIB). Однако выделенное антитело, которое специфически связывается с ActRIIB, может давать перекрестную реакцию с другими антигенами, такими как молекулы ActRIIB из других видов. Кроме того, выделенное антитело может быть практически свободно от другого клеточного материала и/или химических веществ.

Понятия "моноклональное антитело" или "композиция моноклонального антитела" в контексте настоящего описания относятся к препарату молекул антител одинакового молекулярного состава. Композиция моноклональных антител обладает одной специфичностью связывания и аффинностью в отношении конкретного эпитопа.

Понятие "человеческое антитело" в контексте настоящего описания относится к антителам, несущим вариабельные области, в которых как каркасные, так и CDR-участки выводятся из последовательностей, имеющих человеческое происхождение. Кроме того, если антитело содержит константную область, то константную область также выводят из таких человеческих последовательностей, например, последовательностей человеческой зародышевой линии, или мутантных версий последовательностей человеческой зародышевой линии или входящих в антитело последовательностей консенсусных каркасных участков, полученных путем анализа последовательностей человеческих каркасных участков, например, согласно методу, описанному у Knappik и др., J. Mol Biol 296, 2000, с. 57-86.

Человеческие антитела, предлагаемые в изобретении, могут включать также аминокислотные остатки, которые не кодируются человеческими последовательностями (например, в результате мутаций, интродуцированных путем случайного или сайтнаправленного мутагенеза *in vitro* или соматической мутации *in vivo*). Однако в контексте настоящего описания не подразумевается, что под понятие "человеческое антитело" попадают антитела, в которых последовательности CDR, выведенные из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мыши, трансплантированы в последовательности человеческих каркасных участков.

Понятие "человеческое моноклональное антитело" относится к антителам, обладающим одной специфичностью связывания, которые имеют вариабельные области, в которых как каркасные, так и CDR-участки выводятся из человеческих последовательностей. В одном из вариантов осуществления изобретения человеческие моноклональные антитела получают с помощью гибридомы, которая включает В-клетку, полученную из трансгенного животного кроме человека, например, трансгенной мыши, в геноме которого содержится трансген человеческой тяжелой цепи и трансген человеческой легкой цепи, слитую с иммортализованной клеткой.

Понятие "рекомбинантное человеческое антитело" в контексте настоящего описания относится ко всем человеческим антителам, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют с помощью методов рекомбинации, например, к антителам, выделенным из животного (например, мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным благодаря интродукции генов человеческого иммуноглобулина, или которые получены из гибридомы, к антителам, выделенным из клетки-хозяина, трансформированной с целью экспрессии человеческого антитела, например, с использованием трансфектомы, к антителам, выделенным из рекомбинантной комбинаторной библиотеки человеческих антител, и к антителам, полученным, экспрессированным, созданным или выделенным любыми другими путями, которые включают сплайсинг последовательностей всего гена человеческого иммуноглобулина или его части с другими последовательностями ДНК. Указанные рекомбинантные человеческие антитела несут вариабельные области, в которых каркасные и CDR-участки выводятся из последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. Однако в некоторых вариантах осуществления изобретения указанные рекомбинантные человеческие антитела можно подвергать мутагенезу *in vitro* (или, когда для получения человеческих последовательностей Ig используют трансгенных животных, то соматическому мутагенезу *in vivo*), и в результате аминокислотные последовательности V_H- и V_L-областей рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые хотя и выведены и являются родственными последовательностям V_H и V_L человеческой зародышевой линии, могут не встречаться в естественных условиях в популяции антител человеческой зародышевой линии *in vivo*.

В контексте настоящего описания понятие "изотип" относится к классу антител (например, IgM, IgE, IgG, такому как IgG1 или IgG2), который кодируется генами константной области тяжелой цепи.

Фразы "антитело, распознающее антиген" и "антитело, специфическое в отношении антигена" в контексте настоящего описания применяют взаимозаменяемо с понятием "антитело, которое связывается специфически с антигеном".

В контексте настоящего описания подразумевается, что антитело, которое "специфически связывается с полипептидом ActRIIB", представляет собой антитело, связывание которого с полипептидом человеческого ActRIIB характеризуется значением K_D, составляющим 100 нМ или менее, 10 нМ или менее, 1 нМ или менее. Антитело, которое "дает перекрестную реакцию с антигеном, отличным от ActRIIB", означает антитело, связывание которого с антигеном характеризуется значением K_D, составляющим 10×10⁶

⁹ М или менее, 5×10^{-9} М или менее или 2×10^{-9} М или менее. Антитело, которое "не дает перекрестную реакцию с конкретным антигеном", представляет собой антитело, связывание которого с указанным антигеном характеризуется значением K_D , составляющим $1,5 \times 10^{-8}$ М или более, или значением K_D , составляющим $5-10 \times 10^{-8}$ М или 1×10^{-7} М или более. В конкретных вариантах осуществления изобретения те антитела, которые не дают перекрестную реакцию с антигеном, характеризуются практически не выявляемым связыванием с этими белками при оценке с помощью стандартных анализов связывания. K_D можно определять с помощью биосенсорной системы, такой как система Biacore®, или с помощью уравновешивающего титрования растворов.

В контексте настоящего описания подразумевается, что понятие "антагонистическое антитело" относится к антителу, которое ингибирует индуцируемую ActRIIB сигнальную активность в присутствии миостатина. Примеры анализа, предназначенного для выявления этого, включают анализ ингибирования индуцируемой миостатином передачи сигналов (например, посредством анализа Smad-зависимого репортерного гена), ингибирования индуцируемого миостатином Smad-фосфорилирования (P-Smad-ELISA) и ингибирования индуцируемого миостатином ингибирования дифференцировки клеток скелетных мышц (например, посредством анализа креатинкиназы). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела ингибируют индуцируемую миостатином передачу сигналов, оцениваемую с помощью анализа Smad-зависимого репортерного гена, что характеризуется значением IC_{50} , составляющим 10 нМ или менее, 1 нМ или менее или 100 пМ или менее.

В контексте настоящего описания подразумевается, что понятие антитело "не обладающее агонистической активностью" относится к антителу, которое не обладает способностью значительно повышать опосредуемую ActRIIB сигнальную активность в отсутствии миостатина в основном на применении клеток анализе, таком как анализ ингибирования индуцированной миостатином передачи сигналов (например, посредством анализа Smad-зависимого репортерного гена), ингибирования индуцируемого миостатином Smad-фосфорилирования (P-Smad-ELISA) и ингибирования индуцируемого миостатином ингибирования дифференцировки клеток скелетных мышц (например, посредством анализа креатинкиназы). Указанные анализы описаны более подробно ниже в примерах.

Понятие " K_{assoc} " или " K_a " в контексте настоящего описания относится к скорости ассоциации взаимодействия конкретных антитела-антигена, а понятие " K_{dis} " или " K_d " в контексте настоящего описания относится к скорости диссоциации взаимодействия конкретных антитела-антигена. В контексте настоящего описания подразумевается, что понятие " K_D " относится к константе диссоциации, которую получают из соотношения K_d к K_a (т.е. K_d/K_a) и выражают в молярной концентрации (М). Значения K_D для антител можно определять с помощью методов, хорошо известных в данной области. Метод определения значения K_D антитела представляет собой метод, основанный на резонансе поверхностного плазмона, такой как метод, основанный на применении биосенсорной системы, такой как система Biacore®, или метод уравновешивающего титрования растворов (SET) (см. Friguet B. и др., J. Immunol Methods; 77(2), 1985, с. 305-319 и Hanel C. и др., Anal Biochem; 339(1), 2005, с. 182-184).

В контексте настоящего описания понятие "аффинность" относится к силе взаимодействия (степени сродства) между антителом и антигеном в одном из антигенсвязывающих центров антитела. В каждом антигенсвязывающем центре вариabельная область "плеча" антитела взаимодействует посредством слабых нековалентных сил с антигеном в многочисленных сайтах; чем больше взаимодействий, тем сильнее аффинность.

В контексте настоящего описания понятие "авидность" относится к информативному критерию общей стабильности или силе комплекса антитело-антиген. Она контролируется тремя основными факторами: аффинность антитела к эпитопу; валентность и антигена, и антитела; и структурная организация взаимодействующих участков. Эти три фактора определяют, в конце концов, специфичность антитела, то есть вероятность того, что конкретное антитело будет связываться именно с конкретным антигенным эпитопом.

В контексте настоящего описания понятие "ADCC-активность" или "антитело - обусловленная клеточно-зависимая цитотоксичность" относится к способности истощать человеческие В-клетки. ADCC-активность можно измерять с помощью анализов истощения человеческих В-клеток, известных в данной области.

Для получения обладающего большей авидностью зонда можно конструировать димерный конъюгат (две молекулы белка антитела сшиты с FACS-маркером), создавая тем самым обладающие низкой аффинностью взаимодействия (такие, которые имеют место в случае антитела зародышевой линии), что более легко выявлять с помощью FACS. Кроме того, другим средством повышения авидности связывания антигена является создание димеров, тримеров или мультимеров любой из представленных в настоящем описании конструкций антител к ActRIIB. Указанные мультимеры можно создавать путем ковалентного связывания индивидуальных молекул, например, путем имитации встречающегося в естественных условиях связывания C-конца с N-концом или путем имитации димеров антител, которые удерживаются вместе их константными областями. Связи, сконструированные на границе раздела Fc/Fc, могут быть ковалентными или нековалентными. Кроме того, в гибридах ActRIIB можно использовать в качестве партнеров димеризующие или мультимеризующие компоненты, отличные от Fc, для создания

ве партнеров димеризующие или мультимеризующие компоненты, отличные от Fc, для создания таких структур более высокого порядка. Например, можно применять мультимеризующие домены, такие как тримеризующий домен, описанный в WO 2004/039841, или пентамеризующий домен, описанный в WO 98/18943.

В контексте настоящего описания понятие "избирательное, селективное" касательно антитела относится к антителу, которое связывается с определенным полипептидом-мишенью, но не связывается с близкородственными полипептидами.

В контексте настоящего описания понятие "высокая аффинность" касательно антитела относится к антителу, для которого значение KD в отношении антигена-мишени составляет 1 нМ или менее.

В контексте настоящего описания понятие "индивидуум" относится к любому человеку или животному кроме человека.

Понятие "животное кроме человека" включает всех позвоночных животных, например млекопитающих и животных, не относящихся к млекопитающим, таких как приматы кроме человека, овцы, собаки, кошки, лошади, коровы, куры, амфибии, рептилии и т.д.

В контексте настоящего описания понятие "оптимизированная" означает, что нуклеотидная последовательность изменена с позиций кодирования аминокислотной последовательности с помощью кодонов, предпочтительных для продуктивной клетки или организма, как правило, эукариотической клетки, например, клетки *Pichia*, клетки *Trichoderma*, клетки яичника китайского хомячка (CHO) или клетки человека. Оптимизированную нуклеотидную последовательность создают так, чтобы она кодировала аминокислотную последовательность, идентичную или практически идентичную аминокислотной последовательности, кодируемой исходной нуклеотидной последовательностью, которую называют также "родительской" последовательностью. Оптимизированные последовательности, представленные в настоящем описании, создавали так, чтобы они имели кодоны, предпочтительные для клеток млекопитающего, таких как CHO; однако под объем изобретения подпадает также оптимизированная экспрессия этих последовательностей в других эукариотических клетках. Аминокислотные последовательности, кодируемые оптимизированными нуклеотидными последовательностями, также рассматриваются как оптимизированные.

Различные объекты изобретения описаны более подробно в приведенных ниже подразделах.

Стандартные анализы, предназначенные для оценки способности к связыванию антител с ActRIIB различных видов, известны в данной области и включают, например, ELISA, вестерн-блоттинг и РИА. Приемлемые анализы описаны подробно в примерах. Аффинность к связыванию антител можно определять также с помощью стандартных анализов, известных в данной области, таких как Biotac-анализ или метод уравнивающего титрования растворов. Методы, основанные на резонансе поверхностного плазмона, например, Biotac, позволяют определять кинетические характеристики связывания, что дает возможность рассчитывать аффинность связывания. Анализы, предназначенные для оценки воздействий антител на функциональную активность ActRIIB (например, связывание с рецептором, предупреждение или индукция пролиферации человеческих клеток В-клеток или производство IgG) описаны более подробно в примерах.

Таким образом, следует понимать, что антитело, которое "ингибирует" одну или несколько из видов активности ActRIIB (например, биохимическую, иммунохимическую, клеточную, физиологическую или другие виды биологической активности или т.п.), что определяют на основе методик, известных в данной области и представленных в настоящем описании, статистически значимо снижает конкретный вид активности по сравнению с вариантом без антитела (или, например, когда присутствует контрольное антитело с несоответствующей специфичностью). Антитело, которое ингибирует активность ActRIIB, вызывает статистически значимое снижение оцениваемого параметра по меньшей мере на 10, 50, 80 или 90%, и в конкретных вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, может ингибировать более чем на 95, 98 или 99% функциональную активность ActRIIB.

Понятия "перекрестно блокирует" "перекрестно блокированный" или "перекрестная блокада" в контексте настоящего описания используют взаимозаменяемо для обозначения способности антитела или другого связывающего агента оказывать интерферирующее воздействие на связывание других антител или связывающих агентов с ActRIIB, прежде всего с лигандсвязывающим доменом, при оценке с помощью стандартного анализа конкурентного связывания.

Способность или степень, с которой антитело или другой связывающий агент может оказывать интерферирующее воздействие на связывание другого антитела или связывающей молекулы с ActRIIB, и следовательно, могут ли они рассматриваться как перекрестно блокирующие согласно изобретению, можно определять с помощью стандартных анализов конкурентного связывания. Одним из приемлемых анализов предусматривает применение Biotac-технологии (например, с использованием устройства BIAcore (фирма Biotac, Уппсала, Швеция)), с помощью которого можно определять степень взаимодействий с использованием метода на основе резонанса поверхностного плазмона. Другим анализом, который можно применять для оценки перекрестной блокады, является подход на основе ELISA. Другим применяемым анализом является FACS-анализ, с помощью которого определяют конкуренцию различных антител за связывание с экспрессирующими ActRIIB клетками (что подробно описано в примерах).

Согласно изобретению перекрестно блокирующее антитело или другой связывающий агент, предлагаемый в изобретении, связывается с ActRIIB при оценке с помощью описанного BIAcore-анализа перекрестного связывания таким образом, что измеренное связывание комбинации (смеси) антител или связывающих агентов составляет от 80 до 0,1% (например, от 80 до 4%) от максимального теоретического связывания, в частности от 75 до 0,1% (например, от 75 до 4%) от максимального теоретического связывания, и более конкретно от 70 до 0,1% (например, от 70 до 4%), и более конкретно от 65 до 0,1% (например, от 65 до 4%) от максимального теоретического связывания (как описано выше) двух антител или связывающих агентов в комбинации.

Антитело рассматривается как перекрестно блокирующее при оценке с помощью ELISA-анализа, если тестируемое антитело обладает способностью вызывать снижение связывания антитела к ActRIIB с ActRIIB на 60-100%, в частности на 70-100%, и более конкретно на 80-100%, по сравнению с применяемыми в качестве положительного контроля лунками (т.е. включающими такое же антитело к ActRIIB и ActRIIB, но без "тестируемого" перекрестно блокирующего антитела). Примерами перекрестно блокирующих антител являются антитела, обозначенные в контексте настоящего описания как MOR08159 и MOR08213. Таким образом, в изобретении описаны антитела, которые перекрестно блокируют MOR08159 или MOR08213 за связывание с ActRIIB.

Рекомбинантные антитела.

Антитела, предлагаемые в изобретении, представляют собой человеческие рекомбинантные антитела, выделенные и структурно охарактеризованные согласно методам, описанным в примерах. Аминокислотные последовательности V_H выделенных антител, предлагаемых в изобретении, представлены в SEQ ID NO: 99-112. Аминокислотные последовательности V_L выделенных антител, предлагаемых в изобретении, представлены в SEQ ID NO: 85-98 соответственно. Примеры предпочтительных аминокислотных последовательностей тяжелых цепей полноразмерных антител, предлагаемых в изобретении, представлены в SEQ ID NO: 146-150 и 156-160. Примеры предпочтительных аминокислотных последовательностей легких цепей полноразмерных антител, предлагаемых в изобретении, представлены в SEQ ID NO: 141-145 и 151-155 соответственно. Другие антитела, предлагаемые в изобретении, содержат аминокислоты, измененные в результате мутаций, таких как делеция, инсерция или замена аминокислот, при этом их CDR-участки все еще идентичны по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 95, 97 или 99% CDR-участкам, представленным в указанных выше последовательностях. Некоторые варианты осуществления изобретения включают мутантные аминокислотные последовательности, в которых не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот изменены в результате мутаций, таких как делеция, инсерция или замена аминокислот, в CDR-участках по сравнению с CDR-участками, представленными в указанных выше последовательностях.

Кроме того, родительские нуклеотидные последовательности вариативной области тяжелой цепи представлены в SEQ ID NO: 127-140. Родительские нуклеотидные последовательности вариативной области легкой цепи представлены в SEQ ID NO: 161-165 и 171-175. Полноразмерные нуклеотидные последовательности легких цепей, оптимизированные для экспрессии в клетке млекопитающего, представлены в SEQ ID NO: 161-165 и 171-175. Полноразмерные нуклеотидные последовательности тяжелых цепей, оптимизированные для экспрессии в клетке млекопитающего, представлены в SEQ ID NO: 166-170 и 176-180. Другие антитела, предлагаемые в изобретении, включают мутантные аминокислотные или нуклеотидные последовательности, которые еще идентичны по меньшей мере на 60 или более (т.е. на 80, 90, 95, 97, 99% или более) описанным выше последовательностям. Некоторые варианты осуществления изобретения включают мутантные аминокислотные последовательности, в которых не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот изменены в результате мутаций, таких как делеция, инсерция или замена аминокислот, в вариативных областях по сравнению с вариативными областями, представленными в указанных выше последовательностях.

Поскольку каждое из указанных антител связывается с одним и тем же эпитопом и они являются потомками одного и того же родительского антитела, то последовательности V_H , V_L , последовательности полноразмерной легкой цепи и полноразмерной тяжелой цепи (нуклеотидные последовательности и аминокислотные последовательности) можно "смешивать и совмещать" для создания других анти-ActRIIB связывающих молекул, предлагаемых в изобретении. Связывание с ActRIIB указанных полученных в результате "смешения и совмещения" антител можно оценивать с помощью описанных выше и в примерах анализов связывания (например, ELISA). Когда эти цепи смешивают и совмещают, то последовательность V_H из конкретной пары V_H/V_L следует замещать структурно сходной последовательностью V_H . Аналогично этому, полноразмерную последовательность тяжелой цепи из конкретной пары полноразмерная последовательность тяжелой цепи/полноразмерная последовательность легкой цепи следует замещать структурно сходной полноразмерной последовательностью тяжелой цепи. Аналогично этому, последовательность V_L из конкретной пары V_H/V_L следует замещать структурно сходной последовательностью V_L . Аналогично этому, полноразмерную последовательность легкой цепи из конкретной пары полноразмерная последовательность тяжелой цепи/полноразмерная последовательность легкой цепи следует замещать структурно сходной полноразмерной последовательностью легкой цепи.

Таким образом, одним из объектов изобретения является выделенное рекомбинантное антитело к ActRIIB или его антигенсвязывающий участок, которое/который имеет: вариативную область тяжелой

цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 99-112; и вариабельную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 85-98.

Другим объектом изобретения является:

(I) выделенное рекомбинантное антитело к ActRIIB которое имеет: полноразмерную последовательность тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 99-112; и полноразмерную последовательность легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 85-98, или

(II) функциональный белок, содержащий его антигенсвязывающий участок.

Другим объектом изобретения является:

(I) выделенное рекомбинантное антитело к ActRIIB, которое имеет полноразмерную последовательность тяжелой цепи, кодируемую нуклеотидной последовательностью, которая была оптимизирована с целью экспрессии в клетке млекопитающего, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 127-140; и полноразмерную последовательность легкой цепи, кодируемую нуклеотидной последовательностью, которая была оптимизирована с целью экспрессии в клетке млекопитающего, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 113-126, или

(II) функциональный белок, содержащий его антигенсвязывающий участок. Аминокислотные последовательности CDR1 V_H антител представлены в SEQ ID NO: 1-14. Аминокислотные последовательности CDR2 V_H антител представлены в SEQ ID NO: 15-28. Аминокислотные последовательности CDR3 V_H антител представлены в SEQ ID NO: 29-42. Аминокислотные последовательности CDR1 V_L антител представлены в SEQ ID NO: 43-56. Аминокислотные последовательности CDR2 V_L антител представлены в SEQ ID NO: 57-70. Аминокислотные последовательности CDR3 V_L антител представлены в SEQ ID NO: 71-84. CDR-участки описывают с помощью системы Кэбота (Kabat E. A. и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е изд., изд-во U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, 1991). Альтернативный метод определения CDR-участков основан на другом подходе, разработанном Chothia (Chothia и др., Nature, 342, 1998, с. 877-883). Определение Chothia базируется на локализации петель структурных областей. Однако из-за изменения системы нумерации, применяемой у Chothia (см., например, <http://www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/abs/GeneralInfo.html> и <http://www.bioinf.org.uk/abs/>), эта система в настоящее время менее широко используется. Существуют другие системы определения CDR, и они также упоминаются в указанных двух сайтах в сети Интернет.

С учетом того, что каждое из указанных антител может связываться с ActRIIB и что специфичность связывания с антигеном обеспечивается прежде всего участками CDR1, 2 и 3, последовательности CDR1, 2 и 3 V_H и последовательности CDR1, 2 и 3 V_L можно "смешивать и совмещать" (т.е. можно смешивать и совмещать CDR из различных антител), при этом из каждого антитела, содержащего CDR1, 2 и 3 V_H и CDR1, 2 и 3 V_L, создают другие связывающиеся с ActRIIB молекулы, предлагаемые в изобретении. Связывание с ActRIIB таких полученных в результате "смешения и совмещения" антител можно оценивать с помощью описанных выше и в примерах анализов связывания (например, ELISA). Когда смешивают и совмещают CDR-последовательности V_H, то последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3 из конкретной последовательности V_H следует заменять структурно сходной(ыми) последовательность(ями) CDR. Аналогично этому, когда смешивают и совмещают CDR-последовательности V_L, то последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3 из конкретной последовательности V_L следует заменять структурно сходной(ыми) последовательность(ями) CDR. Обычному специалисту в данной области должно быть очевидно, что новые последовательности V_H и V_L можно создавать путем замены одной или нескольких последовательностей CDR-участков V_H и/или V_L на структурно сходные последовательности CDR, указанные в настоящем описании для моноклональных антител, предлагаемых в настоящем изобретении.

Выделенное рекомбинантное антитело к ActRIIB или его антигенсвязывающий участок содержит: CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 1-14; CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 15-28; CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 29-42; CDR1 вариабельной области легкой цепи, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 43-56; CDR2 вариабельной области легкой цепи, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 57-70; и CDR3 вариабельной области легкой цепи, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 71-84.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, который имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1; CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, который имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15; CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, который имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29; CDR1 вариабельной области легкой цепи, который имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43; CDR2 вариабельной области легкой цепи, который имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 57; и CDR3 вариабельной области легкой цепи, который имеет последовательность,

бельную область тяжелой цепи, последовательность которой представлена в SEQ ID NO: 94, и вариативную область легкой цепи, последовательность которой представлена в SEQ ID NO: 108; (л) вариативную область тяжелой цепи, последовательность которой представлена в SEQ ID NO: 95, и вариативную область легкой цепи, последовательность которой представлена в SEQ ID NO: 109; (м) вариативную область тяжелой цепи, последовательность которой представлена в SEQ ID NO: 96, и вариативную область легкой цепи, последовательность которой представлена в SEQ ID NO: 110; (н) вариативную область тяжелой цепи, последовательность которой представлена в SEQ ID NO: 97, и вариативную область легкой цепи, последовательность которой представлена в SEQ ID NO: 111; или (о) вариативную область тяжелой цепи, последовательность которой представлена в SEQ ID NO: 98, и вариативную область легкой цепи, последовательность которой представлена в SEQ ID NO: 112.

Одним из вариантов осуществления изобретения является антитело, которое содержит (а) последовательность вариативной области тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 146, и последовательность вариативной области легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 141; (б) последовательность вариативной области тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 147, и последовательность вариативной области легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 142; (в) последовательность вариативной области тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 148, и последовательность вариативной области легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 143; (г) последовательность вариативной области тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 149, и последовательность вариативной области легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 144; (д) последовательность вариативной области тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 150, и последовательность вариативной области легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 145; (е) последовательность вариативной области тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 156, и последовательность вариативной области легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 151; (ж) последовательность вариативной области тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 157, и последовательность вариативной области легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 152; (з) последовательность вариативной области тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 158, и последовательность вариативной области легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 153; (и) последовательность вариативной области тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 159, и последовательность вариативной области легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 154; или (к) последовательность вариативной области тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 160, и последовательность вариативной области легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 155.

Согласно настоящему описанию человеческое антитело содержит вариативные области тяжелой или легкой цепи или полноразмерные тяжелые или легкие цепи, которые "являются продуктом" или "выведены из" последовательности конкретной зародышевой линии, если вариативные области или полноразмерные цепи антитела получают из системы, основанной на применении генов иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. Для создания таких систем осуществляют иммунизацию трансгенной мыши, несущей человеческие гены иммуноглобулинов, с использованием представляющего интерес антигена или осуществляют скрининг фаговой дисплейной библиотеки человеческих генов иммуноглобулинов с использованием представляющего интерес антигена. Человеческое антитело, которое "является продуктом" или "выведено из" последовательности иммуноглобулина человеческой зародышевой линии, можно идентифицировать индивидуально путем сравнения аминокислотной последовательности человеческого антитела и аминокислотных последовательностей иммуноглобулинов человеческой зародышевой линии и отбора последовательности иммуноглобулина человеческой зародышевой линии, которая является наиболее близкой по последовательности (т.е. имеет самый высокий % идентичности) с последовательностью человеческого антитела. Человеческое антитело, которое "является продуктом" или "выведено из" конкретной последовательности иммуноглобулина человеческой зародышевой линии, может иметь различия в аминокислотах по сравнению с последовательностью зародышевой линии, например, в результате встречающихся в естественных условиях соматических мутаций или преднамеренной интродукции сайтнаправленной мутации. Однако аминокислотная последовательность отобранного человеческого антитела, как правило, по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, кодируемой геном человеческого иммуноглобулина зародышевой линии, и содержит аминокислотные остатки, которые свидетельствуют о том, что человеческое антитело является человеческим, при сравнении с аминокислотными последовательностями иммуноглобулинов зародышевых линий других видов (например, последовательности мышинной зародышевой линии). В определенных случаях аминокислотная последовательность человеческого антитела может быть по меньшей мере на 80, 90% или даже по меньшей мере на 95%, или даже по меньшей мере на 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии. Как правило, человеческое антитело, выведенное из конкретной последовательности человеческой зародышевой линии, должно иметь не более 10 аминокислотных различий по сравнению с аминокислотной последовательностью, кодируемой геном иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. В определенных случаях человеческое антитело может иметь не более 5 или даже не более 4, 3, 2 или 1 аминокислотного различия по сравнению с аминокислотной последовательностью, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, представляет собой антитело, кодируемое pBW522 или pBW524 (депонировано в DSMZ, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Брауншвейг, Германия 18 августа 2009 г. под регистрационными номерами DSM22873 и DSM22874 соответственно).

Гомологичные антитела.

Согласно еще одному варианту осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, имеет аминокислотные последовательности полноразмерных тяжелых и легких цепей; нуклеотидные последовательности полноразмерных тяжелых и легких цепей; нуклеотидные последовательности переменных областей тяжелых и легких цепей или аминокислотные последовательности переменных областей тяжелых и легких цепей, которые гомологичны аминокислотным и нуклеотидным последовательностям представленных в настоящем описании антител, и при этом антитела сохраняют требуемые функциональные свойства антител к ActRIIB, предлагаемых в изобретении.

Например, в изобретении предложено выделенное рекомбинантное антитело к ActRIIB (или функциональный белок, содержащий его антигенсвязывающий участок), которое содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где: переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% (предпочтительно по меньшей мере на 95, 97 или 99%) идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 99-112; переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% (предпочтительно по меньшей мере на 95, 97 или 99%) идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 85-98, и антитело обладает по меньшей мере одним из следующих функциональных свойств: (I) оно ингибирует связывание миостатина *in vitro* или *in vivo* и/или (II) снижает ингибирование мышечной дифференцировки посредством Smad-зависимого пути.

В другом примере в изобретении предложено выделенное рекомбинантное антитело к ActRIIB (или функциональный белок, содержащий его антигенсвязывающий участок), которое содержит полноразмерную тяжелую цепь и полноразмерную легкую цепь, где: полноразмерная тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% (предпочтительно по меньшей мере на 95, 97 или 99%) идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 146-150 и 156-160; полноразмерная легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% (предпочтительно по меньшей мере на 95, 97 или 99%) идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 141-145 и 151-155; и антитело обладает по меньшей мере одним из следующих функциональных свойств: (I) оно ингибирует связывание миостатина *in vitro* или *in vivo* и/или (II) снижает ингибирование мышечной дифференцировки посредством Smad-зависимого пути. Предпочтительно указанное антитело связывается с лигандсвязывающим доменом ActRIIB.

В другом примере в изобретении предложено выделенное рекомбинантное антитело к ActRIIB (или функциональный белок, содержащий его антигенсвязывающий участок), которое содержит полноразмерную тяжелую цепь и полноразмерную легкую цепь, где: полноразмерная тяжелая цепь кодируется нуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% (предпочтительно по меньшей мере на 95, 97 или 99%) идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 166-170 и 176-180; полноразмерная легкая цепь кодируется нуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% (предпочтительно по меньшей мере на 95, 97 или 99%) идентична нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 161-165 и 171-175; и антитело обладает по меньшей мере одним из следующих функциональных свойств: (I) оно ингибирует связывание миостатина *in vitro* или *in vivo* и/или (II) снижает ингибирование мышечной дифференцировки посредством Smad-зависимого пути. Предпочтительно указанное антитело связывается с лигандсвязывающим доменом ActRIIB.

В различных вариантах осуществления изобретения антитело может обладать одним или несколькими, двумя или более или тремя из описанных выше функциональных свойств. Антитело может представлять собой, например, человеческое антитело, гуманизированное антитело или химерное антитело. Предпочтительно антитело представляет собой полностью человеческое антитело IgG1-изотипа.

В других вариантах осуществления изобретения аминокислотные последовательности V_H и/или V_L могут быть на 80, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны указанным выше последовательностям. В других вариантах осуществления изобретения аминокислотные последовательности V_H и/или V_L могут быть идентичны за исключением аминокислотной замены, затрагивающей не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных положений. Антитело, у которого V_H - и V_L -области обладают высоким уровнем (т.е. 80% или выше) идентичности с V_H - и V_L -областями, представленными в SEQ ID NO: 99-112 и SEQ ID NO: 85-98 соответственно, можно получать путем мутагенеза (например, сайтнаправленного или опосредуемого ПЦР мутагенеза) молекул нуклеиновых кислот, представленных в SEQ ID NO: 127-140 и 113-126 соответственно, с последующим тестированием кодируемого измененного антитела в отношении сохранения

функции (т.е. перечисленных выше функций) с помощью приведенных в настоящем описании функциональных анализов.

В других вариантах осуществления изобретения аминокислотные последовательности полноразмерной тяжелой цепи и/или полноразмерной легкой цепи могут быть на 80, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны указанным выше последовательностям. Антитело, у которого полноразмерная тяжелая цепь и полноразмерная легкая цепь обладают высоким уровнем (т.е. 80% или выше) гомологии с полноразмерными тяжелыми цепями, представленными в любой из SEQ ID NO: 146-150 и 156-160, и с полноразмерными легкими цепями, представленными в любой из SEQ ID NO: 141-145 и 151-155 соответственно, можно получать путем мутагенеза (например, сайтнаправленного или опосредуемого ПЦР мутагенеза) молекул нуклеиновых кислот, представленных в SEQ ID NO: 166-170 и 176-180 и SEQ ID NO: 161-165 и 171-175 соответственно, с последующим тестированием кодируемого измененного антитела в отношении сохранения функции (т.е. перечисленных выше функций) с помощью приведенных в настоящем описании функциональных анализов.

В других вариантах осуществления изобретения нуклеотидные последовательности полноразмерной тяжелой цепи и/или полноразмерной легкой цепи могут быть идентичны на 80, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% представленным выше последовательностям.

В других вариантах осуществления изобретения нуклеотидные последовательности переменных областей тяжелой цепи и/или легкой цепи могут быть идентичны на 80, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% представленным выше последовательностям.

Согласно настоящему описанию процент идентичности двух последовательностей является функцией количества идентичных положений в последовательностях (т.е. $\% \text{ идентичности} = \frac{\text{количество идентичных положений}}{\text{общее количество положений}} \times 100$), принимая во внимание количество брешей и длину каждой брешки, которую необходимо интродуцировать для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности двух последовательностей можно осуществлять с помощью описанного ниже математического алгоритма.

Процент идентичности двух аминокислотных последовательностей можно определять с помощью алгоритма, разработанного E. Meyers и W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4, 1988, с. 11-17), который включен в программу ALIGN (версия 2.0), с использованием таблицы взвешенных остатков PAM 120, штрафа за длину брешки 12 и штрафа за брешку 4. Кроме того, процент идентичности двух аминокислотных последовательностей можно определять с помощью алгоритма Needleman и Wunsch (J. Mol. Biol. 48, 1970, с. 444-453), который включен в программу GAP, входящую в пакет программ GCG (которая доступна на сайте <http://www.gcg.com>), с использованием матрицы Blossum 62 или матрицы PAM250 и веса брешки 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и веса длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Антитела с консервативными модификациями.

В конкретных вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, имеет переменную область тяжелой цепи, которая содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и переменную область легкой цепи, которая содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, где одна или нескольких указанных последовательностей CDR представляет собой специфические аминокислотные последовательности, характерные для антител, предлагаемых в настоящем изобретении, или их консервативные модификации, и где антитела сохраняют требуемые функциональные свойства антител к ActRIIB, предлагаемых в изобретении. Таким образом, в изобретении предложено выделенное рекомбинантное антитело к ActRIIB или функциональный белок, содержащий его антигенсвязывающий участок, которые содержат переменную область тяжелой цепи, которая содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и переменную область легкой цепи, которая содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, где: последовательности CDR1 переменной области тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности, выбранные из группы, которая включает аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 1-14, и их консервативные модификации; последовательности CDR2 переменной области тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности, выбранные из группы, которая включает аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 15-28, и их консервативные модификации; последовательности CDR3 переменной области тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности, выбранные из группы, которая включает аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 29-42, и их консервативные модификации; последовательности CDR1 переменной области легкой цепи содержат аминокислотные последовательности, выбранные из группы, которая включает аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 43-56, и их консервативные модификации; последовательности CDR2 переменной области легкой цепи содержат аминокислотные последовательности, выбранные из группы, которая включает аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 57-70, и их консервативные модификации; последовательности CDR3 переменной области легкой цепи содержат аминокислотные последовательности, выбранные из группы, которая включает аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 71-84, и их консервативные модификации. Предпочтительно антитело обладает по меньшей мере одним из следующих функциональных свойств: (I) оно ингибирует связывание миостатина *in vitro* или *in vivo* и/или (II) снижает ингибирование мышечной дифференцировки посредством Smad-

зависимого пути.

В различных вариантах осуществления изобретения антитело может обладать одним или обоими описанными выше функциональными свойствами. Указанные антитела могут представлять собой, например, человеческие антитела, гуманизированные антитела или химерные антитела.

В других вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, оптимизированное с целью экспрессии в клетке млекопитающего, имеет полноразмерную последовательность тяжелой цепи и полноразмерную последовательность легкой цепи, при этом одна или несколько из этих последовательностей имеет аминокислотные последовательности, специфические для антител, представленных в настоящем описании, или их консервативные модификации, и при этом антитела сохраняют требуемые функциональные свойства антител к ActRIIB, предлагаемых в изобретении. Таким образом, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу к ActRIIB, оптимизированному с целью экспрессии в клетке млекопитающего, которое имеет полноразмерную последовательность тяжелой цепи и полноразмерную последовательность легкой цепи, где: полноразмерная тяжелая цепь имеет аминокислотные последовательности, выбранные из группы, которая включает аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 146-150 и 156-160, и их консервативные модификации; а полноразмерная легкая цепь имеет аминокислотные последовательности, выбранные из группы, которая включает аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 141-145 и 151-155, и их консервативные модификации; и антитело обладает по меньшей мере одним из следующих функциональных свойств: (I) оно ингибирует связывание миостатина *in vitro* или *in vivo* и/или (II) снижает ингибирование мышечной дифференцировки посредством Smad-зависимого пути.

В различных вариантах осуществления изобретения антитело может обладать одним или обоими описанными выше функциональными свойствами. Указанные антитела могут представлять собой, например, человеческие антитела, гуманизированные антитела или химерные антитела.

В контексте настоящего описания понятие "консервативные модификации последовательностей" относится к аминокислотным модификациям, которые не оказывают существенного влияния или не существенно изменяют характеристики связывания антитела, которое содержит указанную аминокислотную последовательность. Указанные консервативные модификации включают аминокислотные замены, добавления и делеции. Модификации можно интродуцировать в антитело, предлагаемое в изобретении, с помощью стандартных методов, известных в данной области, таких как сайтнаправленный мутагенез и ПЦР-опосредуемый мутагенез.

Консервативные аминокислотные замены представляют собой замены, при которых аминокислотный остаток замещают аминокислотным остатком, который имеет сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков со сходными боковыми цепями известны в данной области. Эти семейства включают аминокислотные остатки с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, один или несколько аминокислотных остатков в CDR-участках антитела, предлагаемого в изобретении, можно заменять на другие аминокислотные остатки из одного и того же семейства боковых цепей, и измененное антитело можно оценивать в отношении сохранения им функции с помощью представленных в настоящем описании функциональных анализов.

Антитела, которые связываются с тем же эпитопом, что и антитела к ActRIIB, предлагаемые в изобретении.

Другим вариантом осуществления изобретения являются антитела, которые связываются с тем же эпитопом, что и различные специфические антитела к ActRIIB, предлагаемые в изобретении. Все антитела, описанные в примерах, которые обладают способностью блокировать связывание миостатина с ActRIIB, связываются с высокой аффинностью с одним и тем же эпитопом в ActRIIB, указанный эпитоп расположен между аминокислотами 19-134 SEQ ID NO: 181.

Так, дополнительные антитела можно идентифицировать по их способности к перекрестной конкуренции (например, к статистически значимому конкурентному ингибированию связывания) с другими антителами, предлагаемыми в изобретении, при использовании стандартных анализов связывания ActRIIB. Способность тестируемого антитела ингибировать связывание антител, предлагаемых в настоящем изобретении, с человеческим ActRIIB свидетельствует о том, что тестируемое антитело может конкурировать с антителом за связывание с человеческим ActRIIB; согласно одной из возможных теорий такое антитело может связываться с тем же или родственным (например, структурно подобным или находящимся в пространственной близости) эпитопом на человеческом ActRIIB, что и антитело, с которым оно конкурирует. В конкретном варианте осуществления изобретения антитело, которое связывается с тем же эпитопом на человеческом ActRIIB, что и антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, представляет собой человеческое рекомбинантное антитело. Указанные человеческие рекомбинантные антитела можно получать и выделять согласно описанным в примерах методам.

В изобретении предложено также антитело, которое связывается с эпитопом, содержащим аминокислоты 75-85 SEQ ID NO: 181 (KGCWLDDFNCY - SEQ ID NO: 190).

В изобретении предложено также антитело, которое связывается с эпитопом, содержащим аминокислоты 52-56 SEQ ID NO: 181 (EQDKR - SEQ ID NO: 189).

В изобретении предложено также антитело, которое связывается с эпитопом, содержащим аминокислоты 49-63 SEQ ID NO: 181 (CEGEQDKRLHCYASW - SEQ ID NO: 187).

В изобретении предложены также антитела, которые связываются с эпитопами, состоящими из этих последовательностей, или эпитопами, состоящими из комбинаций этих областей эпитопов.

Таким образом, в изобретении предложено также антитело, которое связывается с эпитопом, содержащим или состоящим из аминокислот 78-83 SEQ ID NO: 181 (WLDDFN) и аминокислот 52-56 SEQ ID NO: 181 (EQDKR).

Сконструированные и модифицированные антитела.

Антитело, предлагаемое в изобретении, можно получать также с использованием антитела, которое имеет одну или несколько указанных в настоящем описании последовательностей V_H и/или V_L , в качестве исходного материала для создания модифицированного антитела, где модифицированное антитело может иметь измененные свойства по сравнению с исходным антителом. Антитело можно создавать путем модификации одного или нескольких остатков в одной или обеих переменных областях (т.е. V_H и/или V_L), например, в одном или нескольких CDR-участках и/или в одном или нескольких каркасных участках. В дополнительном или альтернативном варианте антитело можно создавать путем модификации остатков в константной(ых) области(ях), например, для изменения эффекторной(ых) функции(ий) антитела.

Для осуществления одного из типов конструирования переменной области можно применять трансплантацию CDR. Антитела взаимодействуют с антигенами-мишенями в основном посредством аминокислотных остатков, локализованных в шести гиперпеременных участках (CDR) тяжелой и легкой цепи. По этой причине между аминокислотными остатками в CDR индивидуальных антител существуют более значительные различия, чем в последовательностях вне CDR. Поскольку последовательности CDR ответственны за большую часть взаимодействий антитело-антиген, можно экспрессировать рекомбинантные антитела, которые имитируют свойства конкретных встречающихся в естественных условиях антител, путем конструирования экспрессионных векторов, которые содержат последовательности CDR из конкретного встречающегося в естественных условиях антитела, полученные путем трансплантации в последовательности каркасных участков из других антител с другими свойствами (см., например, Riechmann L. и др., *Nature* 332, 1998, с. 323-327; Jones P. и др., *Nature*, 321, 1986, с. 522-525; Queen C. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 1989, с. 10029-10033; US 5225539 на имя Winter и US 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 на имя Queen с соавторами).

Таким образом, следующим объектом изобретения является выделенное моноклональное антитело к ActRIIB или функциональный белок, содержащий его антигенсвязывающий участок, имеющие последовательности CDR1 переменной области тяжелой цепи, которые содержат аминокислотные последовательности, выбранные из группы, включающей SEQ ID NO: 1-14; последовательности CDR2, которые содержат аминокислотные последовательности, выбранные из группы, включающей SEQ ID NO: 15-28; последовательности CDR3, которые содержат аминокислотные последовательности, выбранные из группы, включающей SEQ ID NO: 29-42 соответственно; и последовательности CDR1 переменной области легкой цепи, которые содержат аминокислотные последовательности, выбранные из группы, включающей SEQ ID NO: 43-56; последовательности CDR2, которые содержат аминокислотные последовательности, выбранные из группы, включающей SEQ ID NO: 57-70; и последовательности CDR3, которые содержат аминокислотные последовательности, выбранные из группы, включающей SEQ ID NO: 71-84 соответственно. Таким образом, указанные антитела содержат последовательности CDR V_H и V_L моноклональных антител, кроме того, они могут содержать различные последовательности каркасных участков этих антител.

Указанные последовательности каркасных участков можно получать из публичных баз данных ДНК или опубликованных ссылок, которые содержат последовательности генов зародышевой линии антител. Например, последовательности ДНК генов зародышевой линии переменных областей человеческих тяжелых и легких цепей можно найти в базе данных последовательностей человеческой зародышевой линии "Vbase" (доступной в Интернете на сайте www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), а также у Kabat E.A. и др., выше; Tomlinson I.M. и др., *J. Mol. Biol.* 227, 1992, с. 776-798; и Cox J.P.L. и др., *Eur. J. Immunol.* 24, 1994, с. 827-836.

Примером последовательностей каркасных участков, предназначенных для применения в антителах, предлагаемых в изобретении, являются последовательности, структурно подобные последовательностям каркасных участков, которые входят в отобранные антитела, предлагаемые в изобретении, например, консенсусные последовательности и/или последовательности каркасных участков, которые входят в моноклональные антитела, предлагаемые в изобретении. Последовательности CDR1, 2 и 3 V_H и последовательности CDR1, 2 и 3 V_L можно трансплантировать в каркасные участки, которые имеют последовательность, идентичную с последовательностью гена иммуноглобулина зародышевой линии, из

которого выведена последовательность каркасного участка, или последовательности CDR можно трансплантировать в каркасные участки, которые содержат одну или несколько мутаций по сравнению с последовательностями зародышевой линии. Например, было установлено, что в определенных случаях целесообразно изменять посредством мутации остатки в каркасных участках для поддержания или повышения способности антитела связываться с антигеном (см., например, US 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 на имя Queen с соавторами).

Другим типом модификации вариабельной области является мутация аминокислотных остатков в CDR1, CDR2 и/или CDR3 V_H - и/или V_L -областей, которая повышает тем самым одну или несколько способностей к связыванию (например, аффинность) представляющего интерес антитела, что называют "созреванием аффинности". Для интродукции мутации(й) и воздействия на связывание антитела или на другое представляющее интерес функциональное свойство можно применять сайтнаправленный мутагенез или ПЦР-опосредуемый мутагенез, что можно оценивать с помощью анализов *in vitro* или *in vivo*, представленных в настоящем описании и описанных ниже в примерах. Можно интродуцировать консервативные модификации (указанные выше). Мутации могут представлять собой аминокислотные замены, добавления или делеции. Кроме того, как правило, изменяют не более 1, 2, 3, 4 или 5 остатков в CDR-участке.

Таким образом, другим вариантом осуществления изобретения являются выделенные моноклональные антитела к ActRIIB или функциональный белок, содержащий их антигенсвязывающие участки, которые включают вариабельную область тяжелой цепи, содержащую: CDR1-участок V_H -области, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 1-14, или аминокислотную последовательность с 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, делециями или добавлениями по сравнению с SEQ ID NO: 1-14; CDR2-участок V_H -области, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 15-28, или аминокислотную последовательность с 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, делециями или добавлениями по сравнению с SEQ ID NO: 15-28; CDR3-участок V_H -области, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 29-42, или аминокислотную последовательность с 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, делециями или добавлениями по сравнению с SEQ ID NO: 29-42; CDR1-участок V_L -области, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 43-56, или аминокислотную последовательность с 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, делециями или добавлениями по сравнению с SEQ ID NO: 43-56; CDR2-участок V_L -области, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 52-70, или аминокислотную последовательность с 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, делециями или добавлениями по сравнению с SEQ ID NO: 52-70; и CDR3-участок V_L -области, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 71-84, или аминокислотную последовательность с 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, делециями или добавлениями по сравнению с SEQ ID NO: 71-84.

Трансплантация антигенсвязывающих доменов в альтернативные каркасные участки или остовы.

Можно применять широкое разнообразие остовов или каркасов антитела/иммуноглобулина при условии, что образующийся полипептид включает по меньшей мере один связывающий участок, который специфически связывается с ActRIIB. Такие остовы или каркасы включают пять основных идиотипов человеческих иммуноглобулинов или их фрагментов (например, которые представлены в настоящем описании), и включают иммуноглобулины других видов животных, которые предпочтительно имеют гуманизированные компоненты. В этом плане особенно интересными являются состоящие только из тяжелых цепей антитела, которые идентифицированы в представителях верблюжьих. Специалисты в данной области продолжают выявлять и создавать новые остовы, каркасы и фрагменты.

Одним из объектов изобретения является создание антител, не относящихся к иммуноглобулинам, с использованием неиммуноглобулиновых каркасов, в которые можно трансплантировать CDR, предлагаемые в изобретении. Можно применять известные неиммуноглобулиновые остовы или каркасы или те, которые будут созданы в будущем, при условии, что они содержат связывающий участок, специфический для белка-мишени, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 181 (предпочтительно для его лигандсвязывающего домена, последовательность которого представлена в SEQ ID NO: 182). Такие соединения обозначены в контексте настоящего описания как "полипептиды, содержащие специфический для мишени связывающий участок". Примеры неиммуноглобулиновых каркасов дополнительно описаны ниже в соответствующих разделах (верблюжий антител и каркасы, отличные от характерных для антител каркасов).

Верблюжий антител.

Белки антител, полученные из представителей семейства двугорбых и одногорбых верблюдов (*Camelus bactrianus* и *Camelus dromaderius*), включая представителей животных Нового Света, таких как различные виды лам (*Lama pacos*, *Lama glama* и *Lama vicugna*), охарактеризованы в отношении их размера, структурной комплексности и антигенности в отношении человека. Установлено, что некоторые антитела типа IgG из этого семейства млекопитающих в естественных условиях лишены легких цепей и поэтому отличаются по структуре от типичной состоящей из четырех цепей четвертичной структуры с

двумя тяжелыми и двумя легкими цепями, характерной для антител из организма других животных (см. WO 94/04678).

Участок верблюжьего антитела, представляющий собой небольшую индивидуальную вариативную область, обозначенную как V_{HH} , можно создавать с помощью генной инженерии с получением небольшого белка, обладающего высокой аффинностью к мишени, что приводит к получению низкомолекулярного выведенного из антитела белка, который обозначают как "верблюжье нанотело" (см. US 5759808; Stijlemans B. и др., J. Biol Chem 279, 2004, с. 1256-1261; Dumoulin M. и др., Nature 424, 2003, с. 783-788; Pleschberger M. и др., Bioconjugate Chem 14, 2003, с. 440-448; Cortez-Retamozo V. и др., Int J. Cancer 89, 2002, с. 456-462; и Lauwereys M. и др., EMBO J. 17, 1998, с. 3512-3520). Созданные библиотеки верблюжьих антител и фрагментов антител доступны на коммерческой основе, например, от фирмы Ablynx, Гент, Бельгия. Аналогично другим антителам, полученным из видов кроме человека, аминокислотную последовательность верблюжьего антитела можно изменять рекомбинантно с получением последовательности, в большей степени напоминающей человеческую последовательность, т.е. нанотело можно "гуманизировать". Таким путем можно дополнительно понижать естественную низкую антигенность верблюжьих антител для людей.

Верблюжье нанотело имеет молекулярную массу, составляющую примерно 1/10 от молекулярной массы человеческого IgG, а физический диаметр белка составляет лишь несколько нанометров. Одной из связанных с малым размером особенностей является способность верблюжьих нанотел связываться с антигенными сайтами, которые являются функционально незаметными для более крупных белковых антител, т.е. верблюжьих нанотел можно применять в качестве реагентов, выявляющих антигены, которые остаются скрытыми при использовании классических иммунологических методов, и возможно в качестве терапевтических агентов. Таким образом, другой особенностью верблюжьего нанотела, связанной с его малым размером, является способность ингибировать связывание со специфическим сайтом в бороздке или узкой расщелине белка-мишени, и поэтому их можно применять в качестве субстанции, более напоминающей по своей функции классическое низкомолекулярное лекарственное средство, чем классическое антитело.

Небольшая молекулярная масса и компактный размер обуславливает также очень высокую термостабильность, стабильность при экстремальных значениях pH и стабильность к протеолитическому расщеплению и низкую антигенность верблюжьих нанотел. Еще одним следствием указанных особенностей является то, что верблюжьих нанотел легко проникают из кровеносной системы в ткани и даже проникают через гематоэнцефалический барьер и их можно применять для лечения заболеваний, поражающих нервную ткань. Нанотела могут облегчать также транспорт лекарственных средств через гематоэнцефалический барьер (см. US 2004/0161738). Эти особенности в сочетании с низкой антигенностью в отношении людей свидетельствуют об их большом терапевтическом потенциале. Кроме того, эти молекулы можно полностью экспрессировать в прокариотических клетках, таких как *E.coli*, и экспрессировать в виде слитых белков с бактериофагом, и они являются функционально активными.

Таким образом, отличительным признаком настоящего изобретения является верблюжье антитело или нанотело, обладающее высокой аффинностью к ActRIIB. В конкретных вариантах осуществления изобретения верблюжье антитело или нанотело получают в естественных условиях в животном из семейства верблюжьих, т.е. оно продуцируется в организме представителя верблюжьих после иммунизации ActRIIB или его пептидным фрагментом при применении методов, описанных для других антител. В другом варианте верблюжье нанотело к ActRIIB конструируют, т.е. получают путем отбора, например, из фаговых дисплейных библиотек соответствующим образом мутированных белком верблюжьих нанотел, с помощью метода пэннинга с использованием в качестве мишени ActRIIB, как описано в приведенных в настоящем описании примерах. Сконструированные нанотела можно дополнительно усовершенствовать с помощью генной инженерии таким образом, чтобы время их полужизни в реципиенте составляло от 45 мин до 2 недель. В конкретном варианте осуществления изобретения верблюжье антитело или нанотело получают путем трансплантации последовательностей CDR тяжелой или легкой цепи человеческих антител, предлагаемых в изобретении, в нанотело или в последовательности каркасных участков имеющего один домен антитела согласно методам, описанным, например в WO 94/04678.

Нехарактерные для антител каркасы.

Известные неиммуноглобулиновые остовы или каркасы включают (но, не ограничиваясь только ими) аднектины (фибронектин) (фирма Compound Therapeutics, Inc., Уолтем, шт. Массачусетс), ангириин (фирма Molecular Partners AG, Цюрих, Швейцария), домены антител (фирма Domantis, Ltd (Кэмбридж, шт. Массачусетс) и фирма Ablynx nv (Цвинаарде, Бельгия)), липокалин (антикалин) (фирма Pieris Proteo-lab AG, Фрейзинг, Германия), небольшие модульные иммунологические фармацевтические агенты (фирма Trubion Pharmaceuticals Inc., Сиэтл, шт. Вашингтон), макситела (фирма Avidia, Inc. (Маунтин-Вью, шт. Калифорния), белок А (фирма Affibody AG, Швеция) и аффилин (гамма-кристаллин или убики-тин) (фирма Scil Proteins GmbH, Галле, Германия), миметики белковых эпитопов (фирма Polyphor Ltd, Аллшвиц, Швейцария).

(I) Фибронектиновые каркасы.

Основой фибронектиновых каркасов является предпочтительно домен фибронектина типа III (например, десятый модуль фибронектина типа III (домен 10 Fn3). Домен фибронектина типа III несет 7 или 8 бета-цепей, которые распределены между двумя бета-складками, которые сами упакованы друг напротив друга с образованием ядра белка, и дополнительно содержат петли (аналоги CDR), которые соединяют бета-цепи друг с другом и являются доступными для растворителя. Известно по меньшей мере три таких петли на каждом крае бета-складчатого "сэндвича", при этом край является границей белка, перпендикулярной к направлению бета-цепей (US 6818418).

Эти каркасы, основой которых является фибронектин, не представляют собой иммуноглобулин, хотя общая укладка очень похожа на укладку наименьшего обладающего функциональной активностью фрагмента антитела, т.е. варибельной области тяжелой цепи, который содержит полный распознающий антиген компонент в IgG представителей верблюжьих и лам. Благодаря указанной структуре антитела, не представляющее собой иммуноглобулин, имитирует антигенсвязывающие свойства, которые напоминают по природе и аффинности свойства антител. Эти каркасы можно применять для стратегии рандомизации петель и перестановки *in vitro*, что подобно процессу созревания аффинности антител *in vivo*. Такие молекулы, основой которых является фибронектин, можно применять в качестве каркасов, в которых области петель молекулы можно заменять на CDR, предлагаемые в изобретении, с помощью стандартных методов клонирования.

(II) Анкирин - фирма Molecular Partners.

Технология основана на применении белков, несущих выведенные из анкирина повторяющиеся модули в качестве каркасов для варибельных областей, которые можно использовать для связывания с различными мишенями. Повторяющийся анкириновый модуль представляет собой состоящий из 33 аминокислот полипептид, который содержит две антипараллельные α -спирали и β -петли. Связывание варибельных областей максимально оптимизируют на основе доступности для рибосом.

(III) Максителя/авимеры - фирма Avidia.

Авимеры получают из встречающегося в естественных условиях содержащего А-домен белка, такого как LRP-1. Эти домены используются в естественных условиях для взаимодействий типа белок-белок, и у человека структурной основой более чем 250 белков являются А-домены. Авимеры состоят из нескольких различных мономеров "А-домена" (2-10), сцепленных с помощью аминокислотных линкеров. Можно создавать авимеры, которые могут связываться с антигеном-мишенью, с использованием методологии, описанной, например в US 2004/0175756; US 2005/0053973; US 2005/0048512 и US 2006/0008844.

(VI) Белок А - фирма Affibody.

Обладающие аффинностью лиганды Affibody® представляют собой небольшие простые белки, состоящие из трехспирального пучка, основой которого является каркас одного из IgG-связывающих доменов белка А. Белок А представляет собой поверхностный белок бактерии *Staphylococcus aureus*. Этот каркасный домен состоит из 58 аминокислот, 13 из которых произвольно использовали для создания библиотек Affibody® с большим количеством вариантов лиганда (см., например, US 5831012). Молекулы Affibody® напоминают антитела, их молекулярная масса составляет 6 кДа, для сравнения молекулярная масса антител составляет 150 кДа. Несмотря на небольшой размер, сайт связывания молекул Affibody® подобен сайту связывания антитела.

(V) Антикалины (Anticalins®) - фирма Pieris.

Антикалины (Anticalins®) представляют собой продукты, разработанные компанией Pieris Proteo-Lab AG. Их получают из липокалинов, широко распространенной группы небольших и эффективных белков, которые, как правило, принимают участие в физиологическом транспорте или хранении чувствительных к химическим агентам или нерастворимых соединений. Несколько встречающихся в естественных условиях липокалинов обнаружено в тканях или общей воде организма человека.

Их белковая архитектура напоминает структуру иммуноглобулинов с гиперварибельными петлями на вершине жесткого остова. Однако в отличие от антител или их рекомбинантных фрагментов липокалины состоят из одной полипептидной цепи, содержащей 160-180 аминокислотных остатков, т.е. несколько более крупной, чем один домен иммуноглобулина.

Набор из четырех петель, которые образуют связывающий карман, обладает выраженной структурной пластичностью и допускает широкое разнообразие боковых цепей. Таким образом, при использовании соответствующего процесса сайту связывания можно придавать новую форму, предназначенную для распознавания с высокой аффинностью и специфичностью заранее определенных молекул-мишеней различной формы.

Один из белков семейства липокалинов, а именно связывающий билин белок (BBP) из *Pieris brassicae* (капустная белянка), использовали для создания антикалинов путем мутагенеза, затрагивающего четыре петли. Одной из заявок на патент, в которых описаны "антикалины", приведенной в качестве примера, является WO 1999/16873.

(VI) Аффилин (Affilin) -фирма Scil Proteins.

Молекулы Affilin™ представляют собой небольшие неиммуноглобулиновые белки, которые разработаны с целью достижения специфических аффинностей к белкам и небольшим молекулам. Новые молекулы Affilin™ можно очень быстро отбирать из двух библиотек, основой каждой из которых являются различные полученные из человеческого организма белки-каркасы.

Молекулы Affilin™ не обладают какой-либо структурной гомологией с белками иммуноглобулинов. На фирме Scil Proteins применяют два Affilin™-каркаса, одним из которых является гамма-кристаллин, человеческий структурный белок хрусталика глаза, а другим являются белки суперсемейства "убикитина". Оба человеческих каркаса имеют очень малый размер, характеризуются высокой термостойкостью и практически устойчивы к изменениям значений pH и действию денатурирующих агентов. Указанная высокая стабильность главным образом является результатом расширенной бета-складчатой конформации белков. Примеры выведенных из гамма-кристаллина белков описаны в WO 2001/04144, а примеры "убикитиноподобных" белков описаны в WO 2004/106368.

(VII) Миметики белковых эпитопов (РЕМ).

РЕМ представляют собой имеющие средний размер, циклические, напоминающие пептиды молекулы (ММ 1-2 кДа), которые имитируют вторичные структуры белков типа бета-"шпилек", т.е. основную вторичную структуру, участвующую в белок-белковых взаимодействиях.

Конструирование каркасных участков или Fc.

К сконструированным антителам, предлагаемым в изобретении, относятся антитела, в которых сделаны модификации в остатках каркасных участков в V_H и/или V_L , например, с целью улучшения свойств антитела. Как правило, такие модификации каркасных участков осуществляют для снижения иммуногенности антитела. Например, один из подходов представляет собой "обратное мутирование" одного или нескольких остатков каркасного участка с получением соответствующей последовательности зародышевой линии. Более конкретно, антитело, которое было подвергнуто соматической мутации, может содержать остатки каркасного участка, отличающиеся от последовательности зародышевой линии, из которой выведено антитело. Такие остатки можно идентифицировать путем сравнения последовательностей каркасных участков антитела с последовательностями зародышевой линии, из которой выведено антитело. Для возвращения последовательностей каркасного участка к исходной конфигурации зародышевой линии соматические мутации можно подвергать "обратному мутированию" с получением последовательности зародышевой линии, например, с помощью сайтнаправленного мутагенеза или ПЦР-опосредуемого мутагенеза. Такие антитела с "обратными мутациями" подпадают также под объем настоящего изобретения.

Другой тип модификации каркасного участка включает изменение путем мутации одного или нескольких остатков в каркасном участке или даже в одном или нескольких CDR-участках для удаления Т-клеточных эпитопов с целью снижения потенциальной иммуногенности антитела. Этот подход обозначают также как "деиммунизация", и он описан более подробно в US 2003/0153043.

В дополнительном или альтернативном варианте помимо модификаций в каркасных участках или CDR антитела, предлагаемые в изобретении, могут включать модификации в Fc-фрагменте, как правило, для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела, таких как время полужизни в сыворотке, фиксация комплемента, связывание Fc-рецептора и/или антитело-обусловленная клеточно-зависимая цитотоксичность. Кроме того, антитело, предлагаемое в изобретении, можно модифицировать химически (например, к антителу можно присоединять один или несколько химических фрагментов) или можно модифицировать для изменения его гликозилирования, и в этом случае с целью изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела.

Каждый из указанных вариантов осуществления изобретения будет более подробно описан ниже. Нумерация остатков в Fc-фрагменте соответствует нумерации EU по Кэботу.

В одном из вариантов осуществления изобретения модифицируют шарнирную область CH1 так, чтобы изменять, например, увеличивать или снижать, количество цистеиновых остатков в шарнирной области. Этот подход описан также в US 5677425. Количество цистеиновых остатков в шарнирной области CH1 изменяют, например, для облегчения сборки легких и тяжелых цепей или для повышения или снижения стабильности антитела.

В другом варианте осуществления изобретения шарнирную область Fc-фрагмента антитела можно изменять с помощью мутации для снижения биологического времени полужизни антитела. Более конкретно, интродуцируют одну или несколько аминокислотных мутаций в область контакта CH2-CH3-доменов шарнирной области Fc-фрагмента для ухудшения связывания антитела с белком А золотистого стафилококка Staphylococcus (SpA) по сравнению со связыванием нативной шарнирной области Fc-фрагмента с SpA. Этот подход описан более подробно в US 6165745.

В другом варианте осуществления изобретения антитело модифицируют для удлинения биологического времени полужизни. При этом возможно применение различных подходов. Например, можно интродуцировать одну или несколько из следующих мутаций: T252L, T254S, T256F, описанных в US 6277375. В другом варианте для удлинения биологического времени полужизни можно изменять антите-

ло в CH1- или CL-области путем интродукции связывающегося с рецептором-"спасателем" эпитопа, полученного из двух петель CH2-домена Fc-фрагмента IgG, как описано в US 5869046 и US 6121022.

В других вариантах осуществления изобретения Fc-фрагмент изменяют путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка на другой аминокислотный остаток для изменения эффекторных функций антитела. Например, один или несколько аминокислотных остатков можно заменять на другой аминокислотный остаток таким образом, чтобы у такого антитела изменялась аффинность к эффекторному лиганду, но сохранялась антигенсвязывающая способность родительского антитела. Эффекторный лиганд, аффинность к которому изменяют, может представлять собой, например, Fc-рецептор или C1-компонент системы комплемента. Этот подход описан более подробно в US 5624821 и US 5648260, оба на имя Winter с соавторами. В частности, можно изменять в результате мутации остатки 234 и 235. В частности, эти мутации могут представлять собой замену на аланин. Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, имеет мутацию в Fc-фрагменте, затрагивающую одну или обе аминокислоты в положениях 234 и 235. В другом варианте осуществления изобретения одна или обе аминокислоты в положениях 234 и 235 можно заменять на аланин. Замена обеих аминокислот в положениях 234 и 235 на аланин приводит к пониженной ADCC-активности.

В другом варианте осуществления изобретения один или несколько аминокислотных остатков аминокислотной последовательности можно заменять другим аминокислотным остатком так, чтобы антитело имело измененную способность к C1q-связыванию и/или пониженную комплементзависимую цитотоксичность (CDC) или чтобы у него отсутствовала CDC. Этот подход описан более подробно в US 6194551.

В другом варианте осуществления изобретения один или несколько аминокислотных остатков модифицируют, изменяя тем самым способность антитела к фиксации комплемента. Этот подход описан также в WO 94/29351.

Еще в одном варианте осуществления изобретения Fc-фрагмент модифицируют для повышения способности антитела вызывать антитело-обусловленную клеточно-зависимую цитотоксичность (ADCC) и/или для повышения аффинности антитела к Fcγ-рецептору посредством модификации одной или нескольких аминокислот. Этот подход описан более подробно в WO 00/42072. Кроме того, были картированы сайты связывания человеческого IgG1 с FcγRI, FcγRII, FcγRIII и FcRn, и описаны варианты с улучшенной способностью к связыванию (см. Shields R.L. и др., J. Biol. Chem. 276, 2001, с. 6591-6604).

В следующем варианте осуществления изобретения модифицируют гликозилирование антитела. Например, можно создавать агликозилированное антитело (т.е. антитело, в котором отсутствует гликозилирование). Гликозилирование можно изменять, например, для повышения аффинности антитела к антигену. Такие углеводные модификации можно осуществлять путем, например, изменения одного или нескольких сайтов гликозилирования в последовательности антитела. Например, можно осуществлять одну или несколько аминокислотных замен, которые приводят к элиминации одного или нескольких сайтов гликозилирования каркасного участка варибельной области, устраняя тем самым гликозилирование в этом сайте. Указанное агликозилирование может повышать аффинность антитела к антигену. Этот подход описан более подробно в US 5714350 и US 6350861 на имя Co с соавторами.

В дополнительном или альтернативном варианте можно создавать антитело с измененным типом гликозилирования, например, гипофукозилированное антитело, которое имеет пониженное количество фукозильных остатков, или антитело с повышенным содержанием разделяющих пополам GlcNac-структур. Было продемонстрировано, что такие измененные схемы гликозилирования повышают ADCC-активность антител. Указанные углеводные модификации можно осуществлять, например, путем экспрессии антитела в клетке-хозяине с измененным механизмом гликозилирования. Клетки с измененным механизмом гликозилирования известны в данной области, и их можно применять в качестве клеток-хозяев, в которых экспрессируют рекомбинантные антитела, предлагаемые в изобретении, для получения тем самым антител с измененным гликозилированием. Например, в EP 1176195 на имя Hang с соавторами описана линия клеток с функционально нарушенным геном FUT8, который кодирует фукозилтрансферазу, в результате чего экспрессируемые в такой клеточной линии антитела характеризуются гипофукозилированием. Таким образом, согласно одному из вариантов осуществления изобретения, антитела, предлагаемые в изобретении, получают путем рекомбинантной экспрессии в клеточной линии, которая отличается схемой гипофукозилирования, например, в клеточной линии млекопитающего с дефицитом экспрессии гена FUT8, который кодирует фукозилтрансферазу. В WO 03/035835 на имя Presta описан вариант линии CHO-клеток, Lec13-клетки, с пониженной способностью присоединять фукозу к связанным с Asn(297) углеводам, что приводит также к гипофукозилированию антител, экспрессируемых в этой клетке-хозяине (см. также Shields R.L. и др., J. Biol. Chem. 277, 2002, с. 26733-26740). В WO 99/54342 описаны линии клеток, сконструированные для экспрессии модифицирующих гликопротеин гликозилтрансфераз (например, бета(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII)), в результате чего антитела, которые экспрессируются в сконструированных линиях клеток, характеризуются повышенным содержанием разделяющих пополам GlcNac-структур, что приводит к повышенной ADCC-активности антител (см. также Umana и др., Nat. Biotech. 17, 1999, с. 176-180). В альтернативном варианте антитела, предлагаемые в изобретении, можно получать в дрожжах или нитчатых грибах, сконструиро-

рованных для создания напоминающей характерную для млекопитающих схему гликозилирования, и которые обладают способностью продуцировать антитела с отсутствием фукозы в качестве компонента схемы гликозилирования (см., например, EP 1297172 B1). Другой модификацией антител, подпадающей под объем изобретения, является пэгилирование. Антитело можно пэгилировать, например, для удлинения биологического (например, в сыворотке) времени полужизни антитела. Для пэгилирования антитела, как правило, антитело или его фрагмент подвергают взаимодействию с полиэтиленгликолем (ПЭГ), таким как реакционноспособный сложный эфир или альдегидное производное ПЭГ, в условиях, при которых одна или несколько ПЭГ-групп присоединяется к антителу или фрагменту антитела. Пэгилирование можно осуществлять с помощью реакции ацилирования или реакции алкилирования с реакционноспособной молекулой ПЭГ (или аналогичным реакционноспособным водорастворимым полимером). В контексте настоящего описания подразумевается, что понятие "полиэтиленгликоль" относится к любым формам ПЭГ, которые используют для дериватизации других белков, таким как моно(C₁-C₁₀)алкокси- или арилоксиполиэтиленгликоль или полиэтиленгликольмалеимид. В конкретных вариантах осуществления изобретения антитело, подлежащее пэгилированию, представляет собой агликолизированное антитело. Методы пэгилирования белков известны в данной области, и их можно применять к антителам, предлагаемым в изобретении (см., например, EP 0154316 и EP 0401384).

Другой модификацией антител, подпадающей под объем изобретения, является конъюгат или слитый белок, содержащий по меньшей мере антигенсвязывающий участок антитела, предлагаемого в изобретении, с сывороточным белком, таким как человеческий сывороточный альбумин или его фрагмент, с целью удлинения времени полужизни образовавшейся молекулы (см., например, EP 0322094).

Другим возможным вариантом является слияние по меньшей мере одного антигенсвязывающего участка антитела, предлагаемого в изобретении, с белками, которые могут связываться с сывороточными белками, такими как человеческий сывороточный альбумин, удлиняя время полужизни образовавшейся молекулы (см., например, EP 0486525).

Методы создания измененных антител.

Как указано выше, антитела к ActRIIB, которые имеют последовательности V_H и V_L или последовательности полноразмерной тяжелой и легкой цепи, представленные в настоящем описании, можно применять для создания новых антител к ActRIIB путем модификации последовательностей полноразмерной тяжелой цепи и/или легкой цепи, последовательностей V_H и/или V_L или присоединенной(ых) к ним константной(ых) области(ей). Таким образом, согласно другому объекту изобретения структурные особенности антитела к ActRIIB, предлагаемого в изобретении, используют для создания структурно родственных антител к ActRIIB, которые сохраняют по меньшей мере одно из функциональных свойств антител, предлагаемых в изобретении, таких как связывание с человеческим ActRIIB, а также ингибирование одного или нескольких функциональных свойств ActRIIB (например, ингибирование активации Smad).

Например, один или несколько CDR-участков антител, предлагаемых в настоящем изобретении, или их мутантов можно объединять рекомбинантно с известными каркасными участками и/или другими CDR для получения дополнительных, созданных с использованием рекомбинантной ДНК антител к ActRIIB, предлагаемых в изобретении, с помощью указанных выше методов. Другие типы модификаций включают модификации, описанные в предыдущем разделе. Исходным материалом для конструирования является одна или несколько последовательностей V_H и/или V_L, представленных в настоящем описании, или один или несколько из их CDR-участков. Для создания сконструированного антитела не является необходимым фактическое получение (т.е. экспрессия в виде белка) антитела, которое имеет одну или несколько из последовательностей V_H и/или V_L, представленных в настоящем описании, или одного или нескольких их CDR-участков. Предпочтительно информацию, содержащуюся в последовательности(ях), используют в качестве исходного материала для создания последовательности(ей) "второго поколения", выведенной(ых) из исходной(ых) последовательности(ей), и затем получают последовательность(и) второго поколения и экспрессируют в виде белка. Таким образом, еще одним вариантом осуществления изобретения является способ получения антитела к ActRIIB, состоящего из: последовательности вариабельной области тяжелой цепи антитела, которая содержит последовательность CDR1, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 1-14, последовательность CDR2, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 15-28, и/или последовательность CDR3, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 29-42; и последовательности вариабельной области легкой цепи антитела, которая содержит последовательность CDR1, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 43-56, последовательность CDR2, выбранную из группы, включающей SEQ NO: 57-70, и/или последовательность CDR3, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 71-84; заключающийся в том, что изменяют по меньшей мере один аминокислотный остаток в последовательности вариабельной области тяжелой цепи антитела и/или вариабельной области легкой цепи антитела для создания по меньшей мере одной измененной последовательности антитела; и экспрессируют измененную последовательность антитела в виде белка.

Таким образом, другим вариантом осуществления изобретения является способ получения антитела к ActRIIB, оптимизированного для экспрессии в клетке млекопитающего, которое состоит из: полноразмерной последовательности тяжелой цепи антитела, которая имеет последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 146-150 и 156-160; полноразмерной последовательности легкой цепи

антитела, которая имеет последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 141-145 и 151-155; заключающийся в том, что изменяют по меньшей мере один аминокислотный остаток в полно-размерной последовательности тяжелой цепи антитела и/или в полноразмерной последовательности легкой цепи антитела для создания по меньшей мере одной измененной последовательности антитела; и экспрессируют измененную последовательность антитела в виде белка.

Измененную последовательность антитела можно создавать также путем скрининга библиотек антител, которые имеют фиксированные последовательности CDR3, выбранные из группы, включающей SEQ ID NO: 29-42 и SEQ ID NO: 71-84, или минимальные имеющие решающее значение связывающие детерминанты, описанные в US 2005/0255552, и разнообразные последовательности CDR1 и CDR2. Скрининг можно осуществлять с использованием любого метода скрининга, пригодного для скрининга антител из библиотек антител, такого как технология фагового дисплея.

Для получения и экспрессии измененной последовательности антитела можно применять стандартные методы молекулярной биологии. Антитело, кодируемое измененной(ыми) последовательность(ями), представляет собой антитело, которое сохраняет одну, несколько или все функциональные свойства антитела к ActRIIB, представленных в настоящем описании, где функциональные свойства включают (но, не ограничиваясь только ими) специфичность связывания с человеческим ActRIIB и ингибирование активации Smad.

Измененное антитело может обладать одним или несколькими, двумя или более или тремя или более из указанных выше функциональных свойств.

Функциональные свойства измененных антител можно оценивать с помощью стандартных анализов, известных в данной области и/или представленных в настоящем описании, таких как описанные в примерах анализа (например, ELISA).

В конкретных вариантах способов создания антител, предлагаемых в изобретении, мутации можно интродуцировать произвольно или избирательно во всю или в часть кодирующей последовательности антитела к ActRIIB и полученные в результате модифицированные антитела к ActRIIB можно подвергать скринингу в отношении связывающей активности и/или других описанных выше функциональных свойств. Методы интродукции мутаций известны в данной области. Например, в WO 02/092780 описаны методы создания и скрининга мутаций антител с помощью насыщающего мутагенеза, синтетической сборки лигированием или с помощью комбинации этих методов. Кроме того, в WO 03/074679 описаны альтернативные методы, основанные на вычислительном скрининге для оптимизации физико-химических свойств антител.

Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие антитела, предлагаемые в изобретении.

Следующим объектом изобретения являются молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют антитела, предлагаемые в изобретении. Примерами нуклеотидных последовательностей полноразмерной легкой цепи, оптимизированных для экспрессии в клетке млекопитающего, являются последовательности, представленные в SEQ ID NO: 161-165 и 171-175. Примерами нуклеотидных последовательностей полноразмерной тяжелой цепи, оптимизированных для экспрессии в клетке млекопитающего, являются последовательности, представленные в SEQ ID NO: 166-170 и 176-180.

Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целых клетках, в клеточных лизатах или могут представлять собой нуклеиновые кислоты в частично очищенной или практически чистой форме. Нуклеиновую кислоту "выделяют" или "получают ее в практически очищенном виде", когда ее очищают от других клеточных компонентов или других загрязнителей, например, других присутствующих в клетке нуклеиновых кислот или белков, с помощью стандартных методов, включая обработку щелочью/ДСН, CsCl-бэндинг, хроматографию на колонках, электрофорез в агарозном геле и других методов, хорошо известных в данной области (см. Current Protocols in Molecular Biology, под ред. F. Ausubel и др., изд-во Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, 1987). Нуклеиновая кислота, предлагаемая в изобретении, может представлять собой, например, ДНК или РНК, и может содержать интронные последовательности или не содержать их. В одном из вариантов осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой молекулу кДНК. Нуклеиновая кислота может присутствовать в векторе, таком как фаговый дисплейный вектор или рекомбинантный плазмидный вектор. Изобретение относится также к векторам, обозначенным как pBW522 и pBW524 (депонированы в DSMZ, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Брауншвейг, Германия 18 августа 2009 г. под регистрационными номерами DSM22873 и DSM22874 соответственно).

Нуклеиновые кислоты, предлагаемые в изобретении, можно получать с помощью стандартных методов молекулярной биологии. Для антител, экспрессируемых гибридами (например, гибридами, полученными из трансгенных мышей, которые несут гены человеческих иммуноглобулинов, что будет описано ниже), кДНК, которые кодируют легкие и тяжелые цепи антитела, созданные с использованием гибридомы, можно получать с помощью стандартных методов ПЦР-амплификации или клонирования кДНК. Для антител, которые получают из библиотеки генов иммуноглобулинов (например, с помощью метода фагового дисплея), нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, можно выделять из различных фаговых клонов, которые являются компонентами библиотеки.

Под объем настоящего изобретения подпадают также варианты нуклеотидных последовательностей, которые несут одну или несколько делеций, добавлений или замен. Одним из вариантов осуществ-

ления изобретения является одна или несколько из SEQ ID NO: 113-140 или 161-180, которая(ые) содержит(ат) консервативную нуклеотидную замену. В результате вырожденности генетического кода аминокислота может кодироваться несколькими кодонами. Таким образом, можно внести изменения в нуклеотидную последовательность, но при этом транслируемая аминокислотная последовательность останется такой же. После получения ДНК-фрагментов, кодирующих V_H - и V_L -области, эти ДНК-фрагменты можно подвергать дополнительной обработке с помощью стандартных методов рекомбинантной ДНК, например, для превращения генов варибельной области в гены полноразмерной цепи антитела, в гены Fab-фрагмента или в ген scFv-фрагмента. При осуществлении этого процесса ДНК-фрагмент, кодирующий V_L или V_H , функционально связывают с другой молекулой ДНК или фрагментом, кодирующей/кодирующим другой белок, такой как константная область антитела или гибкий линкер. Понятие "функционально связанный" в контексте настоящего описания означает, что два ДНК-фрагмента соединяют функциональным образом, в результате чего аминокислотные последовательности, кодируемые двумя ДНК-фрагментами, сохраняются в рамке считывания, или в результате чего белок экспрессируется под контролем требуемого промотора.

Выделенную ДНК, кодирующую V_H -область, можно превращать в ген полноразмерной тяжелой цепи путем функционального связывания ДНК, которая кодирует V_H , с другой молекулой ДНК, которая кодирует константные области тяжелой цепи (CH1, CH2 и CH3). Последовательности генов константной области тяжелой цепи известны в данной области (см., например, Kabat E.A. и др., выше), и ДНК-фрагменты, включающие эти области, можно получать с помощью стандартной ПЦР-амплификации. Константная область тяжелой цепи может представлять собой константную область IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM или IgD. Предпочтительно константную область тяжелой цепи выбирают среди IgG1-изотипов. В случае гена Fab-фрагмента тяжелой цепи ДНК, кодирующую V_H , можно функционально связывать с другой молекулой ДНК, которая кодирует только константную область CH1 тяжелой цепи.

Выделенную ДНК, кодирующую V_L -область, можно превращать в ген полноразмерной легкой цепи (а также в ген легкой цепи Fab-фрагмента) путем функционального связывания ДНК, кодирующей V_L , с другой молекулой ДНК, которая кодирует константную область легкой цепи, т.е. CL. Последовательности человеческих генов константной области легкой цепи известны в данной области (см., например, Kabat E.A. и др., выше), и ДНК-фрагменты, включающие эти области, можно получать с помощью стандартной ПЦР-амплификации. Константная область легкой цепи может представлять собой константную область каппа- или лямбда-цепи.

Для создания гена scFv ДНК-фрагменты, которые кодируют V_H и V_L , функционально связывают с другим фрагментом, который кодирует гибкий линкер, например, который кодирует аминокислотную последовательность (Gly4-Ser)₃, в результате чего последовательности V_H и V_L можно экспрессировать в виде смежного одноцепочечного белка, в котором V_L - и V_H -области соединены гибким линкером (см., например, Bird и др., Science 242, 1988, с. 423-426; Huston и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1988, с. 5879-5883; McCafferty и др., Nature 348, 1990, с. 552-554).

Нуклеиновые кислоты, предлагаемые в изобретении, можно применять для введения гена. Это означает, что нуклеиновую кислоту, которая кодирует полипептиды (антитела или функциональные белки), предлагаемые в изобретении, можно вводить непосредственно пациенту с целью трансляции в организме пациента.

Нуклеиновую кислоту, как правило, "упаковывают" для введения пациенту. Носители, применяемые для введения генов, могут быть невирусными, например, липосомы, или представлять собой вирусы с дефектом репликации, такие как векторы на основе аденовируса, описанные у Berkner K.L., Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158, 1992, с. 39-66, или аденоассоциированного вируса (AAV), описанные у Muzyczka N., Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158, 1992, с. 97-129 и US 5252479. В другом варианте можно применять ретровирус, такой как лентивирус. Например, молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, предлагаемый в изобретении, можно создавать для экспрессии вектора на основе ретровируса с дефектом репликации. Эту экспрессионную конструкцию затем можно выделять и интродуцировать в упаковывающую клетку, трансдуцированную ретровирусным плазмидным вектором, который содержит РНК, кодирующую полипептид, указанная упаковывающая клетка в результате продуцирует инфекционные вирусные частицы, которые содержат представляющий интерес ген. Эти клетки-продуценты можно вводить индивидууму для конструирования клеток *in vivo* и экспрессии полипептида *in vivo* (см. главу 20, в Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches (и процитированные в указанной публикации ссылки) в: Human Molecular Genetics, T. Strachan и A.P. Read, 1996, изд-во BIOS Scientific Publishers Ltd).

Другой подход предусматривает введение "голой ДНК", с помощью которой терапевтический ген непосредственно инъецируют в кровотоки или мышечную ткань.

Создание моноклональных антител, предлагаемых в изобретении.

Моноклональные антитела (МАт) можно получать с помощью различных методов, включая общепринятые методы получения моноклональных антител, например, с помощью стандартного метода гибридизации соматических клеток, описанного у Kohler и Milstein, Nature 256, 1975, с. 495. Для получения моноклональных антител можно применять многочисленные методики, например, трансформацию В-

лимфоцитов вирусами или онкогенами. Применяемая для получения гибридом система животного происхождения представляет собой систему, основанную на использовании мышей. Создание гибридомы в мышце является хорошо известной процедурой. Протоколы иммунизации и методы выделения иммунизированных спленоцитов, предназначенных для слияния, хорошо известны в данной области. Компоненты, участвующие в слиянии (например, клетки мышинной миеломы), и процедуры слияния также хорошо известны.

Химерные или гуманизированные антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, можно создавать на основе последовательности мышинного моноклонального антитела, полученного согласно описанному выше методу. ДНК, кодирующую тяжелые и легкие цепи иммуноглобулинов, можно получать из представляющей интерес мышинной гибридомы и создавать так, чтобы она содержала немышинные (например, человеческие) последовательности иммуноглобулинов, с помощью стандартных методов молекулярной биологии. Например, для создания химерного антитела мышинные переменные области можно связывать с человеческими константными областями с использованием известных в данной области методов (см., например, US 4816567). Для создания гуманизированного антитела мышинные CDR-участки можно встраивать в человеческий каркасный участок с помощью известных в данной области методов (см., например, US 5225539; US 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370).

В конкретном варианте осуществления изобретения антитела, предлагаемые в изобретении, представляют собой человеческие моноклональные антитела. Такие человеческие моноклональные антитела к ActRIIB можно создавать с использованием трансгенных или трансхромосомных мышей, несущих фрагменты человеческой, а не мышинной иммунной системы. К этим трансгенным и трансхромосомным мышам относятся мыши, обозначенные в контексте настоящего описания как HuMAb-мыши и KM-мыши соответственно, и мышей обеих указанных линий обозначают в контексте настоящего описания как "мыши, несущие человеческий Ig".

Мыши линии HuMAb (HuMAb mouse®, фирма Medarex, Inc.) содержат минилокусы гена человеческого иммуноглобулина, который кодирует неперегруппированные последовательности человеческой тяжелой (μ и γ) и легкой к-цепи иммуноглобулина, в сочетании с целевыми мутациями, которые инактивируют эндогенные локусы μ - и к-цепи (см., например, Lonberg и др., Nature 368(6474), 1994, с. 856-859). Таким образом, у мыши снижена способность экспрессировать мышинный IgM или к-цепь, и в ответ на иммунизацию интродуцированные трансгены человеческой тяжелой и легкой цепи подвергаются переключению класса и соматической мутации с образованием обладающей высокой аффинностью каппа-цепи человеческого моноклонального IgG (IgGк) (Lonberg N. и др., 1994, выше; обзорная статья Lonberg N., Handbook of Experimental Pharmacology 113, 1994, с. 49-101; Lonberg N. и Huszar D., Intern. Rev. Immunol. 13, 1995, с. 65-93 и Harding F. и Lonberg N., Ann. N. Y. Acad. Sci. 764, 1995, с. 536-546). Получение и применение мышей линии HuMAb и геномные модификации, которые несут такие мыши, описаны также у Taylor L. и др., Nucleic Acids Research 20, 1992, с. 6287-6295; Chen J. и др., International Immunology 5, 1993, с. 647-656; Tuailon и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1993, с. 3720-3724; Choi и др., Nature Genetics 4, 1993, с. 117-123; Chen J. и др., EMBO J. 12, 1993, с. 821-830; Tuailon и др., J. Immunol. 152, 1994, с. 2912-2920; Taylor L. и др., International Immunology, 1994, с. 579-591; и Fishwild D. и др., Nature Biotechnology 14, 1996, с. 845-851 (см. также US 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5789650; 5877397; 5661016; 5814318; 5874299; 5770429 и 5545807; а также WO 92/103918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/113852, WO 98/24884; WO 99/45962 и WO 01/14424).

В другом варианте осуществления изобретения человеческие антитела, предлагаемые в изобретении, можно получать с использованием мыши, которая несет последовательности человеческого иммуноглобулина на трансгенах и трансхромосомах, например, мыши, которая несет трансген человеческой тяжелой цепи и трансхромосому человеческой легкой цепи. Такие мыши, обозначенные в контексте настоящего описания как "KM-мыши", описаны подробно в WO 02/43478.

В данной области известны также и другие альтернативные системы на основе трансгенных животных, экспрессирующих гены человеческого иммуноглобулина, и их можно применять для получения антител к ActRIIB, предлагаемых в изобретении. Например, можно использовать другую трансгенную систему, обозначенную как Xenomouse (фирма Abgenix, Inc.); такие мыши описаны, например, в US 5939598; 6075181; 6114598; 6150584 и 6162963.

Кроме того, в данной области известны также другие трансхромосомные системы, созданные на основе животных, для экспрессии генов человеческого иммуноглобулина, и их можно применять для получения антител к ActRIIB, предлагаемых в изобретении. Например, можно использовать мышей, несущих как трансхромосому человеческой тяжелой цепи, так и трансхромосому человеческой легкой цепи, которые обозначены как "ТС-мыши"; такие мыши описаны, например, у Tomizuka и др. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 2000, с. 722-727. Кроме того, в данной области известны коровы, несущие трансхромосомы человеческой тяжелой и легкой цепи (Kuroiwa и др., Nature Biotechnology 20, 2002, с. 889-894) и их можно применять для получения антител к ActRIIB, предлагаемых в изобретении.

Человеческие рекомбинантные антитела, предлагаемые в изобретении, можно получать также с использованием методов фагового дисплея для скрининга библиотек генов человеческих иммуноглобули-

нов. В данной области разработаны такие методы фагового дисплея для выделения человеческих антител (см., например, US 5223409; 5403484; 5571698; 5427908; 5580717; 5969108; 6172197; 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915 и 6593081).

Человеческие моноклональные антитела, предлагаемые в изобретении, можно получать также с использованием SCID-мышей (мыши с тяжелым комбинированным иммунодефицитом), в которых воссоставляли человеческие иммунocyты с тем, чтобы при иммунизации можно было получать человеческий гуморальный иммунный ответ. Такие мыши описаны, например, в US 5476996 и 5698767.

Создание гибридом, продуцирующих человеческие моноклональные антитела.

Для создания гибридом, которые продуцируют человеческие моноклональные антитела, предлагаемые в изобретении, можно выделять спленocyты и/или клетки лимфатических узлов из иммунизированных мышей и сливать с соответствующей иммортализованной линией клеток, такой как линия клеток мышинной миеломы. Образовавшиеся гибридомы можно подвергать скринингу в отношении производства специфических для антигена антител. Например, суспензии индивидуальных клеток селезеночных лимфоцитов из иммунизированных мышей можно сливать в количестве, составляющем одну шестую часть от количества клеток несекретирующей мышинной миеломы линии P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) с помощью 50% ПЭГ. Клетки высевают примерно из расчета 2×10^5 /лунку в плоскодонные титрационные микропланшеты, затем инкубируют в течение 2 недель в среде для селекции, содержащей 20% фетальной сыворотки (Clone), кондиционированной среды "653", 5% оригена (фирма IGEN), 4 mM L-глутамин, 1 mM пируват натрия, 5 mM HEPES, 0,055 mM 2-меркаптоэтанол, 50 ед./мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина, 50 мкг/мл гентамицина и 1xГАТ (фирма Sigma; ГАТ добавляют через 24 ч после слияния). Примерно через 2 недели клетки можно культивировать в среде, в которой ГАТ заменен на ГТ. Затем индивидуальные лунки можно подвергать скринингу с помощью ELISA в отношении человеческих моноклональных антител в виде IgM и IgG. После достижения интенсивного роста гибридом осуществляют мониторинг среды, как правило, через 10-14 дней. Гибридомы, секретирующие антитела, можно пересевать, вновь подвергать скринингу и, если все еще сохраняется позитивная реакция в отношении человеческого IgG, то моноклональные антитела можно субклонировать по меньшей мере дважды с использованием конечного разведения. Затем стабильные субклоны можно культивировать *in vitro* для получения небольших количеств антител в среде для культуры ткани с целью дальнейшей характеристики.

Для очистки человеческих моноклональных антител отобранные гибридомы можно выращивать в 2-литровых вращающихся колбах с целью очистки моноклональных антител. Супернатанты можно фильтровать и концентрировать перед осуществлением аффинной хроматографии с использованием белка А-сефарозы (фирма Pharmacia, Пискатавей, шт. Нью-Джерси). Элюированный IgG можно проверять с помощью гель-электрофореза и жидкостной хроматографии высокого разрешения для гарантии чистоты. Буферный раствор можно заменять на 3ФР и концентрацию определять на основе ОП₂₈₀ с использованием коэффициента экстинкции 1,43. Моноклональные антитела можно разделять на аликвоты и хранить при -80°C.

Создание трансфектом, продуцирующих моноклональные антитела.

Антитела, предлагаемые в изобретении, можно получать также в трансфектоне клетки-хозяина с использованием, например, комбинации методов рекомбинантной ДНК и методов генной трансфекции, которые хорошо известны в данной области (см., например, Morrison S., Science 229, 1985, с. 1202).

Например, для экспрессии антител или фрагментов антител можно получать ДНК, которые кодируют частичные или полноразмерные легкие и тяжелые цепи, с помощью стандартных методов молекулярной биологии (например, с помощью ПЦР-амплификации или клонирования кДНК с использованием гибридом, которые экспрессируют представляющее интерес антитело), и ДНК можно встраивать в экспрессионные векторы таким образом, чтобы гены были функционально связаны с контролирующими транскрипцию и трансляцию последовательностями. В этом контексте подразумевается, что понятие "функционально связанный" означает, что ген антитела встраивают путем лигирования в вектор таким образом, чтобы присутствующие в векторе контролирующие транскрипцию и трансляцию последовательности выполняли свойственные им функции регуляции транскрипции и трансляции гена антитела. Выбранный экспрессионный вектор и контролирующие экспрессию последовательности должны быть совместимы с применяемой для экспрессии клеткой-хозяином. Ген легкой цепи антитела и ген тяжелой цепи антитела можно встраивать в различные векторы или, как правило, оба гена встраивают в один и тот же экспрессионный вектор. Гены антитела встраивают в экспрессионный вектор стандартными методами (например, встраивают путем лигирования комплементарных сайтов рестрикции на фрагменте гена антитела и вектора, или путем лигирования "затупленных" концов, если отсутствуют какие-либо сайты рестрикции). Вариабельные области легких и тяжелых цепей антител, предлагаемых в изобретении, можно использовать для создания полноразмерных генов антител любых изотипов путем встраивания их в экспрессионные векторы, которые уже кодируют константные области тяжелой цепи и константные области легкой цепи требуемого изотипа, таким образом, чтобы V_H-область была функционально связана с C_H-сегментом(ами) в векторе, а V_L-область функционально связана с CL-сегментом в векторе. В другом

или дополнительном варианте осуществления изобретения рекомбинантный экспрессионный вектор может кодировать сигнальный пептид, который облегчает секрецию цепи антитела из клетки-хозяина. Ген цепи антитела можно клонировать в векторе так, чтобы сигнальный пептид был связан в рамке считывания с N-концом гена цепи антитела. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид (т.е. сигнальный пептид из белка, не относящегося к иммуноглобулинам).

Помимо генов цепей антитела рекомбинантные экспрессионные векторы, предлагаемые в изобретении, несут регуляторные последовательности, которые контролируют экспрессию генов цепи антитела в клетке-хозяине. Подразумевается, что понятие "регуляторная последовательность" относится к промоторам, энхансерам и другим контролирующим экспрессию элементам (например, сигналы полиаденилирования), которые контролируют транскрипцию или трансляцию генов цепи антитела. Указанные регуляторные последовательности описаны, например, у Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, изд-во Academic Press, San Diego, CA 1990). Специалистам в данной области должно быть очевидно, что создание экспрессионного вектора, включая выбор регуляторных последовательностей, может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина для трансформации, требуемый уровень экспрессии белка и т.д. Регуляторные последовательности, предназначенные для экспрессии в клетках млекопитающих, включают вирусные элементы, которые обеспечивают высокие уровни экспрессии белка в клетках млекопитающих, такие как промоторы и/или энхансеры, выведенные из цитомегаловируса (CMV), обезьяньего вируса 40 (SV40), аденовируса (например, главный поздний промотор аденовируса (AdMLP)) и вируса полиомы. В альтернативном варианте можно использовать невирусные регуляторные последовательности, такие как промотор убикитина или промотор Р-глобина. Кроме того, можно применять регуляторные элементы, состоящие из полученных из разных источников последовательностей, такие как промоторная система Sra, которая содержит последовательности раннего промотора SV40 и длинный концевой повтор вируса типа 1 человеческого Т-клеточного лейкоза (Takebe Y. и др., Mol. Cell. Biol. 8, 1988, с. 466-472).

Помимо генов цепей антитела и регуляторных последовательностей рекомбинантные экспрессионные векторы, предлагаемые в изобретении, могут нести дополнительные последовательности, например, последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, сайты инициации репликации) и гены селективируемых маркеров. Гены селективируемых маркеров облегчают отбор клеток-хозяев, в которые интродуцирован вектор (см., например, US 4399216, 4634665 и 5179017). Например, как правило, ген селективируемого маркера обуславливает устойчивость клетки-хозяина, в которую интродуцирован вектор, к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат. К генам селективируемых маркеров относятся ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) (для применения в dhfr⁻-клетках-хозяевах при селекции/амплификации в присутствии метотрексата) и ген нео (для отбора в присутствии G418).

Для экспрессии легких и тяжелых цепей экспрессионным(ыми) вектором(ами), кодирующим(ими) тяжелые и легкие цепи, трансфектируют клетку-хозяина с помощью стандартных методов. Под различные формы понятия "трансфекция" подпадает широкое разнообразие методов, обычно применяемых для интродукции экзогенной ДНК в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяина, например, электропорация, осаждение фосфатом кальция, трансфекция с использованием ДЭАЭ ((диэтиламино)этилцеллюлоза)-декстрана и т.п. Теоретически можно экспрессировать антитела, предлагаемые в изобретении, как в прокариотических, так и в эукариотических клетках-хозяевах. Считается, что следует осуществлять экспрессию в эукариотических клетках, прежде всего в клетках-хозяевах млекопитающих, поскольку указанные эукариотические клетки и, прежде всего клетки млекопитающих, с большей вероятностью, чем прокариотические клетки, могут обеспечивать сборку и секрецию имеющего правильную укладку и обладающего иммунологической активностью антитела. Установлено, что экспрессия генов антител в прокариотических хозяевах не может эффективно обеспечивать высокие уровни производства активного антитела (Boss M.A. и Wood C.R., Immunology Today 6, 1985, с. 12-13).

Клетки-хозяева млекопитающих, предназначенные для экспрессии рекомбинантных антител, предлагаемых в изобретении, представляют собой клетки яичника китайского хомячка (CHO-клетки) (включая CHO-клетки с дефицитом dhfr (dhfr⁻), описанные у Urlaub и Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1980, с. 4216-4220, которые применяют в сочетании с селективируемым маркером DHFR, например, как описано у R.J. Kaufman и P.A. Sharp, Mol. Biol. 159, 1982, с. 601-621, клетки миеломы линии NSO, COS-клетки и SP2-клетки). В одном из вариантов осуществления изобретения клетки-хозяева представляют собой клетки CHO K1PD. В частности, для применения в сочетании с клетками миеломы NSO используют другую экспрессионную систему, представляющую собой экспрессионную систему GS-гена, как описано в WO 87/04462, WO 89/01036 и EP 338841.

В одном из вариантов осуществления изобретения клетки-хозяева млекопитающих, предназначенные для экспрессии рекомбинантных антител, предлагаемых в изобретении, представляют собой линии клеток млекопитающих с дефицитом экспрессии гена FUT8, например, описанные в US 6946292 B2. Когда рекомбинантные экспрессионные векторы, кодирующие гены антитела, интродуцируют в клетки-хозяева млекопитающих, то антитела получают путем культивирования клеток-хозяев в течение периода

времени, достаточного для осуществления экспрессии антитела в клетках-хозяевах или секрети антитела в культуральную среду, в которой выращивают клетки-хозяева. Антитела можно выделять из культуральной среды с помощью стандартных методов очистки белков.

Иммуноконъюгаты.

Следующим объектом настоящего изобретения является антитело к ActRIIB или его фрагмент, конъюгированное/конъюгированный с обладающим терапевтическим действием фрагментом, таким как цитотоксин, лекарственное средство (например, иммунодепрессант) или радиотоксин. Такие конъюгаты обозначены в контексте настоящего описания как "иммуноконъюгаты".

Иммуноконъюгаты, которые содержат один или несколько цитотоксинов, обозначают как "иммунотоксины". К цитотоксинам или цитотоксическим агентам относится любой агент, который повреждает (например, уничтожает) клетки.

Цитотоксины можно конъюгировать с антителами, предлагаемыми в изобретении, с использованием известной в данной области технологии, предусматривающей применение линкеров. Примерами типов линкеров, которые можно использовать для конъюгации цитотоксина с антителом, являются (но, не ограничиваясь только ими) гидразоны, сложные тиеофиры, сложные эфиры, дисульфиды и пептидсодержащие линкеры. Можно выбирать линкер, который, например, чувствителен к расщеплению при низком значении pH в компартменте лизосомы или чувствителен к расщеплению протеазами, например, протеазами, которые преимущественно экспрессируются в опухолевых тканях, такими как катепсины (например, катепсины B, C, D).

Дополнительные данные о типах цитотоксинов, линкерах и методах конъюгации терапевтических агентов и антител приведены также у Saito G. и др., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 2003, с. 199-215; Trai P.A. и др., *Cancer Immunol. Immunother.* 52 2003, с. 328-337; Payne G., *Cancer Cell* 3, 2003, с. 207-212; Allen T.M., *Nat. Rev. Cancer* 2, 2002, с. 750-763; Pastan I. и Kreitman R.J., *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3, 2002, с. 1089-1091; Senter P.D. и Springer C.J., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53, 2001, с. 247-264.

Антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, можно конъюгировать также с радиоактивными изотопами с получением цитотоксических радиоактивных фармацевтических агентов, которые называют также радиоиммуноконъюгатами. Примерами радиоактивных изотопов, которые можно конъюгировать с антителами для применения в диагностических или терапевтических целях, являются (но, не ограничиваясь только ими) иод¹³¹, индий¹¹¹, иттрий⁹⁰ и лютеций¹⁷⁷. В данной области разработаны методы получения радиоиммуноконъюгатов. Примерами имеющихся на рынке радиоиммуноконъюгатов являются ZevalinTM (фирма DEC Pharmaceuticals) и BexxarTM (фирма Corixa Pharmaceuticals), и аналогичные методы можно применять для получения радиоиммуноконъюгатов антител, предлагаемых в изобретении.

Конъюгаты антител, предлагаемые в изобретении, можно применять для модификации конкретного биологического ответа, и в контексте настоящего описания не подразумевается, что компонент, представляющий собой лекарственное средство, ограничен классическими химиотерапевтическими агентами. Например, компонент, являющийся лекарственным средством, может представлять собой белок или полипептид, обладающий требуемой биологической активностью. Такие белки могут представлять собой, например, обладающий ферментативной активностью токсин или его активный фрагмент, такой как абрин, рицин A, экзотоксин *Pseudomonas* или дифтерийный токсин; такой белок, как фактор некроза опухоли или интерферон-γ; или модификаторы биологического ответа, такие, например, как лимфокины, интерлейкин-1 ("IL-1"), интерлейкин-2 ("IL-2"), интерлейкин-6 ("IL-6"), колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов ("GM-CSF"), колониестимулирующий фактор гранулоцитов ("G-CSF") или другие факторы роста.

Методы осуществления конъюгации такого обладающего терапевтической активностью фрагмента с антителами хорошо известны (см., например, Amon и др., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", в: *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, под ред. Reisfeld и др., изд-во Alan R. Liss, Inc., с. 243-56, 1985; Hellstrom и др., "Antibodies For Drug Delivery", в: *Controlled Drug Delivery* (2-е изд.), под ред. Robinson и др., под ред. Marcel Dekker, Inc., с. 623-53, 1987; Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", в: *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, под ред. Pinchera и др., 1985, с. 475-506; "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", в: *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, под ред. Baldwin и др., изд-во Academic Press, 1985, с. 303-316 и Thorpe и др., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62, 1982, с. 119-158).

Биспецифические молекулы.

Следующим объектом настоящего изобретения являются биспецифические или мультиспецифические молекулы, содержащие предлагаемое в изобретении антитело к ActRIIB или его фрагмент. Антитело, предлагаемое в изобретении, или его антигенсвязывающие участки можно дериватизировать или связывать с другой функционально активной молекулой, например, другим пептидом или белком (например, другим антителом или лигандом рецептора), с получением биспецифической молекулы, которая связывается по меньшей мере с двумя различными сайтами связывания или молекулами-мишенями. Антитело, предлагаемое в изобретении, фактически может быть дериватизировано или связано более чем с

одной другой функциональной молекулой с образованием мультиспецифических молекул, которые связываются более чем с двумя различными сайтами связывания и/или молекулами-мишенями; подразумевается, что в контексте настоящего описания указанные мультиспецифические молекулы также подпадают под понятие "биспецифическая молекула". Для создания биспецифической молекулы, предлагаемой в изобретении, антитело, предлагаемое в изобретении, можно функционально связывать (например, путем химического сочетания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одной или несколькими другими связывающими молекулами, такими как другое антитело, фрагмент антитела, пептид или связывающий миметик, с получением биспецифической молекулы.

Таким образом, настоящее изобретение относится к биспецифическим молекулам, которые имеют по меньшей мере одну первую специфичность, обладающую способностью к связыванию с ActRIIB, и вторую специфичность, обладающую способностью к связыванию со вторым эпитопом-мишенью. Например, второй эпитоп-мишень представляет собой другой эпитоп ActRIIB, отличный от первого эпитопа-мишени.

Кроме того, согласно варианту осуществления изобретения, в котором биспецифическая молекула является мультиспецифической, молекула в дополнение к специфичности в отношении первого и второго эпитопа-мишени может дополнительно включать третью специфичность, обладающую способностью к связыванию.

В одном из вариантов осуществления изобретения биспецифические молекулы, предлагаемые в изобретении, содержат в качестве специфичности, обладающей способностью к связыванию, по меньшей мере одно антитело или фрагмент антитела, например, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или одноцепочечный Fv. Антитело может представлять собой также димер легких цепей или тяжелых цепей или любой его минимальный фрагмент, такой как Fv, или одноцепочечную конструкцию, описанную у Ladner и др., US 4946778, содержание которого специально включено в настоящее описание в качестве ссылки.

К другим антителам, которые можно применять в биспецифических молекулах, предлагаемых в изобретении, относятся мышиные, химерные и гуманизированные моноклональные антитела.

Биспецифические молекулы, предлагаемые в настоящем изобретении, можно получать путем конъюгации компонентов, представляющих собой обладающие способностью к связыванию специфичности, с помощью методов, известных в данной области. Например, каждую обладающую способностью к связыванию специфичность биспецифической молекулы можно создавать по отдельности и затем конъюгировать друг с другом. Когда обладающие способностью к связыванию специфичности представляют собой белки или пептиды, для ковалентной конъюгации можно использовать целый ряд агентов для связывания или перекрестного сшивания. Примерами перекрестносшивающих агентов являются белок А, карбодимид, N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат (SATA), 5,5'-дитиобис(2-нитробензойная кислота) (DTNB), о-фенилендималеимид (oPDM), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) и сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC) (см., например, Karpovsky и др., J. Exp. Med. 160, 1984, с. 1686; Liu M.A. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1985, с. 8648). Другие методы представляют собой методы, описанные у Paulus, Behring Ins. Mitt. No. 78, 1985, с. 118-132; Brennan и др., Science 229, 1985, с. 81-83) и Glennie и др., J. Immunol. 139, 1987, с. 2367-2375). Такие предназначенные для конъюгации агенты, как SATA и сульфо-SMCC, оба поступают в продажу от фирмы Pierce Chemical Co. (Рокфорд, шт. Иллинойс).

Когда обладающие способностью к связыванию специфичности представляют собой антитела, то их можно конъюгировать с помощью сульфгидрильной связи С-концевых шарнирных областей двух тяжелых цепей. В конкретном варианте осуществления изобретения шарнирную область модифицируют таким образом, чтобы она до конъюгации содержала нечетное количество сульфгидрильных остатков, например, один остаток.

В альтернативном варианте обе обладающие способностью к связыванию специфичности можно кодировать в одном и том же векторе и экспрессировать и собирать в одной и той же клетке-хозяине. Этот метод является наиболее целесообразным, когда биспецифическая молекула представляет собой слитый белок, такой как МАт × МАт, МАт × Fab, Fab × F(ab')₂ или лиганд × Fab. Биспецифическая молекула, предлагаемая в изобретении, может представлять собой одноцепочечную молекулу, которая содержит одноцепочечное антитело и связывающую детерминанту, или одноцепочечную биспецифическую молекулу, которая содержит две связывающие детерминанты. Биспецифические молекулы могут содержать по меньшей мере две одноцепочечные молекулы. Методы получения биспецифических молекул описаны, например, в US 5260203; 5455030; 4881175; 5132405; 5091513; 5476786; 5013653; 5258498 и 5482858.

Связывание биспецифических молекул с их специфическими мишенями можно подтверждать, например, твердофазным иммуноферментным анализом (ELISA), радиоиммуноанализом (РИА), FACS-анализом, биологическим анализом (например, ингибирование роста) или анализом методом вестерн-блоттинга. Каждый из указанных анализов позволяет выявлять присутствие конкретных представляющих интерес комплексов белок-антитело при использовании меченого реагента (например, антитела), специфического в отношении представляющего интерес комплекса.

Многовалентные антитела.

Следующим объектом настоящего изобретения являются многовалентные антитела, содержащие по меньшей мере два идентичных или различных антигенсвязывающих участка антител, предлагаемых в изобретении, которые связываются с ActRIIB. Одним из вариантов осуществления изобретения являются многовалентные антитела, которые содержат по меньшей мере два, три или четыре антигенсвязывающих участка антител. Антигенсвязывающие участки можно соединять вместе путем белкового слияния или ковалентной или нековалентной связи. В другом варианте можно применять методы связывания, описанные для биспецифических молекул. Четырехвалентные соединения можно получать, например, путем перекрестного сшивания антител, предлагаемых в изобретении, с антителом, которое связывается с константными областями антител, предлагаемых в изобретении, например, с Fc или с шарнирной областью.

Фармацевтические композиции.

Следующим объектом настоящего изобретения является композиция, например, фармацевтическая композиция, содержащая одно или комбинацию моноклональных антител или их антигенсвязывающий(ие) участок(ки), предлагаемые в настоящем изобретении, в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем. Такие композиции могут включать одно или комбинацию (например, два или большее количество различных) антител или иммуноконъюгатов или биспецифических молекул, предлагаемых в изобретении. Например, фармацевтическая композиция, предлагаемая в изобретении, может содержать комбинацию антител, которые связываются с различными эпитопами на антигене-мишени, или которые обладают дополнительным видом активности.

Фармацевтические композиции, предлагаемые в изобретении, можно применять также для комбинированной терапии, т.е. в сочетании с другими агентами. Например, для комбинированной терапии можно применять антитело к ActRIIB, предлагаемое в настоящем изобретении, в сочетании по меньшей мере с одним другим увеличивающим мышечную массу/силу агентом, например, IGF-1, IGF-2 и или вариантом IGF-1 или IGF-2, антителом к миостатину, пропептидом миостатина, белком, представляющим собой "манок" для миостатина, который связывается с ActRIIB, но не активирует его, агонистом бета 2, агонистом грелина, селективными модуляторами андрогенных рецепторов (SARM), агонистами/миметиками GH или фоллистатином. Примеры терапевтических средств, которые можно применять в комбинированной терапии, более подробно описаны ниже в разделе, посвященном применению антител, предлагаемых в изобретении.

В контексте настоящего описания понятие "фармацевтически приемлемый носитель" включает каждый и все растворители, дисперсионные среды, материалы для нанесения покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, агенты, придающие изотоничность, и замедляющие абсорбцию агенты и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Носитель должен быть пригодным для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии). В зависимости от пути введения на действующее вещество, т.е. антитело, иммуноконъюгат или биспецифическую молекулу, можно наносить покрытие из материала, защищающего соединение от воздействия кислот и других факторов окружающей среды, которые могут инактивировать соединение.

Фармацевтические соединения, предлагаемые в изобретении, могут включать одну или несколько фармацевтически приемлемых солей. Понятие "фармацевтически приемлемая соль" относится к соли, которая сохраняет требуемую биологическую активность родительского соединения и не вызывает никаких нежелательных токсикологических действий (см., например, Berge S.M., и др., J. Pharm. Sci. 66, 1977, с. 1-19). Примерами таких солей являются кислотно-аддитивные соли и соли присоединения оснований. К кислотно-аддитивным солям относятся соли, образованные из нетоксичных неорганических кислот, таких как соляная, азотная, фосфорная, серная, бромистоводородная, йодистоводородная, фосфористая кислота и т.п., а также из нетоксичных органических кислот, таких как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, замещенные фенилом алкановые кислоты, оксипалкановые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфоновые кислоты и т.п. Соли присоединения оснований включают соли, образованные со щелочными и щелочноземельными металлами, такими как натрий, калий, магний, кальций и т.п., а также с нетоксичными органическими аминами, такими как N,N'-дибензилэтилендиамин, N-метилглуксамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, прокаин и т.п.

Фармацевтическая композиция, предлагаемая в изобретении, может содержать также фармацевтически приемлемый антиоксидант. Примерами фармацевтически приемлемых антиоксидантов являются: водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т.п.; жирорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВГА), бутилированный гидрокситолуол (БГТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т.п.; металлхелатирующие агенты, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТК), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п.

Примерами приемлемых водных и неводных носителей, которые можно применять в фармацевтических композициях, предлагаемых в изобретении, являются вода, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их приемлемые смеси, растительные масла, такие как

оливковое масло, и пригодные для инъекций сложные органические эфиры, такие как этилолеат. Требуемую текучесть можно поддерживать, например, с помощью применяемых для нанесения покрытий материалов, таких как лецитин, сохраняя требуемый размер частиц в случае дисперсий, и с помощью поверхностно-активных веществ.

Указанные композиции могут содержать также адъюванты, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгаторы и диспергирующие вещества. Отсутствие микроорганизмов можно гарантировать как с помощью описанных выше процессов стерилизации, так и включением различных антибактериальных и противогрибковых средств, таких, например, как парабен, хлорбутанол, фенол, сорбиновая кислота и т.п. Может оказаться желательным включать в композиции придающие изотоничность агенты, такие как сахара, хлорид натрия и т.п. Кроме того, можно получать инъецируемую фармацевтическую форму с пролонгированной абсорбцией, например, путем включения агентов, которые замедляют абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

Фармацевтически приемлемые носители представляют собой стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления при необходимости стерильных инъецируемых растворов или дисперсий. Применение таких сред и агентов для фармацевтических действующих веществ известно в данной области. За исключением случая, когда любые из общепринятых сред или агентов не совместимы с действующим веществом, предусматривается их применение в фармацевтических композициях, предлагаемых в изобретении. В композиции можно включать также дополнительные действующие вещества.

Терапевтические композиции, как правило, должны быть стерильными и стабильными в условиях приготовления и хранения. Композиция может иметь форму раствора, микроэмульсии, липосомы или иметь другую упорядоченную структуру, пригодную для включения лекарственного средства в высокой концентрации. Носитель может представлять собой растворитель или диспергирующую среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их приемлемые смеси. Требуемую текучесть можно поддерживать, например, с помощью применяемых для нанесения покрытий материалов, таких как лецитин, сохраняя требуемый размер частиц в случае дисперсий, и с помощью поверхностно-активных веществ. Во многих случаях можно включать придающие изотоничность агенты, такие как сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия и т.п. Кроме того, можно получать инъецируемую фармацевтическую форму с пролонгированной абсорбцией, например, путем включения агентов, которые замедляют абсорбцию, таких как моностеараты и желатин.

Стерильные предназначенные для инъекций растворы можно получать путем включения действующего вещества в требуемом количестве в соответствующий растворитель либо индивидуально, либо при необходимости в сочетании с указанными выше ингредиентами, с последующей стерилизацией микрофильтрацией. Как правило, дисперсии получают включением действующего вещества в стерильный наполнитель, который содержит основную дисперсионную среду и требуемые другие вышеперечисленные ингредиенты. Методы получения стерильных порошков, предназначенных для приготовления стерильных инъецируемых растворов, представляют собой вакуумную сушку и сушку вымораживанием (лиофилизация), с помощью которых получают порошок действующего вещества в сочетании с любым другим требуемым ингредиентом из предварительно стерилизованного фильтрацией раствора.

Количество действующего вещества, которое можно объединять с носителем для получения формы, содержащей однократную дозу, должно варьироваться в зависимости от индивидуума, подлежащего обработке, и конкретного пути введения. Количество действующего вещества, которое можно объединять с носителем для получения формы, содержащей однократную дозу, как правило, представляет собой количество композиции, которое обладает терапевтическим действием. Как правило, количество, за исключением случая, когда оно составляет 100%, представляет собой количество, составляющее от примерно 0,01 до примерно 99% действующего вещества, от 0,1 до примерно 70% или от примерно 1 до примерно 30% действующего вещества, в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем.

Схему приема лекарственного средства регулируют для получения оптимального требуемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно применять однократную болюсную инъекцию, можно вводить несколько разделенных доз в течение определенного промежутка времени или дозу можно пропорционально понижать или повышать в зависимости от конкретной терапевтической ситуации. Наиболее целесообразно приготавливать композиции для парентерального введения в виде стандартных доз лекарственного средства, что облегчает их применение и обеспечивает однородность доз. Под стандартной дозой лекарственного средства в контексте настоящего описания понимают физически дискретные единицы, предназначенные для введения стандартных доз индивидууму, подлежащему лечению; каждая единица содержит предварительно определенное количество действующего вещества, которое согласно расчету должно обладать желаемым терапевтическим действием, в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем. Специфические особенности форм в виде стандартных доз, предлагаемых в изобретении, определяются и непосредственно зависят от индивидуальных характеристик действующего вещества и конкретного терапевтического действия, которое необходимо достигать, и ограничениями, известными в области приготовления препаративных форм такого действующего вещества, свя-

занными с лечением чувствительных индивидуумов.

Применяемые для введения антитела дозы составляют от примерно 0,0001 до 100 мг/кг и более конкретно от 0,01 до 5 мг/кг веса тела пациента. Например, дозы могут составлять 0,3, 1, 3, 5 или 10 мг/кг веса тела, или могут находиться в диапазоне от 1 до 10 мг/кг или 3-7 мг/кг. Пример схемы лечения включает введение один раз в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые три недели, один раз каждые четыре недели, один раз в месяц, один раз каждые 3 месяца или один раз каждые 3-6 месяцев. В альтернативном варианте антитело можно вводить примерно один раз в год или только один раз. Указанное введение можно осуществлять внутривенно или подкожно. Схемы приема антитела к ActRIIB, предлагаемого в изобретении, могут включать введение 1 мг/кг веса тела или 3 мг/кг веса тела путем внутривенного применения, при этом антитело вводят с использованием следующих режимов применения: например, каждые 4 недели по 6 доз, затем каждые 3 месяца; каждые три недели; 3 мг/кг веса тела однократно, затем 1 мг/кг веса тела каждые 3 недели.

Доза должна быть такой, чтобы вызывать повышающую регуляцию мышечной массы и/или силы. Предпочтительно воздействие затрагивает скелетную мышцу. Предпочтительно доза вызывает гипертрофию мышц с не более чем пропорциональным увеличением внутренних органов (например, сердца, легких, печени, почек). Указанное пропорциональное увеличение можно оценивать на основе определения либо массы, либо объема.

В некоторых вариантах способа можно вводить одновременно два или большее количество моноклональных антител с различными специфичностями связывания, в этом случае доза каждого вводимого антитела находится в указанных диапазонах. Антитело, как правило, вводят многократно. Можно использовать, например, следующие интервалы между каждым введением доз: еженедельно, ежемесячно, каждые три месяца или ежегодно. Интервалы могут также быть нерегулярными в зависимости от измеренных в крови пациента уровней антитела к антигену-мишени. В некоторых вариантах способа дозу регулируют с целью достижения концентрации антитела в плазме, составляющей примерно 1-1000 мкг/мл, а в некоторых вариантах способа до достижения концентрации, составляющей примерно 25-300 мкг/мл. Например, антитело к ActRIIB, предлагаемое в изобретении, можно вводить совместно с антителом к миостатину.

В альтернативном варианте антитело можно вводить в виде формы с замедленным высвобождением, в этом случае требуется меньшая частота введения. Доза и частота введения варьируются в зависимости от времени полужизни антитела в организме пациента. В целом, человеческие антитела обладают наиболее длительным временем полужизни, в порядке снижения этого показателя антитела распределяются следующим образом: гуманизированные антитела, химерные антитела и антитела из организма видов кроме человека. Дозу и частоту введения можно варьировать в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. При применении в профилактических целях вводят относительно низкие дозы с относительно редкими интервалами в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают прием лекарственного средства в течение всей оставшейся жизни. При терапевтическом применении иногда требуется использование относительно высокой дозы с введением через относительно короткие интервалы вплоть до снижения скорости развития заболевания или прекращения его развития или до частичного или полного уменьшения интенсивности симптомов заболевания у пациента. После этого пациента можно переводить на профилактический режим применения.

Фактические уровни доз действующих веществ в фармацевтических композициях, предлагаемых в настоящем изобретении, можно варьировать таким образом, чтобы получать количество действующего вещества, эффективное для достижения требуемого терапевтического ответа у конкретного пациента, при использовании конкретной композиции и пути введения, и они не должны быть токсичными для пациента. Выбранный уровень доз должен зависеть от различных фармакокинетических факторов, включая активность применяемых конкретных композиций, предлагаемых в настоящем изобретении, или сложного эфира, соли или амида, пути введения, времени введения, скорости выделения конкретного применяемого соединения, продолжительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, применяемых в сочетании с конкретными используемыми композициями, возраста, пола, веса, состояния, общего состояния здоровья и истории болезни подлежащего лечению пациента и аналогичных хорошо известных в области медицины факторов.

"Терапевтически эффективная доза" антитела к ActRIIB, предлагаемого в изобретении, может приводить к уменьшению серьезности симптомов заболевания, повышению частоты и продолжительности бессимптомных периодов заболевания или к предупреждению ухудшения состояния или нетрудоспособности, связанной с поражением болезнью, повышение мышечной массы и/или силы.

Композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, можно вводить с помощью одного или нескольких путей введения с использованием одного или нескольких различных методов, известных в данной области. Как должно быть очевидно специалисту в данной области, путь и/или механизм введения должен варьироваться в зависимости от требуемых результатов. Пути введения антител, предлагаемых в изобретении, представляют собой внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, внутрибрюшинный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, с помощью инъекции или инфузии. Под "парентеральное введение" в контексте настоящего описания понимают пути введения,

отличные от энтерального и местного применения, как правило, путем инъекции, и включают (но, не ограничиваясь только ими) внутривенную, внутримышечную, внутриаартериальную, внутриоболочечную, внутрикапсульную, внутриглазничную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, подкутикулярную, внутрисуставную, подкапсульную, подпаутинную, интраспинальную, эпидуральную и надчревную инъекцию и инфузию. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело вводят внутривенно. В другом варианте осуществления изобретения антитело вводят подкожно.

В альтернативном варианте антитело, предлагаемое в изобретении, можно вводить непарентеральным путем, таким как местный, эпидермальный путь применения или нанесение на слизистую оболочку, например, интраназально, орально, вагинально, ректально, подъязычно или местно.

Действующие вещества можно включать в препаративную форму в сочетании с носителями, которые должны защищать соединение от быстрого высвобождения, например, в случае препаративной формы с контролируемым высвобождением, в том числе такой, как имплантаты, трансдермальные пластыри и микрокапсулированные системы введения. Можно применять биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, сложные полиорторозиферы и полимолочная кислота. Целый ряд методов получения таких препаративных форм запатентован или известен специалистам в данной области (см., например, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, под ред. J.R. Robinson, изд-во Marcel Dekker, Inc., New York, 1978).

Терапевтические композиции можно вводить с помощью известных в данной области медицинских устройств. Например, в одном из вариантов осуществления изобретения терапевтическую композицию, предлагаемую в изобретении, можно вводить с помощью безыгольного устройства для гиподермальных (подкожных) инъекций, например, с помощью устройств, описанных в US 5399163; 5383851; 5312335; 5064413; 4941880; 4790824 или 4596556. Примерами хорошо известных имплантатов и модулей, которые можно применять в настоящем изобретении, являются: описанный в US 4487603 пригодный для имплантации насос для микроинфузии дозированных медицинских препаратов с контролируемой скоростью; описанное в US 4486194 терапевтическое устройство для введения медицинских препаратов через кожу; описанный в US 4447233 насос для инфузии медицинских препаратов, предназначенный для введения лекарственных средств с точно установленной скоростью инфузии; описанное в US 4447224 пригодное для имплантации устройство для инфузии с изменяющимся потоком, предназначенное для непрерывного введения лекарственного средства; описанная в US 4439196 система для осмотического введения лекарственных средств, снабженная несколькими компартментами в виде камер; и описанная в US 4475196 система для осмотического введения лекарственных средств. Целый ряд других устройств, таких как имплантаты, системы для введения и модули, известны специалистам в данной области, и они включают устройства, поступающие в продажу под товарным знаком MicroCHIPS (Бедфорд, шт. Массачусетс).

В конкретных вариантах осуществления изобретения человеческие моноклональные антитела, предлагаемые в изобретении, можно приготавливать в формах, гарантирующих соответствующее распределение *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) не пропускает многие обладающие высокой гидрофильностью соединения. Для гарантии того, что обладающие терапевтической активностью соединения, предлагаемые в изобретении, пересекут ГЭБ (если это требуется) их можно включать, например, в липосомы. Методы приготовления липосом описаны, например, в US 4522811; 5374548 и 5399331. Липосомы могут содержать один или несколько фрагментов, которые избирательно транспортируются в определенные клетки или органы, что повышает направленное введение лекарственного средства (см., например, V.V. Ranade, *J. Cline Pharmacol.* 29, 1989, с. 685). Примерами обеспечивающих направленный перенос молекул являются фолат или биотин (см., например, US 5416016); маннозиды (Umezawa и др., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153, 1988, с. 1038); антитела (P.G. Bloeman и др., *FEBS Lett.* 357, 1995, с. 140; M. Owais и др., *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1995, с. 180); обладающий поверхностной активностью рецептор белка А (Briscoe и др., *Am. J. Physiol.* 1233, 1995, с. 134); p120 (Schreier и др., *J. Biol. Chem.* 269, 1994, с. 9090); (см. также K. Keinanen, M.L. Laukkanen, *FEBS Lett.* 346, 1994, с. 123; J.J. Killion, I.J. Fidler, *Immunomethods* 4, 1994, с. 273).

Применения и способы, предлагаемые в изобретении.

Антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, можно применять *in vitro* и *in vivo* в диагностических и терапевтических целях. Например, эти молекулы можно вводить в клетки в культуре, например, *in vitro* или *in vivo*, или индивидууму, например, *in vivo*, для лечения, предупреждения или диагностики различных нарушений. Так, антитела можно применять для лечения заболевания, профилактики и для замедления начала возникновения симптомов. Подразумевается, что понятие "индивидуум" в контексте настоящего описания относится к человеку и животным кроме человека. К животным кроме человека относятся все позвоночные животные, например, млекопитающие и животные, не относящиеся к млекопитающим, в том числе приматы кроме человека, овцы, собаки, кошки, коровы, лошади, куры, амфибии и рептилии.

В изобретении предложен способ лечения пациента, страдающего патологическим нарушением (таким как заболевание или нарушение, связанное с мышечным истощением), заключающийся в том, что вводят в терапевтически эффективном количестве антитело к ActRIIB.

В изобретении предложено также антитело к ActRIIB для применения в терапии.

Изобретение относится также к применению антитела к ActRIIB для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения патологического нарушения.

Способы наиболее целесообразно применять для лечения, предупреждения, облегчения или диагностирования патологических нарушений.

В контексте настоящего описания "патологическое нарушение" включает, (но, не ограничиваясь только ими) мышечно-скелетные заболевания или нарушения, такие как мышечная атрофия. Известно много причин мышечной атрофии, в том числе в результате лечения глюкокортикоидом, таким как кортизол, дексаметазон, бетаметазон, преднизон, метилпреднизолон или преднизолон. Мышечная атрофия может являться также результатом денервации вследствие травмы нерва или в результате дегенеративной, метаболической или воспалительной невропатии (например, синдром Гийена-Барре, периферическая невропатия или экзогенное воздействие токсинов или лекарственных средств).

Кроме того, мышечная атрофия может являться результатом миопатии, такой как миотония; врожденная миопатия, включая немалиновую миопатию, мульти/мини-миопатию центральных стержней и миотубулярную (центронуклеарную) миопатию; митохондриальная миопатия; периодический семейный паралич; воспалительная миопатия; метаболическая миопатия, например, вызываемая болезнью накопления гликогена или липидов; дерматомиозита; полимиозита; миозита с включением телец; оссифицирующего миозита; острого некроза скелетных мышц и миоглобинурии.

Миопатия может вызываться синдромом мышечной дистрофии, например, миопатия Дюшенна, Беккера, миотоническая, фасциальная лопаточно-плечевая, Эмери-Дрейфуса, окулофарингеальная, лопаточно-плечевая, пояса конечностей, Фукуямы, врожденная мышечная дистрофия или наследственная дистальная миопатия. Мышечно-скелетное заболевание может представлять собой также остеопороз, перелом кости, низкий рост или карликовость.

Кроме того, мышечная атрофия может являться результатом таких заболеваний, как болезнь моторных нейронов у взрослых, спинальная мышечная атрофия у детей, амиотрофический боковой склероз, юношеская спинальная мышечная атрофия, аутоиммунная моторная мультифокальная невропатия с блокадой проводимости, паралич в результате удара или повреждения спинного мозга, иммобилизация скелета вследствие травмы, пролонгированного пребывания в постели, добровольной пассивности, принудительной пассивности, метаболический стресс или недостаточность питательных веществ, рак, СПИД, голодание, нарушение щитовидной железы, диабет, доброкачественная врожденная гипотония, болезнь центрального стержня, связанное с ожогом повреждение, хроническое обструктивное легочное заболевание, болезни печени (такие, например, как фиброз, цирроз), сепсис, почечная недостаточность, застойная сердечная недостаточность, старение, полет в космос или пребывание в течение некоторого периода времени в условиях невесомости. Примерами связанных с возрастом состояний, которые можно лечить, являются саркопения, атрофия кожи, мышечное истощение, атрофия головного мозга, атеросклероз, артериосклероз, эмфизема легкого, остеопороз, остеоартрит, иммунологическая недостаточность, высокое кровяное давление, деменции, болезнь Гентингтона, болезнь Альцгеймера, катаракты, возрастная дегенерация желтого пятна, рак предстательной железы, "удар", пониженная вероятность выживания, моральная неустойчивость, потеря памяти, морщины, нарушенная функция почек и возрастная потеря слуха; метаболические нарушения, включая диабет типа II, метаболический синдром, гиперглицемию и ожирение. Естественно, пациенты могут одновременно иметь одно или несколько указанных состояний, например, саркопению и эмфизему легких, или саркопению и нарушенную функцию почек.

Другими состояниями, которые рассматриваются как "патологические нарушения", указанные в настоящем описании, являются острое и/или хроническое заболевание почек или почечная недостаточность, фиброз или цирроз печени, рак, такой как рак молочной железы, болезнь Паркинсона; состояния, ассоциированные с гибелью нейронов, такие как ALS, атрофия головного мозга или деменция и анемия.

Другие состояния представляют собой кахексию, кахексию, ассоциированную с ревматоидным артритом, и кахексию, ассоциированную с раком.

В настоящее время известно очень небольшое количество надежных или эффективных терапий, разработанных для лечения указанных нарушений.

С учетом известных данных об участии активинов, связывающихся среди прочих рецепторов также и с ActRIIB (Werner and Alzheimer, Cytokine Growth Factors Rev 2006, 17(3): 157-171), в развитии фиброза печени, почки и легкого и о роли миостатина, активинов или ActRIIB при различных видах рака (Tsuchida и др., Endo J, 55(1), 2008, с. 11-21), "патологические нарушения", указанные в настоящем описании, включают фиброз печени, почки и легкого и различные виды рака, такие, например, как (но, не ограничиваясь только ими) рабдомиосаркомы, рак, вызывающий потерю костной ткани, гепатоклеточные карциномы, различные виды желудочно-кишечного рака.

Предупреждение может быть полным, например, полное отсутствие связанного с возрастом состояния или метаболического нарушения. Предупреждение может быть также частичным, в результате чего вероятность появления связанного с возрастом состояния или метаболического нарушения у индивидуума уменьшается по сравнению с вероятностью появления у индивидуума, который не получал антитело, предлагаемое в настоящем изобретении.

Связанное с возрастом состояние, указанное в настоящем описании, может начинаться в возрасте 50 лет или старше (т.е. 60, 70, 80 или старше).

В одном из вариантов осуществления изобретения пациента можно предварительно лечить с помощью антитела к ActRIIB до наступления ожидаемого периода принудительного состояния покоя/пассивности. Такой период может иметь место, когда пациент собирается лечь в больницу, например, для операции на тазобедренном суставе или нижней конечности. Отсутствие активности может быть локальным, например, в случае иммобилизации сломанной конечности или сустава, или являться результатом введения парализующего средства.

В одном из вариантов осуществления изобретения пациент, подлежащий лечению, имеет перелом конечности (т.е. нижней или верхней конечности) или сустава (т.е. коленного или тазобедренного сустава). Так, в одном из вариантов осуществления изобретения пациент, подлежащий лечению, имеет перелом одной или нескольких следующих костей: плечевая кость, лучевая кость, локтевая кость, кость запястья, кость пястья, ключица, лопаточная кость, бедренная кость, тазовая кость, надколенная чашечка, большеберцовая кость, малоберцовая кость, таранная кость, пяточная кость, предплюсневая кость, плюсневая кость, седалищная кость или подвздошная кость. В другом варианте осуществления изобретения пациент, подлежащий лечению, подвергался или должен подвергаться хирургическому вмешательству на одном или нескольких следующих суставах: коленный, тазобедренный, голеностопный, плечевой, локтевой. Указанное хирургическое вмешательство включает замену тазобедренного сустава и замену коленного сустава.

Атрофия в результате иммобилизации может происходить быстро, но в норме протекает медленно. Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения пациент, его сустав или конечность иммобилизованы или могут быть иммобилизованы в течение 2 недель или более длительного периода времени (т.е. 3, 4, 6, 8 недель или более). В одном из вариантов осуществления изобретения пациент, его сустав или конечность иммобилизованы или могут быть иммобилизованы в течение 1-8 недель, 2-6 недель или 3-5 недель.

В другом варианте осуществления изобретения пациент может представлять собой пациента, не чувствительного (не дающего реакцию) к предыдущему лечению анаболическими средствами. Например, пациент может не обладать чувствительностью к лечению с использованием IGF-1, IGF-2 или вариантов IGF-1 или IGF-2, антитела к миостатину, пропептида миостатина, белка, являющегося "манком" для миостатина, который связывается с ActRIIB, но не активирует его, агониста бета 2, агониста грелина, SARM, агонистов/миметиков GH или фоллистатина. Простой метод оценки ответа пациента на лечение может быть определение времени, которое требуется пациенту на поднятие на определенную высоту по ступенькам лестницы, и сравнение результатов, полученных до и после лечения.

Антитела, предлагаемые в изобретении, можно применять в качестве единственного действующего вещества или в сочетании, например, с адъювантом, или в комбинации с другими лекарственными средствами, например, IGF-1, IGF-2 или вариантами IGF-1 или IGF-2, антителом к миостатину, пропептидом миостатина, белком, являющимся "манком" для миостатина, который связывается с ActRIIB, но не активирует его, агонистом бета 2, агонистом грелина, SARM, агонистами/миметиками GH или фоллистатином. Например, антитела, предлагаемые в изобретении, можно применять в сочетании с миметиком IGF-1, что описано в WO 2007/146689.

Согласно вышеизложенному следующими объектами настоящего изобретения являются:

способ, как он описан выше, заключающийся в том, что совместно, например, одновременно или последовательно, вводят в терапевтически эффективном количестве антагонист ActRIIB, например, антитело, предлагаемое в изобретении, и по меньшей мере одну вторую лекарственную субстанцию, где вторая лекарственная субстанция представляет собой IGF-1, IGF-2 или варианты IGF-1 или IGF-2, антитело к миостатину, пропептид миостатина, белок, являющийся "манком" для миостатина, который связывается с ActRIIB, но не активирует его, агонист бета 2, агонист грелина, SARM, агонисты/миметики GH или фоллистатин.

Изобретение относится также к терапевтической комбинации, например, набору, который содержит в терапевтически эффективном количестве а) антагонист ActRIIB, например, антитело, предлагаемое в изобретении, и б) и по меньшей мере одну вторую субстанцию, выбранную из группы, включающей IGF-1, IGF-2 или варианты IGF-1 или IGF-2, антитело к миостатину, пропептид миостатина, белок, являющийся "манком" для миостатина, который связывается с ActRIIB, но не активирует его, агонист бета 2, агонист грелина, SARM, агонисты/миметики GH или фоллистатин, например, описанную выше. Набор может включать также инструкции по его применению.

Когда антитела, предлагаемые в изобретении, вводят в сочетании с другим действующим веществом, очевидно, что дозы совместно вводимого в составе комбинации соединения следует варьировать в зависимости от типа совместно применяемого лекарственного средства, от конкретного применяемого лекарственного средства, от состояния, подлежащего лечению, и т.д.

Согласно другому варианту осуществления изобретения антитела, предлагаемые в изобретении, вводят только популяции пациентов, выбранной из пациентов, которые страдают мышечной атрофией. В другом варианте осуществления изобретения антитела, предлагаемые в изобретении, вводят популяции

пациентов, которые страдают атрофией скелетных мышц. Согласно другому варианту осуществления изобретения антитела, предлагаемые в изобретении, вводят только популяции пациентов, выбранной из группы пациентов, которые реагируют на лечение, мишенью которого является ActRIIB. Биомаркерами, которые позволяют идентифицировать пациентов, имеющих повышенную вероятность ответа на лечение, мишенью которого является ActRIIB, могут являться (но, не ограничиваясь только ими): высокие уровни сывороточного миостатина, GDF-11 или активированных по сравнению с контрольным пациентом.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитела, предлагаемые в изобретении, можно применять для определения уровней ActRIIB или количества клеток, которые содержат ActRIIB. Для этой цели, например, можно приводить в контакт образец (такой как образец, применяемый в анализе *in vitro*) и контрольный образец с антителом к ActRIIB в условиях, которые дают образоваться комплексу между антителом и ActRIIB. Любые комплексы, образовавшиеся между антителом и ActRIIB, выявляют и сравнивают в образце и контроле. Например, для композиций, предлагаемых в настоящем изобретении, можно применять стандартные методы, известные в данной области, такие как ELISA и проточная цитометрия.

Таким образом, одним из объектов изобретения являются также способы выявления присутствия ActRIIB (например, человеческого ActRIIB) в образце или определения количества ActRIIB, заключающиеся в том, что приводят в контакт образец и контрольный образец с антителом, предлагаемым в изобретении, или его антигенсвязывающим участком, обладающим способностью специфически связываться с ActRIIB, в условиях, которые дают образоваться комплексу между антителом или его фрагментом и ActRIIB. Затем выявляют образование комплекса, где различие в образовании комплекса в образце и контрольном образце свидетельствует о присутствии ActRIIB в образце.

Под объем изобретения подпадают также наборы, состоящие из композиций (например, антител, человеческих антител и биспецифических молекул), предлагаемых в изобретении, и инструкций по их применению. Набор может содержать также по меньшей мере один дополнительный реагент или одно или несколько дополнительных антител, предлагаемых в изобретении (например, антитело, обладающее дополнительным видом активности, которое связывается с эпитопом на антигене-мишени, отличным от эпитопа первого антитела). В состав набора, как правило, входит этикетка с указанием по применению компонентов набора. Под понятие этикетка подпадает любой письменный или зарегистрированный материал, входящий в набор или иным образом прилагаемый к набору. Набор может содержать также дополнительные инструменты для решения вопроса о том, относится ли пациент к группе, дающей ответ на лечение антителом к ActRIIB, как оно описано выше. Такие наборы могут содержать антитело, предлагаемое в изобретении, находящееся в лиофилизированной форме, разбавитель и инструкции по применению.

Полностью описанное выше изобретение дополнительно проиллюстрировано ниже с помощью примеров, которые даны с целью иллюстрации изобретения и не направлены на его ограничение.

Общие сведения.

Понятие "содержащий" означает "включающий", а также "состоящий", например композиция, "содержащая" X, может состоять только из X или может включать еще некоторый дополнительный компонент, например X+Y.

Понятие "примерно" касательно численного значения x означает, например, величину $x \pm 10\%$.

Описание чертежей

На чертежах показано:

на фиг. 1 - график, иллюстрирующий процедуру определения значения EC_{50} MOR07079 путем FACS-титрования с использованием исходной и трансфектированной ActRIIB клеточных линий HEK293T/17;

на фиг. 2 - данные об ингибировании индуцированной миостатином экспрессии люциферазы, полученные при осуществлении анализа репортерного гена с использованием нескольких Fab-фрагментов ActRIIB в концентрациях 2, 10 и 50 мкг/мл;

на фиг. 3 - графики, иллюстрирующие процедуру определения значений IC_{50} Fab-фрагментов, полученные при осуществлении анализа на основе индуцированной миостатином экспрессии репортерного гена люциферазы;

на фиг. 4 - данные о связывании антитела с первичными человеческими клетками скелетно-мышечной ткани;

на фиг. 5 - значения IC_{50} IgG, полученные при осуществлении анализа индуцируемого миостатином ингибирования дифференцировки клеток скелетных мышц;

на фиг. 6 - данные, полученные в опыте на мышах: оценка эффективности *in vivo* на необработанных животных - 6-недельная обработка MOR08159 или MOR08213 в дозе 10 мг/кг увеличивала вес тела и мышечную массу. Представлены данные об изменении (А) веса тела, (Б) большеберцовой мышцы, (В) икроножной мышцы с подошвенной мышцей, (Г) четырехглавой мышцы и (Д) грудной мышцы;

на фиг. 7 - данные, полученные в опыте на мышах: оценка эффективности *in vivo* в зависимости от дозы на необработанных животных - 6-недельная обработка MOR08213 в дозах 25, 5, 1 мг/кг в зависимости от дозы, увеличивала вес тела и мышечную массу. Представлены данные об изменении (А) веса тела,

(Б) большеберцовой мышцы, (В) икроножной мышцы с подошвенной мышцей, (Г) четырехглавой мышцы и (Д) грудной мышцы;

на фиг. 8 - данные FACS-анализа, демонстрирующие перекрестную блокаду между MOR08159 в присутствии MOR08213 (жирная штриховая линия) и только MOR08159 (жирная черная линия), по сравнению только с контролем изотипа (черная линия) или контролем изотипа в присутствии MOR08213 (штриховая линия);

на фиг. 9 - обобщенные данные об остатках ActRIIB (SEQ ID NO: 181), с которыми связывается MOR08159, полученные с помощью различных методов определения эпитопов.

Варианты осуществления изобретения

Функциональные анализы.

Анализ репортерного гена (RGA).

Культивирование клеток линии HEK293T/17.

Родительские клетки линии HEK293T/17 поддерживали в среде DMEM, содержащей 10% FBS, 2 mM L-глутамин, пенициллин (50 ME/мл) и стрептомицин (50 мкг/мл). Клетки выращивали в инкубаторе при 37°C и 5% CO₂ и пересеивали каждые 3-4 дня. Клетки отделяли с помощью Accutase и затем переносили в новую колбу, содержащую свежую среду.

Клетки линии HEK293T/17, стабильно трансфектированные CAGA-12 luc, культивировали согласно методу, описанному для родительских клеток HEK293T/17, но среду для выращивания клеток дополняли 4 mM L-глутамином и бластицидином в концентрации 3 мкг/мл помимо FBS, пенициллина и стрептомицина.

Анализ репортерного гена люциферазы при индукции миостатином.

Для определения способности антител к ActRIIB ингибировать индуцируемую миостатином передачу сигналов осуществляли анализ репортерного гена с использованием стабильно трансфектированной репортером клеточной линии HEK293T/17 CAGA-12. Конструкция, CAGA-12, несущая репортерную люциферазу, содержит ген люциферазы в направлении по ходу транскрипции относительно минимального промотора и нескольких CAGA-боксов, специфических для фосфорилированных Smad-2 и Smad-3. Добавление очищенного миостатина (но также и GDF-11, активина или TGFβ) индуцировало фосфорилирование Smad и в результате связывание с репортером CAGA-12 и приводило к экспрессии гена люциферазы.

На стадии 90%-ной конfluence клеток HEK293T/17 CAGA-12 luc-клетки отделяли согласно описанному выше методу и разводили в культуральной среде до концентрации $2,5 \times 10^5$ клеток/мл. Затем высевали 100 мкл клеток на лунку в плоскодонные 96-луночные планшеты и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение ночи.

На следующий день антитела (Fab или IgG) и рекомбинантное человеческое антитело к ActRIIB/Fc, которое служило в качестве положительного контроля, разводили 3ФР до требуемых концентраций. В засеянные в предыдущий день лунки добавляли по 20 мкл растворов антител и клетки культивировали в течение 1 ч, давая произойти связыванию антител. И, наконец, в лунки добавляли по 50 нг/мл миостатина и клетки дополнительно культивировали в течение ночи.

На следующее утро в каждую лунку добавляли по 120 мкл реагента для выявления люциферазы Bright-Glo (фирма Promega). После инкубации в течение 2 мин определяли люминисценцию с помощью люминометра. После осуществления полного титрования соответствующих антител рассчитывали концентрацию, при которой ингибирование составляло половину от максимального (значения IC₅₀).

ELISA-анализы для оценки специфичности.

Специфичность Fab-фрагментов антител к ActRIIB в отношении человеческого ActRIIB и перекрестную реактивность с человеческим ActRIIA и мышинным ActRIIB оценивали с использованием набора для ELISA. Кроме того, определяли связывание с родственными рецепторами (контр-мишени: человеческий TGF-PRII/Fc (фирма R&D systems), мышинный TGF-βRI (ALK-5)/Fc (фирма R&D systems), человеческий активин RIB (ALK-4)/Fc (фирма R&D systems)). Для этой цели 5 мкг/мл (если не указано иное) рекомбинантных белков, разведенных в 3ФР, добавляли в черный плоскодонный 96-луночный планшет MaxiSorp и инкубировали в течение ночи при 4°C для осуществления сенсibilизации.

На следующее утро планшеты отмывали TBST и блокировали MTBST. После многократной отмывки планшетов добавляли по 5 мкг/мл Fab-фрагмента антитела к ActRIIB и инкубировали в течение 2,5 ч. После этого связанные с антигеном Fab-фрагменты выявляли путем инкубирования с конъюгированным со щелочной фосфатазой Fab-специфическим козьем античеловеческим IgG, после чего добавляли флуоресцентный субстрат AttoPhos. Определяли испускание флуоресценции при 535 нм при длине волны возбуждения 430 нм с помощью планшет-ридера типа TECAN Spectrafluor.

ELISA для оценки взаимодействия по типу связывания ActRIIB/Fc-миостатина.

Для решения вопроса о том, могут ли обладающие ингибирующим действием Fab-фрагменты действовать путем блокады сайта связывания миостатина на человеческом ActRIIB, осуществляли ELISA, позволяющий определять взаимодействие hActRIIB/Fc-миостатина. Для этой цели рекомбинантный миостатин разводили до концентрации 5 мкг/мл 3ФР и сенсibilизировали им черный плоскодонный 96-

луночный планшет типа Maxisorp. На следующее утро лунки блокировали с помощью MTBST. Параллельно 50 мкг/мл Fab-фрагментов антител к ActRIIB предварительно инкубировали с 10 мкг/мл ActRIIB/Fc в TBST в течение 1,5 ч при комнатной температуре и после этого добавляли в сенсibilизированные и блокированные лунки (1,5 ч при комнатной температуре). После отмывки TBST-буфером осуществляли выявление связанного ActRIIB/Fc с использованием немеченого Fc-специфического мышино-го античеловеческого Ig и меченного с помощью POD овечьего антимышиного IgG в качестве идентифицирующего антитела. После многократной отмывки TBST-буфером добавляли флуорогенный субстрат для пероксидазы Quanta Blu™. Флуоресценцию оценивали с помощью ридера типа GENiosPro™ (длина волны возбуждения 320 нм, испускания 430 нм).

Связывание с клетками.

Клетки.

HEK293T/17-клетки, стабильно трансфектированные человеческим ActRIIA и человеческим ActRIIB, которые создавали, используя HEK293T/17-клетки (ATCC), трансфектированные линейаризованным pEGFP (фирма Clontech)-ActRIIB (ECD) или -ActRIIA(ECD) и pPGK-puro (фирма AddGene) с использованием реагента FuGENE6 (фирма Roche), поддерживали в среде DMEM, содержащей 10% FBS, 2 mM L-глутамин, пенициллин (50 МЕ/мл), стрептомицин (50 мкг/мл) и пурамицин (2 мкг/мл). Клетки выращивали в инкубаторе при 37°C и 5% CO₂ и пересевали каждые 3-4 дня. Клетки отделяли с помощью Accutase™ и затем переносили в новую колбу, содержащую свежую среду.

Человеческие клетки скелетно-мышечной ткани (huSkMC) (фирма Cambrex) собирали на стадии 70-90%-ной конфлюэнтности примерно. Применяемую для этих клеток культуральную среду, представляющую собой среду для выращивания (GM), которая состояла из основной среды для скелетных мышц (skBM; фирма Lonza), дополненной 20% FCS (фирма Amimed), удаляли путем аспирации и клетки отмывали HEPES-BSS и инкубировали с трипсином/ЭДТК. После отделения клеток трипсин нейтрализовали с помощью раствора для нейтрализации трипсина. Клетки центрифугировали при 220×g в течение 5 мин и дебрис ресуспендировали в среде для выращивания скелетных мышц. Затем клетки использовали для экспериментов или в качестве посевного материала при пересевах при клеточной плотности ~ 3500 клеток/см². Клетки выращивали в инкубаторе при 37°C и 5% CO₂ и пересевали каждые 5-6 дней.

FACS-титрование с использованием экспрессирующих hActRIIB и hActRIIA клеток.

Концентрацию, при которой эффективность составляет половину от максимального уровня (EC₅₀), антител к ActRIIB определяли на основе связывания с клеточным hActRIIA и hActRIIB с помощью FACS.

Для этой цели серийные разведения антител к ActRIIB в виде Fab или IgG инкубировали с 1×10⁴ трансфектированных hActRIIA, трансфектированных hActRIIB или родительских HEK293T/17-клеток на лунку в течение 1 ч при 4°C. После нескольких стадий отмывки связанные с клетками Fab-фрагменты или IgG выявляли с помощью конъюгированного с фикоэритрином козьего античеловеческого IgG (H+L) в качестве вторичного антитела. После инкубации в течение 1 ч при 4°C клетки вновь отмывали и ресуспендировали в FACS-буфере, и интенсивность флуоресценции клеток определяли с помощью устройства FACSAgray™.

Связывание с первичными человеческими клетками скелетно-мышечной ткани.

Антитела к ActRIIB в виде Fab или IgG, а также применяемые в качестве контроля изотипа Fab или IgG (10 мкг) инкубировали с 10⁵ huSkMC в FACS-буфере (ЗФР, 2% FCS, 1 mM ЭДТК) на пробирку в течение 1 ч при 4°C. После стадий отмывки связанные с клетками Fab-фрагменты или IgG выявляли с помощью конъюгированного с фикоэритрином козьего античеловеческого IgG (H+L) в качестве вторичного антитела, которое разводили в соотношении 1:200 FACS-буфером. После инкубации в течение 1 ч при 4°C на шейкере клетки вновь отмывали и ресуспендировали в FACS-буфере и интенсивность флуоресценции клеток определяли с помощью устройства FACSCaliber™.

Определение аффинности.

Определение аффинности отобранных Fab-фрагментов человеческого антитела к ActRIIB с помощью резонанса поверхностного плазмона (Biacore).

Для непосредственной иммобилизации антигенов применяли стандартный метод аминного сочтания EDC-NHS. CM5-чипы (фирма Biacore, Швеция) сенсibilизировали человеческим или мышинным ActRIIB/Fc, взятым в количестве, эквивалентном примерно 6000 единиц ответа (RU), или человеческим ActRIIA/Fc, взятым в количестве, эквивалентном примерно 1500 RU (в соответствии с активностью антигенов), в 10 mM ацетатном буфере, pH 4,5. В проточной референс-ячейке использовали соответствующее количество ЧСА. Для регенерации применяли 5 мкл 10 mM глицин/HCl-буфера, pH 1,5.

В другом варианте антигены не были непосредственно иммобилизованы, а "захватывались" CM5-чипом, модифицированным с помощью антитела к человеческому Fc (набор для Fc-"захвата", фирма GE Healthcare/Biacore). В проточной референс-ячейке "захватывающее" антитело было иммобилизованным, но антигены не были иммобилизованы. Регенерацию осуществляли с помощью 2 инъекций по 5 мкл 3 M MgCl₂.

Оценку кинетических параметров осуществляли в модифицированном по методу Дульбекко ЗФР

при скорости потока 20 мкл/мин, используя ряд серийных разведений образцов Fab. Концентрации Fab составляли от 15,6 до 500 нМ. Продолжительность инъекции каждой концентрации составляла 1 мин. Принимали, что продолжительность реакции диссоциации составляла по меньшей мере 2 мин (или более в зависимости от определенной аффинности). В качестве двойного контроля применяли "холостую" инъекцию подвижного буфера. Все сенсограммы подвергали глобальной аппроксимации с помощью программы BIA evaluation software 3.2 (фирма Biacore, Швеция).

Анализ СК (креатинкиназа).

Дифференцировку инициировали через 24 ч после посева путем пересева клеток из GM-среды в бессывороточную среду для дифференцировки, состоящую из основной среды для скелетных мышц (skBM). Клеткам давали дифференцироваться в течение 3 дней без миостатина или в присутствии миостатина (фирма R&D systems) или других белков TGF- β и тестировали антитела в определенных концентрациях. Клетки отмывали 3ФР и затем лизировали в буфере для лизиса, применяемом для репортерного анализа (фирма Promega) и хранили до осуществления измерений при -80°C . СК-активность определяли с помощью реагента для СК (IFCC) (фирма Thermo Electron). Реагент для СК приготавливали согласно инструкциям производителя. Температуру клеточных лизатов доводили до комнатной температуры, добавляли реагент для СК и немедленно определяли абсорбцию при 340 нм в течение 20 мин, интервал между считываниями составлял 1 мин. Строили каждый раз новые стандартные кривые для СК, используя СК из мышц кроликов (фирма Roche Diagnostics). Содержание белка определяли с помощью BCA-набора.

Созданные на животных модели.

Самок мышей линии CB17/ICR-Prkdc^{scid}/Crl 9-недельного возраста (n=10 на группу, фирма Charles River, Германия) произвольно разделяли на группы в зависимости от веса тела и затем вводили внутривенно антитела к человеческому ActRIIB (MOR8159, MOR8213) или контрольное антитело IgG в дозе 10 мг/кг (опыт 1; сравнительное исследование), или MOR8213 в дозах 25, 5, или 1 мг/кг (опыт 2; исследование зависимости от дозы) в день 0, 3, 7, 14, 21, 28 и 35 (один раз в неделю, начиная с дня 3). Вес тела определяли 2 раза в неделю. Через 6 недель (42 дня) после начала обработки мышей умерщвляли с помощью CO₂. Изымали и взвешивали большеберцовую, икроножную вместе с подошвенной, четырехглавую и грудную мышцы.

Протокол обработки.

Контрольное антитело: антитело к куриному лизоциму-hIgG.

Концентрация: 2 мг/мл (опыт 1), 5 мг/мл (опыт 2), применяемый для обработок объем: 5 мл/кг.

Наполнитель: 50 мМ цитрат, 140 мМ NaCl или 3ФР.

Антитела к человеческому ActRIIB: антитела к ActRIIB MOR8159 и MOR8213, hIgG.

Концентрация: 2 мг/мл (опыт 1), 5 мг/мл (опыт 2), 1 мг/мл (опыт 2), 0,2 мг/мл (опыт 2), применяемый для обработок объем: 5 мл/кг.

Наполнитель: 50 мМ цитрат, 140 мМ NaCl.

Группы обработки.

Опыт 1; сравнение MOR8159 и MOR8213

1) IgG-контроль, i.p. (антитело к куриному лизоциму-IgG), 10 мг/кг,

2) к ActRIIB-MOR8159, i.p., 10 мг/кг,

3) к ActRIIB-MOR8213, i.p., 10 мг/кг.

Опыт 2; зависимость от дозы MOR8213

1) IgG-контроль, i.p. (антитело к куриному лизоциму-IgG), 10 мг/кг,

2) к ActRIIB-MOR8213, i.p., 25 мг/кг,

3) к ActRIIB-MOR8213, i.p., 5 мг/кг,

4) к ActRIIB-MOR8213, i.p., 1 мг/кг.

Условия содержания.

Животных содержали группами по 4-5 животных в каждой при 25°C со световым циклом 12:12 ч свет-темнота. Их содержали на стандартном лабораторном корме, содержащем 18,2% белка и 3,0% жира, энергетическая ценность 15,8 МДж/кг (тип NAFAG 3890, фирма Kliba). Животные имели свободный доступ к корму и воде. Эксперименты на животных проводили согласно правилам, действующим в кантоне Базель-Штадт.

Методы.

Статистический анализ.

Результаты выражали в виде средних значений \pm СКО. Статистический анализ осуществляли на основе критерия Дуннета для сравнения множеств (однонаправленный дисперсионный анализ). Оценивали различие между результатами, полученными в обработанных группах (антитела к ActRIIB MOR8159 и MOR8213), и в контрольной группе (контрольное антитело), и различия рассматривали как значимые при уровне вероятности $< 0,05$: * : $P < 0,05$, ** : $P < 0,01$, NS (не существенное различие) относительно IgG-контроля. Статистический анализ осуществляли с помощью программы GraphPad Prism, версия 5.0 (фирма GraphPad Software, Inc). При определении вес тела проводили вычитание веса тела в день 0, а мышечную массу стандартизовали относительно веса тела в день 0 (начальный вес тела).

Пэннинг, идентификация и характеристика антител.

Терапевтически антитела к человеческому белку ActRIIB создавали путем селекции клонов, обладающих высокими аффинностями связывания, используя в качестве источника вариантов антител белки из поступающей в продажу фаговой дисплейной библиотеки, такой как библиотека HuCAL GOLD® фирмы MorphoSys.

Библиотека HuCAL GOLD представляет собой библиотеку Fab-фрагментов (Knappik и др., 2000), в которой все шесть CDR диверсифицированы путем соответствующей мутации, и в которой применяют технологию CysDisplay™ для связывания Fab-фрагментов с поверхностью фага (WO 01/05950).

Фагмидную библиотеку HuCAL GOLD (Rothe и др., 2008) применяли для селекции Fab-фрагментов специфических антител.

Селекция с помощью пэннинга ActRIIB-специфических антител из библиотеки.

Для селекции антител, которые распознают человеческий ActRIIB, использовали несколько стратегий пэннинга.

В целом фаговую библиотеку антител HuCAL GOLD разделяли на несколько пулов, содержащих различные мастер-гены VH.

Эти пулы каждый индивидуально подвергали дифференциальному пэннингу на клетках, при этом циклы селекции на кратковременно трансфектированных человеческим ActRIIB клетках чередовали с циклами селекции на рекомбинантном человеческом белке ActRIIB/Fc.

I. Пэннинг на цельных клетках.

Для осуществления пэннинга фаговые частицы, разведенные в ЗФР, смешивали с равным объемом ЗФР/БСА и блокировали. Параллельно в предварительно блокированных пробирках пул, включающий 1×10^7 соответствующих экспрессирующих hActRIIB клеток на фаг, ресуспендировали с ЗФР/ 3% FCS/ 0,04% NaN₃ и блокировали в течение 1 ч при 4°C на шейкере. Блокированные клетки центрифугировали, ресуспендировали в предварительно блокированных фаговых частицах и инкубировали в течение 3 ч. Параллельно приготавливали пул, включающий 1×10^7 клеток с "выключенным" hActRIIB на фаг.

Комплексы фаги-клетки отмывали ЗФР/БСА, а затем отмывали ЗФР. Элюцию фаговых частиц из экспрессирующих hActRIIB клеток осуществляли путем кислотной элюции, используя глициновый буфер, pH 2,2. После центрифугирования элюат нейтрализовали, добавляя незабуференный Трис.

После заражения и последующего центрифугирования бактериальный дебрис ресуспендировали в среде 2×YT, высевали на LB/CAM/Glc-агаровые пластины и инкубировали в течение ночи при 37°C. На следующие утро колонии отделяли от пластин и осуществляли процедуру "спасения" и амплификации фагов.

II. Твердофазный пэннинг.

Для осуществления твердофазного пэннинга рекомбинантным человеческим ActRIIB/Fc сенсibilизировали планшет MaxiSorp™ при 4°C в течение ночи. После отмывки ЗФР сенсibilизированные лунки блокировали с помощью 5% MPBST.

Перед осуществлением селекции HuCAL GOLD®-фаги предварительно абсорбировали в блокирующем буфере. Блокированные фаги добавляли к применяемому для сенсibilизации антигену и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Неспецифические фаги отмывали с помощью ЗФРТ и ЗФР.

Связанные фаги элюировали, добавляя 20 mM ДТТ. Элюаты применяли для заражения культуры E.coli TG-1. После заражения бактерии высевали на LB/CAM/Glc-агаровые пластины и инкубировали в течение ночи при 37°C. На следующие утро колонии отделяли от пластин и осуществляли процедуру "спасения" и амплификации фагов.

Наиболее успешным вариантом пэннинга является дифференциальный пэннинг с использованием клеток/белков, при котором для первого цикла пэннинга использовали трансфектированные ActRIIB HEK293T/17-клетки, для второго цикла рекомбинантный человеческий ActRIIB/Fc, затем вновь использовали трансфектированные клетки.

Отобранные Fab-фрагменты анализировали в отношении связывания с исходными (родительскими) или трансфектированными rhActRIIB HEK293-клетками.

Fab-фрагмент антитела MOR07079 связывался главным образом с трансфектированными ActRIIB клетками, что характеризовалось значением EC₅₀ 20 nM (фиг. 1). При оценке с помощью ELISA ингибирования связывания миостатина Fab-фрагмент антитела MOR07079 продемонстрировал ингибирующую активность и блокировал связывание rhActRIIB/Fc с миостатином. В случае MOR07079 выраженное ингибирование связывания миостатина по данным ELISA проявлялось в ингибировании миостатина при оценке с помощью анализа репортерного гена с использованием HEK293-CAGA12. При использовании ELISA для оценки специфичности установлено, что MOR07079 специфически связывался с человеческим и мышинным ActRIIB, но не связывался с неродственными рецепторами TGFβRII, ALK4 и ALK5. Установлено также, что MOR07079 связывалось более предпочтительно с ActRIIB по сравнению с ActRIIA.

Получение иммуноглобулинов с помощью библиотеки HuCAL®.

I. Превращение Fab-фрагментов в IgG-формат.

Для экспрессии полноразмерного иммуноглобулина (Ig) фрагменты вариабельных областей тяжелых (V_H) и легких цепей (V_L) субклонировали из экспрессионных векторов pMORPH X9_FH Fab в серии векторов pMORPH® 2_h_Ig для человеческого IgG2. Отобранные клоны можно превращать также в "молчащий" формат IgG1LALA, в котором остатки лейцина в положениях 234 и 235 изменены в результате мутации на остатки аланина для того, чтобы устранить связывание Fc γ и облегчить эффекторные функции.

Применяли соответствующие рестриктазы (Knappik и др., 2000) для субклонирования фрагментов V_H - и V_L -областей в pMORPH® 2_h_IgG2, pMORPH® 2_h_IgG1LALA, pMORPH® 2_h_IgK и pMORPH® 2_h_Ig λ 2.

Все препараты ДНК подвергали анализу последовательности до трансфекции ими НКВ11-клеток.

II. Кратковременная экспрессия и очистка человеческого IgG.

Эукариотические клетки линии НКВ11 трансфектировали ДНК экспрессионного вектора, несущего тяжелую и легкую цепь IgG. Собирали супернатанты клеточной культуры через 3 или 7 дней после трансфекции и подвергали стандартной аффинной хроматографии на белке А. Если не указано иное, то осуществляли замену буфера на 1 × модифицированный по методу Дульбекко 3ФР (pH 7,2) и образцы стерилизовали фильтрацией (0,2 мкм).

Библиотеки для созревания (аффинности) CDR-L3 и CDR-H2.

Для повышения аффинности и биологической активности отобранных фрагментов антител L-CDR3- и H-CDR2-участки оптимизировали параллельно путем кассетного мутагенеза на основе сайтнаправленного мутагенеза с использованием тринуклеотидов (Virnekas и др., Nucleic Acids Res 22, 1994, с. 5600-5607), в то время как каркасные участки оставляли в неизмененном виде (Nagy и др., Nature Medicine, 8, 2002, с. 801-807). Перед клонированием библиотек для созревания аффинности все родительские Fab-фрагменты переносили из экспрессионного вектора pMORPH® x9 в вектор для созревания pMORPH 25, применяемый в технологии CysDisplay™, используя сайты рестрикции XbaI/EcoRI.

Этот вектор представляет собой фаговый белок pIII, слитый на N-конце с остатком цистеина, в котором также С-концевой цистеин слит с цепью Fd-фрагмента антитела, и это позволяет осуществлять с помощью дисульфидных мостиков дисплей соответствующих Fab-фрагментов на поверхности фага.

Для создания библиотек CDR-H2 CDR-H2-участок каждого родительского Fab вырезали и заменяли на кассету для созревания с высоко диверсифицированным CDR-H2.

Параллельно с этим CDR-L3-участок родительских клонов заменяли на кассету для созревания с высоко диверсифицированным CDR-L3.

Размер библиотек для созревания составлял от 4×10^5 до 1×10^8 клонов. Во всех случаях векторный фон составлял менее 1%. Контроль качества, проведенный путем секвенирования индивидуальных клонов, подтвердил высокое качество всех библиотек.

Для всех библиотек для созревания CDR-L3 и CDR-H2 получали антителопрезентирующий фаг и определяли титры фага путем точечного титрования.

Стратегии пэннинга для созревания аффинности.

Антителопрезентирующие фаги из следующих библиотек для созревания (аффинности) подвергали для разделения пэннингу и скринингу.

Лидер 1: MOR07079 (созревание L-CDR3).

Лидер 1: MOR07079 (созревание H-CDR2).

Пэннинг созревания с использованием соответствующих антител осуществляли с применением биотинилированного hActRIIB/Fc и huSkMC.

Для первых циклов селекции использовали либо 2×10^{10} , либо 1×10^{11} фагов на субкод, "спасенных" из вновь созданных библиотек для созревания.

Осуществляли несколько циклов дифференциального пэннинга, при котором селекцию с использованием рекомбинантного биотинилированного hActRIIB/Fc чередовали с циклом селекции с использованием huSkMC.

Для первого и третьего цикла пэннинга в растворе биотинилированный рекомбинантный hActRIIB/Fc иммобилизовывали на покрытых стрептавидином гранулах типа Dynabead. Использовали следующий протокол: для каждого пула фага стрептавидиновые гранулы отмывали 3ФР и ресуспендировали в блокирующем буфере. Частицы фага, разведенные в 3ФР, смешивали с блокирующим буфером, который содержал 0,1% Твин 20, и выдерживали на вращающемся диске. Предварительную очистку фаговых частиц для удаления связанных со стрептавидином или гранулами фагов осуществляли дважды: каждый раз пул фагов, заблокированных стрептавидиновыми гранулами, добавляли к заблокированным фаговым частицам и инкубировали на вращающемся диске. После отделения гранул с помощью магнитного устройства содержащий фаги супернатант переносили в свежую предварительно заблокированную реакционную пробирку и повторяли процедуру предварительной адсорбции.

После процедуры блокады добавляли биотинилированный антиген hActRIIB/Fc к предварительно

очищенным и блокированным фаговыми частицам и инкубировали на вращающемся диске. Комплексы фаг-антиген "захватывали" с использованием блокированных стрептавидиновых гранул, добавляли к пулам, полученным при пэннинге фагов, и дополнительно инкубировали. Собирали фаговые частицы, связанные со стрептавидиновыми гранулами. Затем гранулы отмывали с помощью ЗФРТ и ЗФР. Элюцию фаговых частиц из стрептавидиновых гранул осуществляли, добавляя 20 мМ ДТТ. Элюат собирали и применяли для заражения культуры *E.coli* TG-1, выращенной до достижения ОП_{600 нм} 0,6-0,8.

После заражения и последующего центрифугирования бактериальный дебрис ресуспендировали в среде 2×YT, высевали на LB/CAM/Glc-агаровые пластины и инкубировали в течение ночи при 37°C. На следующие утро колонии отделяли от пластин и осуществляли процедуру "спасения" и амплификации фагов, описанную в целом у Krebs и др., 2001, за исключением того, что зараженные фагом-хелпером клетки выращивали при 22°C в течение ночи в среде, содержащей 0,25 мМ ИПТГ (изопропилтиогалактозид). Третий цикл пэннинга в растворе с использованием биотинилированного hActRIIB/Fc осуществляли согласно протоколу, описанному для первого цикла, за исключением того, что использовали пониженные количества антигена и повышенную строгость условий отмывки.

Для осуществления второго цикла пэннинга (с использованием huSkMC-клеток, экспрессирующих эндогенный hActRIIB) фаговые частицы, разведенные в ЗФР, смешивали с равным объемом ЗФР/БСА и блокировали. Параллельно для каждого субкода 9×10^5 huSkMC блокировали в ЗФР/FCS/0,02% NaN₃ при 4°C. Блокированные клетки центрифугировали, ресуспендировали вместе с предварительно блокированными фаговыми частицами и дополнительно инкубировали.

Комплексы фаг-клетка отмывали ЗФР/БСА, а затем отмывали ЗФР. Клетки центрифугировали при 410×g в течение 2 мин при 4°C. Осуществляли кислотную элюцию фаговых частиц из экспрессирующих hActRIIB huSkMC путем инкубации в течение 10 мин глициновым буфером, pH 2,2. После центрифугирования элюат нейтрализовали, добавляя незабуференный Трис. Содержащий фаг супернатант применяли для заражения культуры *E.coli* TG-1, выращенной до достижения ОП_{600 нм} 0,6-0,8.

После заражения и последующего центрифугирования бактериальный дебрис ресуспендировали в среде 2×YT, высевали на LB/CAM/Glc-агаровые пластины и инкубировали в течение ночи при 37°C. На следующие утро колонии отделяли от пластин и осуществляли процедуру "спасения" и амплификации фагов, описанную в целом у Krebs и др., 2001, за исключением того, что зараженные фагом-хелпером клетки выращивали при 22°C в течение ночи в среде, содержащей 0,25 мМ ИПТГ.

Было установлено, что наиболее успешным вариантом пэннинга, который позволяет получать обладающие очень высокой эффективностью связывающие агенты, является дифференциальный пэннинг, при котором первый и третий цикл осуществляли с использованием биотинилированного ActRIIB/Fc, а второй цикл с использованием huSkMC.

После секвенирования Fab-фрагменты отбирали для экспрессии и очистки и наиболее перспективные дополнительно характеризовали.

Связывание большинства антител к ActRIIB с трансфектированными hActRIIB HEK293T/17-клетками характеризовалось значениями ЕС₅₀, которые находились в наномолярном диапазоне от однозначных чисел до небольших двухзначных чисел. Некоторые Fab-фрагменты обладали способностью вытеснять миостатин из ActRIIB/Fc при анализе ингибирования связывания миостатина с помощью ELISA, но из них только для MOR08067 было характерно полное ингибирование индуцируемой миостатином активности при анализе репортерного гена (фиг. 2).

Ниже в таблице обобщены данные об аффинности наиболее перспективных Fab-фрагментов к человеческому и мышиному ActRIIB/Fc (табл. 1).

Таблица 1
Данные об аффинности Fab-FH антител к ActRIIB к антигенам ActRIIB

Fab	Определение K _D (Biacore)	
	Человеческий ActRIIB-Fc, K _D [нМ]	Мышиный ActRIIB-Fc, K _D [нММ]
MOR07079	51	62
MOR08047	23	22
MOR08062	15	17
MOR08067	<0,1	<0,1
MOR08077	11	13
MOR08078	9	10

Fab-клон MOR08067 обладал высокой ингибирующей способностью по данным анализа индуцируемой миостатином экспрессии репортерного гена (RGA), а также способностью связываться с трансфектированными rhActRIIB HEK293-клетками. Определение аффинности с помощью Biacore-анализа позволило установить, что значения K_D, характеризующие связывание с человеческим и мышиным ActRIIB/Fc, находились на уровне ниже 100 пМ. MOR08067, других кандидатов отбирали для дополнительной оптимизации на основе подхода перекрестного клонирования, а MOR08067, содержащее потенци-

альный N-связанный сайт гликозилирования подвергали также дегликозилированию.

Оптимизация антител, полученных после первой процедуры созревания аффинности.

а) Дегликозилирование MOR08067.

По данным анализа последовательности это антитело содержало потенциальный сайт N-связанного гликозилирования в CDR-H2 тяжелой цепи. Этот сайт удаляли, получая MOR08156 и MOR08159. Характеристики этих производных MOR08067 описаны ниже.

б) Перекрестное клонирование оптимизированных Fab-фрагментов.

Для дальнейшего улучшения функции и удаления потенциальных сайтов N-связанного гликозилирования в CDR-H2- и/или CDR-L3-участках оптимизированные независимо друг от друга CDR-H2- и CDR-L3-участки из индивидуальных зрелых Fab-фрагментов с созревшей аффинностью, полученные после первого цикла созревания аффинности, объединяли, каждое семейство по отдельности. Потомки MOR07079 подвергали перекрестному клонированию. В целом у 200 бактериальных лизатов оценивали с помощью FACS уровень аффинности с использованием HEK293T/17/ActRIIB и наиболее перспективные клоны Fab, такие как MOR08144 и MOR08213, экспрессировали и очищали.

в) Характеризация оптимизированных антител.

Ниже подробно описаны характеристики дегликозилированных потомков MOR08067 (MOR08156, MOR08159) и двух полученных в результате перекрестного клонирования клонов, выведенных из MOR08067 (MOR08144 и MOR08213).

Определяли способность оптимизированных Fab-фрагментов ингибировать опосредуемую миостатином передачу сигналов с помощью анализа репортерного гена, при этом было установлено, что все связывающие агенты обладали способностью вызывать превышающее 95% ингибирование при применении в наиболее высокой концентрации (фиг. 3).

В экспериментах по определению аффинности с использованием Biacore-анализа, установлено, что MOR08159 и MOR08213 являются высокоэффективными связывающими агентами как в отношении человеческого, так и мышинного ActRIIB (табл. 2). Очевидно, что повышенная аффинность зрелых и оптимизированных Fab-фрагментов приводит к их повышенной эффективности по данным индуцированного миостатином анализа репортерного гена.

Таблица 2

Данные об аффинности Fab-фрагментов антител к ActRIIB к антигенам ActRIIB

Fab	Определение K_D (Biacore)	
	Человеческий ActRIIB-Fc K_D [пМ]	Мышиный ActRIIB-Fc K_D [пМ]
MOR08159	3,8	3,1
MOR08213	13,2	13,5

Конверсия в IgG2 Fab-фрагментов с созревшей аффинностью (1-ый цикл созревания аффинности).

Наиболее перспективные Fab-фрагменты, полученные после первого цикла созревания аффинности, отбирали для конверсии в IgG2.

Экспрессию IgG2 осуществляли путем кратковременной трансфекции HKB11-клеток и полноразмерные иммуноглобулины очищали из супернатантов клеточных культур.

При конверсии в IgG все кандидаты сохранили их способность в зависимости от дозы ингибировать индуцируемую миостатином активность при анализе репортерного гена (табл. 3).

Таблица 3

Данные о значениях IC_{50} антител к ActRIIB в виде IgG при оценке индуцируемой миостатином экспрессии люциферазы путем анализа репортерного гена

IgG	IC_{50} [нМ]	% ингибирования
MOR08067	2,57	86,5
MOR08144	0,5	94,9
MOR08156	0,19	97,4
MOR08159	0,32	99
MOR08213	0,32	98,6

Оценивали с помощью FACS способность MOR08159 и MOR08213 связываться с человеческими первичными мышечными миобластами, и получали данные о специфическом связывании с этими клетками с учетом низкого уровня экспрессии ActRIIB на этих клетках (фиг. 4).

Установлено, что MOR08159 и MOR08213 обладали способностью полностью обращать индуцируемое миостатином ингибирование дифференцировки первичных скелетных миобластов (фиг. 5). Указанные антитела также повышали дифференцировку относительно основного уровня в отсутствие экзогенного миостатина благодаря их способности нейтрализовать продуцируемые эндогенно лиганды ActRIIB.

Второй цикл созревания аффинности.

Выбор кандидатов для второго цикла созревания аффинности для дополнительного повышения эффективности.

I. Конструирование библиотек CDR-L3 и CDR-H2 для созревания (аффинности).

Для повышения как аффинности, так и биологической активности отобранных фрагментов антител (например, MOR08067) CDR-L1- и CDR-H2-участки оптимизировали путем кассетного мутагенеза на основе сайтнонаправленного мутагенеза с использованием тринуклеотидов (Virnekas и др., выше), в то время как каркасные участки оставляли в неизменном виде (Nagy и др., выше). Перед клонированием библиотек для созревания аффинности все родительские Fab-фрагменты переносили из экспрессионного вектора pMORPH® x9 в вектор для созревания pMORPH 25, применяемый в технологии CysDisplay™, используя сайты рестрикции XbaI/EcoRI. Размер всех полученных библиотек для созревания всегда составлял как минимум 1×10^7 независимых клонов. Во всех случаях векторный фон составлял менее 1%. Контроль качества, проведенный путем секвенирования индивидуальных клонов, подтвердил высокое качество всех библиотек.

Для всех библиотек, применяемых для созревания CDR-L1 и CDR-H2, получали антителопрезентирующие фаги и определяли титры фага путем точечного титрования.

II. Стратегии пэннинга, ранжирования аффинности и скрининга улучшенных антител.

Дифференциальный пэннинг, применяемый при осуществлении второго цикла созревания аффинности, включал использование родительских HEK293T/17-клеток и huSkMC, экспрессирующих эндогенно человеческий ActRIIB в низких концентрациях. Кроме того, рекомбинантный биотинилированный антиген hActRIIB/Fc включали во все стратегии пэннинга.

Для ранжирования Fab-фрагментов антител к ActRIIB примерно у 2700 бактериальных лизатов (~88 клонов для пэннинга каждого субкода) ранжировали аффинность к рекомбинантному биотинилированному антигену hActRIIB/Fc и препаратам мембранных пузырьков трансфектированных hActRIIB HEK293T/17-клеток с помощью MSD-метода. Наиболее перспективные варианты ("хиты"), аффинности которых был присвоен высокий коэффициент ранжирования, секвенировали.

Кроме того, у произвольно отобранных клонов, которые не были отнесены к "хитам", осуществляли ранжирование аффинности с помощью FACS. Для этой цели бактериальные лизаты подвергали скринингу с использованием родительских HEK293T/17-клеток и/или трансфектированных hActRIIB HEK293T/17-клеток. Связанные с клетками Fab-фрагменты выявляли с помощью конъюгированного с фикоэритрином козьего античеловеческого IgG (H+L) в качестве вторичного антитела. Параллельно осуществляли количественное определение экспрессии Fab-фрагментов в лизатах.

Все стратегии пэннинга позволяли получать специфические в отношении ActRIIB антитела. Потомство MOR08067 можно было идентифицировать после анализа последовательностей. Все связывающие агенты имели созревшие CDR-H2.

Конверсия в IgG2 и характеристика IgG2 (2-ой цикл созревания аффинности).

И в этом случае наиболее перспективные Fab-фрагменты, полученные после второго цикла созревания аффинности, отбирали для конверсии в IgG2. Экспрессию IgG2 осуществляли путем кратковременной трансфекции НКВ11-клеток и полноразмерные иммуноглобулины очищали из супернатантов клеточных культур.

Все изученные IgG сохранили способность полностью обращать индуцируемое миостатином ингибирование дифференцировки первичных скелетных миобластов (табл.4).

Таблица 4

Данные о значениях IC_{50} антител к ActRIIB в виде IgG при оценке на основе анализа индуцируемого миостатином ингибирования дифференцировки клеток скелетных мышц

IgG	СК-анализ IC_{50} [нМ]
MOR08159	1,89
MOR08213	1,7
MOR08806	0,52
MOR08807	5,02
MOR09032	1,02
MOR09058	2,3

При создании изобретения оценивали способность Ат к ActRIIB нейтрализовать связывание миостатина, а также других лигандов из семейства TGFβ, с ActRIIB при использовании первичных человеческих скелетных миобластов. Для анализа дифференцировки миобластов применяли различные лиганды, которые потенциально могли ингибировать дифференцировку, в присутствии либо MOR08159, либо MOR08213 или без антител.

Таблица 5

Данные о значениях IC_{50} и E_{max} , полученные при анализе различных лигандов, индуцирующих ингибирование дифференцировки скелетных мышц, в присутствии MOR08159/MOR08213 (10 мкг/мл) или без антител

Лиганды из семейства TGF β	Без Ат		MOR08159		MOR08213	
	IC_{50} (нг/мл)	E_{max} (% к контролю)	IC_{50} (нг/мл)	E_{max} (% к контролю)	IC_{50} (нг/мл)	E_{max} (% к контролю)
Миостатин	8,5 \pm 0,6	25,7 \pm 1,5	42,7 \pm 5,8	28,9 \pm 4,8	35,1 \pm 5,1	35,3 \pm 4,5
GDF-11	7,0 \pm 1,2	23,2 \pm 3,8	13,3 \pm 0,9	22,1 \pm 2,1	12,0 \pm 1,0	27,1 \pm 2,6
Активин А	14,7 \pm 2,9	37,1 \pm 3,9	34,7 \pm 9,0	61,9 \pm 5,4	41,9 \pm 3,4	57,2 \pm 1,9
BMP-2	26,9 \pm 2,6	2,6 \pm 4,2	34,0 \pm 2,6	5,1 \pm 3,4	32,3 \pm 1,4	4,8 \pm 1,9

Миостатин и GDF-11 обладали способностью ингибировать дифференцировку человеческих миообластов с одинаковой эффективностью и в одинаковой степени. В присутствии взятых в одинаковой концентрации MOR08159 или MOR08213 зависимости ответа от дозы для миостатина и GDF-11 сдвигались параллельно. Активин А также обладал способностью ингибировать дифференцировку, однако в присутствии MOR08159 или MOR08213 при создании изобретения обнаружен непараллельный сдвиг, что сопровождалось изменением значения E_{max} и эффективности. На BMP-2-ответ не оказывало влияние присутствие MOR08159 или MOR08213, что позволяет предположить, что этот ответ не происходит посредством связывания ActRIIB.

Характеризация антител к ActRIIB в опытах *in vivo* на мышах.

Способность антител к ActRIIB индуцировать мышечную гипертрофию оценивали на SCID-мышцах, которым вводили MOR08159 или MOR08213, 10 мкг/кг *i.p.* еженедельно в течение 6 недель (фиг. 6).

В конце эксперимента установлено, что оба антитела обладали способностью индуцировать выраженную гипертрофию всех изученных мышц. Значительное повышение общего веса тела у обработанных антителом к ActRIIB мышей было обнаружено на ранней стадии, уже через 1 неделю после начала обработки.

MOR08213 обладал способностью в зависимости от дозы индуцировать выраженную гипертрофию всех изученных мышц при применении в дозе 5 и 25 мкг/кг, но не обнаружено значительных изменений при применении антитела в дозе 1 мкг/кг (фиг. 7).

Опыты по оценке перекрестной блокады.

Стабильно трансфектированные ActRIIB HEK293T/17-клетки поддерживали в среде DMEM, содержащей 10% FBS, 2 мМ L-глутамин, пенициллин (50 МЕ/мл), стрептомицин (50 мкг/мл) и пуромидин (2 мкг/мл). Клетки выращивали в инкубаторе при 37°C и 5% CO₂ и пересевали каждые 3-4 дня. Клетки отделяли с помощью Accutase и затем переносили в новую колбу, содержащую свежую среду.

Способность антител к ActRIIB связываться с одним и тем же эпитопом человеческого ActRIIB оценивали с помощью FACS, используя экспрессирующие hActRIIB клетки.

Для этой цели антитело к ActRIIB в виде IgG инкубировали с 1×10^5 трансфектированных hActRIIB клеток на лунку в течение 1 ч при 4°C. После отмывки различные биотинилированные антитела к ActRIIB в виде IgG или контрольный биотинилированный IgG инкубировали в эквимоллярной концентрации с первым антителом к ActRIIB в виде IgG в течение 1 ч при 4°C. После отмывки связанный с клетками биотинилированный IgG выявляли с помощью комплекса стрептавидин-APC (фирма Biolegend). После инкубации в течение 1 ч при 4°C клетки вновь отмывали и ресуспендировали в FACS-буфере и интенсивность флуоресценции определяли с помощью устройства FACSArray.

С помощью FACS оценивали способность MOR08159 и MOR08213 к совместному связыванию с трансфектированными ActRIIB клетками, и определяли специфическое связывание MOR08159 индивидуально (жирная черная линия) или в присутствии MOR08213 (жирная штриховая линия) в сравнении с контролем изотипа (черная линия) или контролем изотипа в присутствии MOR08213 (штриховая линия) (фиг. 8).

В присутствии MOR08213 связывание MOR08159 существенно снижалось, это позволяет предположить, что эти два антитела либо связываются с одинаковыми сайтами, либо с перекрывающимися в определенной степени сайтами, или что связывание MOR08213 с другим, но близко расположенным сайтом, может являться стерической помехой связыванию MOR08159.

Эпитопное картирование.

Использовали несколько дополнительных методов для выявления эпитопа, с которым связывается антитело MOR08159. В этом примере нумерация остатков соответствует полноразмерной аминокислотной последовательности ActRIIB (SEQ ID NO: 181).

Дот-блоттинг.

Осуществляли анализ методом дот-блоттинга эпитопа для MOR08159. Нативный и денатурированный (восстановленный и денатурированной тепловой обработкой) ActRIIB наносили пятнами на нитроцеллюлозную мембрану, зондировали MOR08159 и осуществляли обнаружение с помощью меченного античеловеческого антитела. Выявлялся только нативный ActRIIB в отличие от восстановленного и денатурированного тепловой обработкой ActRIIB. Эти результаты свидетельствуют о том, что эпитоп представляет собой конформационный эпитоп.

Изучение мутаций.

Создавали библиотеку внеклеточных доменов ActRIIB (ак 21 - 120) с помощью ПЦР пониженной точности и варианты экспрессировали в периплазме *E. coli*. Связывание примерно 30000 (небольшая фракция от теоретического размера библиотеки) этих вариантов с MOR08159 оценивали с помощью скрининга путем фильтрации колоний и окрашивания методом вестерн-блоттинга. Варианты, для которых обнаружено лишь слабое связывание или отсутствие связывания с MOR08159 дополнительно оценивали с помощью ELISA. Уровень экспрессии (выявляемый с помощью антитела к Flag) и связывание с MOR08159 вариантов ActRIIB сравнивали с указанными показателями для ActRIIB дикого типа. Если уровень экспрессии составлял по меньшей мере 75% от уровня экспрессии дикого типа, а связывание с MOR08159 составляло менее 25%, то мутацию рассматривали как затрагивающую связывание MOR08159. Рассматривали только варианты, имеющие одну точечную мутацию, которая значительно не искажала структуру (как, например, мутация участвующего в формировании S-S мостика цистеина).

Большинство мутаций, препятствующих связыванию MOR08159, было обнаружено на участке от положения K75 до D81, это свидетельствует о том, что эта область важна для связывания антитела. Обнаружено, что мутации в положениях W78, D80 и D81 значительно снижают связывание MOR08159.

Массивы циклических пептидов.

Коллекцию выведенных из антигена циклических пептидов, презентующихся на пептидных микро-массивах, инкубировали с представляющими интерес антителами. Для определения связывания пептид-антитело применяли RepLiTore-анализ, при осуществлении которого пептидный микро-массив инкубировали с первичным антителом, а затем с флуоресцентно меченным вторичным антителом к Fc-фрагменту первичного антитела. После нескольких стадий отмывки пептидные микро-массивы сушили с помощью центрифуги для микро-массивов и сканировали с помощью системы с высоким разрешением для микро-массивов, устанавливая режим с соответствующими длинами волн.

Микро-массив состоял из трех подмассивов, каждый из которых презентовал циклические пептиды, выведенные из ActRIIB (с остатком Cys вместо Ser), которые сканировали (пептидный сканер формата 15/12). В качестве контрольного эксперимента осуществляли одну инкубацию с неродственным антителом (ACE 18543, изотопный контроль), а затем с флуоресцентно меченным вторичным антителом (меченный Cy-5 античеловеческий IgG) для выявления ложных положительных сигналов. Кроме того, осуществляли инкубацию с антителом-мишенью, а затем с флуоресцентно меченным вторичным антителом.

Установлено, что MOR08159 (ACE 19819) распознает один эпитоп, который обнаружен в трех тестируемых пептидах (№ 18-20).

18	IELVKKGSWLDDFNS	(SEQ ID NO: 183)
19	VKKGSWLDDFNSYDR	(SEQ ID NO: 184)
20	GSWLDDFNSYDRQES	(SEQ ID NO: 185)

Последовательность, общая для этих пептидов, с которой, как установлено, связывается MOR08159, представляет собой 76GCWLDDFNC84 (SEQ ID NO: 186).

Этим методом идентифицирована также вторая область, отличающаяся более слабыми характеристиками связывания. Эта вторая область имела последовательность 49CEGEQDKRLHCYASW63 (SEQ ID NO: 187).

Рентгеновская кристаллография.

Экспрессировали фрагменты человеческого ActRIIB, включающие аминокислоты 20-120 и 24-117. Кроме того, экспрессировали и очищали Fab- и Fv-фрагменты MOR08159 (во всех случаях экспрессию осуществляли в *E. coli*). С использованием этих белков получали, очищали и кристаллизовали 4 белковых комплекса (MOR08159Fab-ActRIIB 20-120, MOR08159Fab-ActRIIB 24-117, MOR08159Fv-ActRIIB 20-120, MOR08159Fv-ActRIIB 24-117).

Рентгеновский структурный анализ свободного Fab-фрагмента MOR08159 осуществляли с разрешением вплоть до 1,78 Å. Рентгеновский структурный анализ комплекса Fv с ActRIIB-LBD осуществляли с разрешением вплоть до 3,35 Å. С использованием стандартной пороговой дистанции 3,9 Å для определения контактирующих остатков, установлено, что последовательность 76GCWLDDFNC84 представляет собой важную область, в которой присутствует последовательность 78WLDDFN83 (SEQ ID NO: 188), имеющая решающее значение для связывания. Кроме того, взаимодействие обнаружено также с пептидной областью 49CEGEQDKRLHCYASW63.

Результаты различных экспериментов по эпитопному картированию обобщены на фиг. 9.

Подтверждение аффинности с помощью SET.

Серийные разведения антигена (внеклеточный домен ActRIIB или ActRIIA) приготавливали в ЗФР, содержащем 0,5% (мас./об.) БСА/0,02% (мас./об.) Твин 20, и добавляли антитело (MOR08159) к каждой концентрации антигена до достижения постоянной концентрации антитела. По 100 мкл/лунку каждой смеси разведений вносили с дублированием в 96-луночный полипропиленовый титрационный микропланшет (планшет для микротитрования, МТР) (фирма Greiner). Буфер для анализа служил в качестве отрицательного контроля, а образец без антигена в качестве положительно контроля (B_{max}). Планшет запечатывали и инкубировали в течение ночи. 96-луночный титрационный микропланшет типа High Bind (фирма Meso Scale Discovery) сенсibilизировали 25 мкл (0,1 мкг/мл) мышинового ActRIIB -Fc, разведенного в ЗФР. Этот планшет также запечатывали и инкубировали в течение ночи при 4°C. После инкубации сенсibilизированный титрационный микропланшет типа High Bind отмывали ЗФР/0,05% (мас./об.) Твин 20. Затем планшет блокировали с помощью ЗФР/5% (мас./об.) БСА. Стадии отмывки повторяли и переносили по 50 мкл/лунку препарата, содержащего комплекс антитело-антиген, из полипропиленового титрационного микроплшета в сенсibilизированный антигеном титрационный микропланшет типа High Bind. Титрационный микропланшет типа High Bind инкубировали в течение 25 мин при комнатной температуре. После трех дополнительных стадий отмывки в каждую лунку добавляли по 25 мкл (1 мкг/мл) меченного с помощью сульфогруппы козьего античеловеческого идентифицирующего антитела (фирма Meso Scale Discovery), разведенного в буфере для анализа, и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После отмывки планшета в каждую лунку вносили по 50 мкл буфера для записи (фирма Meso Scale Discovery).

Создавали электрохемилюминисцентные (ECL) сигналы и определяли с помощью ридера Sector Imager 6000 (фирма Meso Scale Discovery).

Строили график зависимости значений ECL от соответствующих концентраций антигена. Значение KD определяли путем подбора элементов согласно аппроксимирующей модели, описанной у Pichler J. и др., J. Immunol Methods; 201(2), 1997, с. 189-206.

Представленные значения K_D и стандартные отклонения определяли на основе индивидуальных значений K_D , полученных в независимых экспериментах.

В этих экспериментах определено среднее значение константы равновесия реакции диссоциации KD для человеческого ActRIIB, составляющее 1,73 пМ ($\pm 0,31$), в то время как среднее значение константы равновесия реакции диссоциации K_D для ActRIIA составляло 434 пМ (± 25).

Как должно быть очевидно, изобретение описано выше только в качестве примера и в него могут быть внесены модификации без отклонения от сущности и объема изобретения.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Новартис АГ
 <120> Композиции и способы для усиления мышечного роста
 <130> 53508
 <150> US 61/173004
 <151> 2009-04-27
 <150> US 61/306137
 <151> 2010-02-19
 <160> 190
 <170> PatentIn, версия 3.3
 <210> 1
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> CDR
 <400> 1
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser Tyr Ile Asn
 1 5 10
 <210> 2
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> CDR
 <400> 2
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser Tyr Ile Asn
 1 5 10
 <210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<223> CDR

<400> 3

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser Tyr Ile Asn
1 5 10

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR

<400> 4

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser Tyr Ile Asn
1 5 10

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR

<400> 5

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser Tyr Ile Asn
1 5 10

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR

<400> 6

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser Tyr Ile Asn
1 5 10

<210> 7

<211> 10

<212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 7

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser Tyr Ile Asn
 1 5 10

<210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 8

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser Tyr Ile Asn
 1 5 10

<210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 9

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser Tyr Ile Asn
 1 5 10

<210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 10

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser Tyr Ile Asn
 1 5 10

<210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 11

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser Tyr Ile Asn
 1 5 10

<210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 12

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser Tyr Ile Asn
 1 5 10

<210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 13

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser Tyr Ile Asn
 1 5 10

<210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 14

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser Tyr Ile Asn
1 5 10

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR

<400> 15

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

Gly

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR

<400> 16

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

Gly

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR

<400> 17

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

Gly

<210> 18
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 18

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

Gly

<210> 19
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 19

Met Ile Asn Ala Pro Ile Gly Thr Thr Arg Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 20
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 20

Gln Ile Asn Ala Ala Ser Gly Met Thr Arg Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR

<400> 21

Met Ile Asn Ala Pro Ile Gly Thr Thr Arg Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR

<400> 22

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

Gly

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR

<400> 23

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

Gly

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR

<400> 24

Gln Ile Asn Ala Ala Ser Gly Met Thr Arg Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 25

<211> 17

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR

<400> 25

Asn Ile Asn Ala Ala Ala Gly Ile Thr Leu Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR

<400> 26

Thr Ile Asn Pro Pro Thr Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 27

<211> 17

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR

<400> 27

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

Gly

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR

<400> 28

Asn Ile Asn Pro Ala Thr Gly His Ala Asp Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 29

<211> 6

<212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 29

Gly Gly Trp Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 30
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 30

Gly Gly Trp Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 31
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 31

Gly Gly Trp Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 32
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 32

Gly Gly Trp Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 33
<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR

<400> 33

Gly Gly Trp Phe Asp Tyr
1 5

<210> 34
<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR

<400> 34

Gly Gly Trp Phe Asp Tyr
1 5

<210> 35
<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR

<400> 35

Gly Gly Trp Phe Asp Tyr
1 5

<210> 36
<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CDR

<400> 36

Gly Gly Trp Phe Asp Tyr
1 5

<210> 37

<211> 6

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR

<400> 37

Gly Gly Trp Phe Asp Tyr
1 5

<210> 38

<211> 6

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR

<400> 38

Gly Gly Trp Phe Asp Tyr
1 5

<210> 39

<211> 6

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR

<400> 39

Gly Gly Trp Phe Asp Tyr
1 5

<210> 40

<211> 6

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR

<400> 40

Gly Gly Trp Phe Asp Tyr

1 5

<210> 41

<211> 6

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR

<400> 41

Gly Gly Trp Phe Asp Tyr

1 5

<210> 42

<211> 6

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR

<400> 42

Gly Gly Trp Phe Asp Tyr

1 5

<210> 43

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR

<400> 43

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Val Asn

1 5 10

<210> 44
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 44

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Val Asn
 1 5 10

<210> 45
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 45

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Val Asn
 1 5 10

<210> 46
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 46

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Val Asn
 1 5 10

<210> 47
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 47

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Val Asn
 1 5 10

<210> 48
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 48

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Val Asn
 1 5 10

<210> 49
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 49

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Val Asn
 1 5 10

<210> 50
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 50

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Val Asn
 1 5 10

<210> 51
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR

<400> 51

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Val Asn
1 5 10

<210> 52

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR

<400> 52

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Val Asn
1 5 10

<210> 53

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR

<400> 53

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Val Asn
1 5 10

<210> 54

<211> 14

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR

<400> 54

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Val Asn
1 5 10

<210> 55

<211> 14

<212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 55

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Val Asn
 1 5 10

<210> 56
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 56

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Val Asn
 1 5 10

<210> 57
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 57

Leu Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser
 1 5 10

<210> 58
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 58

Leu Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser
 1 5 10

<210> 59
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 59

Leu Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser
 1 5 10

<210> 60
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 60

Leu Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser
 1 5 10

<210> 61
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 61

Leu Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser
 1 5 10

<210> 62
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 62

Leu Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser
1 5 10

<210> 63

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR

<400> 63

Leu Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser
1 5 10

<210> 64

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR

<400> 64

Leu Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser
1 5 10

<210> 65

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR

<400> 65

Leu Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser
1 5 10

<210> 66

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR

<400> 66

Leu Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser
1 5 10

<210> 67

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR

<400> 67

Leu Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser
1 5 10

<210> 68

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR

<400> 68

Leu Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser
1 5 10

<210> 69

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR

<400> 69

Leu Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser
1 5 10

<210> 70
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 70

Leu Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser
 1 5 10

<210> 71
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 71

Gln Ala Trp Thr Ser Lys Met Ala Gly
 1 5

<210> 72
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 72

Ser Ser Tyr Thr Arg Met Gly His Pro
 1 5

<210> 73
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 73

Ala Thr Tyr Gly Lys Gly Val Thr Pro Pro
 1 5 10

<210> 74
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 74

Gly Thr Phe Ala Gly Gly Ser Tyr Tyr Gly
 1 5 10

<210> 75
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 75

Gln Ala Trp Thr Ser Lys Met Ala Gly
 1 5

<210> 76
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 76

Gln Ala Trp Thr Ser Lys Met Ala Gly
 1 5

<210> 77
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR

<400> 77

Gly Thr Phe Ala Gly Gly Ser Tyr Tyr Gly
1 5 10

<210> 78

<211> 10

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR

<400> 78

Gly Thr Phe Ala Gly Gly Ser Tyr Tyr Gly
1 5 10

<210> 79

<211> 10

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR

<400> 79

Gly Thr Phe Ala Gly Gly Ser Tyr Tyr Gly
1 5 10

<210> 80

<211> 10

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR

<400> 80

Gly Thr Phe Ala Gly Gly Ser Tyr Tyr Gly
1 5 10

<210> 81

<211> 10

<212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 81

Gly	Thr	Phe	Ala	Gly	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Gly
1				5					10

<210> 82
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 82

Gly	Thr	Phe	Ala	Gly	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Gly
1				5					10

<210> 83
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 83

Gly	Thr	Phe	Ala	Gly	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Gly
1				5					10

<210> 84
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CDR

<400> 84

Gly	Thr	Phe	Ala	Gly	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Gly
1				5					10

<210> 85
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VL

<400> 85

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

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

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Thr Ser Lys
 85 90 95

Met Ala Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

<210> 86
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VL

<400> 86

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

027071

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

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

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

Gly His Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

<210> 87

<211> 113

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VL

<400> 87

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

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

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Gly Lys Gly
85 90 95

Val Thr Pro Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 88

<211> 113

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VL

<400> 88

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

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

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 89
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VL

<400> 89

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

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

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Thr Ser Lys
 85 90 95

Met Ala Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

<210> 90
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VL

027071

<400> 90

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

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

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Thr Ser Lys
85 90 95

Met Ala Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

<210> 91

<211> 113

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VL

<400> 91

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

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

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

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

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

<210> 92
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VL

<400> 92

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

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

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

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

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

<210> 93

<211> 113

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VL

<400> 93

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

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

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

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

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

<210> 94
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VL

<400> 94

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

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

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

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

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

<210> 95
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VL

<400> 95

027071

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

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

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

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

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

<210> 96
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VL

<400> 96

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

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

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

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

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

<210> 97
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VL

<400> 97

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

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

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

027071

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

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 98

<211> 113

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VL

<400> 98

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

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

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 99
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VH

<400> 99

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
 115

<210> 100
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VH

<400> 100

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
 115

<210> 101

<211> 115

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH

<400> 101

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

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

027071

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
 115

<210> 102
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VH

<400> 102

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

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

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

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

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

027071

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 103

<211> 115

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH

<400> 103

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

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

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

Gly Met Ile Asn Ala Pro Ile Gly Thr Thr Arg Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 104
<211> 115
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VH

<400> 104

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 105
<211> 115
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH

<400> 105

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

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

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

Gly Met Ile Asn Ala Pro Ile Gly Thr Thr Arg Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

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

Val Ser Ser
 115

<210> 106

<211> 115

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH

<400> 106

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

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

027071

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 107
<211> 115
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VH

<400> 107

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

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

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

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

027071

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

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 108
<211> 115
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VH

<400> 108

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 109
<211> 115
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VH

<400> 109

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 110
<211> 115
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

027071

<220>

<223> VH

<400> 110

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

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

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

Gly Thr Ile Asn Pro Pro Thr Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 111

<211> 115

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH

<400> 111

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

027071

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 112
<211> 115
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VH

<400> 112

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

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

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

Gly Asn Ile Asn Pro Ala Thr Gly His Ala Asp Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 113
<211> 336
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VL

<400> 113
gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag 120
catcccgga aggcgcgaa acttatgatt tatgggtgtt ctaagcgtcc ctccaggcgtg 180
agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgga gcctgaccat tagcggcctg 240
caagcggaag acgaagcga ttattattgc caggcttgga cttctaagat ggctgggtgtg 300
tttgcgggcg gcacgaagtt aaccgttctt ggccag 336

<210> 114
<211> 336
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VL

<400> 114
gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag 120

catcccggga aggcgccgaa acttatgatt tatggtgttt ctaagcgtec ctcaggcgtg 180
 agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240
 caagcggaag acgaagcgga ttattattgc tcttcttata ctcgatggg tcatcctgtg 300
 tttggcggcg gcacgaagtt aaccgttctt ggccag 336

<210> 115
 <211> 339
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VL

<400> 115
 gatatcgac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
 tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag 120
 catcccggga aggcgccgaa acttatgatt tatggtgttt ctaagcgtec ctcaggcgtg 180
 agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240
 caagcggaag acgaagcgga ttattattgc gctacttatg gtaaggggtg tactctctct 300
 gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtt cttggccag 339

<210> 116
 <211> 339
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VL

<400> 116
 gatatcgac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
 tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag 120
 catcccggga aggcgccgaa acttatgatt tatggtgttt ctaagcgtec ctcaggcgtg 180
 agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240
 caagcggaag acgaagcgga ttattattgc ggtacttttg ctgggtgggtt ttattatggt 300
 gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtt cttggccag 339

<210> 117
 <211> 336
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VL

<400> 117
 gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
 tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag 120
 catcccgga aggcgcgaa acttatgatt tatgggtgtt ctaagcgcc ctcaggcgtg 180
 agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240
 caagcggaag acgaagcgga ttattattgc caggcttgga cttctaagat ggctgggtgtg 300
 tttggcggcg gcacgaagtt aaccgttctt ggccag 336

<210> 118
 <211> 336
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VL

<400> 118
 gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
 tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag 120
 catcccgga aggcgcgaa acttatgatt tatgggtgtt ctaagcgcc ctcaggcgtg 180
 agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240
 caagcggaag acgaagcgga ttattattgc caggcttgga cttctaagat ggctgggtgtg 300
 tttggcggcg gcacgaagtt aaccgttctt ggccag 336

<210> 119
 <211> 339
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VL

<400> 119

```

gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc      60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag      120
catcccgga aggcgcgaa acttatgatt tatggtgttt ctaagcgtcc ctccaggcgtg      180
agcaaccggt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg      240
caagcggaag acgaagcgga ttattattgc ggtacttttg ctggtggttc ttattatggt      300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccggt cttggccag                               339

```

<210> 120

<211> 339

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VL

<400> 120

```

gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc      60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag      120
catcccgga aggcgcgaa acttatgatt tatggtgttt ctaagcgtcc ctccaggcgtg      180
agcaaccggt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg      240
caagcggaag acgaagcgga ttattattgc ggtacttttg ctggtggttc ttattatggt      300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccggt cttggccag                               339

```

<210> 121

<211> 339

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VL

<400> 121

```

gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc      60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag      120
catcccgga aggcgcgaa acttatgatt tatggtgttt ctaagcgtcc ctccaggcgtg      180

```

agcaaccggtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240
 caagcggaag acgaagcgga ttattattgc ggtacttttg ctggtggttc ttattatggt 300
 gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccggt cttggccag 339

<210> 122
 <211> 339
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VL

<400> 122
 gatatcgac tgaccagcc agcttcagt agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
 tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggg tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag 120
 catcccgga aggcgcgaa acttatgatt tatggtgttt ctaagcgtcc ctgaggcgtg 180
 agcaaccggtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240
 caagcggaag acgaagcgga ttattattgc ggtacttttg ctggtggttc ttattatggt 300
 gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccggt cttggccag 339

<210> 123
 <211> 339
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VL

<400> 123
 gatatcgac tgaccagcc agcttcagt agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
 tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggg tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag 120
 catcccgga aggcgcgaa acttatgatt tatggtgttt ctaagcgtcc ctgaggcgtg 180
 agcaaccggtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240
 caagcggaag acgaagcgga ttattattgc ggtacttttg ctggtggttc ttattatggt 300
 gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccggt cttggccag 339

<210> 124
 <211> 339
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VL

<400> 124
 gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
 tcgtgtactg gtactagcag cgatgttggt tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag 120
 catcccggga aggcgccgaa acttatgatt tatgggtgtt ctaagcgtcc ctcaggcgtg 180
 agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240
 caagcggaag acgaagcgga ttattattgc ggtacttttg ctggtggttc ttattatggt 300
 gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtt cttggccag 339

<210> 125
 <211> 339
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VL

<400> 125
 gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
 tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag 120
 catcccggga aggcgccgaa acttatgatt tatgggtgtt ctaagcgtcc ctcaggcgtg 180
 agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240
 caagcggaag acgaagcgga ttattattgc ggtacttttg ctggtggttc ttattatggt 300
 gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtt cttggccag 339

<210> 126
 <211> 339
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VL

<400> 126
 gatatcgcac tgaccacagcc agcttcagtg agcgggtcac caggtcagag cattaccatc 60
 tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag 120
 catcccggga aggcgcggaa acttatgatt tatgggtgttt ctaagcgtcc ctccaggcgtg 180
 agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240
 caagcggaag acgaagcgga ttattattgc ggtacttttg ctggtgggtc ttattatggt 300
 gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtt cttggccag 339

<210> 127
 <211> 345
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VH

<400> 127
 caggtgcaat tggttcagag cggcgcggaa gtgaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg 60
 agctgcaaag cctccggata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc 120
 cctgggcagg gtctcgagt gatgggcact atcaatccgg tttctggcaa tacgtcttac 180
 gcgcagaagt ttcagggccg ggtgaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat 240
 atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtgggtgt 300
 tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctca 345

<210> 128
 <211> 345
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VH

<400> 128
 caggtgcaat tggttcagag cggcgcggaa gtgaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg 60
 agctgcaaag cctccggata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc 120
 cctgggcagg gtctcgagt gatgggcact atcaatccgg tttctggcaa tacgtcttac 180
 gcgcagaagt ttcagggccg ggtgaaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat 240

atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtggtggt 300

tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacgggta gctca 345

<210> 129

<211> 345

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH

<400> 129

caggtgcaat tgggttcagag cggcgcgga gtaaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg 60

agctgcaaag cctccggata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc 120

cctgggcagg gtctcgagt gatgggcact atcaatccgg tttctggcaa tacgtcttac 180

gcgcagaagt ttcagggccg ggtgaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat 240

atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtggtggt 300

tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacgggta gctca 345

<210> 130

<211> 345

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH

<400> 130

caggtgcaat tgggttcagag cggcgcgga gtaaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg 60

agctgcaaag cctccggata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc 120

cctgggcagg gtctcgagt gatgggcact atcaatccgg tttctggcaa tacgtcttac 180

gcgcagaagt ttcagggccg ggtgaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat 240

atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtggtggt 300

tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacgggta gctca 345

<210> 131

<211> 345

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH

<400> 131

```

caggtgcaat tggttcagag cggcgcgga gtaaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg      60
agctgcaaag cctccggata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc      120
cctgggcagg gtctcgagt gatgggcatg attaatgctc ctattggtag tactcgttat      180
gtcagaagt ttcagggtcg ggtgaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat      240
atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtgggtgt      300
tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctca                        345

```

<210> 132

<211> 345

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH

<400> 132

```

caggtgcaat tggttcagag cggcgcgga gtaaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg      60
agctgcaaag cctccggata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc      120
cctgggcagg gtctcgagt gatgggcatg attaatgctc ctattggtag tactcgttat      180
gtcagaagt ttcagggtcg ggtgaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat      240
atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtgggtgt      300
tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctca                        345

```

<210> 133

<211> 345

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH

<400> 133

```

caggtgcaat tggttcagag cggcgcgga gtaaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg      60

```

```

agctgcaaag cctccggata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc 120
cctgggcagg gtctcgagtg gatgggcatg attaatgctc ctattggtag tactcggtat 180
gctcagaagt ttcagggctg ggtgaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat 240
atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtgggtgt 300
tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctca 345

```

```

<210> 134
<211> 345
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

```

```

<220>
<223> VH

```

```

<400> 134
caggtgcaat tggttcagag cggcgcgga gtagaaaaac cggcgcgag cgtgaaagt 60
agctgcaaag cctccggata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc 120
cctgggcagg gtctcgagtg gatgggcact atcaatccgg tttctggcaa tacgcgttac 180
gcgcagaagt ttcagggccg ggtgaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat 240
atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtgggtgt 300
tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctca 345

```

```

<210> 135
<211> 345
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

```

```

<220>
<223> VH

```

```

<400> 135
caggtgcaat tggttcagag cggcgcgga gtagaaaaac cggcgcgag cgtgaaagt 60
agctgcaaag cctccggata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc 120
cctgggcagg gtctcgagtg gatgggcact atcaatccgg tttctggctc tacgtcttac 180
gcgcagaagt ttcagggccg ggtgaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat 240
atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtgggtgt 300

```

tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctca 345

<210> 136

<211> 345

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH

<400> 136

caggtgcaat tggttcagag cggcgcgga gtgaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg 60

agctgcaaag cctccggata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc 120

cctgggcagg gtctcgagt gatgggccag attaatgctg cttctggtat gactcggtat 180

gctcagaagt ttcagggtcg ggtcaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat 240

atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtggtggt 300

tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctca 345

<210> 137

<211> 345

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH

<400> 137

caggtgcaat tggttcagag cggcgcgga gtgaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg 60

agctgcaaag cctccggata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc 120

cctgggcagg gtctcgagt gatgggcaat attaatgctg ctgctggtat tactctttat 180

gctcagaagt ttcagggtcg ggtcaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat 240

atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtggtggt 300

tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctca 345

<210> 138

<211> 345

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH

<400> 138

caggtgcaat tggttcagag cggcgcgga gtagaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg 60

agctgcaaag cctccggata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc 120

cctgggcagg gtctcgagt gatgggcact attaatcctc ctactggagg tacttattat 180

gctcagaagt ttcagggtcg ggtgaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat 240

atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtgggtggt 300

tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctca 345

<210> 139

<211> 345

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH

<400> 139

caggtgcaat tggttcagag cggcgcgga gtagaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg 60

agctgcaaag cctccggata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc 120

cctgggcagg gtctcgagt gatgggcgtt attaatcctc ctgctggtac tacttcttat 180

gctcagaagt ttcagggtcg ggtcaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat 240

atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtgggtggt 300

tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctca 345

<210> 140

<211> 345

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH

<400> 140

caggtgcaat tggttcagag cggcgcgga gtagaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg 60

agctgcaaag cctccggata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc 120

cctgggcagg gtctcgagt gatgggcaat attaatcctg ctactgggtca tgctgattat 180
 gctcagaagt ttcagggtcg ggtgaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat 240
 atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtgggtggt 300
 tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacgggta gctca 345

<210> 141

<211> 217

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> легкая цепь

<400> 141

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

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

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

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

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 142

<211> 217

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> легкая цепь

<400> 142

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

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

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

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

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 143

<211> 217

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> легкая цепь

<400> 143

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

027071

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

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

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

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 144
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> легкая цепь

<400> 144

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

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

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

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

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 165 170 175

027071

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 145

<211> 217

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> легкая цепь

<400> 145

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

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

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 146
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> тяжелая цепь

<400> 146

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270

027071

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 147

<211> 445

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> тяжелая цепь

<400> 147

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

027071

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 148

<211> 445

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> тяжелая цепь

<400> 148

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

027071

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 149

<211> 445

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> тяжелая цепь

<400> 149

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

027071

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 150

<211> 445

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> тяжелая цепь

<400> 150

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

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

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

Gly Asn Ile Asn Pro Ala Thr Gly His Ala Asp Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

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

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

027071

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 151

<211> 217

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> легкая цепь

<400> 151

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

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

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

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

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 152
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> легкая цепь

<400> 152

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

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

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

027071

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 153

<211> 217

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> легкая цепь

<400> 153

027071

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

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

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

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

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 154
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> легкая цепь

<400> 154

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

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

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

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

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 155
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> легкая цепь

<400> 155

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

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

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

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

027071

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 156
 <211> 441
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> тяжелая цепь

<400> 156

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly
 180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys
 210 215 220

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 225 230 235 240

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 245 250 255

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 260 265 270

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 275 280 285

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His
 290 295 300

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 305 310 315 320

Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
 325 330 335

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 340 345 350

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 355 360 365

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 370 375 380

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 385 390 395 400

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 405 410 415

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 420 425 430

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 157

<211> 441

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> тяжелая цепь

<400> 157

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

027071

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly
 180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys
 210 215 220

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 225 230 235 240

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 245 250 255

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 260 265 270

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 275 280 285

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His
 290 295 300

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 305 310 315 320

Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
 325 330 335

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 340 345 350

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 355 360 365

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 370 375 380

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 385 390 395 400

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 405 410 415

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 420 425 430

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 158

<211> 441

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> тяжелая цепь

<400> 158

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

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

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

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

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

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

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

027071

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly
 180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys
 210 215 220

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 225 230 235 240

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 245 250 255

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 260 265 270

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 275 280 285

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His
 290 295 300

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 305 310 315 320

Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
 325 330 335

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 340 345 350

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 355 360 365

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 370 375 380

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 385 390 395 400

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 405 410 415

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 420 425 430

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 159

<211> 441

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> тяжелая цепь

<400> 159

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

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

027071

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

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

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

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

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

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly
 180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys
 210 215 220

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 225 230 235 240

027071

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 245 250 255

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 260 265 270

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 275 280 285

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His
 290 295 300

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 305 310 315 320

Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
 325 330 335

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 340 345 350

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 355 360 365

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 370 375 380

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 385 390 395 400

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 405 410 415

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 420 425 430

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 160
 <211> 441
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> тяжелая цепь

<400> 160

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

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

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

Gly Asn Ile Asn Pro Ala Thr Gly His Ala Asp Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

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

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly
 180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys
 210 215 220

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 225 230 235 240

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 245 250 255

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 260 265 270

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 275 280 285

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His
 290 295 300

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 305 310 315 320

Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
 325 330 335

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 340 345 350

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 355 360 365

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 370 375 380

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 385 390 395 400

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 405 410 415

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 420 425 430

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 161

<211> 651

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> легкая цепь

<400> 161

```

cagagcgccc tgaccagccc cgccagcgtg tccggcagcc caggccagtc taccacaatc      60
agctgcaccg gcacctccag cgacgtgggc agctacaact acgtgaactg gtatcagcag      120
caccceggca agggccccaa gctgatgata tacggcgtga gcaagaggcc cagcggcgtg      180
tccaacaggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgacaat cagtgggctg      240
caggctgagg acgaggccga ctactactgc ggcacctttg ccggcgggatc atactacggc      300
gtgttcggcg gagggaccaa gctgaccgtg ctgggccagc ctaaggctgc ccccagcgtg      360
acctgtttcc cccccagcag cgaggagctg caggccaaca aggccaccct ggtgtgcctg      420
atcagcgact tctaccaggg cgccgtgacc gtggcctgga aggccgacag cagccccgtg      480
aaggccggcg tggagaccac cacccccagc aagcagagca acaacaagta cgccgccagc      540
agctacctga gcctgacccc cgagcagtgg aagagccaca ggtcctacag ctgccaggtg      600
accacgaggg gcagcacctg ggaaaagacc gtggcccca cagagtgag c      651

```

<210> 162

<211> 651

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> легкая цепь

<400> 162

```

cagagcgccc tgaccagcc cgccagcgtg tccggcagcc caggccagtc tatcacaatc      60
agctgcaccg gcacctccag cgacgtgggc agctacaact acgtgaactg gtatcagcag      120
caccgccggca agggcccca gctgatgata tacggcgtga gcaagaggcc cagcggcgtg      180
tccaacaggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgacaat cagtgggctg      240
caggctgagg acgaggccga ctactactgc ggcacctttg ccggcggatc atactacggc      300
gtgttcggcg gagggaccac gctgaccgtg ctgggccagc ctaaggctgc cccagcgtg      360
accctgttcc cccccagcag cgaggagctg caggccaaca aggccaccct ggtgtgcctg      420
atcagcgact tctaccagc cgccgtgacc gtggcctgga aggccgacag cagccccgtg      480
aaggccggcg tggagaccac ccccccagc aagcagagca acaacaagta cgccgccagc      540
agctacctga gcctgacccc cgagcagtg aagagccaca ggtcctacag ctgccagggt      600
accacagagg gcagcacctg ggaagagacc gtggcccca cagagtgcag c      651

```

<210> 163

<211> 651

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> легкая цепь

<400> 163

```

cagagcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc      60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag      120
catcccgga aggcgccgaa acttatgatt tatgggtgtt ctaagcgtcc ctccaggcgtg      180
agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcca gcctgaccat tagcggcctg      240
caagcggaag acgaagcggc ttattattgc ggtacttttg ctgggtggtc ttattatggc      300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc      360
actctgttcc cgccctcttc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc      420

```

ataagtgact tctacccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc 480
aaggcgggag tggagaccac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc 540
agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc 600
acgcatgaag ggagcacctg ggagaagaca gtggccccta cagaatgttc a 651

<210> 164
<211> 651
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> легкая цепь

<400> 164
cagagcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggg tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag 120
catccccgga aggcgccgaa acttatgatt tatgggtgtt ctaagcgtcc ctccaggcgtg 180
agcaaccggt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240
caagcgggaag acgaagcggg ttattattgc ggtacttttg ctggtgggtc ttattatggt 300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc ccctcgggtc 360
actctgttcc cgcctcctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 420
ataagtgact tctacccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc 480
aaggcgggag tggagaccac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc 540
agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc 600
acgcatgaag ggagcacctg ggagaagaca gtggccccta cagaatgttc a 651

<210> 165
<211> 651
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> легкая цепь

<400> 165
cagagcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60

tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggg tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag 120
catcccggga aggcgccgaa acttatgatt tatggtgttt ctaagcgtcc ctccaggcgtg 180
agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240
caagcgggaag acgaagcggg ttattattgc ggtacttttg ctggtgggtc ttattatggt 300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc 360
actctgttcc cgccctcttc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 420
ataagtgact tctaccggg agcgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc 480
aaggcgggag tggagaccac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc 540
agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc 600
acgcatgaag ggagcacctg ggagaagaca gtggccccta cagaatgttc a 651

<210> 166

<211> 1335

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> тяжелая цепь

<400> 166

caggtgcagc tgggtgcagag cggagctgag gtgaagaagc caggcgccag cgtcaagggtg 60
tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc agcagctaca tcaactgggt ccgccaggct 120
cctgggcagg gactggagtg gatgggcacc atcaaccccg tgtccggcag caccagctac 180
gccagaagt tcaggggcag agtcaccatg accagggaca ccagcatcag caccgcctac 240
atggagctgt ccaggctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc caggggcggc 300
tggttcgact actggggcca gggcaacctg gtgaccgtgt cctcagctag caccaagggc 360
cccagcgtgt tccccctggc cccagcagc aagagcacct ccggcggcac agccgcctg 420
ggctgcctgg tgaaggacta cttccccgag cccgtgaccg tgtcctggaa cagcggagcc 480
ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccgcc gtgctgcaga gcagcggcct gtacagcctg 540
tcagcgtgg tgacagtgcc cagcagcagc ctgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600
aaccacaagc ccagcaacac caaggtggac aagagagtgg agcccaagag ctgcgacaag 660

```

accacacact gccccccctg cccagccccc gaagctgcag gcggcccttc cgtgttccctg      720
ttccccccca agcccaagga caccctgatg atcagcagga cccccgaggt gacctgcgtg      780
gtggtggacg tgagccacga ggacccagag gtgaagttca actgggtacgt ggacggcgtg      840
gaggtgcaca acgccaagac caagcccaga gaggagcagt acaacagcac ctacagggtg      900
gtgtccgtgc tgaccgtgct gcaccaggac tggctgaacg gcaaagaata caagtgcaag      960
gtctccaaca aggccctgcc tgcccccatc gaaaagacca tcagcaaggc caagggccag     1020
ccacgggagc cccaggtgta caccctgccc ccttctcggg aggagatgac caagaaccag     1080
gtgtccctga cctgtctggt gaagggcttc taccccagcg acatcgccgt ggagtgggag     1140
agcaacggcc agcccgagaa caactacaag accaccccc cagtgtctgga cagcgacggc     1200
agcttcttcc tgtacagcaa gctgaccgtg gacaagagca ggtggcagca gggcaacgtg     1260
ttcagctgca gcggtgatgca cgaggccctg cacaaccact acaccagaa gagcctgagc     1320
ctgtcacccg gcaag                                           1335

```

<210> 167

<211> 1335

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> тяжелая цепь

<400> 167

```

caggtgcagc tgggtgcagag cggagctgag gtgaagaagc caggcgccag cgtcaagggtg      60
tcctgcaagg ccagcggcta caccctcacc agcagctaca tcaactgggt gcgccaggct     120
ccagggcagg gactggagtg gatgggccag atcaacgccg ccagcggcat gaccagatac     180
gcccagaagt tccagggcag agtcacaatg accagggaca cctctatcag caccgcctac     240
atggagctgt ccaggtgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc caggggcggc     300
tggttcgact actggggcca gggcaccttg gtgaccgtgt cctcagctag caccaagggc     360
cccagcgtgt tccccctggc cccagcagc aagagcaact ccggcggcac agccgccctg     420
ggctgcctgg tgaaggacta cttccccgag cccgtgaccg tgtcctggaa cagcggagcc     480
ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccgcc gtgctgcaga gcagcggcct gtacagcctg     540

```

tccagcgtgg tgacagtgcc cagcagcagc ctgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600
 aaccacaagc ccagcaacac caaggtggac aagagagtgg agcccaagag ctgcgacaag 660
 acccacacct gccccccctg cccagccccc gaagctgcag gcggcccttc cgtgttcctg 720
 ttcccccca agcccaagga caccctgatg atcagcagga ccccgaggt gacctgcgtg 780
 gtgggtggacg tgagccacga ggaccagag gtgaagttca actggtacgt ggacggcgtg 840
 gaggtgcaca acgccaagac caagcccaga gaggagcagt acaacagcac ctacagggtg 900
 gtgtccgtgc tgaccgtgct gcaccaggac tggctgaacg gcaaagaata caagtgcaag 960
 gtctccaaca aggcctgcc tgccccatc gaaaagacca tcagcaaggc caagggccag 1020
 ccacgggagc cccaggtgta caccctgccc ccttctcggg aggagatgac caagaaccag 1080
 gtgtccctga cctgtctggt gaagggttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
 agcaacggcc agcccgagaa caactacaag accaccccc cagtgtctgga cagcgacggc 1200
 agcttcttcc tgtacagcaa gctgaccgtg gacaagagca ggtggcagca gggcaacgtg 1260
 ttcagctgca gcgtgatgca cgaggccctg cacaaccact acaccagaa gagcctgagc 1320
 ctgtcaccgc gcaag 1335

<210> 168

<211> 1335

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> тяжелая цепь

<400> 168

caggtgcaat tgggttcagag cggcgcgga gtgaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg 60
 agctgcaaag cctccgata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc 120
 cctgggcagg gtctcgagt gatgggcaat attaatgctg ctgctggtat tactctttat 180
 gctcagaagt ttcagggctg ggtcaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat 240
 atggaactga gccgcctgcg tagcgatgat acggccgtgt attattgcgc gcgtgggtgt 300
 tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctcagctc caccaagggg 360
 ccacgggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggac agcggccctg 420

```

ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 480
ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggt gtctacagt cctcaggact ctactccctc 540
agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600
aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagagagttg agcccaaate ttgtgacaaa 660
actcacacat gcccaccgtg ccagcacct gaagcagcgg ggggaccgtc agtcttcctc 720
ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 780
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 840
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgggtg 900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 960
gtctccaaca aagccctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccattccggg aggagatgac caagaaccag 1080
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccgagc acatcgccgt ggagtgggag 1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
tccttcttcc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
ctgtctccgg gtaaa 1335

```

<210> 169

<211> 1335

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> тяжелая цепь

<400> 169

```

caggtgcaat tgggttcagag cggcgcgga gtgaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg 60
agctgcaaag cctccgata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc 120
cctgggcagg gtctcgagt gatgggcggg attaatcctc ctgctggtag tacttcttat 180
gtcagaagt ttcagggtcg ggtcaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat 240
atggaactga gccgcctgcg tagcgatgat acggccgtgt attattgcgc gcgtggtggt 300

```

tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacgggta gctcagcctc caccaagggt 360
 ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg 420
 ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 480
 ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccggc gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 540
 agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600
 aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagagagttg agcccaaata ttgtgacaaa 660
 actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaagcagcgg ggggaccgtc agtcttcctc 720
 tcccccccaa aacccaagga caccctcatg atctccccga cccctgaggt cacatgcgtg 780
 gtggtggacg tgagccacga agacctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 840
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgggtg 900
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag 960
 gtctccaaca aagccctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
 ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatccccggg aggagatgac caagaaccag 1080
 gtcagcctga cctgcctggc caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
 tcctttcttc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggtctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
 ctgtctccgg gtaaa 1335

<210> 170

<211> 1335

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> тяжелая цепь

<400> 170

caggtgcaat tgggtcagag cggcgcgga gtgaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg 60
 agctgcaaag cctccggata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc 120
 cctgggcagg gtctcgagt gatgggcaat attaatcctg ctactggtca tgctgattat 180

gctcagaagt ttcagggtcg ggtgaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat 240
 atggaactga gccgcctgcg tagcgatgat acggccgtgt attattgcgc gcgtggtggt 300
 tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctcagcctc caccaagggg 360
 ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg 420
 ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 480
 ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccggt gtctacagt cctcaggact ctactccctc 540
 agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600
 aatcacaagc ccagcaacac caagggtggac aagagagttg agcccaaata ttgtgacaaa 660
 actcacacat gccaccctg cccagcacct gaagcagcgg ggggaccgtc agtcttctc 720
 tccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg 780
 gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 840
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgggtg 900
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag 960
 gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
 ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccatcccggg aggagatgac caagaaccag 1080
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
 tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
 ctgtctccgg gtaaa 1335

<210> 171

<211> 651

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> легкая цель

<400> 171

cagagcgcgc tgaccagcc cgcagcgtg tccggcagcc caggccagtc tatcacaatc 60

```

agctgcaccg gcacctccag cgacgtgggc agctacaact acgtgaactg gtatcagcag 120
caccgccgga agggccccc aa gctgatgata tacggcgtga gcaagaggcc cagcggcgtg 180
tccaacaggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgacaat cagtgggctg 240
caggctgagg acgaggccga ctactactgc ggcacctttg ccggcggatc atactacggc 300
gtgttcggcg gagggaccaa gctgaccgtg ctgggccagc ctaaggctgc cccagcgtg 360
accctgttcc cccccagcag cgaggagctg caggccaaca aggccaccct ggtgtgcctg 420
atcagcgact tctaccagc gcgcgtgacc gtggcctgga aggccgacag cagccccgtg 480
aaggccggcg tggagaccac ccccccagc aagcagagca acaacaagta cgccgccagc 540
agctacctga gcctgacccc cgagcagtg aagagccaca ggtcctacag ctgccaggtg 600
accacgagg gcagcacctg ggaaaagacc gtggcccca cagagtgcag c 651

```

<210> 172

<211> 651

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> легкая цепь

<400> 172

```

cagagcgccc tgaccagcc cgccagcgtg tccggcagcc caggccagtc tatcacaatc 60
agctgcaccg gcacctccag cgacgtgggc agctacaact acgtgaactg gtatcagcag 120
caccgccgga agggccccc aa gctgatgata tacggcgtga gcaagaggcc cagcggcgtg 180
tccaacaggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgacaat cagtgggctg 240
caggctgagg acgaggccga ctactactgc ggcacctttg ccggcggatc atactacggc 300
gtgttcggcg gagggaccaa gctgaccgtg ctgggccagc ctaaggctgc cccagcgtg 360
accctgttcc cccccagcag cgaggagctg caggccaaca aggccaccct ggtgtgcctg 420
atcagcgact tctaccagc gcgcgtgacc gtggcctgga aggccgacag cagccccgtg 480
aaggccggcg tggagaccac ccccccagc aagcagagca acaacaagta cgccgccagc 540
agctacctga gcctgacccc cgagcagtg aagagccaca ggtcctacag ctgccaggtg 600
accacgagg gcagcacctg ggaaaagacc gtggcccca cagagtgcag c 651

```

<210> 173
 <211> 651
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> легкая цепь

<400> 173
 cagagcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
 tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag 120
 catccccgga aggcgccgaa acttatgatt tatggtgttt ctaagcgtcc ctcaggcgtg 180
 agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240
 caagcgggaag acgaagcggg ttattattgc ggtacttttg ctgggtggttc ttattatggt 300
 gtgtttggcg ggggcacgaa gtaaacgtc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc 360
 actctgttcc cggcctcctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 420
 ataagtgact tctaccggg agcctgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc 480
 aaggcgggag tggagaccac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc 540
 agctatctga gcctgacgc tgagcagtg aagtcacaca gaagctacag ctgccaggtc 600
 acgcatgaag ggagcacctg ggagaagaca gtggccccta cagaatgttc a 651

<210> 174
 <211> 651
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> легкая цепь

<400> 174
 cagagcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
 tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag 120
 catccccgga aggcgccgaa acttatgatt tatggtgttt ctaagcgtcc ctcaggcgtg 180
 agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240
 caagcgggaag acgaagcggg ttattattgc ggtacttttg ctgggtggttc ttattatggt 300

gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc 360
actctgttcc cgcctctctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 420
ataagtgact tctacccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc 480
aaggcgggag tggagaccac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc 540
agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc 600
acgcatgaag ggagcaccgt ggagaagaca gtggccccta cagaatgttc a 651

<210> 175

<211> 651

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> легкая цепь

<400> 175

cagagcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggc tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag 120
catccccgga aggcgcgcaa acttatgatt tatgggtgtt ctaagcgtcc cttaggcgtg 180
agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240
caagcgggaag acgaagcggg ttattattgc ggtacttttg ctggtgggtc ttattatggt 300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc 360
actctgttcc cgcctctctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 420
ataagtgact tctacccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc 480
aaggcgggag tggagaccac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc 540
agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc 600
acgcatgaag ggagcaccgt ggagaagaca gtggccccta cagaatgttc a 651

<210> 176

<211> 1323

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> тяжелая цепь

<400> 176

```

caggtgcagc tgggtgcagag cggagctgag gtgaagaagc caggcgccag cgtcaagggtg      60

tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc agcagctaca tcaactgggt ccgccaggct      120

cctgggcagg gactggagtg gatgggcacc atcaaccccg tgtccggcag caccagctac      180

gccagaagt tccagggcag agtcaccatg accagggaca ccagcatcag caccgcctac      240

atggagctgt ccaggctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc caggggcggc      300

tggttcgact actggggcca gggcaccctg gtgaccgtgt cctcagctag caccaagggc      360

cccagcgtgt tccccctggc cccctgcagc agaagcacca gcgagagcac agccgccttg      420

ggctgcctgg tgaaggacta cttccccgag ccagtgaccg tgtcctggaa cagcggagcc      480

ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccgcc gtgctgcaga gcagcggcct gtacagcctg      540

tccagcgtgg tgaccgtgcc cagcagcaac ttcggcaccc agacctacac ctgcaacgtg      600

gaccacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaccgtgg agaggaagtg ctgcgtggag      660

tgccccccct gccagcccc cccagtggcc ggaccctccg tgttcctggt ccccccaag      720

cccaaggaca cctgatgat cagcaggacc cccgaggtga cctgcgtggt ggtggacgtg      780

agccacgagg acccagaggt gcagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcacaac      840

gccaagacca agcccagaga ggaacagttt aacagcacct tcagggtggt gtccgtgctg      900

accgtggtgc accaggactg gctgaacggc aaagagtaca agtgcaaggc ctccaacaag      960

ggcctgccag ccccatcga gaaaaccatc agcaagacca agggccagcc acgggagccc     1020

caggtgtaca ccctgcccc cagccgggag gaaatgacca agaaccaggt gtccctgacc     1080

tgtctggtga agggcttcta cccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caacggccag     1140

cccgagaaca actacaagac ccccccccc atgctggaca gcgacggcag cttcttcttg     1200

tacagcaagc tgacagtgga caagagcagg tggcagcagg gcaacgtggt cagctgcagc     1260

gtgatgcacg aggccttgca caaccactac acccagaaga gcctgagcct gtccccgggc     1320

aag                                                                 1323

```

<210> 177

<211> 1323

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> тяжелая цепь

<400> 177

```

cagggtgcagc tgggtgcagag cggagctgag gtgaagaagc caggcgccag cgtcaagggtg      60

tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc agcagctaca tcaactgggt gcgccaggct      120

ccagggcagg gactggagtg gatggggccag atcaacgccg ccagcggcat gaccagatac      180

gcccagaagt tccagggcag agtcacaatg accagggaca cctctatcag caccgcctac      240

atggagctgt ccaggctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagggggcggc      300

tggttcgact actggggcca gggcaccttg gtgaccgtgt cctcagctag caccaagggc      360

cccagcgtgt tccccctggc cccctgcagc agaagcacca gcgagagcac agccgccttg      420

ggctgcctgg tgaaggacta cttccccgag ccagtgaccg tgtcctggaa cagcggagcc      480

ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccgcc gtgctgcaga gcagcggcct gtacagcctg      540

tccagcgtgg tgaccgtgcc cagcagcaac ttgggcaccc agacctacac ctgcaacgtg      600

gaccacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaccgtgg agaggaagtg ctgcgtggag      660

tgccccccct gccagcccc cccagtggcc ggacctccg tgttcctggt ccccccaag      720

cccaaggaca ccctgatgat cagcaggacc cccgaggtga cctgcgtggg ggtggacgtg      780

agccacgagg acccagaggt gcagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcacaac      840

gccaagacca agcccagaga ggaacagttt aacagcacct tcaggggtgg gtccgtgctg      900

accgtggtgc accaggactg gctgaacggc aaagagtaca agtgcaaggc ctccaacaag      960

ggcctgccag ccccatcga gaaaaccatc agcaagacca agggccagcc acgggagccc     1020

cagggtgtaca ccctgcccc cagccgggag gaaatgacca agaaccagggt gtccttgacc     1080

tgtctggtga agggcttcta cccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caacggccag     1140

cccgagaaca actacaagac ccccccccc atgctggaca gcgacggcag cttcttcttg     1200

tacagcaagc tgacagtgga caagagcagg tggcagcagg gcaacgtggt cagctgcagc     1260

gtgatgcacg aggccctgca caaccactac accagaaga gcctgagcct gtcccccggc     1320

aag                                                                 1323

```

<210> 178
 <211> 1323
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> тяжелая цепь

<400> 178
 caggtgcaat tgggttcagag cggcgcgga gtgaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg 60
 agctgcaaaag cctccggata tacctttact tcttcttata ttaattgggt cgcceaagcc 120
 cctgggcagg gtctcgagt gatgggcaat attaatgctg ctgctggtat tactctttat 180
 gctcagaagt ttcagggtcg ggtcaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat 240
 atggaactga gccgcctgcg tagcgatgat acggccgtgt attattgcgc gctgggtggt 300
 tggtttgatt attggggcca aggcacctg gtgacggtta gctcagcttc caccaagggc 360
 ccagcgtgt tccccctggc cccctgcagc agaagcacca gcgagagcac agccgccctg 420
 ggctgcctgg tgaaggacta cttccccgag cccgtgaccg tgagctggaa cagcggagcc 480
 ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccgcc gtgctgcaga gcagcggcct gtacagcctg 540
 agcagcgtgg tgaccgtgcc cagcagcaac ttcggcaccc agacctacac ctgcaacgtg 600
 gaccacaagc ccagcaacac caagggtggac aagaccgtgg agcggaagtg ctgcgtggag 660
 tgccccccct gccctgcccc tctgtggcc ggacctccg tgttctgtt ccccccaag 720
 cccaaggaca ccctgatgat cagccggacc cccgaggtga cctgcgtggt ggtggacgtg 780
 agccacgagg accccgaggt gcagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcacaac 840
 gccaagacca agccccggga ggaacagttc aacagcacct tccgggtggt gtccgtgctg 900
 accgtggtgc accaggactg gctgaacggc aaagaatata agtgcaaggt gtccaacaag 960
 ggctgcctg ccccatcga gaaaaccatc agcaagacaa agggccagcc cagggaaacc 1020
 caggtgtaca ccctgcccc cagccgggag gaaatgacca agaaccaggt gtccctgacc 1080
 tgtctggtga agggcttcta cccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caacggccag 1140
 cccgagaaca actacaagac ccccccccc atgctggaca gcgacggcag cttcttctg 1200
 tacagcaagc tgacagtgga caagagccgg tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc 1260

gtgatgcacg aggccctgca caaccactac acccagaaga gcctgagcct gtcccccggc 1320

aaa 1323

<210> 179

<211> 1323

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> тяжелая цепь

<400> 179

caggtgcaat tggttcagag cggcgcgga gtgaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg 60

agctgcaaag cctccggata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc 120

cctgggcagg gtctcgagt gatgggcggt attaatcctc ctgctggtac tacttcttat 180

gtcagaagt ttcagggtcg ggtcaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat 240

atggaactga gccgcctgcg tagcgatgat acggccgtgt attattgcgc gcgtgggtgg 300

tggtttgatt attggggcca aggcacctg gtgacggta gtcagcttc caccaagggc 360

cccagcgtgt tccccctggc cccctgcagc agaagcacca gcgagagcac agccgccttg 420

ggctgcctgg tgaaggacta ctccccgag cccgtgaccg tgagctggaa cagcggagcc 480

ctgaccagcg gcgtgcacac ctccccgoc gtgctgcaga gcagcggcct gtacagcctg 540

agcagcgtgg tgaccgtgcc cagcagcaac ttcggcaccc agacctaac ctgcaacgtg 600

gaccacaagc ccagcaacac caagggtggac aagaccgtgg agcggaaagt ctgcgtggag 660

tgccccccct gccctgcccc tctgtggcc ggacctccg tgttctgtt ccccccaag 720

cccaaggaca cctgatgat cagccggacc cccgaggtga cctgcgtggg ggtggacgtg 780

agccacgagg accccgaggt gcagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcacaac 840

gccaagacca agccccggga ggaacagttc aacagcacct tccgggtggg gtccgtgctg 900

accgtggtgc accaggactg gctgaacggc aaagaataca agtgcaagg gtccaacaag 960

ggcctgcctg ccccatcga gaaaaccatc agcaagacaa agggccagcc cagggaacct 1020

caggtgtaca cctgcccc cagccgggag gaaatgacca agaaccagg gtccctgacc 1080

tgtctggtga agggcttcta cccagcgcac atcgccgtgg agtgggagag caacggccag 1140

cccgagaaca actacaagac cccccccccc atgctggaca gcgacggcag cttcttctctg 1200
 tacagcaagc tgacagtggg caagagccgg tggcagcagg gcaacgtggt cagctgcagc 1260
 gtgatgcacg aggcacctgca caaccactac acccagaaga gcctgagcct gtcccccggc 1320
 aaa 1323

<210> 180
 <211> 1323
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> тяжелая цепь

<400> 180
 caggtgcaat tggttcagag cggcgcgga gtgaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg 60
 agctgcaaaag cctccggata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc 120
 cctgggcagg gtctcgagt gatgggcaat attaatacctg ctactgggtca tgctgattat 180
 gctcagaagt ttcagggtcg ggtgaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat 240
 atggaactga gccgcctgcg tagcgatgat acggccgtgt attattgcgc gcgtgggtgt 300
 tggtttgatt attggggcca aggcacctg gtgacggtta gctcagcttc caccaagggc 360
 cccagcgtgt tccccctggc cccctgcagc agaagcacca gcgagagcac agccgcctg 420
 ggctgcctgg tgaaggacta ctcccccgag cccgtgaccg tgagctggaa cagcggagcc 480
 ctgaccagcg gcgtgcacac ctcccccgcc gtgctgcaga gcagcggcct gtacagcctg 540
 agcagcgtgg tgaccgtgcc cagcagcaac ttcggcacc agacctacac ctgcaacgtg 600
 gaccacaagc ccagcaacac caagggtggac aagaccgtgg agcggaagtg ctgcgtggag 660
 tgccccccct gccctgcccc tcctgtggcc ggacctccg tgttctgtt ccccccaag 720
 cccaaggaca ccctgatgat cagccggacc cccgaggtga cctgcgtggg ggtggacgtg 780
 agccacgagg accccgaggt gcagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcacaac 840
 gccaaagacca agccccggga ggaacagttc aacagcacct tccgggtggg gtccgtgctg 900
 accgtgggtgc accaggactg gctgaacggc aaagaatata agtgcaagg gtccaacaag 960
 ggctgcctg ccccatcga gaaaaccatc agcaagacaa agggccagcc cagggaaccc 1020

```

caggtgtaca ccctgcccc cagccgggag gaaatgacca agaaccaggt gtccttgacc 1080
tgtctggtga agggcttcta ccccgagcag atcgccgtgg agtgggagag caacggccag 1140
cccgagaaca actacaagac ccccccccc atgctggaca gcgacggcag cttcttctg 1200
tacagcaagc tgacagtgga caagagccgg tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc 1260
gtgatgcacg aggccttgca caaccactac acccagaaga gcctgagcct gtcccccggc 1320
aaa 1323

```

```

<210> 181
<211> 512
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 181

```

```

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

```

```

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

```

```

Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg
          35           40           45

```

```

Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg
          50           55           60

```

```

Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp
65           70           75           80

```

```

Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn
          85           90           95

```

```

Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
          100          105          110

```

```

Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
          115          120          125

```

Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
 130 135 140

Pro Ile Gly Gly Leu Ser Leu Ile Val Leu Leu Ala Phe Trp Met Tyr
 145 150 155 160

Arg His Arg Lys Pro Pro Tyr Gly His Val Asp Ile His Glu Asp Pro
 165 170 175

Gly Pro Pro Pro Pro Ser Pro Leu Val Gly Leu Lys Pro Leu Gln Leu
 180 185 190

Leu Glu Ile Lys Ala Arg Gly Arg Phe Gly Cys Val Trp Lys Ala Gln
 195 200 205

Leu Met Asn Asp Phe Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Leu Gln Asp Lys
 210 215 220

Gln Ser Trp Gln Ser Glu Arg Glu Ile Phe Ser Thr Pro Gly Met Lys
 225 230 235 240

His Glu Asn Leu Leu Gln Phe Ile Ala Ala Glu Lys Arg Gly Ser Asn
 245 250 255

Leu Glu Val Glu Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Asp Lys Gly Ser
 260 265 270

Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Gly Asn Ile Ile Thr Trp Asn Glu Leu Cys
 275 280 285

His Val Ala Glu Thr Met Ser Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asp
 290 295 300

Val Pro Trp Cys Arg Gly Glu Gly His Lys Pro Ser Ile Ala His Arg
 305 310 315 320

Asp Phe Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Leu Thr Ala Val
 325 330 335

027071

Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys Pro Pro
340 345 350

Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu
355 360 365

Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg Ile
370 375 380

Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Val Ser Arg Cys
385 390 395 400

Lys Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu Glu
405 410 415

Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Glu Leu Gln Glu Val Val Val
420 425 430

His Lys Lys Met Arg Pro Thr Ile Lys Asp His Trp Leu Lys His Pro
435 440 445

Gly Leu Ala Gln Leu Cys Val Thr Ile Glu Ala Cys Trp Asp His Asp
450 455 460

Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Glu Glu Arg Val Ser Leu
465 470 475 480

Ile Arg Arg Ser Val Asn Gly Thr Thr Ser Asp Cys Leu Val Ser Leu
485 490 495

Val Thr Ser Val Thr Asn Val Asp Leu Pro Pro Lys Glu Ser Ser Ile
500 505 510

<210> 182

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 182

027071

Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala
1 5 10 15

Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu
20 25 30

Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser
35 40 45

Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe
50 55 60

Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln
65 70 75 80

Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr
85 90 95

His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro
100 105 110

Thr Ala Pro Thr
115

<210> 183
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 183

Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Ser Trp Leu Asp Asp Phe Asn Ser
1 5 10 15

<210> 184
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 184

Val Lys Lys Gly Ser Trp Leu Asp Asp Phe Asn Ser Tyr Asp Arg
1 5 10 15

<210> 185
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 185

Gly Ser Trp Leu Asp Asp Phe Asn Ser Tyr Asp Arg Gln Glu Ser
 1 5 10 15

<210> 186
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 186

Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys
 1 5

<210> 187
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 187

Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp
 1 5 10 15

<210> 188
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 188

Trp Leu Asp Asp Phe Asn
 1 5

<210> 189
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 189

Glu Gln Asp Lys Arg
1 5

<210> 190
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 190

Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr
1 5 10

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело к ActRIIB или его функциональный фрагмент, содержащие:

(a) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9; CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23; CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37; CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 51; CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 65; и CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 79, или

(b) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10; CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24; CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38; CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52; CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 66; и CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 80.

2. Антитело к ActRIIB или его функциональный фрагмент по п.1, содержащие:

(a) последовательность варибельной области легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 93, и последовательность варибельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 107, или

(b) последовательность варибельной области легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 94, и последовательность варибельной области тяжелой цепи, последовательность которой представлена в SEQ ID NO: 108.

3. Антитело к ActRIIB или его функциональный фрагмент по п.1 или 2, содержащие:

(a) последовательность тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 146, и последовательность легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 141;

(b) последовательность тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 147, и последовательность легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 142.

4. Антитело к ActRIIB по одному из предыдущих пунктов, где антитело относится к IgG1-изотипу.

5. Антитело к ActRIIB по одному из предыдущих пунктов, которое имеет измененную в результате мутации Fc-области эффекторную функцию, где указанная измененная эффекторная функция представляет собой "отключенную" активность антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

6. Выделенная полинуклеотидная последовательность, кодирующая антитело или его функциональный фрагмент по п.1, содержащая:

(a) нуклеотидные последовательности, содержащие SEQ ID NO: 121 и 135, кодирующие варибельные домены легкой и тяжелой цепи, или

(b) нуклеотидные последовательности, содержащие SEQ ID NO: 122 и 136, кодирующие варибельные домены легкой и тяжелой цепи, или

(c) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 161 или 162, кодирующую легкую цепь, или

(d) нуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 166 или 167, кодирующую тяжелую цепь.

7. Клонировующий или экспрессионный вектор, содержащий одну или более выделенных полинуклеотидных последовательностей по п.6.

8. Вектор по п.7, где указанный вектор содержит нуклеотидные последовательности по п.6 или их фрагмент, кодирующий по меньшей мере один участок CDR.

9. Выделенная клетка-хозяин, продуцирующая антитело по любому из пп.1-5, где указанная клетка-хозяин содержит один или более векторов по п.7 или 8.

10. Способ получения антитела или его функционального фрагмента по любому из пп.1-5, содержащий культивирование клетки-хозяина по п.9 и выделение указанного антитела или его функционального фрагмента.

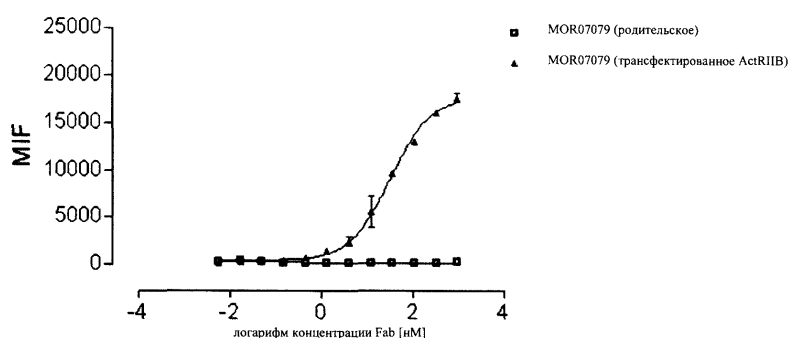
11. Фармацевтическая композиция для лечения мышечно-скелетного заболевания или нарушения, содержащая антитело или его функциональный фрагмент по любому из пп.1-5.

12. Фармацевтическая композиция по п.11, содержащая также фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

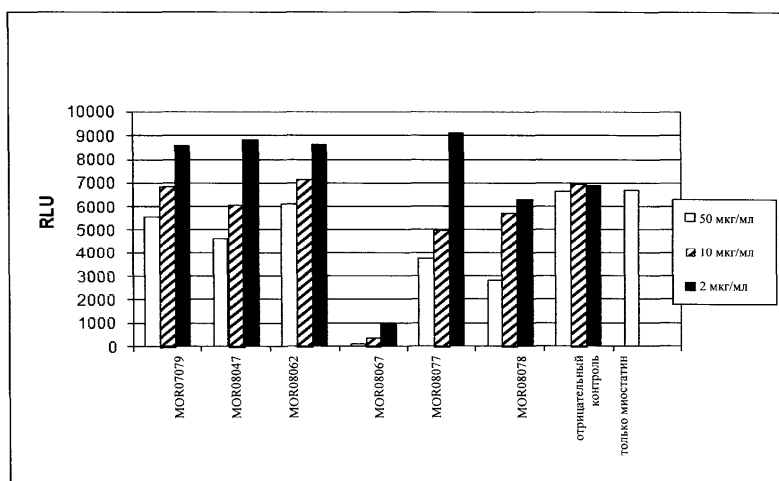
13. Фармацевтическая композиция по п.11 или 12, содержащая также одно или более дополнительных действующих веществ, в которой указанное дополнительное действующее вещество выбрано из IGF-1, IGF-2 или вариантов IGF-1 или IGF-2, антитела к миостатину, пропептида миостатина, белка, "улавливающего" миостатина, который связывается с ActRIIB, но не активирует его, агониста бета 2, агониста грелина, SARM, агонистов/миметиков GH или фоллистатина.

14. Антитело по п.1, кодируемое плазмидным вектором pBW522 (DSM22873) или pBW524 (DSM22874).

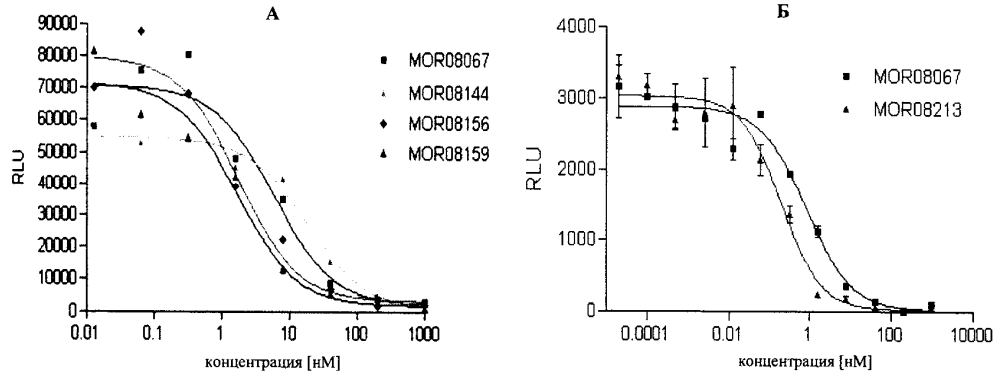
15. Антитело к ActRIIB по п.1, содержащее (а) последовательность вариабельной области легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 93, и (b) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, состоящую из аминокислот 1-115, содержащихся в последовательности тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 146.



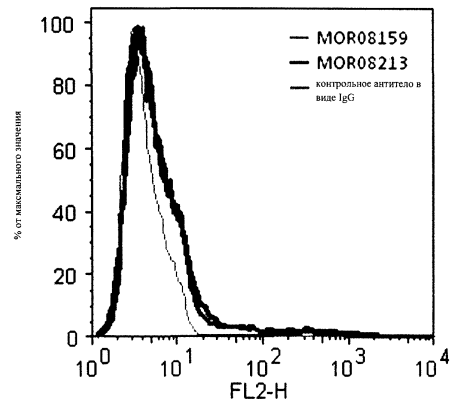
Фиг. 1



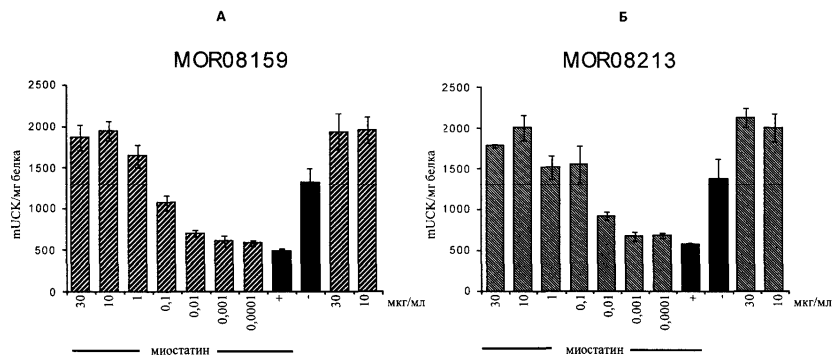
Фиг. 2



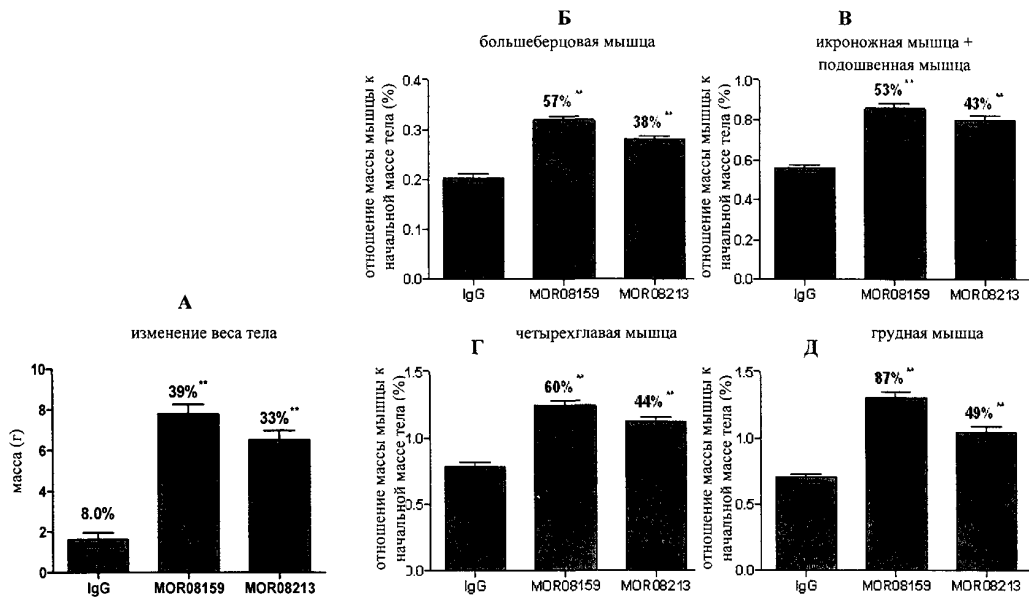
Фиг. 3



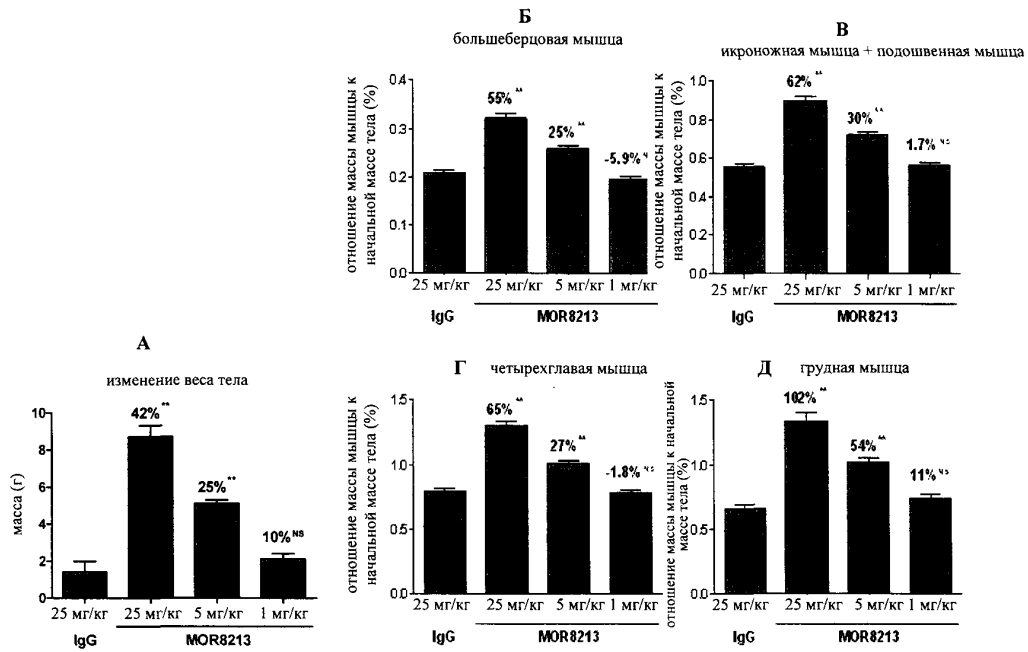
Фиг. 4



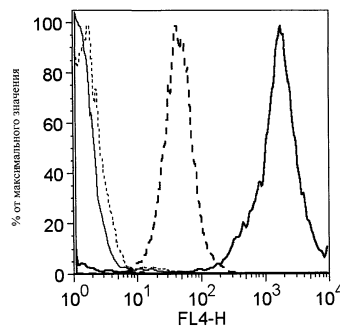
Фиг. 5



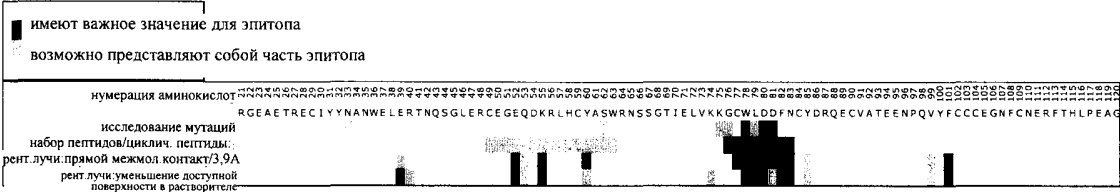
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

