



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012126098, 24.11.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
24.11.2010Дата регистрации:
03.08.2017

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
24.11.2009 US 61/263,865

(43) Дата публикации заявки: 27.12.2013 Бюл. № 36

(45) Опубликовано: 03.08.2017 Бюл. № 22

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 25.06.2012(86) Заявка РСТ:
CA 2010/001882 (24.11.2010)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2011/063523 (03.06.2011)Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ТРЕМБЛЭ Жилье Бернар (CA),
ФИЛИОН Марио (CA),
СУЛЕА Трейен (CA)

(73) Патентообладатель(и):

АЛЕТИА БАЙОТЕРАПЬЮТИКС ИНК.
(CA),
НЭШНЛ РИСЕРЧ КАУНСЛ ОФ
КАНАДА (CA)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2007/030930 A1, 22.03.2007. US
2007/003547 A1, 04.01.2007. SAFFER H. et al.
"Clusterin expression in malignant lymphomas:
a survey of 266 cases." Modern pathology, 2002,
15(11): 1221-1226. LENFERINK A.E.G. et al.,
"Transcriptome profiling of a TGF- β -induced
epithelial-to-mesenchymal transition reveals
extracellular clusterin as a target for (см.
прод.)(54) АНТИКЛАСТЕРИНОВЫЕ АНТИТЕЛА И АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ ФРАГМЕНТЫ И ИХ
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ УМЕНЬШЕНИЯ ОБЪЕМА НОВООБРАЗОВАНИЙ

(57) Реферат:

Данное изобретение относится к иммунологии. Предложено антитело, связывающее кластерин, и его антигенсвязывающий фрагмент. Описаны нуклеиновые кислоты, кодирующие вариабельные области антитела, экспрессионный вектор; клетка; набор и способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Также описана фармацевтическая композиция для снижения роста злокачественной клетки или снижения объема опухолевых клеток; комбинация для лечения рака, содержащая фармацевтическую композицию и химиотерапевтическое средство; способ снижения роста злокачественной клетки

или снижения объема опухолевых клеток; способ лечения карциномы; набор для применения в лечении или детектировании злокачественной опухоли; применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента для уменьшения объема опухоли. Антитело по настоящему изобретению является гуманизированной формой мышиного антитела 16B5 и обладает примерно равной с ним аффинностью связывания с кластерином. Данное изобретение может найти дальнейшее применение в терапии заболеваний, ассоциированных с кластерином. 14 н. и 14 з.п. ф-лы, 16 ил., 1 табл., 6 пр.

(56) (продолжение):

therapeutic antibodies", Oncogene, 2010, published online 23.11.2009, 29(6), 831-844. CHOWDHURY PS, VASMATZIS G. "Engineering scFvs for improved stability". Methods Mol Biol, 2003; 207, стр.241-247. WO 2009/093246 A2, 30.07.2009. МОЙСЕЕНКО В.М. "Моноклональные антитела в лечении злокачественных опухолей", Практическая онкология, 2003, Т. 4, 3:148-156.

R U 2 6 2 7 1 6 3 C 2

R U 2 6 2 7 1 6 3 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)*C12N 15/13* (2006.01)*C12N 5/10* (2006.01)*C12N 15/63* (2006.01)*A61K 39/395* (2006.01)*A61P 35/00* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2012126098, 24.11.2010**(24) Effective date for property rights:
24.11.2010Registration date:
03.08.2017

Priority:

(30) Convention priority:
24.11.2009 US 61/263,865(43) Application published: **27.12.2013** Bull. № 36(45) Date of publication: **03.08.2017** Bull. № 22(85) Commencement of national phase: **25.06.2012**(86) PCT application:
CA 2010/001882 (24.11.2010)(87) PCT publication:
WO 2011/063523 (03.06.2011)Mail address:
**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, stroenie 3,
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**TREMBLE Zhill Bernar (CA),
FILION Mario (CA),
SULEA Trejen (CA)**

(73) Proprietor(s):

**ALETIA BAJOTERAPYUTIKS INK. (CA),
NESHNL RISERCH KAUNSL OF KANADA
(CA)**(54) **ANTI-CLUSTERIN ANTIBODIES AND ANTIGEN-BINDING FRAGMENTS AND THEIR USE FOR TUMOURS VOLUME REDUCTION**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: clusterin-binding antibody and an antigen-binding fragment thereof are proposed. Nucleic acids encoding variable regions of antibodies, an expression vector; a cell; a kit and a method for production of an antibody or an antigen-binding fragment thereof are described. Also a pharmaceutical composition for cancer cell growth reduction or tumour cells volume reduction; combination for cancer treatment, and a pharmaceutical composition comprising a chemotherapeutic agent; a method for cancer cell

growth reduction or tumour cells volume reduction; a method for carcinomas treatment; kit for application in cancer treatment or detection; use of an antibody or an antigen-binding fragment thereof for tumour volume reduction. The invention may find further application for treatment of diseases associated with clusterin.

EFFECT: antibody of the present invention is a humanized form of murine antibody 16B5 and has an approximately equal binding affinity for clusterin.

28 cl, 16 dwg, 1 tbl, 6 ex

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Изобретение относится к анти-кластериновым антителам и к их использованию для уменьшения объема новообразований. Более конкретно, изобретение относится к гуманизированным антителам, гибридным антителам и антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с кластерином и их использованию для уменьшения объема опухоли, для ингибирования роста опухоли и метастазов.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Наиболее частые злокачественные образования у людей - карциномы - происходят из эпителиальных клеток. Прогрессирование эпителиального рака начинается с разрушения межклеточных контактов и приобретения миграционного фенотипа (мезенхимального типа). Этот феномен, называемый эпителиально-мезенхимальным переходом (ЭМП), считается ключевым на поздних стадиях прогрессирования опухоли и метастазирования.

Секретируемый белок TGF- β (трансформирующий фактор роста) вначале подавляет выраженный рост опухоли вследствие его ингибирующего действия на клетки эпителиального происхождения, а на поздних стадиях ускоряет прогрессирование опухоли и метастазирование. Один из механизмов, по которому TGF- β может стимулировать прогрессирование опухоли - индукция ЭМП.

Вследствие двойной роли TGF- β в развитии рака, использование прямых ингибиторов TGF- β может быть рискованным, поскольку, хотя они могут оказывать благоприятное действие на поздних стадиях опухолей, но, в то же время, они могут способствовать развитию предраковых поражений. Более подходящим был бы препарат, который ингибирует про-онкогенное ЭМП-стимулирующее действие TGF- β , но не ингибирует супрессивное воздействие на рост опухоли, оказываемое TGF- β . Чтобы разработать такой ингибитор, необходимо определить точку, при которой происходит раздвоение сигнального пути TGF- β , в одной ветви которого медиаторы участвуют в ЭМП-ответе, но не участвуют в ингибировании роста опухоли, оказываемом TGF- β . Лекарственные препараты, ингибирующие медиаторы, которые действуют исключительно в ветви ЭМП-ответа TGF- β сигнального пути, будут уменьшать метастазирование, не способствуя образованию предраковых поражений.

До настоящего времени не было выявлено специфических компонентов TGF- β сигнального пути, ускоряющих или опосредующих ЭМП-действие TGF- β , которые бы не участвовали в ингибировании роста, оказываемом TGF- β .

Наоборот, был установлен эндогенный белок (ядерный фактор YY1), который способен воздействовать (обратно ускорению) на онкогенное действие ЭМП, оказываемое TGF- β , не затрагивая подавление опухоли (ингибирование роста) (Kurisaki et al., 2004).

Известны ингибиторы, направленные на лиганды TGF- β , его рецепторы и сигнальные белки Smad. Растворимые эктодомены рецепторов, антитела и иные связывающие белки способны оказывать антагонистическое воздействие при взаимодействии с лигандами TGF- β и их секвестировании из рецепторов, расположенных на поверхности клеток. Известны небольшие молекулы, которые ингибируют киназную активность TGF- β рецептора I типа, а также эндогенные ингибиторы сигнальных белков Smad. Поскольку все эти компоненты сигнального пути вовлечены как в прокарциногенное так и в антикарциногенное воздействия TGF- β , эти ингибиторы могут оказывать благоприятное влияние при новообразованиях поздних стадий, но, в то же время, могут способствовать образованию предраковых поражений.

В международной патентной заявке PCT/CA2006/001505, поданной 13 сентября 2006

и опубликованной 22 марта 2007 WO2007/030930, описаны анти-кластериновые антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые направлены против специфического эпитопа кластерина и способные ингибировать эпителиально-мезенхимальный переход клеток карциномы. В данной патентной заявке более конкретно описана способность анти-кластериновых антител ингибировать ЭМП карциномы предстательной железы и карциномы молочной железы.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится, в одном аспекте, к антителу, способному к специфическому связыванию с кластерином и содержащему гуманизированный переменный регион легкой цепи и/или гуманизированный переменный регион тяжелой цепи.

Более конкретно, настоящее изобретение предоставляет гуманизированные антитела нечеловеческого происхождения, способные специфически связываться с кластерином, а также гибридные антитела и антигенсвязывающий фрагмент.

Гуманизированные или гибридные антитела по настоящему изобретению включают переменный регион легкой цепи и переменный регион тяжелой цепи, которые могут содержать нечеловеческие аминокислотные последовательности области, определяющей комплементарность и человеческие аминокислотные последовательности каркасной области натурального человеческого антитела.

Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающему фрагменту, который включает переменный регион легкой цепи и переменный регион тяжелой цепи, которые могут содержать нечеловеческие аминокислотные последовательности области, определяющей комплементарность и человеческие аминокислотные последовательности каркасной области.

Антитела и антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут использоваться для ингибирования эпителиально-мезенхимального перехода, индуцируемого кластерином.

В ином аспекте настоящее изобретение относится к анти-кластериновому антителу (поликлональному антителу, моноклональному антителу, химерному антителу, гуманизированному антителу, изолированному человеческому антителу, гибриднему антителу или их фрагменту), используемому для уменьшения объема опухоли и к способам его получения.

Также настоящее изобретение охватывает изолированные нуклеиновые кислоты, кодирующие переменный регион легкой цепи и/или переменный регион тяжелой цепи гуманизированного антитела, гибридного антитела или антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе или изолированного антитела, описанного в данном документе.

Также изобретение охватывает вектор или конструкцию, содержащую нуклеиновую кислоту, описанную в данном документе. В соответствии с данным изобретением, вектор может являться, к примеру, но не ограничиваясь перечисленным, вектором экспрессии млекопитающего, бактериальным вектором экспрессии и т. д.

Изобретение также относится к клеткам, содержащим или экспрессирующим антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно данному изобретению или содержащим нуклеиновые кислоты или векторы согласно данному изобретению.

В еще одном аспекте настоящее изобретение предоставляет набор, включающий флакон или флаконы, которые могут содержать, к примеру, гуманизированное антитело, описанное в данном документе, гибридное антитело, описанное в данном документе, антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, изолированное

антитело, описанное в данном документе, изолированную нуклеиновую кислоту, описанную в данном документе, либо вектор, описанный в данном документе.

В ином аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, которая может содержать, к примеру, гуманизированное антитело, описанное в данном документе, гибридное антитело, описанное в данном документе, антигенсвязывающий регион, описанный в данном документе, изолированное антитело, описанное в данном документе и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом аспекте, изобретение относится к комбинированной терапии, включающей фармацевтическую композицию, описанную в данном документе и химиотерапевтический препарат.

Помимо этого, изобретение охватывает способы получения гуманизированных или гибридных анти-кластериновых антител или антигенсвязывающих фрагментов, а также способы лечения болезней, ассоциированных с экспрессией или секрецией кластерина при помощи гуманизированных или гибридных анти-кластериновых антител или антигенсвязывающих фрагментов.

Охват, применимость и преимущества настоящего изобретения следуют из нелимитирующего детального описания, приведенного ниже. Необходимо понимать, что данное детальное описание, показывая приблизительные воплощения изобретения, приведено лишь в качестве примера, со ссылкой на сопутствующие фигуры.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фигура 1. Гомологическая 3D-модель вариабельного региона мышинового анти-кластеринового антитела 16B5. Помечены определяющие комплементарность области (L1, L2, L3 в легкой цепи, H1, H2, H3 в тяжелой цепи). Мышинные каркасные остатки, замещенные на человеческие каркасные остатки, показаны в виде сферических моделей.

Фигура 2. Выравнивание последовательности мышинового 16B5, гуманизированного 16B5 и выбранной каркасной человеческой области (с указанными ссылками на базу данных NCBI). Нумерация Kabat обозначена сверху. Выделены области, определяющие комплементарность. Остатки, представляющие интерес для обратных мутаций выделены ниже выравнивания последовательности в соответствии с близостью к определяющим комплементарность областям (5: в пределах 5 ангстрем), нахождением на поверхности (В: скрытые) и контактом с парными вариабельными регионами.

Фигура 3. Кинетический анализ мышинных антител 16B5 и гуманизированных анти-кластериновых антител.

Фигура 4. Блокирование h16B5 миграции раковых клеточных линий. В анализе способом царапины на клетках мышинной карциномы молочной железы h16B5 обладает, по меньшей мере, такой же активностью, что и мышинный 16B6. На фигуре ниже показана способность антител в различных конфигурациях блокировать миграцию клеток *in vitro*.

Фигура 5. Уменьшение инвазивности клеток рака предстательной железы человека при ингибировании, оказываемом h16B5. Нижняя часть 12-луночных планшетов была покрыта 200 мкл матригеля, обедненного факторами роста (Becton Dickinson). Клетки ($2,5 \times 10^4$) были ресуспендированы в 200 мкл матригеля, помещенного сверху, затем сверху матригеля добавили 500 мкл питательной среды для роста клеток. В каждый слой матригеля и в среду добавили h16B5 в концентрации 8 мкг/мл. Планшеты были инкубированы при 37°C в течение 3 недель, питательную среду (+/- h16B5) обновляли еженедельно. Стрелками показаны области роста клеток эпителиального типа.

Фигура 6. Уменьшение роста опухолей и увеличение их чувствительности к химиотерапии при обработке опухолей предстательной железы антителами h16B5.

Клетки рака предстательной железы DU145 (2×10^6) были имплантированы подкожно мышам с ТКИН, опухоли выращивали до достижения объема, равного, примерно, 100 мм³. Размеры опухолей измеряли два раза в неделю при помощи цифрового штангенциркуля, объемы опухолей рассчитывали по формуле $L \times W \times H$

(длина×ширина×высота). В каждой группе было по 8 животных, проходивших рандомизацию до начала процедур. Результаты выражались в мм³ ± стандартная погрешность средней величины. р-величины определялись по t-тесту Стьюдента.

Фигура 7. Гомологическая 3D-модель варибельного регионамышинного анти-кластеринового антитела 21B12. Помечены определяющие комплементарность области (L1, L2, L3 в легкой цепи, H1, H2, H3 в тяжелой цепи). Мышиные каркасные остатки, замещенные на человеческие каркасные остатки, показаны в виде сферических моделей.

Фигура 8. Выравнивание последовательности мышинного 16B5, гуманизированного 21B12 и выбранной каркасной человеческой области (с указанными ссылками на базу данных NCBI). Нумерация Kabat обозначена сверху. Выделены области, определяющие комплементарность. Остатки, представляющие интерес для обратных мутаций выделены ниже выравнивания последовательности в соответствии с близостью к определяющим комплементарность областям (5: в пределах 5 ангстрем), нахождением на поверхности (В: скрытые) и контактом с парными варибельными фрагментами.

Фигура 9. Кинетический анализ мышинных антител 21B12 и гуманизированных анти-кластериновых антител.

Фигура 10. Ингибирование, оказываемое h16B5 на рост опухолей предстательной железы РС-3. Клетки рака предстательной железы ЗС-3 (2×10^6) были имплантированы подкожно мышам с ТКИН, опухоли выращивали до достижения объема, равного, примерно, 100 мм³. Размеры опухолей измеряли два раза в неделю при помощи цифрового штангенциркуля, объемы опухолей рассчитывали по формуле $L \times W \times H$ (длина×ширина×высота). В каждой группе было по 8 животных, проходивших рандомизацию до начала процедур. Результаты выражались в мм³ ± стандартная погрешность средней величины.

Фигура 11. Экспрессия кластерина опухолями поджелудочной железы человека. У мышей с ТКИН были выращены опухоли, происходящие из клеточных линий рака поджелудочной железы (как показано), далее они были отобраны, зафиксированы в формалине, были изготовлены срезы, которые изучались иммуногистохимическим способом с использованием h16B5. Положительное окрашивание было визуализировано стандартными способами с использованием вторичного антитела, конъюгированного с пероксидазой хрена. В аналогичных условиях проводились эксперименты отрицательного контроля с использованием контролируемых по изотипу антител.

Фигура 12. Блокирование h16B5 миграции клеточных линий рака поджелудочной железы. Клетки PANC-1 были высеяны на среду без сыворотки в верхнюю камеру 24-луночного планшета Transwell, содержащую барьер матригеля. Нижние лунки были заполнены средой, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки в качестве хемоаттрактанта. После 24-часовой инкубации в присутствии и отсутствии TGFβ и/или h16B5 (как указано), клетки в слое матригеля были окрашены и подсчитаны.

Фигура 13. Поглощение раковыми клетками секретируемого кластерина. Рекомбинантный человеческий кластерин экспрессировался в клетках 293-6Е, очищался и помечался Alexa Fluor 488 при помощи доступного в продаже набора для внедрения меток (Invitrogen). Клетки мышинной карциномы молочной железы BRI-JM01 были высеяны на покровные стекла и обработаны 250 нг/мл меченного секретируемого

кластерина. С установленными временными интервалами, клетки промывались ледяным фосфатно-солевым буферным раствором и фиксировались в 2% параформальдегиде. Стекла устанавливали на Antifade Gold, делали снимки флуоресцентным микроскопом.

Фигура 14. Ингибирование интернализации секретируемого кластерина раковыми клетками при помощи H16B5. Эксперимент проводился так, как описано в подписи к фигуре 13. H16B5 добавлялся в концентрации 10 мкг/мл.

Фигура 15. Показана область гомологии человеческого кластерина (NP_001822) и мышинового кластерина (NP_038520).

Фигура 16. Показано связывание h16B5 (помеченного *AB-16B5* на фигуре) с мышинным кластерином, экспрессированным в зафиксированных замороженных срезах, полученных из опухолей молочной железы мыши 4T1. Эксперимент проводился с использованием иммуногистохимического способа, детектирование осуществлялось с использованием конъюгированного с пероксидазой хрена вторичного антитела.

ДЕТАЛЬНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится в одном аспекте к антителам, способным к специфическому связыванию с кластерином и содержащим гуманизированный переменный регион легкой цепи и/или гуманизированный переменный регион тяжелой цепи.

Последовательность человеческого кластерина доступна по номеру доступа RefSeq; NM_001831.2 (ID белка=NP_001822), последовательность мышинового кластерина доступна по номеру доступа RefSeq; NM_013492.2 (ID белка = NP_038520).

Антитела или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут быть способны к связыванию с мышиной и/или человеческой формой кластерина. Антитела или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению может, также, быть способен связываться с природным вариантом и синтетическими вариантами кластерина, имеющими, по меньшей мере, 75% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%) идентичность в аминокислотной последовательности с человеческим или мышинным кластерином.

Настоящее изобретение предоставляет гуманизированные антитела нечеловеческого происхождения, способные специфически связываться с кластерином или его антигенсвязывающим фрагментом, а также гибридные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты.

В соответствии с воплощением изобретения, гуманизированное или гибридное антитело может ингибировать (понижать) рост опухолевой клетки, экспрессирующей или секретирующей кластерин.

В соответствии с последующим воплощением изобретения, гуманизированное или гибридное антитело может уменьшать объем опухоли, содержащей клетки, экспрессирующие или секретирующие кластерин.

В соответствии с иным воплощением изобретения, гуманизированное или гибридное антитело может ингибировать (понижать) миграцию или инвазию опухолевых клеток, экспрессирующих или секретирующих кластерин.

В соответствии с еще одним воплощением изобретения, гуманизированное или гибридное антитело может ингибировать (понижать) метастазирование опухолевых клеток, экспрессирующих или секретирующих кластерин.

В ином аспекте, настоящее изобретение относится к способу уменьшения объема опухоли, содержащей кластерин-экспрессирующие клетки, который может включать введение анти-кластеринового антитела (поликлонального антитела, моноклонального антитела, химерного антитела, гуманизированного антитела, изолированного

человеческого антитела, гибридного антитела или его фрагмента) млекопитающему, испытывающему в этом необходимость. Более конкретно, способ включает введение химерных, гуманизированных или гибридных антител.

В одном воплощении гибридное антитело или его фрагмент могут содержать, к примеру, переменный регион легкой цепи гуманизированного антитела и переменный регион тяжелой цепи гуманизированного антитела.

В ином воплощении гибридное антитело или его фрагмент могут содержать, к примеру, переменный регион легкой цепи нечеловеческого антитела и переменный регион тяжелой цепи гуманизированного антитела.

Термин «антитело» относится к интактному антителу, моноклональному, (полностью или частично) гуманизированному, гибриднему, химерному или поликлональному антителу, а также к изолированным человеческим антителам. Термин «антитело», также, охватывает мультиспецифические антитела, например, биспецифические.

Человеческие антитела, как правило, состоят из двух легких и двух тяжелых цепей, каждая из которых содержит переменные и постоянные участки. Переменный участок легкой цепи содержит 3 области, определяющих комплементарность (CDR), обозначенных в данном документе как CDRL1, CDRL2 и CDRL3, фланкированных каркасными областями. Переменный участок тяжелой цепи содержит 3 области, определяющих комплементарность (CDR), обозначенных в данном документе как CDRH1, CDRH2 и CDRH3, фланкированных каркасными областями.

Термин «гуманизированное антитело» относится к антителу, содержащему от одной до шести областей, определяющих комплементарность, включающих нечеловеческие аминокислотные последовательности областей, определяющих комплементарность и у которых значительная часть каркасных областей тяжелой и/или легкой цепей соответствует человеческим антителам. В некоторых случаях, каркасные области тяжелой и/или легкой цепей гуманизированных антител полностью идентичны с областями антител, закодированных в человеческом спектре антител (натуральных природных антител). В иных случаях, каркасные области тяжелой и/или легкой цепей гуманизированных антител могут содержать от одной до тридцати аминокислот гуманизируемого нечеловеческого антитела, с остальной частью последовательности, происходящей от натурального человеческого антитела. В других случаях, гуманизированное антитело может содержать от 1 до 6 полностью нечеловеческих областей, определяющих комплементарность областей, часто шесть определяющих комплементарность областей полностью происходят от нечеловеческих антител. В иных случаях «гуманизированное антитело» может содержать постоянную область человеческого или иного (например, от млекопитающего) происхождения.

Термин «гибридное антитело» относится к антителу, в котором одна из переменных областей тяжелой или легкой цепей (тяжелая или легкая цепь) гуманизирована или происходит от натурального природного антитела (имеющего аффинность к кластерину), а другой переменный регион тяжелой или легкой цепи (тяжелая или легкая цепь) остается нечеловеческим.

Термин «химерное антитело» относится к антителу с нечеловеческими переменными областями и человеческой постоянной областью.

Термин «натуральное человеческое антитело» относится к антителу, закодированному в человеческом спектре антител, например, в последовательности антител эмбрионального типа.

При использовании в данном документе, изолированное человеческое антитело «происходит из» конкретной зародышевой последовательности, если антитело получено

из системы с использованием человеческих последовательностей иммуноглобулинов, например, путем иммунизации трансгенных мышей, несущих человеческие гены иммуноглобулинов или путем скрининга библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов. Изолированное человеческое антитело, «происходящее из» последовательности человеческого зародышевого иммуноглобулина, может быть идентифицировано путем сравнения аминокислотной последовательности человеческого антитела с аминокислотной последовательностью человеческих зародышевых иммуноглобулинов. Выбранное человеческое антитело, как правило, по меньшей мере, на 90% идентично по аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, кодируемой геном зародышевого иммуноглобулина и содержит аминокислотные остатки, которые идентифицируют антитело как человеческое при сравнении с аминокислотными последовательностями зародышевых иммуноглобулинов иных видов (например, мышинными зародышевыми последовательностями). В определенных случаях аминокислотная последовательность человеческого антитела может быть, по меньшей мере, на 95% или даже, по меньшей мере, на 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, кодируемой геном зародышевого иммуноглобулина. Как правило, у человеческого антитела, происходящего от конкретной человеческой зародышевой последовательности, будет не более 10 аминокислотных отличий от аминокислотной последовательности, кодируемой человеческим геном зародышевого иммуноглобулина. В некоторых случаях, у человеческого антитела, происходящего от конкретной человеческой зародышевой последовательности, может быть не более 4, 3, 2, 1 аминокислотных отличия от аминокислотной последовательности, кодируемой геном зародышевого иммуноглобулина.

Термин «антигенсвязывающий фрагмент», при использовании в данном документе, относится к одному и более фрагментов антитела, сохраняющих способность связываться с антигеном. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами неизмененного антитела. Примерами связывающих фрагментов, охватываемых термином «антигенсвязывающий фрагмент» антитела служат: (i) фрагмент Fab - моновалентный фрагмент, состоящий из фрагментов V_L , V_H , C_L и C_{H1} ; (ii) фрагмент $F(ab')_2$ - бивалентный фрагмент, включающий два фрагмента Fab, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из фрагментов V_H и C_{H1} ; (iv) фрагмент Fv, состоящий из фрагментов V_L и V_H единой спейсерной группы антитела, а также (v) фрагмент dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), состоящий из фрагмента V_H . Далее, хотя два домена фрагмента Fv, V_L и V_H , кодируются различными генами, они могут быть соединены, при помощи рекомбинантных способов, синтетическим сшивающим агентом, благодаря чему они могут быть получены в виде единой полипептидной цепочки, в которой области V_L и V_H спарены с образованием моновалентных молекул (известны как одинарные цепи Fv (scFv); см., например, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; а также Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Подобные антитела с одинарной цепью также охватываются термином «антигенсвязывающий фрагмент антитела». Далее, антигенсвязывающие фрагменты включают иммуноглобулиновые слитые белки фрагментов связывания, содержащие (i) полипептид фрагмента связывания (например, переменный регион тяжелой цепи, переменный регион легкой цепи, переменный регион тяжелой цепи, слитую с переменной областью легкой цепи через сшивающий

пептид), слитый с полипептидом шарнирной области иммуноглобулина, (ii) константную область тяжелой цепи иммуноглобулина CH2, слитую с шарнирной областью, (iii) константную область тяжелой цепи иммуноглобулина CH3, слитую с константной областью CH2. Шарнирная область может быть модифицирована путем замены одного и более цистеиновых остатков на сериновые остатки, чтобы предотвратить димеризацию. Подобные слитые белки связывающих фрагментов иммуноглобулинов описаны в патентных заявках США US 2003/0118592 и US 2003/0133939. Эти фрагменты антител были получены по обычным методикам, известным в отрасли, фрагменты были проверены на пригодность аналогично целым антителам.

Антигенсвязывающий сайт, обычно, состоит из переменных регионов, образованных при спаривании легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина. Структура переменных областей антител весьма постоянна и сходна. Данные переменные области, как правило, состоят из относительно гомологичных каркасных областей (FR), перемежающихся гиперпеременными областями, называемыми областями, определяющими комплементарность (CDR). Совокупная связывающая активность антигенсвязывающего фрагмента часто определяется последовательностью области, определяющей комплементарность. Однако, зачастую каркасные области необходимы для правильного расположения и упорядочивания в пространстве областей, определяющих комплементарность, чтобы обеспечить наилучшее связывание антигена.

Гуманизированное или гибридное антитело по настоящему изобретению может включать переменный регион тяжелой цепи, который может содержать нечеловеческие аминокислотные последовательности области, определяющей комплементарность и человеческие аминокислотные последовательности каркасной области натурального человеческого антитела и комплементарную легкую цепь.

Гуманизированное или гибридное антитело по настоящему изобретению может включать переменный регион легкой цепи, который может содержать нечеловеческие аминокислотные последовательности области, определяющей комплементарность и человеческие аминокислотные последовательности каркасной области натурального человеческого антитела и комплементарную тяжелую цепь.

Гуманизированное или гибридное антитело по настоящему изобретению могут ингибировать метастазирование, миграцию или инвазию опухолевых клеток или ингибировать рост кластерин-экспрессирующих, включая, к примеру, клетки карциномы. Заявителем было сделано неожиданное открытие, заключающееся в том, что анти-кластериновые антитела, включая гуманизированные или гибридные антитела по настоящему изобретению, уменьшают объем опухоли *in vivo*. Альтернативно, гуманизированное или гибридное антитело по настоящему изобретению может использоваться для выявления кластерин-экспрессирующих клеток.

Натуральное человеческое антитело, выбранное для гуманизирования нечеловеческого родительского антитела, может содержать переменный участок, содержащий трехмерную структуру, сходную (совпадающую) с (моделированным) переменным участком нечеловеческого родительского антитела. Таким образом, у гуманизированного или гибридного антитела есть больше шансов иметь трехмерную структуру, аналогичную нечеловеческому родительскому антителу.

Гуманизированное антитело по настоящему изобретению имеет высокую аффинность к кластерину. Было показано, что гуманизированное антитело связывается с рекомбинантным мономерным кластерином с аффинностью $4,49 \times 10^{-9} \text{ M} \pm 8,5 \times 10^{-10}$ и больше.

В соответствии с настоящим изобретением, человеческие аминокислотные

последовательности легкой цепи гуманизированного или гибридного антитела происходят из каркасной области легкой цепи натурального человеческого антитела. Каркасная область легкой цепи натурального человеческого антитела, выбранного для гуманизирования, может обладать, к примеру, по меньшей мере, 70%-й

5 идентичностью с каркасной областью легкой цепи нечеловеческого родительского антитела. Предпочтительно, чтобы натуральное человеческое антитело, выбранное для гуманизирования, имело такое же или практически такое же число аминокислот в определяющем комплементарность фрагменте легкой цепи, что и у определяющего комплементарность фрагмента легкой цепи нечеловеческого родительского антитела.

10 В иных воплощениях изобретения человеческие аминокислотные последовательности легкой цепи гуманизированного или гибридного антитела происходят из каркасной области легкой цепи натурального человеческого антитела, обладающей, по меньшей мере, 75, 80, 83% идентичностью (и более) с каркасной областью легкой цепи нечеловеческого родительского антитела.

15 Также, в соответствии с настоящим изобретением, аминокислотные остатки человеческой каркасной области тяжелой цепи гуманизированного или гибридного антитела происходят из каркасной области тяжелой цепи натурального человеческого антитела, обладающей, по меньшей мере, 70% идентичностью с каркасной областью тяжелой цепи нечеловеческого родительского антитела. Предпочтительно, чтобы
20 натуральное человеческое антитело, выбранное для гуманизирования, имело такое же или практически такое же число аминокислот в определяющем комплементарность фрагменте тяжелой цепи, что и у определяющего комплементарность фрагмента тяжелой цепи нечеловеческого родительского антитела.

В иных воплощениях изобретения аминокислотные остатки человеческой каркасной
25 области тяжелой цепи гуманизированного или гибридного антитела происходят из каркасной области тяжелой цепи натурального человеческого антитела, обладающей, по меньшей мере, 73, 75, 80% идентичностью с каркасной областью тяжелой цепи нечеловеческого родительского антитела.

В одном воплощении изобретения вариабельный участок тяжелой цепи
30 гуманизированного или гибридного антитела может содержать, по меньшей мере, один нечеловеческий определяющий комплементарность регион.

Альтернативно, в иных воплощениях изобретения вариабельный участок тяжелой цепи гуманизированного или гибридного антитела может содержать, по меньшей мере, два или даже три нечеловеческих определяющих комплементарность регионов.

35 В дополнительном воплощении изобретения вариабельный участок легкой цепи может содержать, по меньшей мере, один нечеловеческий определяющий комплементарность регион.

Альтернативно, в дополнительных воплощениях изобретения вариабельный участок легкой цепи может содержать, по меньшей мере, два или даже три нечеловеческих
40 определяющих комплементарность регионов.

Гуманизированное антитело может, предпочтительно, содержать все шесть определяющих комплементарность регионов нечеловеческого антитела. В случае двухвалентного гуманизированного антитела, все двенадцать определяющих комплементарность регионов могут происходить из нечеловеческого антитела.

45 Кластерин-экспрессирующие клетки, которые могут выявляться гуманизированными или гибридными антителами, включают клетки карциномы. Гуманизированные или гибридные антитела также могут использоваться для ингибирования роста клеток кластерин-экспрессирующей карциномы и, особенно, клеток человеческой карциномы.

Было показано, что кластерин секретируют или экспрессируют несколько типов человеческих клеток карциномы, среди которых: клетки эндометриальной карциномы, карциномы молочной железы, печеночно-клеточной карциномы, карциномы предстательной железы, почечно-клеточной карциномы, карциномы яичника, колоректального рака, карциномы поджелудочной железы и т. д.

Примеры воплощений изобретения включают, к примеру, гуманизированное или гибридное антитело, содержащее аминокислотные остатки каркасной области тяжелой цепи натурального человеческого антитела, как описано в данном документе и определяющую комплементарность область тяжелой цепи (CDRH), выбранную из группы, состоящей из: CDRH1, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:1, CDRH2, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:2 и CDRH3, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:3 и их комбинаций с определяющей комплементарность областью тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из CDRH1, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:11, CDRH2, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:12 и CDRH3, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:13 и их комбинаций.

В ином приблизительном воплощении изобретения гуманизированное или гибридное антитело может содержать аминокислотные остатки каркасной области тяжелой цепи натурального человеческого антитела, как описано в данном документе и, по меньшей мере, две определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH), выбранные из группы, состоящей из: CDRH1, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:1, CDRH2, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:2 и CDRH3, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:3 или, по меньшей мере, две определяющие комплементарность области тяжелой цепи, выбранные из группы, состоящей из CDRH1, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:11, CDRH2, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:12 и CDRH3, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:13 и их комбинаций.

Альтернативно, в другом приблизительном воплощении изобретения гуманизированное или гибридное антитело согласно данному изобретению, может содержать аминокислотные остатки каркасной области тяжелой цепи натурального человеческого антитела, как описано в данном документе и CDRH1, обладающую аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:1, CDRH2, обладающую аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:2 и CDRH3, обладающую аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:3 или CDRH1, обладающую аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:11, CDRH2, обладающую аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:12 и CDRH3, обладающую аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:13.

В более специфическом воплощении изобретения гуманизированное или гибридное антитело (или любой антигенсвязывающий фрагмент, полученный из них), может включать переменный регион легкой цепи, содержащий SEQ ID NO.:26 (h16B5 VL consensus1):

DIVMXQSPXSLAVSXGEXXTXXCKSSQSLLNSRTRKKNYLAWYQQKPGQXP~~KLLI~~YWASTRESGVPDRFXGSGSGTDFLT~~LT~~ISSXQAEDXAVYYCKQSYNLWTFGXG~~TK~~LEXK; причем, по меньшей мере, одна из аминокислот, обозначенных буквой X, заменена в сравнении с соответствующей аминокислотой полипептидного набора SEQ ID NO.:25 (мышинный 16B5 VL). Аминокислотная замена может быть консервативной или неконсервативной.

В соответствии с изобретением, аминокислотная замена может быть консервативной.

Гуманизированное или гибридное антитело (или любой антигенсвязывающий фрагмент, полученный из них) может включать вариабельный регион легкой цепи, содержащий SEQ ID NO.:27 (16B5 VL consensus2):

5 ~~IMMQPRLASCEX_{a1}XX_{a2}KS_{a3}LNIRKNLAWQKQ_{a4}KLWAS_{a5}DR_{a6}CT_{a7}HS_{a8}Q_{a9}DA_{a10}CK_{a11}NWIC_{a12}SK_{a13}~~

Где X_{a1} может являться нейтральной гидрофильной аминокислотой, например, Т или S;

Где X_{a2} может являться, например, D или S;

10 Где X_{a3} может являться гидрофобной аминокислотой, например, L или A;

Где X_{a4} может являться основной аминокислотой, например, R или K;

Где X_{a5} может являться гидрофобной аминокислотой, например, A или V;

Где X_{a6} может являться гидрофобной аминокислотой, например, I или M;

15 Где X_{a7} может являться, например, N или S;

Где X_{a8} может являться, например, P или S;

Где X_{a9} может являться нейтральной гидрофильной аминокислотой, например, S или Т;

Где X_{a10} может являться гидрофобной аминокислотой, например, L или V;

20 Где X_{a11} может являться гидрофобной аминокислотой, например, V или L;

Где X_{a12} может являться, например, Q или G;

Где X_{a13} может являться, например, I или F; и

25 где вариабельный участок легкой цепи может содержать, по меньшей мере, одну аминокислотную замену в сравнении с SEQ ID NO.:25.

Гуманизированное или гибридное антитело (или любой антигенсвязывающий фрагмент, полученный из них) может включать вариабельный регион легкой цепи, содержащий SEQ ID NO.:28 (16B5 VL consensus3):

30 ~~IMMQPRLASCEX_{a1}XX_{a2}KS_{a3}LNIRKNLAWQKQ_{a4}KLWAS_{a5}DR_{a6}CT_{a7}HS_{a8}Q_{a9}DA_{a10}CK_{a11}NWIC_{a12}SK_{a13}~~

Где X_{a1} может являться, например, Т или S;

Где X_{a2} может являться, например, D или S;

Где X_{a3} может являться, например, L или A;

Где X_{a4} может являться, например, R или K;

35 Где X_{a5} может являться, например, A или V;

Где X_{a6} может являться, например, I или M;

Где X_{a7} может являться, например, N или S;

Где X_{a8} может являться, например, P или S;

40 Где X_{a9} может являться, например, S или Т;

Где X_{a10} может являться, например, L или V;

Где X_{a11} может являться, например, V или L;

Где X_{a12} может являться, например, Q или G;

45 Где X_{a13} может являться, например, I или F; и

где вариабельный участок легкой цепи может содержать, по меньшей мере, одну аминокислотную замену в сравнении с SEQ ID NO.:25.

В ином, более специфическом воплощении изобретения, гуманизированное или

гибридное антитело (или любой антигенсвязывающий фрагмент, полученный из них), может включать вариабельный регион тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO.:30 (16B5 VH consensus1);

XVQLXQSGAEXXKPGAXVXXSCXXSGFNKDLYMHVWVXQXPXXGLEWXGRIDPAYGNTKYDPKFGX
 5 XTITADTSXXTAYXXLSSLXSEDTAVYYCARRYDTAMDYWGQGTXTVTVSS;

причем, по меньшей мере, одна из аминокислот, обозначенных буквой X, заменена в сравнении с соответствующей аминокислотой полипептидного набора SEQ ID NO.: 29 (мышинный 16B5 VH). Аминокислотная замена может быть консервативной или неконсервативной. В соответствии с изобретением аминокислотная замена может быть
 10 консервативной.

Гуманизированное или гибридное антитело (или любой антигенсвязывающий фрагмент, полученный из них) может включать вариабельный регион тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO.:31 (16B5 VH consensus2);

~~XVQLXQSGAEXXKPGAXVXXSCXXSGFNKDLYMHVWVXQXPXXGLEWXGRIDPAYGNTKYDPKFGX~~
 15 ~~XTITADTSXXTAYXXLSSLXSEDTAVYYCARRYDTAMDYWGQGTXTVTVSS~~

Где X_{b1} может являться, например, Q или E;

Где X_{b2} может являться, например, V или Q;

Где X_{b3} может являться гидрофобной аминокислотой, например, V или L;

Где X_{b4} может являться, например, K или V;

Где X_{b5} может являться нейтральной гидрофильной аминокислотой, например, T
 20 или S;

Где X_{b6} может являться основной аминокислотой, например, K или R;

Где X_{b7} может являться гидрофобной аминокислотой, например, I или L;

Где X_{b8} может являться, например, K или T;

Где X_{b9} может являться, например, V или T;

Где X_{b10} может являться основной аминокислотой, например, Q или K;

Где X_{b11} может являться, например, A или R;

Где X_{b12} может являться, например, G или E;

Где X_{b13} может являться основной аминокислотой, например, K или Q;

Где X_{b14} может являться гидрофобной аминокислотой, например, M или I;

Где X_{b15} может являться основной аминокислотой, например, R или K;

Где X_{b16} может являться гидрофобной аминокислотой, например, V или A;

Где X_{b17} может являться нейтральной гидрофильной аминокислотой, например, T
 35 или S;

Где X_{b18} может являться, например, D или N;

Где X_{b19} может являться гидрофобной аминокислотой, например, M или L;

Где X_{b20} может являться, например, E или Q;

Где X_{b21} может являться, например, R или T;

Где X_{b22} может являться, например, L или S; и

где вариабельный участок тяжелой цепи может содержать, по меньшей мере, одну
 45 аминокислотную замену в сравнении с SEQ ID NO.:29.

Гуманизированное или гибридное антитело (или любой антигенсвязывающий фрагмент, полученный из них) может включать вариабельный регион тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO.:32 (16B5 VH consensus3);

~~QDSEAMCAWSSXSNIMWQRAEVRPCKIKQGLASAYMSSEAYCARDMDWGQVNS~~

Где X_{b1} может являться, например, Q или E;

Где X_{b2} может являться, например, V или Q;

5 Где X_{b3} может являться, например, V или L;

Где X_{b4} может являться, например, K или V;

Где X_{b5} может являться, например, T или S;

Где X_{b6} может являться, например, K или R;

10 Где X_{b7} может являться, например, I или L;

Где X_{b8} может являться, например, K или T;

Где X_{b9} может являться, например, V или T;

Где X_{b10} может являться, например, Q или K;

15 Где X_{b11} может являться, например, A или R;

Где X_{b12} может являться, например, G или E;

Где X_{b13} может являться, например, K или Q;

Где X_{b14} может являться, например, M или I;

Где X_{b15} может являться, например, R или K;

20 Где X_{b16} может являться, например, V или A;

Где X_{b17} может являться, например, T или S;

Где X_{b18} может являться, например, D или N;

Где X_{b19} может являться, например, M или L;

25 Где X_{b20} может являться, например, E или Q;

Где X_{b21} может являться, например, R или T;

Где X_{b22} может являться, например, L или S; и

30 где вариабельный участок тяжелой цепи может содержать, по меньшей мере, одну аминокислотную замену в сравнении с SEQ ID NO.:29.

В дополнительном специфическом воплощении изобретения гуманизированное или гибридное антитело (или любой антигенсвязывающий фрагмент, полученный из них), может включать вариабельный регион легкой цепи, содержащий SEQ ID NO.:34 (21B12 VL consensus1):

35 ~~DIVMX_cQSPXSLAVSXGEXXTXXCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQXPGQXPKLLIYWASTRESG~~
~~VPDRFXGSGSGTDFTLTISSXXAEDXAVYYCQQYYIYPRTFGXGTKLEIK;~~

причем, по меньшей мере, одна из аминокислот, обозначенных буквой X, заменена в сравнении с соответствующей аминокислотой полипептидного набора SEQ ID NO.: 33 (мышинный 21B12 VL). Аминокислотная замена может быть консервативной или
 40 неконсервативной. В соответствии с изобретением аминокислотная замена может быть консервативной.

Гуманизированное или гибридное антитело (или любой антигенсвязывающий фрагмент, полученный из них) может включать вариабельный регион легкой цепи, содержащий SEQ ID NO.:35 (21B12 VL consensus2):

45 ~~IMQPSLASGEXXKSSQSLNQNLAWQKQKILWASREPRXKSTNLSX_cAD_cAYCQYMRFXSKK~~

Где X_{c1} может являться нейтральной гидрофильной аминокислотой, например, T или S;

Где X_{c2} может являться, например, D или S;

Где X_{c3} может являться гидрофобной аминокислотой, например, L или V;

Где X_{c4} может являться основной аминокислотой, например, R или K;

5 Где X_{c5} может являться гидрофобной аминокислотой, например, A или V;

Где X_{c6} может являться гидрофобной аминокислотой, например, I или M;

Где X_{c7} может являться, например, N или S;

Где X_{c8} может являться основной аминокислотой, например, K или R;

10 Где X_{c9} может являться, например, P или S;

Где X_{c10} может являться нейтральной гидрофильной аминокислотой, например, S или T;

Где X_{c11} может являться гидрофобной аминокислотой, например, L или V;

Где X_{c12} может являться основной аминокислотой, например, Q или K;

15 Где X_{c13} может являться гидрофобной аминокислотой, например, V или L;

Где X_{c14} может являться, например, Q или G; и

где вариабельный участок легкой цепи может содержать, по меньшей мере, одну аминокислотную замену в сравнении с SEQ ID NO.:33.

20 Гуманизированное или гибридное антитело (или любой антигенсвязывающий фрагмент, полученный из них) может включать вариабельный регион легкой цепи, содержащий SEQ ID NO.:36 (21B12 VL consensus3):

~~IMQELASGEXXKXKSLNQLAMQKQKILWARSFPRKSKTNSXNDXAYCQMPKXSKK~~

Где X_{c1} может являться, например, T или S;

25 Где X_{c2} может являться, например, D или S;

Где X_{c3} может являться, например, L или V;

Где X_{c4} может являться, например, R или K;

Где X_{c5} может являться, например, A или V;

30 Где X_{c6} может являться, например, I или M;

Где X_{c7} может являться, например, N или S;

Где X_{c8} может являться, например, K или R;

Где X_{c9} может являться, например, P или S;

35 Где X_{c10} может являться, например, S или T;

Где X_{c11} может являться, например, L или V;

Где X_{c12} может являться, например, Q или K;

Где X_{c13} может являться, например, V или L;

40 Где X_{c14} может являться, например, Q или G; и

где вариабельный участок легкой цепи может содержать, по меньшей мере, одну аминокислотную замену в сравнении с SEQ ID NO.:33.

В следующем приблизительном воплощении изобретения гуманизированное или гибридное антитело (или любой антигенсвязывающий фрагмент, полученный из них),
45 может включать вариабельный регион тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO.:38 (21B12 VH consensus1);

~~QXQIVQSGXELKKPGXXVKXSCKASGYTFINYGMHWVXQAPGXGLXWMGWINTYTGEPTYADDFKGR~~
~~FXFSLXTSXSTAYLQIXXLKXEDTAXYXCARDGFLYFFDYWGQGTXXTVSS;~~

причем, по меньшей мере, одна из аминокислот, обозначенных буквой X, заменена в сравнении с соответствующей аминокислотой полипептидного набора SEQ ID NO.: 37 (мышинный 21B12 VH). Аминокислотная замена может быть консервативной или неконсервативной. В соответствии с изобретением аминокислотная замена может быть

Гуманизированное или гибридное антитело (или любой антигенсвязывающий фрагмент, полученный из них) может включать вариабельный регион тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO.:39 (21B12 VH consensus2);

~~QDSSHHKQWKKSKAGTNCNHWQDGLWMQWTEHADGKHSYSSAQMKLDAWADQYHWGQSTYS~~

Где X_{d1} может являться гидрофобной аминокислотой, например, V или I;

Где X_{d2} может являться, например, S или P;

Где X_{d3} может являться, например, A или E;

Где X_{d4} может являться нейтральной гидрофильной аминокислотой, например, S

или T;

Где X_{d5} может являться гидрофобной аминокислотой, например, V или I;

Где X_{d6} может являться основной аминокислотой, например, R или K;

Где X_{d7} может являться основной аминокислотой, например, Q или K;

Где X_{d8} может являться, например, E или K;

Где X_{d9} может являться гидрофобной аминокислотой, например, V или A;

Где X_{d10} может являться кислой аминокислотой, например, D или E;

Где X_{d11} может являться гидрофобной аминокислотой, например, V или A;

Где X_{d12} может являться, например, S или N;

Где X_{d13} может являться, например, S или N;

Где X_{d14} может являться, например, A или N;

Где X_{d15} может являться, например, V или T;

Где X_{d16} может являться ароматической аминокислотой, например, Y или F;

Где X_{d17} может являться, например, L или T;

Где X_{d18} может являться гидрофобной аминокислотой, например, V или L; и

где вариабельный участок тяжелой цепи может содержать, по меньшей мере, одну аминокислотную замену в сравнении с SEQ ID NO.:37.

Гуманизированное или гибридное антитело (или любой антигенсвязывающий фрагмент, полученный из них) может включать вариабельный регион тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO.:40 (21B12 VH consensus3):

~~QDSSHHKQWKKSKAGTNCNHWQDGLWMQWTEHADGKHSYSSAQMKLDAWADQYHWGQSTYS~~

Где X_{d1} может являться, например, V или I;

Где X_{d2} может являться, например, S или P;

Где X_{d3} может являться, например, A или E;

Где X_{d4} может являться, например, S или T;

Где X_{d5} может являться, например, V или I;

Где X_{d6} может являться, например, R или K;

Где X_{d7} может являться, например, Q или K;

Где X_{d8} может являться, например, E или K;

Где X_{d9} может являться, например, V или A;

Где X_{d10} может являться, например, D или E;

Где X_{d11} может являться, например, V или A;

5 Где X_{d12} может являться, например, S или N;

Где X_{d13} может являться, например, S или N;

Где X_{d14} может являться, например, A или N;

Где X_{d15} может являться, например, V или T;

10 Где X_{d16} может являться, например, Y или F;

Где X_{d17} может являться, например, L или T;

Где X_{d18} может являться, например, V или L; и

где вариабельный участок тяжелой цепи может содержать, по меньшей мере, одну аминокислотную замену в сравнении с SEQ ID NO.:37.

15 В более специфическом воплощении, гуманизированное или гибридное антитело может содержать вариабельный участок тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO.:7 или SEQ ID NO.:17.

В еще более специфическом воплощении, изобретение включает гуманизированное или гибридное антитело, которое может содержать тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO.:9 или SEQ ID NO.:19.

В гуманизированном или гибридном антителе по данному изобретению может присутствовать тяжелая цепь или вариабельный регион тяжелой цепи, определенные в данном документе и комплементарная легкая цепь или вариабельный регион легкой цепи.

25 С другой стороны, в гуманизированном или гибридном антителе по данному изобретению может присутствовать легкая цепь или вариабельный регион легкой цепи, определенные в данном документе и комплементарная тяжелая цепь или вариабельный регион тяжелой цепи.

Гуманизированное или гибридное антитело согласно настоящему изобретению 30 может содержать аминокислотные остатки каркасной области легкой цепи натурального человеческого антитела, как описано в данном документе и определяющую комплементарность область легкой цепи, выбранную, например, из группы, состоящей из: CDRL1, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:4, CDRL2, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:5 и CDRL3, обладающей 35 аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:6 или определяющую комплементарность область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из CDRL1, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:14, CDRL2, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:15 и CDRL3, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:16 и их комбинаций.

40 В следующем воплощении гуманизированное или гибридное антитело может содержать аминокислотные остатки каркасной области легкой цепи натурального человеческого антитела, как описано в данном документе и, по меньшей мере, две определяющие комплементарность области легкой цепи (CDRL), выбранные из группы, состоящей из: CDRL1, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.: 4, CDRL2, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:5 и CDRL3, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:6 или, по меньшей 45 мере, две определяющие комплементарность области тяжелой цепи, выбранные из группы, состоящей из CDRL1, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ

ID NO.:14, CDRL2, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:15 и CDRL3, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:16 и их комбинаций.

В еще одном воплощении гуманизированное или гибридное антитело может
5 содержать аминокислотные остатки каркасной области легкой цепи натурального человеческого антитела, как описано в данном документе и CDRL1, обладающую аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:4, CDRL2, обладающую аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:5 и CDRL3, обладающую аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:6 или CDRL1, обладающую
10 аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:14, CDRL2, обладающую аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:15 и CDRL3, обладающую аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:16 и их комбинации.

В более частном воплощении, гуманизированное или гибридное антитело может содержать переменный участок легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO.:8
15 или SEQ ID NO.:18.

В еще более частном воплощении, гуманизированное или гибридное антитело согласно изобретению, может содержать переменный участок легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO.:10 или SEQ ID NO.:20.

Иные специфические воплощения изобретения охватывают гуманизированное
20 антитело, содержащее переменный участок тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO.:7 или SEQ ID NO.:17 и переменный участок легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO.:8 или SEQ ID NO.:18.

Дополнительное специфическое воплощение изобретения охватывает гуманизированное антитело, содержащее тяжелую цепь с последовательностью SEQ
25 ID NO.:9 и легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO.:10.

Дополнительное специфическое воплощение изобретения охватывает гуманизированное антитело, содержащее тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO.:19 и легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO.:20.

Настоящее изобретение относится, в следующем аспекте, к антителу или его
30 антигенсвязывающему фрагменту, способным к специфическому связыванию с кластерином, которые могут быть выбраны из группы, состоящей из:

антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, имеющего переменный регион легкой цепи, по меньшей мере, на 80% идентичный (например, на 85%, 90%, 95%, 99%)
35 последовательности SEQ ID NO.:25 и/или переменный регион тяжелой цепи, по меньшей мере, на 80% идентичный (например, на 85%, 90%, 95%, 99%)

последовательности SEQ ID NO.:29, причем в антителе или антигенсвязывающем
фрагменте может присутствовать, например, по меньшей мере, одна аминокислотная замена в сравнении с SEQ ID NO.:25 или SEQ ID NO.:29 и аминокислотная замена может
быть, например, вне области, определяющей комплементарность (CDR); и

40 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, имеющего переменный регион легкой цепи, по меньшей мере, на 80% идентичный (например, на 85%, 90%, 95%, 99%) последовательности SEQ ID NO.:33 и/или переменный регион тяжелой цепи, по меньшей мере, на 80% идентичный (например, на 85%, 90%, 95%, 99%) последовательности SEQ ID NO.:37, причем в антителе или антигенсвязывающем
45 фрагменте может присутствовать, по меньшей мере, одна аминокислотная замена в сравнении с SEQ ID NO.:33 или SEQ ID NO.:37 и аминокислотная замена может быть, например, вне области, определяющей комплементарность (CDR).

В соответствии с настоящим изобретением, по меньшей мере, одна аминокислотная

замена может присутствовать, например, в вариабельном регионе легкой цепи.

В соответствии с настоящим изобретением, по меньшей мере, одна аминокислотная замена может присутствовать, например, в вариабельном регионе тяжелой цепи.

Аминокислотная замена может быть консервативной или неконсервативной. В более специфическом воплощении аминокислотная замена может быть консервативной.

В соответствии с воплощением изобретения антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению, связываются с человеческим кластерином. В соответствии с другим воплощением изобретения антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению, связываются с мышинным кластерином.

Антитела и антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут также связываться с природным или синтетическим вариантом мышинового или человеческого кластерина. Подобный вариант может, к примеру, обладать аминокислотной последовательностью, по меньшей мере, на 75% идентичной последовательности человеческого или мышинового кластерина.

Определяющие комплементарность регионы (CDR) SEQ ID NO.:29 (идентичные SEQ ID NO. 30, 31, 32 и 7) были идентифицированы при помощи определений Kabat и Chothia. Соответствующие последовательности определяющих комплементарность регионов идентифицированы следующим образом: CDR1 вариабельного региона тяжелой цепи соответствует SEQ ID NO.:1, CDR2 вариабельного региона тяжелой цепи соответствует SEQ ID NO.:2, а CDR3 вариабельного региона тяжелой цепи соответствует SEQ ID NO.:3.

Более короткие версии SEQ ID NO.:1, 2 и 3 были представлены в международной заявке PCT/CA2006/001505, поданной 13 сентября 2006 (т.е., 1505 заявка) и опубликованной WO2007/030930. В данной патентной заявке определяющие комплементарность регионы последовательности SEQ ID NO.:29 (соответствует SEQ ID NO.:23 в заявке '1505) были идентифицированы при помощи поискового ПО IMGT/V, реализующего определения IMGT. Соответствующие последовательности идентифицированы следующим образом: CDR1 вариабельного региона тяжелой цепи соответствует SEQ ID NO.:44, CDR2 вариабельного региона тяжелой цепи соответствует SEQ ID NO.:45, а CDR3 вариабельного региона тяжелой цепи соответствует SEQ ID NO.:46.

При использовании в данном документе, термин «аминокислотная замена ... снаружи определяющего комплементарность региона (CDR)» по отношению к SEQ ID NO.:29, в общем, относится к аминокислотам, окружающим (расположенным снаружи) SEQ ID NO.:1, 2 и 3. В некоторых воплощениях данный термин, альтернативно, может относиться к аминокислотам, окружающим (расположенным снаружи) SEQ ID NO.:44, 45 и 46.

Определяющие комплементарность регионы (CDR) SEQ ID NO.:25 (идентичные SEQ ID NO. 26, 27, 28 и 8), были идентифицированы при помощи определений Kabat и Chothia. Соответствующие последовательности определяющих комплементарность регионов идентифицированы следующим образом: CDR1 вариабельного региона легкой цепи соответствует SEQ ID NO.:4, CDR2 вариабельного региона легкой цепи соответствует SEQ ID NO.:5, а CDR3 вариабельного региона легкой цепи соответствует SEQ ID NO.:6.

Более короткие версии последовательностей SEQ ID NO. 4, 5 и 6 были представлены в международной заявке No. PCT/CA2006/001505, поданной 13 сентября 2006 (т.е., 1505 заявка) и опубликованной под No. WO2007/030930. В данной патентной заявке определяющие комплементарность регионы последовательности SEQ ID NO.:25

(соответствует SEQ ID NO.:12 в заявке '1505) были идентифицированы при помощи поискового ПО IMGT/V, реализующего определения IMGT. Соответствующие последовательности определяющих комплементарность регионов идентифицированы следующим образом: CDR1 варибельного региона легкой цепи соответствует SEQ ID NO.:47, CDR2 варибельного региона легкой цепи соответствует SEQ ID NO.:48, а CDR3 варибельного региона легкой цепи соответствует SEQ ID NO.:49.

При использовании в данном документе, термин «аминокислотная замена ... снаружи определяющего комплементарность региона (CDR)» по отношению к SEQ ID NO.:25, в общем, относится к аминокислотам, окружающим (расположенным снаружи) SEQ ID NO.:4, 5 и 6. В некоторых воплощениях данный термин, альтернативно, может относиться к аминокислотам, окружающим (расположенным снаружи) SEQ ID NO.:47, 48 и 49.

Определяющие комплементарность регионы (CDR) SEQ ID NO.:37 (идентичные SEQ ID NO. 38, 39, 40 и 17), были идентифицированы при помощи определений Kabat и Chothia. Соответствующие последовательности определяющих комплементарность регионов идентифицированы следующим образом: CDR1 варибельного региона тяжелой цепи соответствует SEQ ID NO.:11, CDR2 варибельного региона тяжелой цепи соответствует SEQ ID NO.:12, а CDR3 варибельного региона тяжелой цепи соответствует SEQ ID NO.:13.

Более короткие версии SEQ ID NO.:11, 12 и 13 были представлены в международной заявке No. PCT/CA2006/001505, поданной 13 сентября 2006 (т.е., 1505 заявка) и опубликованной под No. WO2007/030930. В данной патентной заявке, определяющие комплементарность регионы последовательности SEQ ID NO.:37 (соответствует SEQ ID NO.:22 в заявке '1505), были идентифицированы при помощи поискового ПО IMGT/V, реализующего определения IMGT. Соответствующие последовательности идентифицированы следующим образом: CDR1 варибельного региона тяжелой цепи соответствует SEQ ID NO.:50, CDR2 варибельного региона тяжелой цепи соответствует SEQ ID NO.:51, а CDR3 варибельного региона тяжелой цепи соответствует SEQ ID NO.:52.

При использовании в данном документе, термин «аминокислотная замена ... снаружи определяющего комплементарность региона (CDR)» по отношению к SEQ ID NO.:37, в общем, относится к аминокислотам, окружающим (расположенным снаружи) SEQ ID NO.:11, 12 и 13. В некоторых воплощениях данный термин, альтернативно, может относиться к аминокислотам, окружающим (расположенным снаружи) SEQ ID NO.:50, 51 и 52.

Определяющие комплементарность регионы (CDR) SEQ ID NO.:33 (идентичные SEQ ID NO. 34, 35, 36 и 18), были идентифицированы при помощи определений Kabat и Chothia. Соответствующие последовательности определяющих комплементарность регионов идентифицированы следующим образом: CDR1 варибельного региона легкой цепи соответствует SEQ ID NO.:14, CDR2 варибельного региона легкой цепи соответствует SEQ ID NO.:15, а CDR3 варибельного региона легкой цепи соответствует SEQ ID NO.:16.

Более короткие версии последовательностей SEQ ID NO. 14, 15 и 16 были представлены в международной заявке PCT/CA2006/001505, поданной 13 сентября 2006 (т.е., 1505 заявка) и опубликованной WO2007/030930. В данной патентной заявке, определяющие комплементарность регионы последовательности SEQ ID NO.:33 (соответствует SEQ ID NO.:11 в заявке '1505), были идентифицированы при помощи поискового ПО IMGT/V, реализующего определения IMGT. Соответствующие

последовательности определяющих комплементарность регионов идентифицированы следующим образом: CDR1 варибельного региона легкой цепи соответствует SEQ ID NO.:53, CDR2 варибельного региона легкой цепи соответствует SEQ ID NO.:54, а CDR3 варибельного региона легкой цепи соответствует SEQ ID NO.:55.

5 При использовании в данном документе, термин «аминокислотная замена ... снаружи определяющего комплементарность региона (CDR)» по отношению к SEQ ID NO.:33, в общем, относится к аминокислотам, окружающим (расположенным снаружи) SEQ ID NO.:14, 15 и 16. В некоторых воплощениях данный термин, альтернативно, может относиться к аминокислотам, окружающим (расположенным снаружи) SEQ ID NO.:53,
10 54 и 55.

Гуманизированное антитело по настоящему изобретению (или любой антигенсвязывающий фрагмент, полученный из них) может включать варибельный регион легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO.:7, SEQ ID NO.:26 или SEQ ID NO.:27 и варибельный регион тяжелой цепи, выбранный из группы,
15 состоящей из SEQ ID NO.:8, SEQ ID NO.:29 и SEQ ID NO.:30.

Гибридное антитело по настоящему изобретению (или любой антигенсвязывающий фрагмент, полученный из них) может включать варибельный регион легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO.:7, SEQ ID NO.:26 и SEQ ID NO.:27 и варибельный регион тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO.:28.

20 Альтернативно, гибридное антитело по настоящему изобретению (или любой антигенсвязывающий фрагмент, полученный из них), может включать варибельный регион легкой цепи, содержащий SEQ ID NO.:25 и варибельный регион тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO.:8, SEQ ID NO.:29 и SEQ ID NO.:30.

Гуманизированное антитело по настоящему изобретению (или любой антигенсвязывающий фрагмент, полученный из них) может включать варибельный регион легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO.:18, SEQ ID NO.:32 и SEQ ID NO.:33 и варибельный регион тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO.:17, SEQ ID NO.:35 и SEQ ID NO.:36.

Гибридное антитело по настоящему изобретению (или любой антигенсвязывающий фрагмент, полученный из них) может включать варибельный регион легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO.:18, SEQ ID NO.:32 или SEQ ID NO.:33 и варибельный регион тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO.:34.

Альтернативно, гибридное антитело по настоящему изобретению (или любой антигенсвязывающий фрагмент, полученный из них), может включать варибельный регион легкой цепи, содержащий SEQ ID NO.:31 и варибельный регион тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO.:17, SEQ ID NO.:35 и SEQ ID NO.:36.

Иное примерное воплощение гуманизированного антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению включает, например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент с варибельным регионом легкой цепи, который может
40 содержать, по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO.:26, SEQ ID NO.:27, SEQ ID NO.:28 или SEQ ID NO.:8.

При использовании в данном документе, термин «по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:26», также, включает термины «по меньшей мере, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105,
45 106, 107, 108, 109, 110, 111 или, по меньшей мере, 112 последовательных аминокислот». Термин «по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:26» охватывает любую возможную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:26,

в особенности те последовательности, которые включают 3 определяющих комплементарность региона последовательности SEQ ID NO.:26, например, последовательность, включающую аминокислотные остатки от 6 до 108, от 5 до 109, от 13 до 103, от 9 до 111 последовательности SEQ ID NO.:26 и так далее.

5 При использовании в данном документе, термин «по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:27», также, включает термины «по меньшей мере, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111 или, по меньшей мере, 112 последовательных аминокислот». Термин «по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности
10 SEQ ID NO.:27» охватывает любую возможную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:27, в особенности те последовательности, которые включают 3 определяющих комплементарность региона последовательности SEQ ID NO.:27, например, последовательность, включающую аминокислотные остатки от 7 до 109, от 12 до 104,
15 от 22 до 113, от 18 до 112 последовательности SEQ ID NO.:27 и так далее.

Термины «по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:28» и «по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:8» имеют аналогичные значения.

В соответствии с настоящим изобретением, антитело или антигенсвязывающий
20 фрагмент могут включать, например, вариабельный регион легкой цепи, определенный в SEQ ID NO.:8.

Также, в соответствии с настоящим изобретением, антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут включать, например, легкую цепь, определенную в SEQ ID NO.:10.

Гуманизированное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению
25 включает (или далее включает), например, вариабельный регион тяжелой цепи, который может содержать, по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO.:30, 31, 32 или 7.

При использовании в данном документе, термин «по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:30», также, включает
30 термины «по меньшей мере, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116 или, по меньшей мере, 117 последовательных аминокислот». Термин «по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:30» охватывает любую возможную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот
35 последовательности SEQ ID NO.:30, в особенности те последовательности, которые включают 3 определяющих комплементарность региона последовательности SEQ ID NO.:30, например, последовательность, включающую аминокислотные остатки от 1 до 108, от 2 до 112, от 11 до 113, от 7 до 109 последовательности SEQ ID NO.:30 и так далее.

40 При использовании в данном документе, термин «по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:31», также, включает термины «по меньшей мере, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116 или, по меньшей мере, 117 последовательных аминокислот». Термин «по меньшей мере, 90 последовательных
45 аминокислот последовательности SEQ ID NO.:31» охватывает любую возможную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:31, в особенности те последовательности, которые включают 3 определяющих комплементарность региона последовательности SEQ ID

NO.:31, например, последовательность, включающую аминокислотные остатки от 6 до 109, от 8 до 113, от 1 до 108, от 2 до 115 последовательности SEQ ID NO.:31 и так далее.

Термины «по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:32» и «по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:7» имеют аналогичные значения.

В соответствии с настоящим изобретением, антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут включать, например, вариабельный регион тяжелой цепи, определенный в SEQ ID NO.:7.

Также, в соответствии с настоящим изобретением, антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут включать, например, тяжелую цепь, определенную в SEQ ID NO.:9.

В соответствии с настоящим изобретением, антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут включать, например,

а. вариабельный регион легкой цепи, который может содержать по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:26 и вариабельный регион тяжелой цепи, который может содержать, по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO.:30, SEQ ID NO.:31, SEQ ID NO.:32 или SEQ ID NO.:7;

б. вариабельный регион легкой цепи, который может содержать по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:27 и вариабельный регион тяжелой цепи, который может содержать, по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO.:30, SEQ ID NO.:31, SEQ ID NO.:32 или SEQ ID NO.:7;

в. вариабельный регион легкой цепи, который может содержать по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:28 и вариабельный регион тяжелой цепи, который может содержать, по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO.:30, SEQ ID NO.:31, SEQ ID NO.:32 или SEQ ID NO.:7; или

г. вариабельный регион легкой цепи, который может содержать, по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:8 и вариабельный регион тяжелой цепи, который может содержать, по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO.:30, SEQ ID NO.:31, SEQ ID NO.:32 или SEQ ID NO.:7;

В соответствии с более специфическим воплощением изобретения, вариабельный регион легкой цепи может содержать, по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:8, вариабельный регион тяжелой цепи может содержать, по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO.:7.

В соответствии с еще более специфическим воплощением изобретения, вариабельный регион легкой цепи может соответствовать последовательности SEQ ID NO.:8, а вариабельный регион тяжелой цепи может соответствовать последовательности SEQ ID NO.:7.

Иными примерными воплощениями гуманизированных антител или антигенсвязывающих фрагментов согласно изобретению, являются те, которые могут включать вариабельный регион легкой цепи, содержащий, по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO.:34, 35, 36 или 18.

При использовании в данном документе, термин «по меньшей мере, 90

последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:34», также, включает термины «по меньшей мере, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112 или, по меньшей мере, 113 последовательных аминокислот». Термин «по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:34» охватывает любую возможную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:34, в особенности те последовательности, которые включают 3 определяющих комплементарность региона последовательности SEQ ID NO.:34, например, последовательность, включающую аминокислотные остатки от 6 до 103, от 11 до 106, от 1 до 106, от 3 до 110, от 5 до 107 последовательности SEQ ID NO.:34 и так далее.

При использовании в данном документе, термин «по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:35», также, включает термины «по меньшей мере, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112 или, по меньшей мере, 113 последовательных аминокислот». Термин «по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:35» охватывает любую возможную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:35, в особенности те последовательности, которые включают 3 определяющих комплементарность региона последовательности SEQ ID NO.:35, например, последовательность, включающую аминокислотные остатки от 9 до 106, от 10 до 113, от 1 до 109, от 20 до 110, от 7 до 107 последовательности SEQ ID NO.:35 и так далее.

Термины «по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:36» и «по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:18» имеют аналогичные значения.

В соответствии с настоящим изобретением, антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут включать, например, вариабельный регион легкой цепи, определенный в SEQ ID NO.:18.

Также, в соответствии с настоящим изобретением, антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут включать, например, легкую цепь, определенную в SEQ ID NO.:20.

Гуманизированное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по изобретению включает (или далее включает), например, вариабельный регион тяжелой цепи, который может содержать, по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO.:38, 39, 40 или 17.

При использовании в данном документе, термин «по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:38», также, включает термины «по меньшей мере, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117 или, по меньшей мере, 118 последовательных аминокислот». Термин «по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:38» охватывает любую возможную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:38, в особенности те последовательности, которые включают 3 определяющих комплементарность региона последовательности SEQ ID NO.:38, например, последовательность, включающую аминокислотные остатки от 6 до 111, от 1 до 114, от 12 до 109, от 5 до 113, от 10 до 107 последовательности SEQ ID NO.:38 и так далее.

При использовании в данном документе, термин «по меньшей мере, 90

последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:39», также, включает термины «по меньшей мере, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117 или, по меньшей мере, 118 последовательных аминокислот». Термин «по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:39» охватывает любую возможную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:39, в особенности те последовательности, которые включают 3 определяющих комплементарность региона последовательности SEQ ID NO.:39, например, последовательность, включающую аминокислотные остатки от 3 до 109, от 1 до 115, от 1 до 110, от 22 до 116, от 20 до 115 последовательности SEQ ID NO.:39 и так далее.

Термины «по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:40» и «по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:17» имеют аналогичные значения.

В соответствии с настоящим изобретением, антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут включать, например, вариабельный регион тяжелой цепи, определенную в SEQ ID NO.:17.

Также, в соответствии с настоящим изобретением, антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут включать, например, тяжелую цепь, определенную в SEQ ID NO.:19.

В соответствии с настоящим изобретением, антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут включать, например,

а. вариабельный регион легкой цепи, который может содержать по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:34 и вариабельный регион тяжелой цепи, который может содержать, по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO.:38, SEQ ID NO.:39, SEQ ID NO.:40 или SEQ ID NO.:17;

б. вариабельный регион легкой цепи, который может содержать по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:35 и вариабельный регион тяжелой цепи, который может содержать, по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO.:38, SEQ ID NO.:39, SEQ ID NO.:40 или SEQ ID NO.:17;

в. вариабельный регион легкой цепи, который может содержать по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:36 и вариабельный регион тяжелой цепи, который может содержать, по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO.:38, SEQ ID NO.:39, SEQ ID NO.:40 или SEQ ID NO.:17; или

г. вариабельный регион легкой цепи, который может содержать по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:18 и вариабельный регион тяжелой цепи, который может содержать, по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO.:38, SEQ ID NO.:39, SEQ ID NO.:40 или SEQ ID NO.:17.

В соответствии с более специфическим воплощением изобретения, вариабельный регион легкой цепи может содержать, по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:18, вариабельный регион тяжелой цепи может содержать, по меньшей мере, 90 последовательных аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO.:17.

В соответствии с еще более специфическим воплощением изобретения, вариабельный регион легкой цепи может соответствовать последовательности SEQ ID NO.:18, а

вариабельный регион тяжелой цепи может соответствовать последовательности SEQ ID NO.:17.

Разумеется, легкая цепь или тяжелая цепь, либо их вариабельные области, описанные в данном документе, также, могут содержать сигнальный пептид. Такой сигнальный пептид может происходить из оригинальной последовательности, либо может быть сконструирован таким образом, чтобы оптимизировать локализацию полипептида в клетке. Разумеется, желаемые сигнальные пептиды могут позволять секрецию полипептида (например, быть отщепляемыми).

Гуманизированное или гибридное антитело по настоящему изобретению может содержать константную область, предпочтительно, человеческую. Хотя могут быть выбраны и иные подтипы, гуманизированное или гибридное антитело может содержать аминокислотные остатки константной области иммуноглобулинов подтипов IgG1, IgG2 или IgG3.

Настоящее изобретение, также, в ином аспекте, относится к антигенсвязывающему фрагменту, который включает вариабельный регион легкой цепи (или ее фрагмент) и вариабельный регион тяжелой цепи (или ее фрагмент), которые могут содержать нечеловеческие аминокислотные последовательности области, определяющей комплементарность и человеческие аминокислотные последовательности каркасной области.

Антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению может связываться с кластерином и, более предпочтительно, может обладать более высокой аффинностью, нежели антигенсвязывающий фрагмент нечеловеческого родительского антитела.

Было показано, что антигенсвязывающий фрагмент связывается с рекомбинантным мономерным кластерином с аффинностью в $1,7 \times 10^{-8} \text{ M} \pm 2,97 \times 10^{-9}$ и более.

В примерном воплощении, антигенсвязывающий фрагмент может содержать аминокислотные остатки каркасной области тяжелой цепи натурального человеческого антитела, как описано в данном документе и определяющую комплементарность область тяжелой цепи (CDRH), выбранную из группы, состоящей из: CDRH1, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:1, CDRH2, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:2 и CDRH3, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:3 или определяющую комплементарность область тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из CDRH1, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:11, CDRH2, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:12 и CDRH3, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:13.

В ином приблизительном воплощении изобретения, антигенсвязывающий фрагмент может содержать аминокислотные остатки каркасной области тяжелой цепи натурального человеческого антитела, как описано в данном документе и, по меньшей мере, две определяющие комплементарность области тяжелой цепи (CDRH), выбранные из группы, состоящей из: CDRH1, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:1, CDRH2, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:2 и CDRH3, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:3 или, по меньшей мере, две определяющие комплементарность области тяжелой цепи, выбранные из группы, состоящей из CDRH1, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:11, CDRH2, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:12 и CDRH3, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:13.

В еще одном приблизительном воплощении изобретения, Антигенсвязывающий

фрагмент может содержать аминокислотные остатки каркасной области тяжелой цепи натурального человеческого антитела, как описано в данном документе и CDRH1, обладающую аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:1, CDRH2, обладающую аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:2 и CDRH3, обладающую

5 аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:3 или CDRH1, обладающую аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:11, CDRH2, обладающую аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:12 и CDRH3, обладающую аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:13.

В более частном воплощении, антигенсвязывающий фрагмент может содержать

10 переменный участок тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO.:7 или SEQ ID NO.:17 (или их фрагменты).

В следующем примерном воплощении, антигенсвязывающий фрагмент может содержать аминокислотные остатки каркасной области легкой цепи натурального человеческого антитела, как описано в данном документе и, определяющую

15 комплементарность области легкой цепи (CDRL), выбранную из группы, состоящей из: CDRL1, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:4, CDRL2, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:5 и CDRL3, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:6 или определяющую комплементарность области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из CDRL1,

20 обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:14, CDRL2, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:15 и CDRL3, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:16.

В еще одном воплощении, антигенсвязывающий фрагмент может содержать аминокислотные остатки каркасной области легкой цепи натурального человеческого

25 антитела, как описано в данном документе и, по меньшей мере, две определяющие комплементарность области легкой цепи (CDRL), выбранные из группы, состоящей из: CDRL1, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:4, CDRL2, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:5 и CDRL3, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:6 или, по меньшей мере, две

30 определяющие комплементарность области легкой цепи, выбранные из группы, состоящей из CDRL1, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:14, CDRL2, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:15 и CDRL3, обладающей аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:16.

В еще одном примерном воплощении, антигенсвязывающий фрагмент может

35 содержать аминокислотные остатки каркасной области легкой цепи натурального человеческого антитела, как описано в данном документе и CDRL1, обладающую аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:4, CDRL2, обладающую аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:5 и CDRL3, обладающую аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:6 или CDRL1, обладающую

40 аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:14, CDRL2, обладающую аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:15 и CDRL3, обладающую аминокислотной последовательностью SEQ ID NO.:16.

В более специфическом воплощении, антигенсвязывающий фрагмент может содержать переменный участок легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO.:8 или SEQ ID

45 NO.:18 (или их фрагменты).

В соответствии с настоящим изобретением, антигенсвязывающий фрагмент может включать, например, фрагмент Fab, фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fd, фрагмент Fv, фрагмент dAb.

Предпочтительно, чтобы антигенсвязывающий фрагмент был, например, фрагментом Fab, фрагментом F(ab')₂.

Настоящее изобретение, также, охватывает изолированное антитело, содержащее аминокислотную последовательность антигенсвязывающего фрагмента, описанную в данном документе. Изолированное антитело, также, может содержать константную область.

Вариантные антитела и антигенсвязывающие фрагменты

Хотя замещения определяющих комплементарность областей в антителах грызунов на человеческие области, определяющие комплементарность в человеческих каркасных областях, иногда достаточно для достижения высокой антигенсвязывающей аффинности (Jones, P.T. et al., Nature 321:522-525 (1986); Verhoeven, M. et al., Science 239:1534-1536 (1988)), в других случаях необходимо, дополнительно, заменить один (Riechmann, L. et al., Nature 332:323-327 (1988)) или несколько (Queen, C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989)) остатков в каркасных областях. До сих пор существует непредсказуемость результатов в области гуманизирования антител. К примеру, в патентной заявке США No. 7537931, при попытке перенести определяющую комплементарность область мышинового антитела в человеческое антитело, была утрачена способность к связыванию с антигеном.

Если процесс гуманизирования не дает гуманизированного или гибридного антитела с желаемыми характеристиками (например, специфичностью, аффинностью и т.д.), то может потребоваться заместить аминокислотные остатки нечеловеческой каркасной области на остатки человеческой каркасной области.

Настоящее изобретение, таким образом, охватывает варианты гуманизированных или гибридных антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе. К вариантам антител или антигенсвязывающих фрагментов относятся те гуманизированные или гибридные антитела, либо антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, у которых изменена аминокислотная последовательность. К примеру, варианты антитела или антигенсвязывающие фрагменты, охватываемые настоящим изобретением, включают переменный регион легкой цепи и переменный регион тяжелой цепи, которые могут содержать нечеловеческие аминокислотные последовательности области, определяющей комплементарность и человеческие аминокислотные последовательности каркасной области натурального человеческого антитела и, далее, содержат, по меньшей мере, одну аминокислотную замену (предпочтительно, в каркасной области).

К вариантам антител или антигенсвязывающих фрагментов, охватываемым настоящим изобретением, относятся, к примеру, те, которые обладают сходными или улучшенными характеристиками в сравнении с гуманизированными или гибридными антителами или антигенсвязывающими фрагментами, но несущие, по меньшей мере, одно аминокислотное отличие относительно гуманизированного или гибридного антитела, описанного в данном документе.

Вариантные антитела или антигенсвязывающие фрагменты, охватываемые настоящим изобретением, могут содержать вставку, делецию, аминокислотную замену (консервативную или неконсервативную). В некоторых вариантах, таким образом, может быть удалена, по меньшей мере, одна аминокислота из последовательности, а на ее место может быть внедрен другой аминокислотный остаток.

Заместительному мутагенезу могут подвергаться гипервариабельные регионы (CDR), каркасные области или, даже, константные области. Консервативные замещения могут осуществляться путем обмена аминокислоты одной из групп, перечисленных ниже

(группы от 1 до 6) на другую аминокислоту из той же группы.

Иные примерные воплощения консервативных замещений показаны в Таблице 1А под заголовком «предпочтительные замены». Если подобное замещение приводит к нежелательному свойству, то может быть произведена более существенная замена, приведенная под заголовком «примерные замены» в Таблице 1А, либо описанная ниже, согласно классам аминокислот, после чего продукт может быть подвергнут проверке.

Примеры замещений, определяемых как «консервативные замены», приведены в Таблице 1А. Если подобное замещение приводит к нежелательному свойству, то может быть произведен иной тип замены, приведенный под заголовком «примерные замены» в Таблице 1А, либо замена, описанная ниже, согласно классам аминокислот, после чего продукт может быть подвергнут проверке.

Существенные модификации функции или иммунологической идентичности могут осуществляться путем выбора замещений, которые существенно отличаются во влиянии на поддержание (а) структуры полипептидного скелета в области замещения, например, складчатой или спиральной конформации, (б) заряда или гидрофобности молекулы в целевой области, либо (с) массы боковой цепи. Природные аминокислоты классифицированы в группы, основываясь на свойствах боковой цепи:

(группа 1) гидрофобные: норлейцин, метионин (Met), аланин (Ala), валин (Val), лейцин (Leu), изолейцин (Ile)

(группа 2) нейтральные гидрофильные: Цистеин (Cys), Серин (Ser), Треонин (Thr)

(группа 3) кислые: Аспарагиновая кислота (Asp), Глутаминовая кислота (Glu)

(группа 4) основные: Аспарагин (Asn), Глутамин (Gln), Гистидин (His), Лизин (Lys), Аргинин (Arg)

(группа 5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: Глицин (Gly), Пролин (Pro); и

(группа 6) ароматические: Триптофан (Trp), Тирозин (Tyr), Фенилаланин (Phe)

Неконсервативное замещение заключается в замене члена одного класса на члена другого класса.

Таблица 1А. Замещение аминокислот		
Исходный остаток	Примерное замещение	Консервативное замещение
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg, Asp	Gln
Asp (D)	Glu, Asn	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp, Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg,	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, норлейцин	Leu
Leu (L)	норлейцин, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe

Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, норлейцин	Leu
---------	---------------------------------------	-----

Вариация аминокислотной последовательности вариантного антитела или антигенсвязывающего фрагмента может включать добавление, делецию, вставку, замещение аминокислоты и т.д., одну и более модификаций скелета или боковой цепи одной и более аминокислот, добавление группы или иной молекулы к одной и более аминокислот (в боковые цепи или скелет).

Вариантное антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут обладать значительным сходством и/или идентичностью аминокислотных последовательностей в сравнении с аминокислотной последовательностью оригинального антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Степень сходства двух последовательностей определяется на процентном количестве совпадений (одинаковых аминокислот) и консервативных замен.

При определении процентного совпадения каркасной области в сравнении с другой каркасной областью, аминокислотные последовательности областей, определяющих комплементарность, не должны браться в расчет. Процентное совпадение одной каркасной области в сравнении с другой, предпочтительно, определяется для всей каркасной области, а не только для каркаса.

В общем, степень сходства и идентичности варьируемых цепей определяется при помощи программы секвенирования Blast2 (Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden (1999), "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250) с использованием настроек по умолчанию, т.е., программа blastp, матрица BLOSUM62 (open gap 11 и extension gap penalty 1; gapx dropoff 50, expect 10.0, word size 3) и активированных фильтров.

Процентная идентичность учитывает аминокислоты, одинаковые в сравнении с оригинальным пептидом и способные занимать те же самые или сходные положения.

Процентное сходство учитывает идентичные аминокислоты и аминокислоты, замещенные консервативно в сравнении с оригинальным пептидом и способные занимать те же самые или сходные положения.

Варианты по настоящему изобретению, таким образом, включают последовательности, по меньшей мере, на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичные оригинальной последовательности или участку оригинальной последовательности.

Примерные воплощения вариантов включают последовательности, по меньшей мере, на 81% идентичные последовательности, описанной в данном документе и на 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% подобные с оригинальной последовательностью или участком оригинальной последовательности.

Иные примерные воплощения вариантов включают последовательности, по меньшей мере, на 82% идентичные последовательности, описанной в данном документе и на 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% подобные с оригинальной последовательностью или участком оригинальной последовательности.

Последующие примерные воплощения вариантов включают последовательности, по меньшей мере, на 85% идентичные последовательности, описанной в данном документе и на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% подобные с оригинальной последовательностью или участком оригинальной последовательности.

Иные примерные воплощения вариантов включают последовательности, по меньшей мере, на 90% идентичные последовательности, описанной в данном документе и на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% подобные с оригинальной последовательностью или участком оригинальной последовательности.

5 Дополнительные примерные воплощения вариантов включают последовательности, по меньшей мере, на 95% идентичные последовательности, описанной в данном документе и на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% подобные с оригинальной последовательностью или участком оригинальной последовательности.

10 Последующие примерные воплощения вариантов включают последовательности, по меньшей мере, на 97% идентичные последовательности, описанной в данном документе и на 97%, 98%, 99% или 100% подобные с оригинальной последовательностью или участком оригинальной последовательности.

15 Для краткости, заявителем в таблице 1В представлены примерные воплощения индивидуальных вариантов, охватываемых изобретением и содержащих указанную процентную идентичность и процентную схожесть последовательностей. Символ «X» понимается как охватывание варианта.

		Таблица 1В																						
		Процентная (%) идентичность последовательности																						
20	Процентная (%) схожесть последовательности		80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	
		80	x																					
81		x	x																					
82		x	x	x																				
83		x	x	x	x																			
84		x	x	x	x	x																		
25		85	x	x	x	x	x	x																
86		x	x	x	x	x	x	x	x															
87		x	x	x	x	x	x	x	x	x														
88		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x													
30	89	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x													
	90	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x												
	91	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x											
	92	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x										
	93	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x									
	94	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x								
	95	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x							
35	96	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x					
	97	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x				
	98	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
	99	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
	100	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

40 Настоящее изобретение, таким образом, охватывает гуманизированное или гибридное антитело, в котором вновь внедрены нечеловеческие аминокислотные остатки каркасной области или в котором произведены иные типы модифицирования аминокислот. Аминокислоты, выбранные для оптимизации характеристик антитела включают те аминокислоты, которые вовлечены в связывание с антигеном. Примеры подобных аминокислот представлены на фигуре 2.

45 В примерном воплощении, гуманизированное или гибридное антитело согласно настоящему изобретению может, таким образом, содержать от одного до двадцати одного аминокислотных остатков нечеловеческой каркасной области в переменном регионе тяжелой цепи (обратные мутации).

В ином примерном воплощении, гуманизированное или гибридное антитело согласно

настоящему изобретению может, таким образом, содержать от одного до двенадцати аминокислотных остатков нечеловеческой каркасной области в вариабельном регионе легкой цепи (обратные мутации).

При использовании в данном документе, термин «от одного до двадцати» включает все конкретные значения и интервалы, например, 1, 2, 3, и так далее до 20; от 1 до 20; от 1 до 19; от 1 до 18; от 1 до 17; от 1 до 16; от 1 до 15 и так далее; от 2 до 20; от 2 до 19; от 2 до 18; от 2 до 17 и так далее; от 3 до 20; от 3 до 19; от 3 до 18 и так далее; от 4 до 20; от 4 до 19; от 4 до 18; от 4 до 17; от 4 до 16 и так далее; от 5 до 20; от 5 до 19; от 5 до 18; от 5 до 17 и так далее и т.п.

Аналогично, при использовании в данном документе, термин «от одного до двенадцати» включает все конкретные значения и интервалы, например, 1, 2, 3, и так далее до 12; от 1 до 12; от 1 до 11; от 1 до 10 и так далее; от 2 до 12; от 2 до 11, от 2 до 10; от 2 до 9; от 2 до 8 и так далее; от 3 до 12; от 3 до 11; от 3 до 10; от 3 до 9 и так далее; от 4 до 12; от 4 до 11 и так далее; от 5 до 12; от 5 до 11; от 5 до 10; от 5 до 9; от 5 до 8; от 5 до 7; и так далее и т.п.

Аналогичные термины следует толковать подобным образом.

Изобретение охватывает или использует аминокислотную последовательность, обладающую желаемой % идентичностью с другой аминокислотной последовательностью, например, «каркасная область легкой цепи натурального человеческого антитела, обладающая, по меньшей мере, 70% идентичностью с каркасной областью легкой цепи нечеловеческого родительского антитела» или «каркасная область тяжелой цепи натурального человеческого антитела, обладающая, по меньшей мере, 70% идентичностью с каркасной областью тяжелой цепи нечеловеческого родительского антитела».

Термин «каркасная область легкой цепи натурального человеческого антитела, обладающая, по меньшей мере, 70% идентичностью с каркасной областью легкой цепи нечеловеческого родительского антитела» охватывает каркасные области легкой цепи натурального человеческого антитела, обладающие 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с каркасной областью легкой цепи нечеловеческого родительского антитела. % идентичность, предпочтительно, определяется для каркасных областей целиком (исключая области, определяющие комплементарность).

Как указано выше по отношению к вариантам, термин «каркасная область легкой цепи натурального человеческого антитела, обладающая, по меньшей мере, 70% идентичностью с каркасной областью легкой цепи нечеловеческого родительского антитела» охватывает каркасные области легкой цепи, обладающие 70% идентичностью с каркасной областью легкой цепи нечеловеческого родительского антитела и, также, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с каркасной областью легкой цепи нечеловеческого родительского антитела.

Термин «каркасная область тяжелой цепи натурального человеческого антитела, обладающая, по меньшей мере, 70% идентичностью с каркасной областью тяжелой цепи нечеловеческого родительского антитела» охватывает каркасные области тяжелой цепи натурального человеческого антитела, обладающие 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности

с каркасной областью тяжелой цепи нечеловеческого родительского антитела.

Как указано выше по отношению к вариантам, термин «каркасная область тяжелой цепи натурального человеческого антитела, обладающая, по меньшей мере, 70% идентичностью с каркасной областью тяжелой цепи нечеловеческого родительского антитела» охватывает каркасные области тяжелой цепи, обладающие 70% идентичностью с каркасной областью тяжелой цепи нечеловеческого родительского антитела и, также, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности с каркасной областью тяжелой цепи нечеловеческого родительского антитела.

Получение антител из клеток

Антитела, описанные в данном документе, могут быть получены по ряду способов, известных специалистам в данной отрасли (способы с использованием рекомбинантной ДНК, химический синтез и т.д.).

Чтобы экспрессировать антитела, нуклеотидные последовательности, кодирующие любые легкую и тяжелую цепи иммуноглобулинов, описанные в данном документе, могут быть внедрены в вектор экспрессии, например, в вектор, содержащий элементы транскрипционного и трансляционного контроля внедренной кодирующей последовательности для конкретного носителя. Данные элементы могут включать регуляторные последовательности, например, энхансеры, конститутивные и индуцируемые промоторы, а также 5'- и 3'- нетранслируемые регионы. Для конструирования подобных векторов экспрессии могут применяться способы, известные специалистам в данной отрасли. К данным способам относятся техники с использованием рекомбинантной ДНК *in vitro*, синтетические техники, генетическая рекомбинация *in vivo*.

Для экспрессии полипептида или РНК из нуклеотидных последовательностей, кодирующих любые легкую и тяжелую цепи иммуноглобулинов, описанные в данном документе, может использоваться множество систем вектор-клетка-носитель, известных специалистам в данной отрасли. К ним относится, но не ограничиваясь перечисленным, использование микроорганизмов, например, бактерий, трансформированных рекомбинантными бактериофаговыми, плазмидными, космидными ДНК векторами экспрессии; дрожжей, трансформированных векторами экспрессии дрожжей; клеток насекомых, инфицированных бакуловирусными векторами; клеток растений, трансформированных вирусными или бактериальными векторами экспрессии; клеток животных. Для долгосрочного получения рекомбинантных белков в системах клеток млекопитающих, можно прибегать к стабильной экспрессии в клеточных линиях. К примеру, нуклеотидные последовательности, кодирующие одну из легких и тяжелых иммуноглобулиновых цепей, описанные в данном документе, могут быть трансформированы в клеточные линии при помощи векторов экспрессии, которые могут содержать вирусные приемы репликации и/или эндогенные элементы экспрессии, а также селектируемый или видимый маркерный ген в том же или отдельном векторе. Выбор вектора или клетки не ограничивает изобретение. В определенных воплощениях данного изобретения, нуклеотидные последовательности, кодирующие любые легкую и тяжелую иммуноглобулиновые цепи, описанные в данном документе, могут быть сшиты с раздельными векторами экспрессии, каждая цепочка будет экспрессироваться отдельно. В ином воплощении данного изобретения, обе нуклеотидные последовательности, кодирующие любые легкую и тяжелую иммуноглобулиновые цепи, описанные в данном документе, могут быть сшиты с одним вектором экспрессии

и экспрессироваться совместно.

Альтернативно, РНК и/или полипептид могут экспрессироваться из вектора, содержащего нуклеотидные последовательности, которые кодируют любую легкую и тяжелую иммуноглобулиновые цепи, описанные в данном документе, при помощи систем транскрипции *in vitro* или спаренных систем транскрипции и трансляции *in vitro*.

В общем, клетки-носители, содержащие нуклеотидные последовательности, которые могут кодировать любую легкую и тяжелую иммуноглобулиновые цепи, описанные в данном документе и/или экспрессирующие полипептид, закодированный нуклеотидными последовательностями, которые могут кодировать любую легкую и тяжелую иммуноглобулиновые цепи, описанные в данном документе, либо их участок, могут идентифицироваться по множеству процедур, известных в отрасли. Данные процедуры включают, не ограничиваясь перечисленным, ДНК/ДНК или ДНК/РНК гибридизацию, ПЦР-амплификацию, способы белковых биопроб или иммунопроб, включающие мембранные техники, техники в растворах или чиповые технологии по детектированию и/или количественному определению нуклеиновых кислот или аминокислотных последовательностей. Иммунологические способы для детектирования и измерения экспрессии полипептидов, использующие специфические поликлональные или моноклональные антитела, известны в отрасли. Примерами таких технологий являются способы иммуноферментного анализа (ELISA), способы радиоиммунного анализа (RIA), сортировка флуоресцентно-активированных клеток (FACS). Специалисты в данной отрасли могут легко приспособить данные технологии к настоящему изобретению.

Клетки-хозяева, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие любую легкую и тяжелую иммуноглобулиновые цепи, описанные в данном документе, могут культивироваться в условиях, подходящих для транскрипции соответствующей РНК и/или экспрессии полипептида в клеточной культуре. Полипептид, продуцируемый клеткой, может секретироваться или может удерживаться внутри клетки, в зависимости от последовательности и/или используемого вектора. В приблизительном воплощении, векторы экспрессии, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие любую легкую и тяжелую иммуноглобулиновые цепи, описанные в данном документе, могут быть сконструированы таким образом, чтобы содержать сигнальные последовательности, вызывающие прямую секрецию полипептида через мембрану прокариотной или эукариотной клетки.

Примерными воплощениями нуклеиновых кислот, кодирующих переменный регион тяжелой цепи, служат SEQ ID NO.:21 и SEQ ID NO.:22.

Примерными воплощениями нуклеиновых кислот, кодирующих переменный регион легкой цепи, служат SEQ ID NO.:23 и SEQ ID NO.:24.

Вследствие свойственной генетическому коду вырожденности, иные последовательности ДНК, кодирующие такую же, практически такую же или функционально эквивалентную аминокислотную последовательность, могут продуцироваться и использоваться, например, для экспрессирования полипептида, закодированного нуклеотидной последовательностью, способной кодировать любую легкую и тяжелую иммуноглобулиновые цепи, описанные в данном документе.

Нуклеотидные последовательности по настоящему изобретению могут быть сконструированы при помощи способов, известных в отрасли и предназначенных для изменения нуклеотидных последовательностей для множества целей, включая, но не ограничиваясь перечисленным, модификацию клонируемого, процессируемого и/или экспрессию генного продукта. Для конструирования нуклеотидных последовательностей

могут применяться перестановка ДНК путем случайной фрагментации и ПЦР-восстановления фрагментов генов и синтетических олигонуклеотидов. К примеру, для введения мутаций, формирующих новые сайты рестрикции, изменяющих схемы гликозилирования, изменяющих кодоновые предпочтения, дающих расщепленные варианты и так далее, может использоваться олигонуклеотидно-опосредованный сайт-направленный мутагенез.

Также, может выбираться штамм клеток-носителей по их способности модулировать экспрессии внедренных последовательностей или процессировать экспрессируемый полипептид желаемым образом. К таким модификациям полипептида относятся, не ограничиваясь перечисленным, ацетилирование, карбоксилирование, гликозилирование, фосфорилирование, липидирование, ацилирование. В примерном воплощении, могут быть желательными антитела, содержащие конкретные структуры или схемы гликозилирования. Для установления мишени белка, его структуры и/или активности, может использоваться послетрансляционный процессинг, во время которого разрезается «препро»-форма полипептида. В продаже, у Американской коллекции типовых культур (ATCC), доступны различные клетки-носители, имеющие специфические клеточные комплексы и характерные механизмы послетрансляционного процессинга (например, СНО, HeLa, MDCK, HEK293, W138), которые могут быть выбраны для корректного модифицирования и процессинга экспрессируемого полипептида.

Специалистами в данной отрасли может быть оценено то, что в любой из перечисленных выше систем клеток-носителей, натуральная, модифицированная или рекомбинантная последовательность нуклеиновой кислоты может быть связана с гетерологической последовательностью с формированием, при трансляции, слитого полипептида, содержащего гетерологические полипептидные фрагменты. Подобные гетерологические полипептидные фрагменты могут облегчать очистку слитых полипептидов на доступных в продаже аффинных матрицах. К таким фрагментам относятся, не ограничиваясь перечисленным, глутатион-S-трансфераза (GST), белок, связывающий мальтозу, тиоредоксин, белок, связывающий кальмодулин, 6-His (His), FLAG, с-тус, гемагглютинин (НА), а также эпитопы антител, например, эпитопы моноклональных антител.

В последующем аспекте, настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, который может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок. Слитый белок может содержать партнерский белок (например, НА, Fc, и т.д.), слитый с полипептидом (например, полной легкой цепью, полной тяжелой цепью, переменными областями, определяющими комплементарность областями и т.д.), описанным в данном документе.

Специалистам в отрасли понятно, что нуклеиновая кислота и полипептидная последовательность могут быть синтезированы, целиком или частично, при помощи известных в отрасли химических или ферментных способов. К примеру, пептидный синтез может проводиться по различным твердофазным техникам и с использованием различного оборудования, например, синтезатор пептидов ABI 431A (PE Biosystems) может применяться для автоматического синтеза. При желании, аминокислотная последовательность может модифицироваться при синтезе и/или комбинироваться с другими последовательностями иных белков, с получением вариантного белка.

Если доступен лишь один переменный фрагмент тяжелой или легкой цепи, то антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут быть восстановлены путем скрининга библиотеки комплементарных переменных фрагментов по способам, известным в отрасли (Portolano et al. The Journal of Immunology (1993) 150:880-887, Clarkson

et al., Nature (1991) 352:624-628). Таким образом, сведений только об одном переменном регионе аминокислотной последовательности (тяжелой или легкой цепи), зачастую, достаточно для восстановления полной последовательности антитела, обладающего специфичностью к желаемому антигену. Нуклеиновые кислоты, кодирующие

5 переменный регион легкой или тяжелой цепи антитела, могут быть полезны при идентификации комплементарной цепи, при присоединении которой образуется антигенсвязывающий фрагмент или антитело, обладающие достаточной антигенсвязывающей специфичностью. Одноцепочечная нуклеиновая кислота (например, олиго-) или его комплемент с высокой степенью идентичности последовательности с

10 нуклеиновой кислотой, кодирующей переменный регион легкой цепи или переменный регион тяжелой цепи антитела, может быть полезна для его детектирования или для детектирования иных последовательностей нуклеиновых кислот с высокой степенью идентичности.

Также, в дополнительном аспекте, настоящее изобретение охватывает изолированные

15 нуклеиновые кислоты, кодирующие переменный регион легкой цепи и/или переменный регион тяжелой цепи гуманизированного антитела, гибридного антитела или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе или изолированное антитело, описанное в данном документе.

В еще одном аспекте, настоящее изобретение охватывает вектор или конструкцию,

20 содержащую (изолированную) нуклеиновую кислоту, описанную в данном документе. В соответствии с данным изобретением, вектор может являться, к примеру, вектором экспрессии млекопитающего, бактериальным вектором экспрессии и т.д.

Настоящее изобретение, также, охватывает изолированную клетку, содержащую изолированную нуклеиновую кислоту, описанную в данном документе или вектор,

25 описанный в данном документе. Также, охватываются изолированные клетки, экспрессирующие антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению. К пригодным для этого клеткам, к примеру, относятся клетки млекопитающих, бактериальные клетки и т.д.

Еще один аспект изобретения относится к способу получения гуманизированного

30 или гибридного анти-кластеринового антитела, который может включать введение нечеловеческой определяющей комплементарности области тяжелой цепи нечеловеческого антитела, способного к специфическому связыванию с кластерином в переменный регион тяжелой цепи каркасной области натурального человеческого антитела.

Еще один аспект изобретения относится к способу получения гуманизированного

35 или гибридного анти-кластеринового антитела, который может включать трансформирование клетки при помощи нуклеиновой кислоты, кодирующей переменный фрагмент тяжелой цепи (или полностью тяжелую цепь), содержащий нечеловеческой определяющей комплементарности области тяжелой цепи

40 нечеловеческого антитела, способного к специфическому связыванию с кластерином и переменный регион тяжелой цепи каркасной области натурального человеческого антитела. Способ, также, может включать трансформирование клетки при помощи нуклеиновой кислоты, кодирующей комплементарный переменный регион легкой цепи (или полностью легкую цепь).

В ином аспекте, изобретение относится к способу получения гуманизированного

45 или гибридного анти-кластеринового антитела, который может включать экспрессирование переменного фрагмента тяжелой цепи (или полностью тяжелой цепи), содержащего аминокислотные остатки нечеловеческой определяющей

комплементарность области тяжелой цепи нечеловеческого антитела, способного к специфическому связыванию с кластерином и аминокислотные остатки варибельного региона тяжелой цепи каркасной области натурального человеческого антитела. Способ, также, может включать экспрессирование комплементарного варибельного региона легкой цепи (или полностью легкой цепи).

Варибельный регион тяжелой цепи натурального человеческого антитела, который может быть выбрана для гуманизирования, может иметь следующие характеристики: а) трехмерную структуру, схожую или идентичную (наложимую) со структурой тяжелой цепи нечеловеческого антитела, б) каркасную область, обладающую, по меньшей мере, 70%-й идентичностью с аминокислотной последовательностью тяжелой цепи нечеловеческого антитела и/или; с) аминокислотные остатки (определенное количество) определяющей комплементарность области тяжелой цепи (например, всех трех), одинаковые или практически одинаковые с аминокислотными остатками нечеловеческой определяющей комплементарность области тяжелой цепи.

Способ, таким образом, может содержать введение аминокислотных остатков нечеловеческой области тяжелой цепи, определяющей комплементарность, по меньшей мере, двух областей, определяющих комплементарность нечеловеческого антитела. Нуклеиновая кислота, используемая для создания гуманизированных или гибридных антител может, таким образом, кодировать, по меньшей мере, две области, определяющие комплементарность нечеловеческого антитела. Варибельный регион тяжелой цепи, экспрессируемый для создания гуманизированных или гибридных антител может, таким образом, содержать, по меньшей мере, два региона, определяющие комплементарность нечеловеческого антитела.

Способ может, предпочтительно, содержать введение аминокислотных остатков нечеловеческой области тяжелой цепи, определяющей комплементарность, во все три области, определяющие комплементарность. Нуклеиновая кислота, используемая для создания гуманизированных или гибридных антител может, таким образом, кодировать, три области, определяющие комплементарность нечеловеческого антитела. Варибельный регион тяжелой цепи, экспрессируемый для создания гуманизированных или гибридных антител может, таким образом, содержать, все три региона, определяющие комплементарность нечеловеческого антитела.

Способ, таким образом, включает введение нечеловеческих определяющих комплементарность областей, содержащих аминокислотные последовательности SEQ ID NO.:1, SEQ ID NO.:2 и SEQ ID NO.:3. Нуклеиновая кислота, используемая для создания гуманизированных или гибридных антител может, таким образом, кодировать SEQ ID NO.:1, SEQ ID NO.:2 и SEQ ID NO.:3. Варибельный регион тяжелой цепи, экспрессируемый для создания гуманизированных или гибридных антител может, таким образом, содержать SEQ ID NO.:1, SEQ ID NO.:2 и SEQ ID NO.:3.

Способ, также, включает введение нечеловеческих определяющих комплементарность областей, содержащих аминокислотные последовательности SEQ ID NO.:11, SEQ ID NO.:12 и SEQ ID NO.:13. Нуклеиновая кислота, используемая для создания гуманизированных или гибридных антител может, таким образом, кодировать SEQ ID NO.:11, SEQ ID NO.:12 и SEQ ID NO.:13. Варибельный регион тяжелой цепи, экспрессируемый для создания гуманизированных или гибридных антител может, таким образом, содержать SEQ ID NO.:11, SEQ ID NO.:12 и SEQ ID NO.:13.

Альтернативно, более короткие версии упомянутых выше областей, определяющих комплементарность, могут быть введены в каркасную область варибельного региона тяжелой цепи человеческого антитела.

Способ по настоящему изобретению может, далее, включать введение нечеловеческой определяющей комплементарности области легкой цепи нечеловеческого антитела, способного к специфическому связыванию с кластерином в переменный регион легкой цепи каркасной области натурального человеческого антитела.

5 Способ по настоящему изобретению может, далее, включать экспрессию нуклеиновой кислоты, кодирующей переменный регион легкой цепи (или полностью легкую цепь), содержащую нечеловеческую определяющую комплементарность области легкой цепи нечеловеческого антитела, способного к специфическому связыванию с кластерином и аминокислоты переменного региона легкой цепи каркасной области натурального
10 человеческого антитела. Способ, также, может включать трансформирование клетки при помощи нуклеиновой кислоты, кодирующей комплементарный переменный регион тяжелой цепи (или полностью тяжелую цепь).

В ином аспекте, изобретение относится к способу получения гуманизированного или гибридного анти-кластеринового антитела, который может включать
15 экспрессирование кодирующей переменный фрагмент легкой цепи (или полностью тяжелую цепь), содержащий нечеловеческой определяющей комплементарности области легкой цепи нечеловеческого антитела, способного к специфическому связыванию с кластерином и переменный регион легкой цепи каркасной области натурального человеческого антитела. Способ, также, может включать экспрессирование
20 комплементарного переменного региона тяжелой цепи (или полностью тяжелой цепи).

Переменный регион легкой цепи натурального человеческого антитела, который может быть выбран для гуманизирования, может иметь следующие характеристики:
а) трехмерную структуру, схожую или идентичную (наложимую) со структурой легкой
25 цепи нечеловеческого антитела, б) каркасную область, обладающую, по меньшей мере, 70%-й идентичностью с аминокислотной последовательностью легкой цепи нечеловеческого антитела и/или; с) (определенное количество) аминокислотные остатки определяющей комплементарности области легкой цепи (например, всех трех),
одинаковые или практически одинаковые с аминокислотными остатками нечеловеческой
30 определяющей комплементарности области легкой цепи.

Способ, таким образом, может содержать введение аминокислотных остатков нечеловеческой области легкой цепи, определяющей комплементарность, по меньшей мере, двух областей, определяющих комплементарность нечеловеческого антитела. Нуклеиновая кислота, используемая для создания гуманизированных или гибридных
35 антител может, таким образом, кодировать, по меньшей мере, две области, определяющие комплементарность нечеловеческого антитела. Переменный регион легкой цепи, экспрессируемый для создания гуманизированных или гибридных антител может, таким образом, содержать, по меньшей мере, две области, определяющие комплементарность нечеловеческого антитела.

40 Способ может, предпочтительно, содержать введение аминокислотных остатков нечеловеческой области легкой цепи, определяющей комплементарность, во все три области, определяющие комплементарность. Нуклеиновая кислота, используемая для создания гуманизированных или гибридных антител может, таким образом, кодировать, три области, определяющие комплементарность нечеловеческого антитела.
45 Переменный регион легкой цепи, экспрессируемый для создания гуманизированных или гибридных антител может, таким образом, содержать, все три области, определяющие комплементарность нечеловеческого антитела.

Способ, таким образом, включает введение нечеловеческих определяющих

комплементарность областей, содержащих аминокислотные последовательности SEQ ID NO.:4, SEQ ID NO.:5 и SEQ ID NO.:6. Нуклеиновая кислота, используемая для создания гуманизированных или гибридных антител может, таким образом, кодировать SEQ ID NO.:4, SEQ ID NO.:5 и SEQ ID NO.:6. Вариабельный регион легкой цепи, экспрессируемый для создания гуманизированных или гибридных антител может, таким образом, содержать SEQ ID NO.:4, SEQ ID NO.:5 и SEQ ID NO.:6.

Способ, также, включает введение нечеловеческих определяющих комплементарность областей, содержащих аминокислотные последовательности SEQ ID NO.:14, SEQ ID NO.:15 и SEQ ID NO.:16. Нуклеиновая кислота, используемая для создания гуманизированных или гибридных антител может, таким образом, кодировать SEQ ID NO.:14, SEQ ID NO.:15 и SEQ ID NO.:16. Вариабельный регион легкой цепи, экспрессируемый для создания гуманизированных или гибридных антител может, таким образом, содержать SEQ ID NO.:14, SEQ ID NO.:15 и SEQ ID NO.:16.

Альтернативно, более короткие версии упомянутых выше областей, определяющих комплементарность, могут быть введены в каркасную область вариабельного региона тяжелой цепи человеческого антитела.

В дополнительном аспекте, изобретение относится к способу получения гуманизированного или гибридного анти-кластеринового антитела, который может включать введение аминокислотных остатков нечеловеческой определяющей комплементарности области тяжелой цепи нечеловеческого антитела, способного к специфическому связыванию с кластерином в вариабельный регион тяжелой цепи каркасной области натурального человеческого антитела и введение аминокислотных остатков нечеловеческой определяющей комплементарности области легкой цепи нечеловеческого антитела, способного к специфическому связыванию с кластерином в вариабельный регион легкой цепи каркасной области натурального человеческого антитела.

В дополнительном аспекте, изобретение относится к способу получения гуманизированного или гибридного анти-кластеринового антитела, который может включать экспрессию нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотные остатки нечеловеческой определяющей комплементарности области тяжелой цепи нечеловеческого антитела, способного к специфическому связыванию с кластерином и вариабельного региона тяжелой цепи каркасной области натурального человеческого антитела и экспрессию нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотные остатки нечеловеческой определяющей комплементарности области легкой цепи нечеловеческого антитела, способного к специфическому связыванию с кластерином и вариабельный регион легкой цепи каркасной области натурального человеческого антитела.

Вариабельный регион тяжелой цепи натурального человеческого антитела, который может быть выбран для гуманизирования, может иметь следующие характеристики:

- a) содержать каркасную область, на 70% идентичную по аминокислотной последовательности с каркасной областью тяжелой цепи нечеловеческого антитела, b) иметь аминокислотные остатки (определенное количество) в области, определяющей комплементарность тяжелой цепи (например, во всех трех областях, определяющих комплементарность), одинаковые или практически одинаковые с аминокислотными остатками области, определяющей комплементарность нечеловеческой тяжелой цепи,
- a) содержать каркасную область, на 70% идентичную по аминокислотной последовательности с каркасной областью легкой цепи нечеловеческого антитела, b) иметь аминокислотные остатки (определенное количество) в области, определяющей комплементарность легкой цепи (например, во всех трех областях, определяющих комплементарность), одинаковые или практически одинаковые с аминокислотными остатками области, определяющей комплементарность нечеловеческой легкой цепи,

иметь аминокислотные остатки (определенное количество) в области, определяющей комплементарность легкой цепи (например, во всех трех областях, определяющих комплементарность), одинаковые или практически одинаковые с аминокислотными остатками области, определяющей комплементарность нечеловеческой легкой цепи.

5 Предпочтительно, чтобы переменная(ые) область(и) натурального человеческого антитела обладала трехмерной структурой, схожей или идентичной (наложимой) с переменной(ыми) областью(ями) нечеловеческого антитела.

В соответствии с настоящим изобретением, способ может содержать введение аминокислотных остатков нечеловеческой области тяжелой цепи, определяющей
10 комплементарность, по меньшей мере, двух областей, определяющих комплементарность нечеловеческого антитела. Нуклеиновая кислота, используемая для создания гуманизированных или гибридных антител может, таким образом, кодировать, по меньшей мере, две области, определяющие комплементарность нечеловеческого антитела. Переменный регион тяжелой цепи, экспрессируемый для создания
15 гуманизированных или гибридных антител может, таким образом, содержать, по меньшей мере, две области, определяющие комплементарность нечеловеческого антитела.

Альтернативно, способ может содержать введение аминокислотных остатков нечеловеческой области тяжелой цепи, определяющей комплементарность, во все три
20 области, определяющие комплементарность. Нуклеиновая кислота, используемая для создания гуманизированных или гибридных антител может, таким образом, кодировать, три области, определяющие комплементарность нечеловеческого антитела. Переменный регион тяжелой цепи, экспрессируемый для создания гуманизированных или гибридных антител может, таким образом, содержать, все три области,
25 определяющие комплементарность нечеловеческого антитела.

Также, в соответствии с настоящим изобретением, способ может включать введение аминокислотных остатков нечеловеческой области легкой цепи, определяющей комплементарность, в, по меньшей мере, две области, определяющие комплементарность нечеловеческого антитела. Нуклеиновая кислота, используемая для создания
30 гуманизированных или гибридных антител может, таким образом, кодировать, по меньшей мере, две области, определяющие комплементарность нечеловеческого антитела. Переменный регион легкой цепи, экспрессируемый для создания гуманизированных или гибридных антител может, таким образом, содержать, по меньшей мере, две области, определяющие комплементарность нечеловеческого
35 антитела.

Альтернативно, способ может содержать введение аминокислотных остатков нечеловеческой области легкой цепи, определяющей комплементарность, во все три области, определяющие комплементарность. Нуклеиновая кислота, используемая для создания гуманизированных или гибридных антител может, таким образом, кодировать,
40 три региона, определяющие комплементарность нечеловеческого антитела. Переменный регион легкой цепи, экспрессируемый для создания гуманизированных или гибридных антител может, таким образом, содержать, все три региона, определяющие комплементарность нечеловеческого антитела.

При помощи способа, описанного в данном документе, определяющие
45 комплементарность области, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO.:1, SEQ ID NO.:2 и SEQ ID NO.:3, предпочтительно, импортированные в переменный регион тяжелой цепи натурального человеческого антитела. Нуклеиновая кислота, используемая для создания гуманизированных или гибридных антител может,

таким образом, кодировать SEQ ID NO.:1, SEQ ID NO.:2 и SEQ ID NO.:3. Варибельный регион легкой цепи, экспрессируемый для создания гуманизированных или гибридных антител может, таким образом, содержать SEQ ID NO.:1, SEQ ID NO.:2 и SEQ ID NO.:3.

При помощи способа, описанного в данном документе, определяющие комплементарность области, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO.:11, SEQ ID NO.:12 и SEQ ID NO.:13, предпочтительно, импортированные в варибельный регион тяжелой цепи натурального человеческого антитела. Нуклеиновая кислота, используемая для создания гуманизированных или гибридных антител может, таким образом, кодировать SEQ ID NO.:11, SEQ ID NO.:12 и SEQ ID NO.:13.

Варибельный регион легкой цепи, экспрессируемый для создания гуманизированных или гибридных антител может, таким образом, содержать SEQ ID NO.:11, SEQ ID NO.:12 и SEQ ID NO.:13.

При помощи способа, описанного в данном документе, определяющие комплементарность области, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO.:4, SEQ ID NO.:5 и SEQ ID NO.:6, предпочтительно, импортированные в варибельный регион легкой цепи натурального человеческого антитела. Нуклеиновая кислота, используемая для создания гуманизированных или гибридных антител может, таким образом, кодировать SEQ ID NO.:4, SEQ ID NO.:5 и SEQ ID NO.:6. Варибельный регион легкой цепи, экспрессируемый для создания гуманизированных или гибридных антител может, таким образом, содержать SEQ ID NO.:4, SEQ ID NO.:5 и SEQ ID NO.:6.

При помощи способа, описанного в данном документе, определяющие комплементарность области, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO.:14, SEQ ID NO.:15 и SEQ ID NO.:16, предпочтительно, импортированные в варибельный регион легкой цепи натурального человеческого антитела. Нуклеиновая кислота, используемая для создания гуманизированных или гибридных антител может, таким образом, кодировать SEQ ID NO.:14, SEQ ID NO.:15 и SEQ ID NO.:16. Варибельный регион легкой цепи, экспрессируемый для создания гуманизированных или гибридных антител может, таким образом, содержать SEQ ID NO.:14, SEQ ID NO.:15 и SEQ ID NO.:16.

В ином аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения гуманизированного или гибридного антитела, который может включать трансформацию клетки-носителя нуклеиновой кислотой, кодирующей варибельный регион тяжелой цепи, описанный в данном документе.

Примерными воплощениями подходящих варибельных областей тяжелой цепи служат те области нечеловеческого антитела, которые могут содержать три области, определяющие комплементарность, обладающие аминокислотными последовательностями SEQ ID NO.:1, SEQ ID NO.:2 и SEQ ID NO.:3 и каркасную область тяжелой цепи натурального человеческого антитела, обладающую, по меньшей мере, 70% идентичностью с каркасной областью тяжелой цепи нечеловеческого антитела.

Предпочтительно, натуральное человеческое антитело может содержать (определенное количество) аминокислотные остатки области тяжелой цепи, определяющей комплементарность, одинаковые или практически одинаковые с остатками области, определяющей комплементарность (например, всех трех областей, определяющей комплементарность) нечеловеческой тяжелой цепи.

Примерными воплощениями подходящих варибельных регионов тяжелой цепи служат те области нечеловеческого антитела, которые могут содержать три региона, определяющих комплементарность, обладающие аминокислотными последовательностями SEQ ID NO.:11, SEQ ID NO.:12 и SEQ ID NO.:13 и каркасную

область тяжелой цепи натурального человеческого антитела, обладающую, по меньшей мере, 70% идентичностью с каркасной областью тяжелой цепи нечеловеческого антитела. Предпочтительно, натуральное человеческое антитело может содержать (определенное количество) аминокислотные остатки области тяжелой цепи, определяющей комплементарность, одинаковые или практически одинаковые с остатками области, определяющей комплементарность (например, всех трех областей, определяющей комплементарность) нечеловеческой тяжелой цепи.

Способ по настоящему изобретению может, далее, содержать трансформирование клетки-носителя при помощи нуклеиновой кислоты, кодирующей комплементарную легкую цепь.

При необходимости, комплементарная легкая цепь может кодироваться той же нуклеиновой кислотой, которая кодирует тяжелую цепь.

Подобная комплементарная легкая цепь может содержать вариабельный регион легкой цепи, который может содержать три области, определяющие комплементарность, обладающие аминокислотными последовательностями SEQ ID NO.:4, SEQ ID NO.:5 и SEQ ID NO.:6 и каркасную область легкой цепи натурального человеческого антитела, обладающую, по меньшей мере, 70% идентичностью с каркасной областью легкой цепи нечеловеческого антитела. Предпочтительно, натуральное человеческое антитело может содержать (определенное количество) аминокислотные остатки области легкой цепи, определяющей комплементарность, одинаковые или практически одинаковые с остатками области, определяющей комплементарность (например, всех трех областей, определяющей комплементарность) нечеловеческой легкой цепи.

Подобная комплементарная легкая цепь может содержать вариабельный регион легкой цепи, который может содержать три области, определяющие комплементарность, обладающие аминокислотными последовательностями SEQ ID NO.:14, SEQ ID NO.:15 и SEQ ID NO.:16 и каркасную область легкой цепи натурального человеческого антитела, обладающую, по меньшей мере, 70% идентичностью с каркасной областью легкой цепи нечеловеческого антитела. В предпочтительном воплощении, натуральное человеческое антитело может содержать (определенное количество) аминокислотные остатки области легкой цепи, определяющей комплементарность, одинаковые или практически одинаковые с остатками области, определяющей комплементарность (например, всех трех областей, определяющей комплементарность) нечеловеческой легкой цепи.

В еще одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения гуманизированного или гибридного антитела, который может включать трансформацию клетки-носителя нуклеиновой кислотой, кодирующей вариабельный регион легкой цепи.

Примерные воплощения подходящего вариабельного региона легкой цепи являются теми вариабельными областями, которые могут содержать три области, определяющие комплементарность, обладающие аминокислотными последовательностями SEQ ID NO.:4, SEQ ID NO.:5 и SEQ ID NO.:6 и каркасную область легкой цепи натурального человеческого антитела, обладающую, по меньшей мере, 70% идентичностью с каркасной областью легкой цепи нечеловеческого антитела. Предпочтительно, натуральное человеческое антитело содержит (определенное количество) аминокислотные остатки области легкой цепи, определяющей комплементарность, одинаковые или практически одинаковые с остатками области, определяющей комплементарность (например, всех трех областей, определяющей комплементарность) нечеловеческой легкой цепи.

Примерные воплощения подходящего вариабельного региона легкой цепи являются

теми вариабельными областями, которые могут содержать три области, определяющие комплементарность, обладающие аминокислотными последовательностями SEQ ID NO.:14, SEQ ID NO.:15 и SEQ ID NO.:16 и каркасную область легкой цепи натурального человеческого антитела, обладающую, по меньшей мере, 70% идентичностью с каркасной областью легкой цепи нечеловеческого антитела. Предпочтительно, натуральное человеческое антитело содержит (определенное количество) аминокислотные остатки области легкой цепи, определяющей комплементарность, одинаковые или практически одинаковые с остатками области, определяющей комплементарность (например, всех трех областей, определяющей комплементарность) нечеловеческой легкой цепи.

Способ по настоящему изобретению может, далее, содержать трансформирование клетки-носителя при помощи нуклеиновой кислоты, кодирующей комплементарную тяжелую цепь.

При необходимости, комплементарная тяжелая цепь может кодироваться той же нуклеиновой кислотой, которая кодирует легкую цепь.

Фармацевтические композиции антител и их использование

В ином аспекте, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, которая может содержать, к примеру, гуманизированное или гибридное антитело, описанное в данном документе, антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, изолированное антитело, описанное в данном документе и фармацевтически приемлемый носитель.

В других аспектах, изобретение относится к использованию изолированного антитела или антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе, с терапевтической или диагностической целью.

В другом аспекте изобретение относится к комбинированной терапии, включающей фармацевтическую композицию, описанную в данном документе и химиотерапевтический препарат.

В соответствии с настоящим изобретением, фармацевтическая композиция может вводиться (или быть вводимой) одновременно с химиотерапевтическим препаратом.

Также, в соответствии с настоящим изобретением, фармацевтическая композиция и химиотерапевтический препарат могут вводиться (или быть вводимыми) с различными временными интервалами.

Далее, в соответствии с настоящим изобретением, химиотерапевтический препарат может быть конъюгирован с антителом или антигенсвязывающим фрагментом.

Помимо активных компонентов, фармацевтическая композиция может содержать фармацевтически приемлемые носители, включая воду, фосфатно-солевой буферный раствор, растворы солей, желатина, масла, спирты, иные вспомогательные компоненты, способствующие получению препаратов активного вещества, которые можно использовать фармацевтически. В других случаях, такие препараты могут быть стерилизованы.

При использовании в данном документе, термин «фармацевтическая композиция» обозначает терапевтически эффективное количество препарата вместе с фармацевтически приемлемыми растворителями, консервантами, растворителями, эмульгаторами, адъювантами и/или носителями. Термин «терапевтически эффективное количество», при использовании в данном документе, обозначает такое количество, которое обеспечивает терапевтический эффект при определенном состоянии и режиме ввода. Такие композиции могут являться жидкостями, лиофилизированными или иным образом высушенными составами, включать растворители с различным буферным

содержимым (например, трис-НCl., ацетаты, фосфаты), pH и ионной силой, добавки, например, альбумин или желатин для предотвращения абсорбции к поверхностям, ПАВ (например, Твин-20, Твин-80, Pluronic F68, соли желчных кислот). Растворители (например, глицерин, полиэтиленгликоль), антиоксиданты (например, аскорбиновую кислоту, натрия метабисульфит), консерванты (например, тимеросал, бензиловый спирт, парабены), вещества, придающие объем и корректоры тоничности (например, лактозу, маннитол), ковалентно присоединенные полимеры, например, полиэтиленгликоль, сшитый с белком, комплексы с ионами металлов; материалы могут быть внедрены в конкретные препараты полимерных соединений, например, полимолочную кислоту, полигликолевую кислоту, гидрогели и т.д., либо в липосомы, микроэмульсии, мицеллы, униламеллярные или мультиламеллярные пузырьки, тени эритроцитов, сферопласты. При использовании таких композиций можно регулировать агрегатное состояние, растворимость, стабильность, скорость высвобождения *in vivo*, скорость клиренса *in vivo*. Композиции с контролируемым или поддерживаемым высвобождением вещества включают формы в липофильных депо (например, жирных кислотах, восках, маслах). Также, изобретение охватывает композиции с частицами, покрытыми полимерами (например, поллоксамерами или поллоксаминами). Иные воплощения композиций по изобретению охватывают формы с защитными покрытиями, ингибиторами протеаз или усилителями проникновения по различным путям введения, включая парентеральный, легочный, назальный, оральный, вагинальный, ректальный пути. В одном воплощении, фармацевтическая композиция вводится парентерально, параканцерально, трансмукозально, трансдермально, внутримышечно, внутривенно, внутрикожно, подкожно, интраперитонеально, интравентрикулярно, интракраниально и внутрь опухоли.

Далее, при использовании в данном документе, термин «фармацевтически приемлемый носитель» или «фармацевтический носитель», являются известными в отрасли и включают, но не ограничиваясь перечисленным, 0,01-0,1 М или 0,05 М фосфатный буфер или 0,8% физраствор. Также, такие фармацевтически приемлемые носители могут являться водными или неводными растворами, суспензиями, эмульсиями. Примерами неводных растворителей служат пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, например, оливковое, инъекционные органические эфиры, например, этилолеат. Водные носители включают воду, спирто-водные растворы, эмульсии или суспензии, включая физиологический раствор и буферные среды. Носители для парентерального введения включают раствор натрия хлорида, декстрозный раствор Рингера, раствор декстрозы и натрия хлорид, лактатный раствор Рингера или жирные масла. Носители для внутривенного введения включают жидкости и растворы для возмещения питательных веществ, электролитов, например, основанные на декстрозном растворе Рингера и тому подобное. Также, в составе могут присутствовать консерванты и иные добавки, например, антимикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие агенты, инертные газы и тому подобное.

Фармацевтические композиции, используемые в рамках данного изобретения, могут вводиться рядом путей, включая, но не ограничиваясь перечисленным, прием внутрь, введение внутривенно, внутримышечно, внутриартериально, интрамедуллярно, интратекально, внутрисуставно, трансдермально, подкожно, интраперитонеально, интраназально, энтерально, местно, сублингвально, ректально.

Термин «лечение» для целей данной публикации, относится и к терапии и к профилактическим мерам, имеющими целью предотвратить или замедлить (уменьшить) целевое патологическое состояние или нарушение. К нуждающимся в терапии

причисляют тех пациентов, у которых уже развилось нарушение, а также тех, которые предрасположены к нему или те, которые нуждаются в его профилактике.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты могут применяться для лечения различных заболеваний. В определенных случаях, антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут взаимодействовать с клетками, экспрессирующими интересующий антиген и индуцирующими иммунологическую реакцию посредством опосредованной антителами клеточной цитотоксичности. В других случаях, антитела или фрагменты могут блокировать взаимодействие антигена с его белковыми партнерами. В иных случаях, антитела или фрагменты могут секвестрировать антиген.

«Химиотерапевтический агент» - соединение, использующееся для лечения рака. Примерами химиотерапевтических препаратов служат алкилирующие препараты, например, тиотепа и циклофосфамид; алкилсульфонаты, например, бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, например, бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метилмеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентифосфамид и триметилломеламин; азотистые иприты, например, хлорамбуцил, хломафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлоретамин, мехлоретамин оксида гидрохлорид, мелфалан, новэмбихин, фенестрин, преднимустин, трофосфамид, уромустин; производные нитрозомочевины, например, кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики например, аклациномицины, актиномицин, отрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, калихеамицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эзрубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, микофеноловую кислоту, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфирамицин, пуромицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, например, метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, например, деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пурина, например, флударабин, 6-меркаптопурин, тиампирин, тиогуанин; аналоги пиримидина, например, анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидеоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, например, калустерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; ингибиторы синтеза гормонов надпочечников, например, аминоглутетимид, митотан, трилостан; заместители фолиевой кислоты, например, фолиниевая кислота; ацеглатон; альдофосфамида гликозид; аминоклевулиновая кислота; амсакрин; бестрабуцид; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демекольцин; диазиквон; эльфомитин; эллиптиния ацетат; этоглуцид; галлия нитрат; гидроксимочевина; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK7; разоксан; сизофиран; спирогерманий; теназониновая кислота; триазиквон; 2,2',2"-трихлотриэтиламин; уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ara-C»); циклофосфамид; тиотепа; таксаны, например, паклитаксел и доцетаксел; хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, например, цисплатин и карбоплатин; винбластин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин C; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навелбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоптерин; зелода; ибандронат; CPT-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (DMFO); ретиноевая кислота; эсперамицины; капецитабин; фармацевтически приемлемые соли, кислоты, производные любого из перечисленного выше. Также в это определение

включены антигормональные агенты, которые действуют таким образом, чтобы регулировать или ингибировать гормональное воздействие на опухоли, например, антиэстрогены, включая, к примеру, тамоксифен, ралоксифен, ингибиторы ароматазы 4(5)-имидазолы, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон, торемифен (фарестон); антиандрогены, например, флутамид, нилутамид, бикалутамид, леупролид, гозерелин; фармацевтически приемлемые соли, кислоты, производные любого из перечисленного выше.

Конъюгаты антител

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению может быть конъюгирован с детектируемым фрагментом (например, для целей детектирования или диагностики) или с терапевтическим фрагментом (для терапевтических целей, например, с химиотерапевтическим агентом).

Под «детектируемым фрагментом» понимается фрагмент, детектируемый спектроскопическими, биохимическими, иммунохимическими, химическими и/или иными физическими способами. Детектируемый фрагмент может быть связан напрямую или не напрямую (например, через сшивающий агент, в том числе, но не ограничиваясь перечисленным, DOTA (1,4,7,10-тетраазоциклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота) или NHS (N-гидроксисукцинимид)) с антителами и их антигенсвязывающими фрагментами согласно настоящему изобретению при помощи способов, известных в отрасли. Может использоваться множество детектируемых фрагментов, в зависимости от требуемых чувствительности, легкости конъюгации, стабильности и доступного оборудования. Подходящие детектируемые фрагменты включают, не ограничиваясь перечисленным, флуоресцентные метки, радиоактивные метки (например, не ограничиваясь перечисленным, ^{125}I , In^{111} , Tc^{99} , I^{131} и позитрон-эмитирующие изотопы для позитронно-эмиссионных сканирующих томографов и т.д.), метки для ядерного магнитного резонанса, люминесцентные метки, хемилюминесцентные метки, хромофорные метки, ферментные метки (к примеру, не ограничиваясь перечисленным, пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу и т.д.), квантовые точки и/или наночастицы. Детектируемый фрагмент может вызывать и/или производить детектируемый сигнал, что позволяет осуществить его детектирование.

В ином примерном воплощении изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть связаны (модифицированы) с терапевтическим фрагментом (например, препаратом, цитотоксическим фрагментом).

В примерном воплощении, антитела и антигенсвязывающие фрагменты могут содержать химиотерапевтический агент или цитотоксический агент. К примеру, антитела и антигенсвязывающие фрагменты могут быть конъюгированы с химиотерапевтическим агентом или цитотоксическим агентом. Помимо приведенных в иных местах настоящей заявки, к таким терапевтическим или цитотоксическим агентам относятся, не ограничиваясь перечисленным, иттрий-90, скандий-47, рений-186, иод-131, иод-125, а также множество иных агентов, известных специалистам в данной отрасли (например, лютеций (например, Lu^{177}), висмут (например, Bi^{213}), медь (например, Cu^{67})). В иных случаях, химиотерапевтический или цитотоксический агент может содержать, среди прочих, известных специалистам в данной отрасли, 5-фторурацил, адриамицин, иринотекан, таксаны, псевдомонадный эндотоксин, рицин и иные токсины.

Альтернативно, для осуществления способов по настоящему изобретению и способов, известных в отрасли, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению (конъюгированный и неконъюгированный), могут использоваться в комбинации со второй молекулой (например, с вторичным антителом и т.д.), которая

способна специфически связываться с антителом или антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению и которая может нести желаемую детектируемую, диагностическую или терапевтическую группу.

Терапевтические методики

5 В дальнейшем аспекте, изобретение относится к способу уменьшения роста раковых клеток, экспрессирующих кластерин или уменьшения объема опухоли, содержащей клетки, экспрессирующие кластерин. Способ может включать, например, введение нуждающемуся млекопитающему анти-кластеринового антитела, например, поликлонального антитела, моноклонального антитела, химерного антитела, гуманизированного антитела, изолированного человеческого антитела, гибридного антитела или его фрагмента.

Способ, далее, может включать введение химиотерапевтического препарата.

Настоящее изобретение, также, относится в дополнительном аспекте к способу лечения заболеваний, ассоциированных с повышенной экспрессией или секрецией кластерина. Способ может включать введение гуманизированного или гибридного антитела, описанного в данном документе, антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе или изолированного антитела, описанного в данном документе, млекопитающему, испытывающему в этом необходимость.

К млекопитающему, испытывающему необходимость в введении, способному 20 получить благоприятный эффект от данного терапевтического способа, может быть отнесено млекопитающее с карциномой, млекопитающее с повышенным уровнем кластерина плазмы или крови, млекопитающее, у которого выявлены или подозреваются присутствие клеток, способных к эпителиально-мезенхимальному переходу, млекопитающее с заболеванием, связанным с повышенным уровнем кластерина (пре-кластерина или секретируемого кластерина) или с экспрессией, либо секрецией кластерина (включая кластерин крови или плазмы) и т.д.

В другом аспекте изобретение относится к использованию гуманизированного или гибридного антитела, описанного в данном документе, антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе или изолированного антитела, описанного 30 в данном документе, при производстве лекарственного препарата для терапии заболевания, связанного с экспрессией или секрецией кластерина.

Наборы и анализы

В еще одном аспекте настоящее изобретение предоставляет набор, включающий флакон или флаконы, которые могут содержать, к примеру, гуманизированное или гибридное антитело, описанное в данном документе, антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, изолированное антитело, описанное в данном документе. Набор может использоваться для целей детектирования или терапевтических 35 целей.

В ином примерном воплощении набор может включать изолированную нуклеиновую кислоту, описанную в данном документе или вектор, описанный в данном документе. Подобный набор может быть пригоден для выявления комплементарных нуклеиновых кислот, экспрессирующих кодируемый ими белок или чего-либо иного.

Настоящее изобретение, также, относится к способу детектирования кластерина (пре-кластерина и секретируемого кластерина) при контактировании образца, содержащего кластерин или образца, в котором предполагается присутствие кластерина, с гуманизированным или гибридным антителом, описанным в данном документе, антигенсвязывающим фрагментом, описанным в данном документе, изолированным антителом, описанным в данном документе. Детектирование производится на 45

оборудовании, оснащенном датчиками, способными выявить связывание антигена с антителом (например, на VIAcoreTM, считывающем устройстве для микропланшетов, спектрофотометре и т.д.). Подобное оборудование может быть сопряжено с компьютером.

При использовании в данном документе термин «трехмерная структура, сходная с или наложимая на» в применении к вариабельному региону означает, что, при использовании компьютерной модели, определенный вариабельный регион имеет конформацию, способную соединиться со связывающим участком антигена таким же способом, что и иная вариабельная область. Вариабельные области называют наложимыми, если на компьютерном представлении, аминокислоты одного вариабельного региона занимают такие же положения в пространстве, что и аминокислоты другой вариабельной области.

При использовании в данном документе, термин «моделированная вариабельная область» обозначает компьютерное представление вариабельной области, полученной из известных трехмерных структур близкородственных вариабельных областей антител.

При использовании в данном документе, термин «нечеловеческий» охватывает, без ограничений, грызунов (напр., мышей, крыс и т.д.), кроликов, нечеловекообразных обезьян и т.д.

При использовании в данном документе, термин «аминокислоты нечеловеческой области, определяющей комплементарность» обозначает, что аминокислотные остатки области, определяющей комплементарность, происходят не от человека, обычно от грызуна, например, мыши.

При использовании в данном документе, термин «нечеловеческое родительское антитело» охватывает антитела, полученные не от людей и используемые в качестве исходного материала для процедур гуманизирования.

При использовании в данном документе, термин «трансформация клетки-носителя» включает ряд техник, известных в отрасли, предназначенных для переноса или внедрения желаемой нуклеиновой кислоты в клетку-носитель. К таким техникам относятся, не ограничиваясь перечисленным, трансфекция, инфекция, липофекция, инъекция, трансдукция, нуклеофекция, электропорация, сонопорация, тепловой шок, магнитофекция и т.д.

Термин «импортирование» касательно нечеловеческих областей, определяющих комплементарность легких или тяжелых цепей, охватывает физические и компьютерные способы, например, технологии клонирования, химического синтеза нуклеиновых кислот или белков, компьютерное генерирование гуманизированных антител и т.д. При использовании в данном документе, термин «практически одинаковый» касательно количества аминокислот, означает, что допустима вариация в +/- 3 аминокислоты, либо, предпочтительно, в +/- 2 аминокислоты, либо, еще более предпочтительно, в +/- 1 аминокислоту.

Пример 1- Гуманизирование анти-кластериновых мышечных моноклональных антител 3D-моделирование вариабельных областей мышечного 16B5 моноклонального антитела

Данное задание было выполнено мутированием 3 остатков легкой цепи и 7 остатков тяжелой цепи в доступных кристаллических структурах двух различных мышечных антител (коды Protein Data Bank (PDB) 1Q9Q и 1TY7, соответственно) с последующим соединением легкой и тяжелой цепей посредством совмещения шаблонных структур. Часть петли CDR-H3 основывалась на структуре другого антитела (код PDB 1UJ3, гуманизированное антитело), которое тоже обладает высоким сходством в

последовательности с тяжелой цепью 16B5 но, в отличие от мышинной шаблонной структуры, имеет такую же длину петли CDR-H3. Результирующая структура была уточнена с целью минимизации энергии при помощи силового поля AMBER и использовалась в последующем анализе. В данном случае ожидалось высокое качество полученной гомологической модели, с высокой степенью гомологичности мышинной последовательности 16B5 с доступными структурными шаблонами. Сравнимые результаты были получены в параллельных контрольных экспериментах по гомологическому моделированию, в которых авторами производилось моделирование переменного региона мышинного 16B5 при помощи обычных программ моделирования 3D-гомологии Modeller или Composer, либо специализированного для 3D-моделирования гомологии антител ПО, типа WAM. Сведения о моделированных переменных областях мышинного антитела 16B5 приведены на фиг. 1.

Определение характеристик исходных донорских (мышинных) последовательностей 16B5 и моделированной структуры

Данный этап проводился, чтобы оценить индекс соответствия человеческой структуре, установить границы областей, определяющих комплементарность, определить канонические остатки, межцепочечную упаковку (поверхностные остатки переменных областей тяжелой и легкой цепей (VH/VL)), упаковку переменных/константных областей (поверхностные остатки VH/CH и VL/CL), необычные остатки каркасной области, сайты потенциального N- и O- гликозирования, скрытые остатки, остатки зоны Вернье, близость к определяющим комплементарность областям. Для оценивания этих характеристик использовались ресурсы, доступные в интернете и локальное ПО.

Выбор наилучших каркасных областей легкой и тяжелой цепей для мышинных определяющих комплементарность регионов

Выбор наилучших каркасных областей легкой и тяжелой цепей осуществлялся путем стандартного сравнения гомологии последовательностей относительно локальной копии базы человеческих зародышевых линий (VBASE), относительно других библиотек последовательностей (Genbank и SwissProt), а также набора человеческих каркасных консенсусных последовательностей. Для определения совпадений последовательностей с наибольшей гомологией в каркасной области (исключая, таким образом, определяющие комплементарность области), и с поддержанием длины петель определяющих комплементарность областей, был произведен поиск BLAST. Структуры человеческих или гуманизированных переменных последовательностей, наиболее сходных с переменными последовательностями 16B5, идентифицированные в PDB, были наложены на моделированную структуру переменного региона 16B5 для сравнения структур. Несколько наиболее последовательностей подобных человеческих каркасных областей были отобраны, чтобы оценить аминокислотную изменчивость в позициях, пригодных для мутирования, а также, чтобы собрать набор подходящих каркасных последовательностей в случае утраты аффинности после гуманизирования. Наиболее близкие человеческие каркасные области были выровнены относительно мышинных последовательностей 16B5, см. фиг. 2.

Идентификация мышинных каркасных остатков, которые могут влиять на конформацию и связывание антигена

Идентификация мышинных каркасных остатков, которые могут влиять на конформацию и связывание антигена, является важным шагом, при котором определяются аминокислотные остатки, которые должны быть мутированы, чтобы в наибольшей мере соответствовать человеческим последовательностям. Данные остатки являются основными кандидатами для обратных мутаций к мышинным

последовательностям в случае утраты аффинности. Этот этап гуманизирования наиболее сложен и непредсказуем, особенно в отсутствие экспериментальной структуры комплекса антиген-антитело. Данный этап основывается на идентификации остатков одной или

большого количества следующих категорий: канонических, CDR-H3, зоны Вернье, необычных, близких к CDR (в пределах 5 ангстрем), межцепочечной упаковки, сайтов гликозилирования. Данные остатки могут оказывать прямое и косвенное влияние на антигенсвязывающие сайты и аффинность. Для получения финальных гуманизированных последовательностей анти-кластеринового моноклонального антитела 16B5

потребовалось ввести 13 мутаций в каркасную область легкой цепи и 22 мутации в каркасную область тяжелой цепи относительно мышиных последовательностей, не затрагивая области, определяющие комплементарность. Неожиданностью явилось то, что при тщательном структурном и сравнительном анализе последовательностей, была выявлена высокая вероятность сохранения антигенсвязывающей аффинности при введении всех этих мутаций, что обеспечивает наибольшую степень гуманизирования, которую позволяют способы прививки областей, определяющих комплементарность (т.е., 100%, исключая области, определяющие комплементарность). 3D-моделирование разработанного гуманизированного антитела подтверждает данное предсказание. Авторами были идентифицированы кандидатные остатки для обратных мутаций, включая остатки, близкие к области, определяющей комплементарность (3 в легкой

цепи и 9 в тяжелой цепи в пределах 5 Å от областей, определяющих комплементарность), один легкоцепочечный остаток, контактирующий с тяжелой цепью, а также несколько скрытых остатков (и, как следствие, вероятно, не иммуногенных), которые могут быть конвертированы обратно в соответствующие мышиным последовательностям (4 в легкой цепи и 6 в тяжелой цепи). Мутированные остатки и кандидатные остатки для обратных мутаций показаны на фигуре 1 и фигуре 2.

Дополнительный структурный анализ

До передачи гуманизированной последовательности на рекомбинантную экспрессию, был выполнен дополнительный структурный анализ, который включал выбор сигнального пептида, выбор изоформа, анализ структурной совместимости в областях сочленений переменных и константных регионов. Помимо этого, сравнительный анализ межцепочечной упаковки и упаковки переменных и константных областей у мышиного и гуманизированного антитела показал, что в случае гуманизирования 16B5, допустимо образовывать гибридные антитела путем комбинирования гуманизированных и химерных (с мышиными переменными областями) цепей, например, мышиное/мышиное (М/М), мышиное/гуманизированное (М/Н), гуманизированное/мышиное (Н/М) и гуманизированное/гуманизированное (Н/Н) при спаривании легких/тяжелых цепей. Для анти-кластериновых антител был выбран человеческий изоформ IgG2. Человеческий изоформ IgG2 не несет выраженных эффекторных функций, что свойственно для блокирующих антител, описанных в данном документе. Помимо этого, человеческий изоформ IgG2 в меньшей степени подвержен протеолитическому разрезанию, что обеспечивает большую стабильность этих антител *in vivo*.

3D-моделирование переменных областей мышиного 21B12 моноклонального антитела

Моделирование мышиного анти-кластеринового антитела 21B12 проводилось аналогично 16B5. Полученное гуманизированное антитело 21B12 было на 100% гуманизировано и обладало 18 мутациями в тяжелой цепи и 14 мутациями в легкой цепи. Мутированные остатки и кандидатные остатки для обратных мутаций показаны на фигуре 7 и фигуре 8.

Пример 2. Кинетический анализ анти-кластериновых антител

Целью данных исследований было определить кинетические параметры анти-кластериновых антител. В частности, определить, влияет ли гуманизирование моноклональных анти-кластериновых антител 16B5 и 21B12 на кинетические параметры их связывания с человеческим кластерином. С этой целью был выполнен кинетический анализ с использованием ВІАcore 3000. Человеческий кластерин был иммобилизован на сенсорном чипе. Антитела полной длины или фрагменты Fab были инжестированы для взаимодействия с иммобилизованным кластерином. В данном примере описывается работа с антителом 16B5, антитело 21B12 подготавливалось и анализировалось аналогичным образом.

Иммобилизация кластерина

Во всех экспериментах ВІАcore в качестве подвижного буфера использовался буфер HBST (10мМ HEPES pH 7,4, 135 мМ NaCl, 3,4 мМ ЭДТА, 0,005% Твин-20).

Рекомбинантный мономерный кластерин был иммобилизован на чипе CM3 способом спаривания с нормальным амином на потоке 5 мкл/мин. Поверхность была активирована 35 мкл смеси 50мМ N-гидроксисукцинимиды и 0,2М дихлорэтана.

Кластерин в 10мМ натрий-ацетатном растворе с pH 4,5 инжестировали до захвата нужного количества (ниже 60RU). Непрореагировавшие эфиры были деактивированы 35 мкл 1М этаноламина гидрохлорида-NaOH с pH 8,5. Контрольная поверхность была подготовлена аналогичным образом путем инжестирования смеси N-гидроксисукцинимиды и 0,2М дихлорэтана и этаноламина.

Приготовление гуманизированных анти-кластериновых антител IgG2

Векторы экспрессии, содержащие кДНК, кодирующую легкие и тяжелые цепи иммуноглобулинов, были экспрессированы в 293 клетках с использованием способов временной трансфекции, известных в отрасли. Зрелый IgG2 собирался из среды, не содержащей сыворотки, на которой росли клетки, благодаря сигнальным пептидам, внедренным на N-концах обеих иммуноглобулиновых цепей. Рост клеток продолжался 5 дней после трансфекции, по истечении которых культуральная среда была отобрана для выделения IgG2 химерных моноклональных антител. Белок был очищен при помощи Protein-A агарозы согласно рекомендациям производителя (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Оуквилль, Онтарио).

Получение мышинных 16B5 и НН 16B5 Fab

Мышиный иммуноглобулин 16B5 IgG был обработан папаином в молярном соотношении 1:100 4 часа при комнатной температуре. Ферментация была остановлена путем добавления ингибитора папаина Е64 в молярном соотношении 4:1. Фрагменты Fab были отделены от фрагментов Fc путем хроматографии на колонке 1 мл HiTrap Protein G. Фрагменты Fab были элюированы из колонки 0,1 М раствором глицина с pH 2,7. Уровень pH тут же нейтрализовывался путем сбора элюата фракциями по 1 мл в пробирки с 100 мкл 2 М Трис с pH 9. Фракции, содержащие Fab, были объединены и концентрированы на центрифужном концентраторе Amicon Ultra 4 с порогом отсечения по молекулярной массе, равным 30 кДа. Образцы были пропущены через эксклюзионную колонку Superose 12 (10×300 мм) в 20 мМ HEPES, pH 7,5, 200 мМ NaCl, чтобы разделить фракции Fab и F(ab')₂. Фракции, содержащие Fab, были объединены и концентрированы на центрифужном концентраторе Amicon Ultra 4 с порогом отсечения по молекулярной массе, равным 30 кДа.

Получение НН 16B5 Fab осуществлялось по той же схеме, что и мышинового Fab, за исключением того, что ферментация проводилась 20 часов при комнатной температуре, а фрагменты Fab и Fc разделялись на колонке HiTrap Protein A, а не HiTrap Protein G.

Продолжительность ферментации была увеличена на основании результатов маломасштабного испытания по удалению F(ab')₂. Эксклюзионный профиль показал, что при большей длительности ферментации уменьшалось, хотя и не полностью, содержание фрагментов F(ab')₂. Protein A использовался вместо Protein G, чтобы избежать воздействия низкого pH на фрагменты Fab, которое требуется для их элюирования из Protein G. Фрагменты Fab продвигались через колонку Protein A, а фрагменты Fc ею удерживались. Эксклюзионная сепарация проводилась в фосфатно-солевом буфере, а не буфере HEPES. Аналогичные способы использовались для получения фрагментов 21B12.

Кинетический анализ мышинных 16B5, НН16B5 и Fab

Кинетический анализ проводился на потоке 50 мкл/мин. Антитела с полной длиной (мышинные или гуманизированные) или Fab были разбавлены буфером HBST. Интервал концентраций составлял 1,953-31,25 нМ для антител с полной длиной и 15,625-250 нМ для Fab. Раствор с каждым уровнем концентрации инжестировали над кластерином и контрольной поверхностью в течение 5 минут, затем осуществляли диссоциирующую отмывку 5 минут. Перед каждой инъекцией антител, поверхность кластерина регенерировали 50 мкл 20 мМ HCl.

Кинетический анализ антител, связывающихся с кластерином

На фигуре 3 представлены результаты, полученные при определении кинетических параметров анти-кластериновых антител полной длины 16B5 и Fab.

Кинетические параметры гуманизированного антитела с полной длиной 16B5 (НН16B5) очень подобны с кинетическими параметрами мышинного антитела полной длины (16B5), что позволяет сделать вывод о том, что гуманизирование не влияет на связываемость антитела с кластерином. Однако, кинетические параметры гуманизированного 16B5 Fab (НН16B5 Fab) несколько лучше, нежели кинетические параметры Fab мышинного антитела (16B5 Fab), что также позволяет сделать вывод о том, что гуманизирование не влияет на связываемость антитела с кластерином. Величина K_D взаимодействия между иммобилизированным человеческим кластерином и мышинным 16B5 или гуманизированным 16B5 находится в интервале небольших нМ. Способ в развитии может использоваться для сравнения кинетических параметров во время процесса гуманизирования анти-кластериновых антител.

На фигуре 9 представлены результаты, полученные при определении кинетических параметров анти-кластериновых антител полной длины 21B12 и Fab. Как уже было сказано для 16B5, для гуманизированных 21B12 (НН21B12) были определены показатели связывания, аналогичные параметрам родительского мышинного антитела 21B12. Величина K_D взаимодействия между иммобилизированным человеческим кластерином и мышинным 21B12 или гуманизированным 21B12 находится в интервале небольших нМ. Способ в развитии может использоваться для сравнения кинетических параметров во время процесса гуманизирования анти-кластериновых антител.

Пример 3. Биологическая активность h16B5 в клеточных анализах

Данные исследования были произведены, чтобы сравнить биологическую активность h16B5 с активностью мышинного 16B5. Для тестирования h16B5 использовались два анализа, при помощи которых ранее было показано, что блокирование кластерина моноклональным антителом может уменьшать миграцию и инвазию раковых клеточных линий.

Для тестирования активности анти-кластериновых антител на миграцию раковых клеток, использовался стандартный тест затяжения ран, или тест царапины. Анализ заключался в выращивании с высокой плотностью клеток линии мышинной карциномы

ЕМТ6 с последующим нанесением раны, процарапывая слой клеток. В момент времени 0, видна широкая обнаженная область, быстро затягивающаяся при инкубировании клеток при 37°C 15ч (см. фиг. 4 сверху слева). При инкубировании клеток в присутствии либо поликлональных анти-кластериновых антител, доступных в продаже (C-18, Santa Cruz Biotech, Санта-Круз, Калифорния), либо мышинных антител 16B5, выделенных из оригинальной гибридомы, отмечалось понижение количества клеток в обнаженной области (см. фиг. 4 сверху справа, с метками *доступные в продаже* и *гибридома 16B5*). При инкубировании поврежденного слоя клеток ЕМТ6 с химерным 16B5 (см. фиг. 4, снизу, метка *ММ*), гибридным антителом, содержащим химерную легкую цепь и гуманизированную тяжелую цепь (см. фиг. 4, снизу, метка *МН*), гибридным антителом, содержащим химерную тяжелую цепь с гуманизированной легкой цепью (см. фиг. 4, снизу, метка *НМ*), либо полностью гуманизированным 16B5 (см. фиг. 4, снизу, метка *НН*), также отмечалось блокирование миграции клеток в обнаженную область. Гуманизированное антитело 16B5 было наиболее эффективным ингибитором.

Дополнительно, способность химерных и гибридных мышинных-человеческих антител ингибировать миграцию показывает, что взаимодействие с кластерином во всех случаях одинаково, независимо от того, какая иммуноглобулиновая цепь содержится в антителе 16B5.

Далее, авторами было определено, может ли h16B5 влиять на инвазивное поведение и рост других клеточных линий, например, линий клеток предстательной железы человека PC3 и DU145, секретирующих эндогенный кластерин в различном количестве. При посеве в матрикеле (фиг. 5, сверху слева), клеточная линия опухоли PC3 образовывала звездчатую структуру с лучами, внедряющимися в матригель, что коррелирует с ее повышенной инвазивностью (Thompson et al., 1992). При обработке h16B5 (фиг. 5, сверху справа), звездчатость существенно уменьшалась, что позволяет предположить, что секреция кластерина дает свой вклад в инвазивность клеток PC3. Клетки DU145 не образовывали звездчатых структур аналогично клеткам PC3, а формировали шарообразные структуры на матрикеле (фиг. 5, снизу слева), которые в присутствии h16B5 образовывались в меньшем количестве и меньших размеров (фиг. 5, снизу справа). Эти результаты показывают, что способность h16B5 уменьшать инвазивность раковых клеточных линий сравнима с исходными мышинными 16B5 и что гуманизирование не влияет на способность взаимодействовать с секретируемым кластерином и блокировать его активность.

Были получены опухоли, происходящие из 4 различных человеческих линий клеток поджелудочной железы, далее их зафиксировали в формалине, залили парафином и разрезали на срезы. Чтобы определить, экспрессируют ли опухоли данного вида рака кластерин, производился иммуногистохимический анализ с антителами h16B5. Опухоли происходили из Aspc-1, VxPC-3, PANC-1 и MiaPaCa-2, все из которых происходили от пациентов с раком поджелудочной железы (ATCC, Манассас, Вирджиния). Залитые парафином образцы эпителиальных опухолей поджелудочной железы были помещены на предметные стекла и зафиксированы в течение 15 минут при 50°C. Депарафинизацию проводили путем 2-кратной обработки ксилолом с последующей дегидратацией 5-минутными промываниями в 100%, 80% и 70% этаноле. Стекла были промыты 2 раза фосфатно-солевым буфером в течение 5 минут и обработаны антигенизвлекающим раствором (цитрат-ЭДТА), чтобы выявить антиген. Эндогенные пероксид-реактивные виды были удалены инкубированием стекол с H₂O₂ в метаноле, блокирование было выполнено инкубированием стекол с блокирующим раствором без сыворотки (Dakocytomation) в течение 20 минут при комнатной температуре. Первичное

моноклональное антитело (контрольный IgG или h16B5) было добавлено на уровне 5 мкг/мл 1 ч при комнатной температуре. H16B5-реактивный кластерин был выявлен путем инкубирования с биотинилированным человеческим анти-каппа антителом, а затем обработкой третичным антителом, конъюгированным со стрептавидин-пероксидазой хрена. Положительное окрашивание осуществлялось путем обработки предметных стекол субстратом диаминобензидина-пероксида водорода не менее 5 минут с последующим контрастным окрашиванием гематоксилином. Как показано на фиг. 11, все четыре опухоли прокрасились позитивно по экспрессированию кластерина (см фиг. 11 справа). Интересно, что в опухолях, устойчивых к химиотерапии (PANC-1 и MisPaCa-2), был отмечен самый высокий уровень секреции кластерина. Клеточная линия PANC-1 была культивирована и выращена на матриксе аналогично линиям рака предстательной железы (см. выше). Клетки были стимулированы TGF β , индуктором эпителиально-мезенхимального перехода и фактором роста, обуславливающим миграцию клеток по мембране в матриксе (см. фиг. 12, сверху справа). При обработке стимулированных клеток антителами h16B5, наблюдалось выраженное ингибирование миграции (фиг. 12, снизу справа). Это свидетельствует о том, что h16B5 может блокировать миграцию клеток рака поджелудочной железы, а также, что антитело имеет потенциал для терапевтической активности при данном виде рака.

Пример 4. Биологическая активность h16B5 в животных моделях рака

Данные исследования были проведены, чтобы измерить эффективность h16B5 *in vivo* на моделях человеческого рака. Сообщалось о том, что антисмысловые олигонуклеотиды и малые интерферирующие РНК к кластерину индуцируют апоптоз и чувствительность к химиотерапии *in vitro* для ксенотрансплантатов рака предстательной железы [1-4]. Используемая модельная система содержала линию клеток рака предстательной железы человека DU145, нечувствительную к андрогенам и представляющую собой одну из наиболее полно охарактеризованных моделей данного заболевания. Мышам с ТКИМ в бок вводили по 2 миллиона клеток подкожно, опухоли выращивали до размера, примерно, 100 мм³. Начиная с 1 дня, вводили h16B5 интраперитонеально в дозировке 5 мг/кг, начиная с 4 дня, вводили интраперитонеально таксотер (ТхТ) в дозировке 10 мг/мг. h16B5 вводили два раза в неделю, а ТхТ вводили один раз в неделю. Как показано на фиг. 6, рост опухолей (первичных) существенно замедлялся у животных, получавших лечение с h16B5, в сравнении с контрольными. Этот эффект наблюдался как в группе монотерапии (при сравнении *контрольной группы с h16B5*, $P=0,0104$), так и в группе комбинированной с ТхТ терапии (при сравнении *ТхТ с h16B5+ТхТ*, $P=0,0395$). Этот результат свидетельствует о том, что блокирование кластерина при помощи h16B5 приводит к уменьшению роста новообразований и увеличивает чувствительность опухолей к ТхТ.

Второе моделированное исследование рака предстательной железы было проведено с другой опухолевой моделью, путем введения клеток рака предстательной железы РС-3. Клетки РС-3 также нечувствительны к гормонам, однако, согласно литературным данным, более инвазивны, нежели клетки DU145. Как было описано выше, клетки были имплантированы подкожно мышам с ТКИМ, лечение начиналось по достижении опухолями объема в ~100 мм³ (назначенный день 1). h16B5 вводился интраперитонеально на день 1 в дозировке 5 мг/кг и далее два раза в неделю, ТхТ вводился интраперитонеально однократно на день 5, в дозировке 10 мг/кг. Схема введений ТхТ была изменена, поскольку было выяснено, что клетки РС-3 существенно более чувствительны к данному химиотерапевтическому препарату в сравнении с опухолями DU145.

Результаты исследования представлены на фиг. 10. Как и ранее, было отмечено, что опухоли у животных, получавших только h16B5, давали практически немедленный ответ к антителам, в сравнении с животными, не получавшими h16B5. К 43 дню терапии размеры опухолей в группе терапии h16B5 были на 37% меньше, чем в контрольной.

Также, контролировалась выживаемость. Было определено, что ко дню смерти всех животных в контрольной группе (день 43), более 60% мышей оставались живыми в группе терапии АВ-16B5. Увеличение общей выживаемости составляло 47% у животных, получавших h16B5.

Отмечалось цитотоксическое влияние ТхТ на клетки рака предстательной железы, однако, опухоли восстанавливались спустя, примерно, 18 дней после инъекции. Рост новообразований в группе приема ТхТ был даже более выраженным, нежели в группе приема АВ-16B5 (см. день 50, фиг. 10). Однако, при назначении h16B5 в комбинации с ТхТ, наблюдалось существенное замедление скорости роста опухолей, в результате опухоли были на 41% меньше, чем в группе, получавшей только ТхТ. В присутствии h16B5 увеличивалась выживаемость животных. При совокупном рассмотрении, результаты данных исследований *in vivo* показывают, что гуманизированное антитело h16B5, ингибирующее функцию секретируемого опухолями кластерина, может существенно замедлять рост новообразований.

Пример 5. Ингибирование интернализации секретируемого кластерина раковыми клетками при помощи Н16В5.

Результаты, приведенные выше, показывают, что индуцирование эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) приводит к секреции кластерина равыми клетками. Дополнительно, согласно нашим данным, кластерин, который секретируется этими раковыми клетками, является мощным индуктором ЭМП. Данные открытия позволяют предположить, что секретируемый кластерин вызывает данный эффект либо косвенно, путем взаимодействия с иными ассоциированными с опухолями факторами в межклеточном матриксе, либо прямо, путем взаимодействия с рецептором на поверхности раковых клеток. Хотя секретируемый кластерин, присутствующий в нормальной сыворотке, может связываться со множеством разных белков, например, с членами каскада реакций комплемента, лептином, различными апополипротеинами, вопрос присутствия белковых партнеров для секретируемого кластерина в раковых клетках или в микросреде опухоли остается практически неизученным. В литературных источниках по данному вопросу, присутствует, например, отчет Jo и сотрудников (Jo *et al.*, 2008), показавших, что секретируемый опухолью кластерин связывается с ИФР-1 в стрессовых условиях, вызванных сывороточной депривацией. Помимо этого, кластерин, содержащийся в клеточных линиях рака предстательной железы, способен взаимодействовать с белком COMMD1 (Zoubeidi *et al.*, 2010). Данное взаимодействие приводило к увеличению активации пути ядерного фактора каппа-В, что, в свою очередь, способствовало выживанию клеток рака предстательной железы. Эти данные прояснили способы, по которым секретируемый кластерин может оказывать влияние на образование опухолей, однако молекулярный механизм, по которому он ускоряет ЭМП, остается неустановленным.

Чтобы начать исследования этого вопроса, были произведены клеточные эксперименты, в которых определялось, взаимодействует ли секретируемый кластерин с раковыми клетками напрямую или посредством других секретируемых факторов в межклеточном пространстве. Чтобы это измерить, секретируемый кластерин был помечен флуоресцентно и инкубирован с клетками мышинной карциномы молочной железы BRI-JM01. Было установлено, что после примерно 24 часов обработки,

флуоресцентный сигнал обнаруживался внутри клеток. Анализ этих клеток с короткими временными интервалами показал, что секретируемый кластерин, помеченный флуоресцентной меткой, был захвачен клетками (см. фиг. 13). Как было продемонстрировано, захват со временем увеличивается, что согласуется с версией о рецептор-обусловленном эндоцитозном пути. Далее, пунктат и перинуклеарное окрашивание через 24 часа (см. белые стрелки на фиг. 13) соответствуют картине, наблюдаемой для белков, которые захватываются эндосомальным путем. Аналогичные результаты наблюдались с клетками рака предстательной железы человека DU145.

Далее проверялось, может ли h16B5 блокировать захват секретируемого кластерина. Клетки были обработаны секретируемым кластерином -Alexa480 в присутствии либо h16B5, либо изотипного контроля IgG. Как показано на фиг. 14, захват секретируемого кластерина клетками JM01 блокировался после добавления h16B5. У клеток, обработанных контролем IgG продолжало наблюдаться внутреннее перинуклеарное окрашивание секретируемого кластерина (см. белые стрелки на фиг. 14).

Данные результаты в совокупности показывают, что интернализация секретируемого кластерина может быть ингибирована путем добавления h16B5, что может быть одним из механизмов ингибирования антителом ЭМП, вызванного секретируемым кластерином в раковых клетках.

Описанные эксперименты могут выполнены с целью определения того, как специфические мутации аминокислотной последовательности антитела (напр., в вариабельной(ых) области(ях), константной области, каркасной области или определяющей комплементарность области(ях)) могут влиять на биологическую активность антитела. К примеру, в каркасную область вариабельной легкой цепи или вариабельной тяжелой цепи h16B5 (или мышинового 16B5) могут быть внедрены одна и более мутаций, далее рост опухоли может оцениваться так, как описано в данном документе.

Связывание вариантных антител и антигенсвязывающих фрагментов с человеческим или мышинным кластерином может определяться при помощи ряда способов, известных в отрасли, например, ИФА (ELISA), вестерн-блоттингом, поверхностным плазмонным резонансом и т.д.

Пример 6. связывание анти-кластериновых антител с вариантами кластерина.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению, связываются как с человеческим, так и с мышинным кластерином. Данные два белка на 77% идентичны по аминокислотной последовательности и на 89% одинаковы (см. фиг. 15). При сравнении аминокислотных последовательностей мышиной и человеческой форм, можно понять, что антитело, вероятно, связывается линейным или конформационным эпитопом, присутствующими в обоих белках. Ожидается, что антитела и антигенсвязывающие фрагменты могут быть способными связываться с иными природными вариантами и синтетическими вариантами кластерина (включая рекомбинантные белки), имеющими, по меньшей мере, 75% (например, 85%, 90%, 95%, 99%, 100%) идентичность в аминокислотной последовательности с человеческим или мышинным кластерином. Например, антитела и антигенсвязывающие фрагменты могут связываться с вариантом кластерина, обладающим аминокислотной последовательностью, содержащей SEQ ID NO.:56 (где + обозначает аминокислотную замену, например, консервативную аминокислотную замену) или SEQ ID NO.:57.

В настоящем изобретении показано, что мишенью анти-кластериновых антител является кластерин, экспрессируемый в человеческих опухолях. Чтобы продемонстрировать взаимодействие анти-кластериновых антител, например, h16B5,

с мышинным опухолевым кластерином, были приготовлены замороженные срезы опухоли молочной железы мыши 4T1, которые затем были инкубированы с h16B5. Замороженные срезы были зафиксированы холодным ацетоном в течение 10 минут, неспецифическое связывание было заблокировано реактивом, поставляемым в составе набора, доступного в продаже (Dako Canada, Inc., Берлингтон, Онтарио). H16B5 был инкубирован со срезами мышинной опухоли в течение 1 часа при концентрации 5 мкг/мл. После отмывки было произведено специфическое окрашивание путем инкубирования с анти-человеческим IgG, конъюгированным с пероксидазой хрена. Контрольный образец был обработан идентичным образом, с человеческим изотипным контролем IgG. Как показано на фиг. 16, h16B5 детектировало мышинный кластерин в опухолях 4T1 (см. справа, метка *4T1-AB-16B5*), о чем свидетельствовало коричневое окрашивание после воздействия пероксидазы хрена. Контрольное антитело не обнаружило антигенов (см. слева, метка *4T1-ct*). Это свидетельствует о том, что анти-кластериновые антитела, например, h16B5, взаимодействуют с мышинным кластерином, который экспрессируется в мышинных опухолях. Помимо это, в других иммунофлуоресцентных исследованиях было показано, что h16B5 детектирует мышинный кластерин, экспрессируемый в клетках BRI-JM01 - другой клеточной линии карциномы молочной железы мыши.

Связывание антител и антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению с природным или синтетическими вариантами кластерина могут быть изучены и иными способами, известными в отрасли, например, описанными выше способами.

Ген CLU консервативен у человека, шимпанзе, собаки, коровы, мыши, крысы, курицы и данио-рерио. Тестирование антител и антигенсвязывающих фрагментов в данных моделях охватывается настоящим изобретением.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ:

SEQ ID NO:1
16B5 CDRH1: GFNIKDIYMH
SEQ ID NO.:2
16B5 CDRH2: RIDPAYGNTKYDPKFQG
SEQ ID NO.:3
16B5 CDRH3: RYDTAMDY
SEQ ID NO.:4
16B5 CDRL1: KSSQSLLNSRTRKNYLA
SEQ ID NO.:5
16B5 CDRL2: WASTRES
SEQ ID NO.:6
16B5 CDRL3: KQSYNLWT
SEQ ID NO.:7
16B5 Гуманизированный переменный регион тяжелой цепи
QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNKDIYMHVQAPGKGLEWMGRIDPAY
GNTKYDPKFQGRVTITADTSTDYAYMELSSLRSEDTAVYYCARRYDTAMDYWGQGT
LVTSS
SEQ ID NO.:8
16B5 Гуманизированный переменный регион легкой цепи
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSRTRKNYLA
WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS
SLQAEDVAVYYCKQSYNLWTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO.:9
Полная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулинов h16B5
QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNKDIYMHVQAPGKGLEWMGRIDPAY

GNTKYDPKFQGRVTITADTSTDATAYMELSSLRSEDTAVYYCARRYDTAMDYWGQGT
 VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCAPPV
 AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
 5 EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL
 PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSGDSFFLYSKLT
 VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.:10

Полная последовательность легкой цепи иммуноглобулинов h16B5

10 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSNRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWA
 STRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCKQSYNLWTFGQGTKEIKVAAP
 SVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYAPREKQVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
 YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.:11

15 21B12 CDRH1: GYTFTNYGMH

SEQ ID NO.:12

21B12 CDRH2: WINTYTGEPTYADDFKG

SEQ ID NO.:13

21B12 CDRH3: DGFLYFFDY

20 SEQ ID NO.:14

21B12 CDRL1: KSSQSLLYSSNQKNYLA

SEQ ID NO.:15

21B12 CDRL2: WASTRES

SEQ ID NO.:16

25 21B12 CDRL3: QQYYIYPR

SEQ ID NO.:17

21B12 Гуманизированный вариабельный регион тяжелой цепи

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKKASGYTFTNYGMHWVRQAPGQGLEWMGWINTY
 TGEPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDGFLYFFDYWGQGT
 30 LVTVSS

SEQ ID NO.:18

21B12 Гуманизированный вариабельный регион легкой цепи

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWA
 STRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYIYPRTFGQGTKEIK

35 SEQ ID NO.:19

Полная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулинов h21B12

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKKASGYTFTNYGMHWVRQAPGQGLEWMGWINTY
 TGEPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDGFLYFFDYWGQGT
 VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 40 VLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCAPPV
 AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
 EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL
 PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSGDSFFLYSKLT
 VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

45 SEQ ID NO.:20

Полная последовательность легкой цепи иммуноглобулинов h21B12

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWA
 STRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYIYPRTFGQGTKEIKRTVA

APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.:21

Полная нуклеотидная последовательность тяжелой цепи h16B5

5 ATGGACTGGACCTGGCGGATCCTGTTCTGGTGGCCGCTGCTACCGGCACCCACG
CCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCTGGCGCCACCGTC
AAGATCAGCTGCAAGGTGTCCGGCTTCAACATCAAGGACATCTACATGCACTGGGT
GCAGCAGGCTCCAGGCAAGGGACTGGAGTGGATGGGCGGATCGACCCTGCCTACG
GCAACACCAAGTACGACCCTAAGTTCCAGGGCCGGGTGACCATCACCGCCGACACC
10 TCCACCGACACCGCCTACATGGAAGTGTCTCCCTGCGGTCCGAGGACACCGCCGTG
TACTACTGCGCCCGGAGATACGACACCGCCATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCCCT
GGTGACCGTGTCTCCGCTTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTG
CTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT
TCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGAC
15 ACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACC
GTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCC
CAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCAC
CGTGCCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAA
AGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGACGTG
20 AGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA
TAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCA
GCGTCTCTACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG
GTCTCCAACAAAGGCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGG
GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCA
25 AGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCC
GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACACCTCCCA
TGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCA
GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC
CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

30 SEQ ID NO.:22

Полная нуклеотидная последовательность тяжелой цепи h21B12

ATGGACTGGACCTGGCGGATCCTGTTTCTGGTGGCCGCTGCTACCGGCACACACG
CCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCTCCGAGCTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTG
AAGGTGTCTTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTACCAACTACGGCATGCACTGGGT
35 GCGCCAGGCACCTGGACAGGGACTGGAATGGATGGGCTGGATCAACACCTACACCG
GCGAGCCTACCTACGCCGACGACTTCAAGGGCAGATTCGTGTTCTCCCTGGACACCT
CCGTGTCCACCGCCTACCTGCAGATCTCCTCCCTGAAGGCCGAGGACACCGCCGTGT
ACTACTGCGCCAGGGACGGCTTCTGTACTTCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCC
TGGTGACCGTGTCTCTGCCTCCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTTG
40 CTCCCGGTCCACCTCTGAGTCTACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTT
CCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTTGGAAGTCTGGCGCCCTGACCTCTGGCGTGACAC
CTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTGGTGACAGTG
CCTTCTCTCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCTTCC
AACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAGCGGAAGTGCTGCGTGGAGTGCCCTCCTTG
45 TCCTGCTCCTCCTGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTCTGTTCCTCCTAAGCCTAAGGAC
ACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCAC
GAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGC
CAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGGTGGTGTCCGTGC

TGACCGTGGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTGTCC
 AACAAAGGGCCTGCCTGCCCCCTATCGAAAAGACCATCTCTAAGACCAAGGGCCAGCC
 TCGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCTCCCGCGAGGAAATGACCAAGAACC
 AGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAGT
 5 GGGAGTCTAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCTATGCTGGAC
 TCCGACGGCTCCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAG
 CAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACC
 CAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCCTGGCAAGTGA

SEQ ID NO.:23

10 Полная нуклеотидная последовательность легкой цепи h16B5

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCCT
 ACGGCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCGACTCCCTGGCCGTGTCCCTGGGCGAG
 AGAGCCACCATCAACTGCAAGTCCTCCAGTCCCTGCTGAACTCCCGGACCCGGAA
 GAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTGATCTA
 15 CTGGGCCTCCACCCGGGAGTCCGGCGTGCCTGACCGGTTCTCCGGCTCCGGCAGCG
 GCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTAC
 TACTGCAAGCAGTCCCTACAACCTGTGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGAT
 CAAGCGGACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTT
 GAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGC
 20 CAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAGTCCAGGAGAGTG
 TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTG
 AGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGG
 GCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

SEQ ID NO.:24

25 Полная нуклеотидная последовательность легкой цепи h21B12

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCTGGCGCCT
 ACGGCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCGACTCTCTGGCTGTGTCCCTGGGCGAGC
 GGGCCACCATCAACTGCAAGTCCTCCAGTCCCTGCTGTACTCCTCCAACCAGAAGA
 ACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTGATCTACT
 30 GGGCCTCCACCCGGGAATCTGGCGTGCCTGACCGGTTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCA
 CCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTACT
 GCCAGCAGTACTACATCTACCCTCGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATC
 AAGCGGACCGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTTCATCTTCCCCCCTTCCGACGAGCAGCTG
 AAGTCCGGCACCGCCTCTGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCC
 35 AAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCAGGAATCCGT
 CACCGAGCAGGACTCCAAGGACTCTACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGTC
 CAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGC
 CTGTCCTCTCCCGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGCTGA

SEQ ID NO.:25 (мышинный 16B5 VL)

40 DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNSRTRKKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWA
 STRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCKQSYNLWTFGGGKLEFK

SEQ ID NO.:26 (h16B5 VL consensus1)

DIVMXQSPXSLAVSXGEXXTXXCKSSQSLNSRTRKKNYLAWYQQKPGQXPXKLLIYW
 ASTRESGVPDRFXGSGSGTDFTLTISXQAEDXAVYYCKQSYNLWTFGXGKLEKX;

45 X является аминокислотной заменой в сравнении с соответствующей аминокислотой
 полипептидного набора SEQ ID NO.:25.

SEQ ID NO.:27 (h16B5 VL consensus2)

DIVMX_{a1}QSPX_{a2}SLAVSX_{a3}GEX_{a4}X_{a5}TX_{a6}X_{a7}CKSSQSLNSRTRKKNYLAWYQQ

KPGQX_{a8}PKLLIYWASTRESGVPDRFX_{a9}GSGSGTDFTLTISSX_{a10}QAEDX_{a11}AVYY
CKQSYNL-WTFGX_{a12}GTKLEX_{a13}K

X_{a1} -это нейтральная гидрофильная аминокислота, например, Т или S;

X_{a2} - это D или S;

X_{a3} - это гидрофобная аминокислота, например, L или A;

X_{a4} - это основная аминокислота, например, R или K;

X_{a5} - это гидрофобная аминокислота, например, A или V;

X_{a6} - это гидрофобная аминокислота, например, I или M;

X_{a7} - это N или S;

X_{a8} - это Р или S;

X_{a9} - это нейтральная гидрофильная аминокислота, например, S или Т;

X_{a10} - это гидрофобная аминокислота, например, L или V;

X_{a11} - это гидрофобная аминокислота, например, V или L;

X_{a12} - это Q или G; и

X_{a13} - это I или F.

SEQ ID NO.:28 (h16B5 VL consensus3)

DIVMX_{a1}QSPX_{a2}SLAVSX_{a3}GEX_{a4}X_{a5}TX_{a6}X_{a7}CKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQ
KPGQX_{a8}PKLLIYWASTRESGVPDRFX_{a9}GSGSGTDFTLTISSX_{a10}QAEDX_{a11}AVYY
CKQSYNL-WTFGX_{a12}GTKLEX_{a13}K

X_{a1} - это Т или S; X_{a2} - это D или S; X_{a3} - это L или A; X_{a4} - это R или K; X_{a5} - это A
или V; X_{a6} - это I или M; X_{a7} - это N или S; X_{a8} - это Р или S; X_{a9} - это S или Т; X_{a10} - это
L или V; X_{a11} - это V или L; X_{a12} - это Q или G; и X_{a13} - это I или F.

SEQ ID NO.:29 (мышинный 16B5 VH)

EVQLQQSGAELVKPGASVRLSCTTSGFN~~IKDIY~~MHWVKQRPEQGLEWIGRIDPAYGNTKYDPKFQGK
ATITADTSSNTAYLQLSSLTSED~~TA~~VYYCARRYDTAMDYWGQGTSTVTVSS

SEQ ID NO.:30 (h16B5 VH consensus1)

XVQLXQSGAEXXKPGAXVXXSCXXSGFN~~IKDIY~~MHWVXQXPXXGLEWXGRIDPAYGNTKYDPKFQGX
XTITADTSXXTAYXXLSSLXSEDTAVYYCARRYDTAMDYWGQGTXTVTVSS;

X является аминокислотной заменой в сравнении с соответствующей аминокислотой
полипептидного набора SEQ ID NO.:29.

SEQ ID NO.:31 (h16B5 VH consensus2)

~~WQXSLNCAWSSXGFMHWVQRPCEWIRPKNIRGVAISVAWSSSLAYCARDAMDWQGTST~~

X_{b1} - это Q или E;

X_{b2} - это V или Q;

X_{b3} - это гидрофобная аминокислота, например, V или L;

X_{b4} - это K или V;

X_{b5} - это нейтральная гидрофильная аминокислота, например, Т или S;

X_{b6} - это основная аминокислота, например, K или R;

X_{b7} - это гидрофобная аминокислота, например, I или L;

X_{b8} - это K или Т;

X_{b9} - это V или Т;

X_{b10} - это основная аминокислота, например, Q или K;

X_{b11} - это A или R;

X_{b12} - это G или E;

5 X_{b13} - это основная аминокислота, например, K или Q;

X_{b14} - это гидрофобная аминокислота, например, M или I;

X_{b15} - это основная аминокислота, например, R или K;

X_{b16} - это гидрофобная аминокислота, например, V или A;

10 X_{b17} - это нейтральная гидрофильная аминокислота, например, T или S;

X_{b18} - это например, D или N;

X_{b19} - это гидрофобная аминокислота, например, M или L;

X_{b20} - это E или Q;

15 X_{b21} - это R или T; и

X_{b22} - это L или S.

SEQ ID NO.:32 (h16B5 VH consensus3)

~~QXSLAVSXGEXXTXXCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQRPGQSPKLLIYWASTRESG~~

20 X_{b1} - это Q или E; X_{b2} - это V или Q; X_{b3} - это V или L; X_{b4} - это K или V; X_{b5} - это T или S; X_{b6} - это K или R; X_{b7} - это I или L; X_{b8} - это K или T; X_{b9} - это V или T; X_{b10} - это Q или K; X_{b11} - это A или R; X_{b12} - это G или E; X_{b13} - это K или Q; X_{b14} - это M или I; X_{b15} - это R или K; X_{b16} - это V или A; X_{b17} - это T или S; X_{b18} - это D или N; X_{b19} - это M или L; X_{b20} - это E или Q; X_{b21} - это R или T; и X_{b22} - это L или S.

25 SEQ ID NO.:33 (мышинный 21B12 VL)

DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQRPGQSPKLLIYWA
STRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISXKAEDLAVYYCQQYYIYPRTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO.:34 (h21B12 VL consensus1)

30 DIVMX_cQSPXSLAVSXGEXXTXXCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQXPGQXP_cKLLIYWASTRESG
VPDRFXGSGSGTDFTLTISX_cKAEDXAVYYCQQYYIYPRTFGXG_cTKLEIK

X является аминокислотной заменой в сравнении с соответствующей аминокислотой полипептидного набора SEQ ID NO.:33.

SEQ ID NO.:35 (h21B12 VL consensus2)

35 DIVMX_{c1}QSPX_{c2}SLAVSX_{c3}GEX_{c4}X_{c5}TX_{c6}X_{c7}CKSSQSLLYSSNQKNYLAWY
QQX_{c8}PGQX_{c9}PKLLIYWASTRESGVPDRFX_{c10}GSGSGTDFTLTISX_{c11}X_{c12}AE
DX_{c13}AVYYCQQYYIYPRTFGX_{c14}G_cTKLEIK;

X_{c1} - это нейтральная гидрофильная аминокислота, например, T или S;

X_{c2} - это D или S;

40 X_{c3} - это гидрофобная аминокислота, например, L или V;

X_{c4} - это основная аминокислота, например, R или K;

X_{c5} - это гидрофобная аминокислота, например, A или V;

X_{c6} - это гидрофобная аминокислота, например, I или M;

45 X_{c7} - это N или S;

X_{c8} - это основная аминокислота, например, K или R;

X_{c9} - это P или S;

X_{c10} - это нейтральная гидрофильная аминокислота, например, S или T;

X_{c11} - это гидрофобная аминокислота, например, L или V;

X_{c12} - это основная аминокислота, например, Q или K;

5 X_{c13} - это гидрофобная аминокислота, например, V или L; и

X_{c14} - это Q или G.

SEQ ID NO.:36 (h21B12 VL consensus3)

DIVMX_{c1}QSPX_{c2}SLAVSX_{c3}GEX_{c4}X_{c5}TX_{c6}X_{c7}CKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQ

10 X_{c8}PGQX_{c9}PKLLIYWASTRESGVPDRFX_{c10}GSGSGTDFTLTISSX_{c11}X_{c12}AE

DX_{c13}AVYYCQQYYIYPRTFGX_{c14}GTKLEIK;

X_{c1} - это T или S; X_{c2} - это D или S; X_{c3} - это L или V; X_{c4} - это R или K; X_{c5} - это A или V; X_{c6} - это I или M; X_{c7} - это N или S; X_{c8} - это K или R; X_{c9} - это P или S; X_{c10} - это S или T; X_{c11} - это L или V; X_{c12} - это Q или K; X_{c13} - это V или L; и X_{c14} - это Q или G.

15 SEQ ID NO.:37 (мышинный 21B12 VH)

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMHWVKQAPGKGLKWMGWINTYT
GEPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNKLKNETATYFCARDGFLYFFDYWGQGTTL
TVSS

SEQ ID NO:38 (h21B12 VH consensus1)

20 QX_{d1}QLVQSGX_{d2}ELKKPGX_{d3}X_{d4}VKX_{d5}SCKASGYTFTNYGMHWVX_{d6}QAPGX_{d7}GLX_{d8}WM
FXFSLXTSXSTAYLQIXXLKXEDTAXYXCARDGFLYFFDYWGQGTXXTVSS

X является аминокислотной заменой в сравнении с соответствующей аминокислотой полипептидного набора SEQ ID NO.:37.

SEQ ID NO:39 (h21B12 VH consensus2)

25 QX_{d1}QLVQSGX_{d2}ELKKPGX_{d3}X_{d4}VKX_{d5}SCKASGYTFTNYGMHWVX_{d6}QAPGX_{d7}GLX_{d8}WM
GWINTYTGEPTYADDFKGRFX_{d9}FSLX_{d10}TSX_{d11}STAYLQIX_{d12}X_{d13}LKX_{d14}ED
TAX_{d15}YX_{d16}CARDGFLYFFDYWGQGTX_{d17}X_{d18}TVSS;

X_{d1} - это гидрофобная аминокислота, например, V или I;

30 X_{d2} - это S или P;

X_{d3} - это A или E;

X_{d4} - это нейтральная гидрофильная аминокислота, например, S или T;

X_{d5} - это гидрофобная аминокислота, например, V или I;

35 X_{d6} - это основная аминокислота, например, R или K;

X_{d7} - это основная аминокислота, например, Q или K;

X_{d8} - это E или K;

X_{d9} - это гидрофобная аминокислота, например, V или A;

40 X_{d10} - это кислая аминокислота, например, D или E;

X_{d11} - это гидрофобная аминокислота, например, V или A;

X_{d12} - это S или N;

X_{d13} - это S или N;

45 X_{d14} - это A или N;

X_{d15} - это V или T;

X_{d16} - это ароматическая аминокислота, например, Y или F;

X_{d17} - это L или T; и

X_{d18} - это гидрофобная аминокислота, например, V или L.

SEQ ID NO:40 (h21B12 VH consensus3)

5 QX_{d1}QLVQSGX_{d2}ELKKPGX_{d3}X_{d4}VKX_{d5}SCKASGYTFTNYGMHWVX_{d6}QAPGX_{d7}GLX_{d8}WM
GWINYTGEPYADDFKGRFX_{d9}FSLX_{d10}TSX_{d11}STAYLQIX_{d12}X_{d13}LKX_{d14}ED
TAX_{d15}YX_{d16}CARDGFLYFFDYWGQGTGX_{d17}X_{d18}TVSS;

10 X_{d1} - это V или I; X_{d2} - это S или P; X_{d3} - это A или E; X_{d4} - это S или T; X_{d5} - это V или I; X_{d6} - это R или K; X_{d7} - это Q или K; X_{d8} - это E или K; X_{d9} - это V или A; X_{d10} - это D или E; X_{d11} - это V или A; X_{d12} - это S или N; X_{d13} - это S или N; X_{d14} - это A или N; X_{d15} - это V или T; X_{d16} - это Y или F; X_{d17} - это L или T; и X_{d18} - это V или L.

SEQ ID NO.: 41 (человеческая модель 16B5VL)

15 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNSKNYLAWEYQQKPGQPPKLLIYW
STRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPYSFGQGTKLEIK

SEQ ID NO.: 42 (человеческая модель 16B5VH)

QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYIMHWVQQAPGKGLEWMGLVDPE
DGETIYAEKFQGRVTITADTSTDYMEYSSLRSEDVAVYYCARIPFLGRDHWGQGTIV
TVSR

20 SEQ ID NO.: 43 (человеческая модель 21B12VL)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNSKNYLAWEYQQKPGQPPKLLIYW
STRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPYSFGQGTKLEIK

SEQ ID NO.: 58 (человеческая модель 21B12VH)

25 QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTSYAMNWRQAPGQGLEWMGWINTN
TGNPTYAQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDVAVYYCARDWGQGTIVTVSSVA
TIDENWFDP

SEQ ID NO:44

16B5 CDRH1: GFNIKDIY

SEQ ID NO:45

30 16B5 CDRH2: IDPAYGNT

SEQ ID NO:46

16B5 CDRH3: X₁X₂RYDTAMDY

X₁ - это A;

35 X₂ - это R;

или X₁ и X₂ находятся вне CDRH3

SEQ ID NO.:47

16B5 CDRL1: QSLLNSRTRKNY

16B5 CDRL2: WAS

40 SEQ ID NO.:49

16B5 CDRL3: KQSYNLWT

SEQ ID NO.:50

21B12 CDRH1: GYTFTNYG

SEQ ID NO.:51

45 21B12 CDRH2: INTYTGEP

SEQ ID NO.:52

21B12 CDRH3: X₃X₄DGFLYFFDY

X₃ - это A;

X₄- это R;

или X₃ и X₄ находятся вне CDRH3

SEQ ID NO.:53

21B12 CDRL1: QSLLYSSNQKNY

21B12 CDRL2: WAS

SEQ ID NO.:55

21B12 CDRL3: QQYYIYPRT

Литература

1. Gleave, M.E., et al., *Use of antisense oligonucleotides targeting the antiapoptotic gene, clusterin/testosterone-repressed prostate message 2, to enhance androgen sensitivity and chemosensitivity in prostate cancer*. Urology, 2001. 58(2 Suppl 1): p. 39-49.

2. Trougakos, I.P., et al., *Silencing expression of the clusterin/apolipoprotein j gene in human cancer cells using small interfering RNA induces spontaneous apoptosis, reduced growth ability, and cell sensitization to genotoxic and oxidative stress*. Cancer Res, 2004. 64(5): p. 1834-42.

3. Gleave, M. and H. Miyake, *Use of antisense oligonucleotides targeting the cytoprotective gene, clusterin, to enhance androgen- and chemo-sensitivity in prostate cancer*. World J Urol, 2005. 23(1): p. 38-46.

4. Springate, C.M., et al., *Efficacy of an intratumoral controlled release formulation of clusterin antisense oligonucleotide complexed with chitosan containing paclitaxel or docetaxel in prostate cancer xenograft models*. Cancer Chemother Pharmacol, 2005. 56(3): p. 239-47.

5. Jo, H., Jia, Y., et al., *Cancer cell-derived clusterin modulates the phosphatidylinositol-3'-kinase-Akt pathway through attenuation of insulin-like growth factor 1 during serum deprivation*. Mol. Cell. Biol. 2008. 28:4285-4299.

6. Zoubeidi, A., ettinger, S. et al., *Clusterin facilitates COMMD1 and I-kappaB degradation to enhance NF-kappaB activity in prostate cancer cells*. Mol. Cancer Res. 2010, 8:119-130.

(57) Формула изобретения

1. Изолированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающие вариабельную область легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 8, и вариабельную область тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 7, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают кластерин.

2. Изолированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где указанное антитело содержит аминокислоты константной области.

3. Изолированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.2, где указанные аминокислоты константной области взяты из антитела человека.

4. Изолированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащие константную область IgG2 человека.

5. Изолированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где указанный антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv, Fab, Fab' или (Fab')₂.

6. Изолированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, конъюгированные с цитотоксической частью или с поддающейся детекции частью.

7. Изолированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, где антитело включает легкую цепь, указанную в SEQ ID NO: 10, и тяжелую цепь, указанную в SEQ ID NO: 9.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6 для применения в лечении или детектировании злокачественной опухоли, содержащей опухолевые клетки, экспрессирующие кластерин или вариант кластерина, или для предотвращения или лечения метастазов.

9. Изолированная нуклеиновая кислота, кодирующая

(a) варибельную область легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 8; или

(b) варибельную область легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 10.

10. Изолированная нуклеиновая кислота по п.9, где последовательность указанной нуклеиновой кислоты указана в SEQ ID NO: 23.

11. Изолированная нуклеиновая кислота, кодирующая

(a) варибельную область тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 7; или

(b) варибельную область тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 9.

12. Изолированная нуклеиновая кислота по п.11, где последовательность указанной нуклеиновой кислоты указана в SEQ ID NO: 21.

13. Изолированная нуклеиновая кислота, кодирующая

(a) варибельную область легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 8, и варибельную область тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 7; или

(b) варибельную область легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 10, и варибельную область тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 9.

14. Изолированная нуклеиновая кислота по п.13, где указанная нуклеиновая кислота содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23, и последовательность, указанную в SEQ ID NO: 21.

15. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп.9-14.

16. Выделенная клетка для экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-7, содержащая: (i) нуклеиновые кислоты по любому из пп.9-14, кодирующие тяжелую и легкую цепи антитела или кодирующие варибельные области тяжелой и легкой цепей антитела; или (ii) векторы по п.15, включающие нуклеиновые кислоты из (i).

17. Фармацевтическая композиция для снижения роста злокачественной клетки, экспрессирующей кластерин, или снижения объема опухолевых клеток, секретирующих или экспрессирующих кластерин, содержащая терапевтически эффективное количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и фармацевтически приемлемый носитель, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают варибельную область легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 8, и варибельную область тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 7, где указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают кластерин.

18. Фармацевтическая композиция по п.17, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают легкую цепь, указанную в SEQ ID NO: 10, и тяжелую цепь, указанную в SEQ ID NO: 9.

19. Комбинация для лечения рака, содержащая фармацевтическую композицию по п.17 или 18 и химиотерапевтическое средство.

20. Комбинация по п.19, где указанное химиотерапевтическое средство содержит таксан.

21. Способ снижения роста злокачественной клетки, экспрессирующей кластерин, или снижения объема опухолевых клеток, секретирующих или экспрессирующих кластерин, причем способ включает введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-7 млекопитающему, нуждающемуся в этом.

22. Способ лечения карциномы, причем способ включает введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-7 млекопитающему, нуждающемуся в этом.

23. Способ по п.21 или 22, дополнительно включающий введение

химиотерапевтического средства.

24. Набор для применения в лечении или детектировании злокачественной опухоли, содержащей опухолевые клетки, экспрессирующие кластерин или вариант кластерина, или для предотвращения или лечения метастазов, содержащий флакон или флаконы, содержащие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7 или фармацевтическую композицию по п.17 или 18.

25. Набор для получения анти-кластеринового антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащий флакон или флаконы, содержащие: (i) нуклеиновые кислоты по любому из пп.9-14, кодирующие тяжелую и легкую цепи антитела или кодирующие переменные области тяжелой и легкой цепей антитела; или (ii) векторы по п.15, включающие нуклеиновые кислоты из (i).

26. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-7 для уменьшения объема опухоли, содержащей клетки, экспрессирующие или секретирующие кластерин.

27. Способ получения анти-кластеринового антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий экспрессирование (а) переменной области легкой цепи, указанной в SEQ ID NO: 8, и (b) переменной области тяжелой цепи, указанной в SEQ ID NO: 7.

28. Способ по п.27, где указанные антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат (а) легкую цепь, указанную в SEQ ID NO: 10, и (b) тяжелую цепь, указанную в SEQ ID NO: 9.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ALETHIA BIOTHERAPEUTICS INC.
 NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA
 TREMBLAY, Gilles Bernard
 FILION, Mario
 SULEA, Traian

<120> АНТИ-КЛАСТЕРИНОВЫЕ АНТИТЕЛА И АНТИГЕН-СВЯЗЫВАЮЩИЕ ФРАГМЕНТЫ И ИХ
 ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ УМЕНЬШЕНИЯ ОБЪЕМА НОВООБРАЗОВАНИЙ

<130> 280317.61

<140> PCT/CA2010/001882
 <141> 2010-11-24

<150> 61/263,865
 <151> 2009-11-24

<160> 58

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 16B5 CDRH1

<400> 1

Thr	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Ile	Tyr	Met	His
1			5					10		

<210> 2
 <211> 17
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 16B5 CDRH2

<400> 2

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

Gly

<210> 3
 <211> 8
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 16B5 CDRH3

<400> 3

2

Arg Tyr Asp Thr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 4
<211> 17
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 16B5 CDRL1

<400> 4

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 5
<211> 7
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 16B5 CDRL2

<400> 5

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 6
<211> 8
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 16B5 CDRL3

<400> 6

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Trp Thr
1 5

<210> 7
<211> 117
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Вариабельная область гуманизированной тяжелой цепи 16B5

<400> 7

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp 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 Arg Tyr Asp Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8
<211> 112
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Вариабельная область гуманизированной легкой цепи 16B5
<400> 8

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

4

100

105

110

<210> 9

<211> 443

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина для h16B5

<400> 9

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp 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 Arg Tyr Asp Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn
 180 185 190

Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro
 210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
 260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 275 280 285

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 290 295 300

Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 305 310 315 320

Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys
 325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 340 345 350

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 10
 <211> 217
 <212> Белок

6

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полная последовательность легкой цепи иммуноглобулина для h16B5

<400> 10

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
 85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 115 120 125

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 130 135 140

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 145 150 155 160

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 165 170 175

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 180 185 190

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 195 200 205

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 11

7

<211> 10
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 21B12 CDRH1

<400> 11

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met His
 1 5 10

<210> 12
 <211> 17
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 21B12 CDRH2

<400> 12

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 13
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 21B12 CDRH3

<400> 13

Asp Gly Phe Leu Tyr Phe Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 14
 <211> 17
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 21B12 CDRL1

<400> 14

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Ala

<210> 15

8

<211> 7
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 21B12 CDRL2

<400> 15

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 21B12 CDRL3

<400> 16

Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Arg Thr
1 5

<210> 17
<211> 118
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Вариабельная область гуманизированной тяжелой цепи 21B12

<400> 17

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

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

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 18
<211> 113
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Вариабельная область гуманизированной легкой цепи 21B12
<400> 18

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

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

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ile Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 19
<211> 444
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Полная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина для h21B12
<400> 19

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

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

10

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

11

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 20

<211> 220

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полная последовательность легкой цепи иммуноглобулина для h21B12

<400> 20

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

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

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

12

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ile Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 21
<211> 1389
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Полная нуклеотидная последовательность тяжелой цепи h16B5

<400> 21
atggactgga cctggcggat cctgttctctg gtggccgctg ctaccggcac ccacgcccag 60
gtgcagctgg tgcagtctgg cgccgaggtg aagaagcctg gcgccaccgt caagatcagc 120
tgcaaggtgt ccggcttcaa catcaaggac atctacatgc actgggtgca gcaggctcca 180
ggcaagggac tggagtggat gggccggatc gaccctgcct acggcaaacac caagtacgac 240
octaagttcc agggccgggt gaccatcacc gccgacacct ccaccgacac cgcctacatg 300
gaactgtcct ccctgcggtc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg gagatacgac 360
accgccatgg attactgggg ccagggcacc ctggtgaccg tgtcctccgc ttccaccaag 420

ggcccatcgg tcttccccct ggcgcctgc tccaggagca cctccgagag cacagcggcc 480
 ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgctgt gaactcaggc 540
 gctctgacca ggcgcgtgca caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 600
 ctcagcagcg tggtagccgt gccctccagc aacttcggca cccagaccta cacctgcaac 660
 gtagatcaca agcccagcaa caccaagggt gacaagacag ttgagcgcaa atgttggtgc 720
 gagtgtccac cgtgtccagc accacctgtg gcaggaccgt cagtcttcct cttcccccca 780
 aaaccaagg acaccctcat gatctcccg acccctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac 840
 gtgagccacg aagaccccg ggtccagttc aactggtagc tggacggcgt ggaggtgcat 900
 aatgccaaga caaagccacg ggaggagcag ttcaacagca cgttcctgtg ggtcagcgtc 960
 ctcaccgttg tgcaccagga ctgggtgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 1020
 aaaggcctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaaa ccaaagggca gcccgagaa 1080
 ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg 1140
 acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatgccg tggagtggga gagcaatggg 1200
 cagccggaga acaactacaa gaccacacct cccatgctgg actccgacgg ctccttcttc 1260
 ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1320
 tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 1380
 ggtaaatga 1389

<210> 22

<211> 1392

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полная нуклеотидная последовательность тяжелой цепи h21B12

<400> 22

atggactgga cctggcggat cctgtttctg gtggccgctg ctaccggcac acacgccag 60
 gtgcagctgg tgcagtcggg ctccgagctg aagaaacctg gcgcctccgt gaaggtgtcc 120
 tgcaaggcct ccggctacac cttaccaaac tacggcatgc actgggtgcg ccaggcacct 180
 ggacagggac tggaatggat gggctggatc aacacctaca ccggcgagcc tacctacgcc 240
 gacgacttca agggcagatt cgtgttctcc ctggacacct ccgtgtccac cgcctacctg 300
 cagatctcct ccctgaaggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag ggacggcttc 360
 ctgtacttct tcgactactg gggccagggc accctggtga ccgtgtcttc tgctccacc 420
 aagggccctt ccgtgttccc tctggccctt tgctcccggt ccacctetga gtctaccgcc 480
 gctctgggct gcctggtgaa ggactacttc cctgagcctg tgacagtgtc ctggaactct 540
 ggcgcctga cctctggcgt gcacaccttc cctgccgtgc tgcagtcctc cggcctgtac 600

tccctgtcct ccgtggtgac agtgccttcc tccaacttcg gcacccagac ctacacctgc	660
aacgtggacc acaagccttc caacaccaag gtggacaaga ccgtggagcg gaagtgtctgc	720
gtggagtgcc ctccctgtcc tgctcctcct gtggctggcc ctacgtgtt cctgttcct	780
cctaagccta aggacacct gatgatctcc cggacctctg aagtgcctg cgtggtggtg	840
gacgtgtccc acgaggacct tgagggtcag ttcaattggt acgtggacgg cgtggagggtg	900
cacaacgcc aagaccaagc tcgggaggaa cagttcaact ccaccttcg ggtggtgtcc	960
gtgtgaccg tgggtcacca ggactggctg aacggcaaag aatacaagt caaggtgtcc	1020
aacaagggcc tgctgtccc tatcgaaaag accatctcta agaccaagg ccagctcgc	1080
gagcctcagg tgtacacct gcctccctcc cgcgaggaaa tgaccaagaa ccaggtgtcc	1140
ctgacctgtc tgggtgaagg cttctaccct tccgatatcg ccgtggagtg ggagtctaac	1200
ggccagcctg agaacaact caagaccacc cctcctatgc tggactccga cggctcctc	1260
ttcctgtaca gcaagctgac agtggacaag tcccgggtgc agcagggcaa cgtgttctcc	1320
tgctccgtga tgcacgaggc cctgcacaac cactacacc agaagtcct gtccctgtct	1380
cctggcaagt ga	1392

<210> 23
 <211> 720
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полная нуклеотидная последовательность легкой цепи h16B5

<400> 23	
atggtgtctg agaccaggt gttcatctcc ctgctgtgt ggatctccg cgcctacggc	60
gacatctgta tgaccagtc ccccgactcc ctggcctgt ccctgggcga gagagccacc	120
atcaactgca agtcctccca gtccctgtg aactcccga cccggaagaa ctacctggcc	180
tggatatcagc agaagcctgg ccagcctcct aagctgtga tctactgggc ctccaccgg	240
gagtccggcg tgctgaccg gttctccggc tccggcagcg gcaccgactt caccctgacc	300
atcagctccc tgcaggccga ggacgtggc gtgtactact gcaagcagtc ctacaacctg	360
tggaccttcg gccagggcac caagctggag atcaagcgga ctgtggctgc accatctgtc	420
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgctg	480
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtga aggtggataa cggcctccaa	540
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc	600
agcagcacc tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa	660
gtcaccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag	720

15

<210> 24
 <211> 723
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полная нуклеотидная последовательность легкой цепи h21B12

<400> 24

```

atggtgctgc agaccacaggt gttcatctcc ctgctgctgt ggatctctgg cgcctacggc      60
gacatcgtga tgaccacagtc ccccgactct ctggctgtgt ccctgggcga gcggggccacc      120
atcaactgca agtcctccca gtccctgctg tactcctcca accagaagaa ctacctggcc      180
tggtatcagc agaagccttg ccagcctcct aagctgctga tctactgggc ctccaccgg      240
gaatctggcg tgctgaccg gttctccggc tctggctccg gcaccgactt caccctgacc      300
atcagctccc tcgaggccga ggacgtggcc gtgtactact gccagcagta ctacatctac      360
cctcgacact tcggccaggg caccaagctg gaaatcaagc ggaccgtggc cgctccttcc      420
gtgttcatct tcccccttc cgacgagcag ctgaagtcgg gcaccgcctc tgtggtgtgc      480
ctgctgaaca acttctaccc ccgggaggcc aaggtgcagt ggaaggtgga caacgccctg      540
cagtcgggca actcccagga atccgtcacc gagcaggact ccaaggactc tacctactcc      600
ctgtcctcca cctgaccct gtccaaggcc gactacgaga agcacaaggt gtacgcctgc      660
gaagtgaccc accagggcct gtcctctccc gtgaccaagt ccttcaaccg gggcgagtgc      720
tga                                                                 723
  
```

<210> 25
 <211> 112
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> 16B5 VL мыши

<400> 25

```

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20           25           30

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

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50           55           60

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

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
 85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Phe Lys
 100 105 110

<210> 26
 <211> 112
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> консенсусная последовательность 1 VL гуманизированного 16B5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:25

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:25

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 <223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:25

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18)..(18)
 <223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:25

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19)..(19)
 <223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:25

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21)..(21)
 <223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:25

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:25

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (49)..(49)

17

<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:25

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (69)..(69)

<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:25

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (84)..(84)

<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:25

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (89)..(89)

<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:25

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (105)..(105)

<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:25

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (111)..(111)

<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:25

<400> 26

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

Glu Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

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

Xaa Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Xaa Gln Ala Glu Asp Xaa Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Trp Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Lys Leu Glu Xaa Lys
100 105 110

<210> 27

<211> 112
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> консенсусная последовательность 2 VL гуманизированного 16B5

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Хаа представляет собой нейтральную гидрофильную аминокислоту

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Хаа представляет собой D или S

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 <223> Хаа представляет собой гидрофильную аминокислоту

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18)..(18)
 <223> Хаа представляет собой основную аминокислоту

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19)..(19)
 <223> Хаа представляет собой гидрофильную аминокислоту

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21)..(21)
 <223> Хаа представляет собой гидрофильную аминокислоту

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Хаа представляет собой N или S

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (49)..(49)
 <223> Хаа представляет собой P или S

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (69)..(69)
 <223> Хаа представляет собой нейтральную гидрофобную аминокислоту

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (84)..(84)
 <223> Хаа представляет собой гидрофильную аминокислоту

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (89)..(89)
 <223> Хаа представляет собой гидрофильную аминокислоту

 <220>

19

<221> MISC_FEATURE
 <222> (105)..(105)
 <223> Хаа представляет собой Q или G

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (111)..(111)
 <223> Хаа представляет собой I или F

<400> 27

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

Glu Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

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

Xaa Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

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

Ile Ser Ser Xaa Gln Ala Glu Asp Xaa Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
 85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Trp Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Lys Leu Glu Xaa Lys
 100 105 110

<210> 28
 <211> 112
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> консенсусная последовательность 3 VL гуманизированного 16B5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Хаа представляет собой T или S

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Хаа представляет собой D или S

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 <223> Хаа представляет собой L или A

<220>

20

```

<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(18)
<223> Хаа представляет собой R или K

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19)..(19)
<223> Хаа представляет собой A или V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (21)..(21)
<223> Хаа представляет собой I или M

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> Хаа представляет собой N или S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (49)..(49)
<223> Хаа представляет собой P или S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (69)..(69)
<223> Хаа представляет собой S или T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (84)..(84)
<223> Хаа представляет собой L или V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (89)..(89)
<223> Хаа представляет собой V или L

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (105)..(105)
<223> Хаа представляет собой Q или G

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (111)..(111)
<223> Хаа представляет собой I или F

<400> 28

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

Glu Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20          25          30

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

Xaa Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

```

21

50 55 60

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

Ile Ser Ser Xaa Gln Ala Glu Asp Xaa Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Trp Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Lys Leu Glu Xaa Lys
100 105 110

<210> 29
<211> 117
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 16B5 VH мышцы

<400> 29

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

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

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

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 30
<211> 117
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> консенсусная последовательность 1 VH гуманизированного 16B5

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:29

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:29

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:29

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:29

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:29

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19)..(19)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:29

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:29

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (23)..(23)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:29

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(24)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:29

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (38)..(38)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:29

<220>
<221> MISC_FEATURE

```

```

<222> (40)..(40)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:29

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (42)..(42)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:29

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (43)..(43)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:29

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (48)..(48)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:29

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (67)..(67)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:29

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (68)..(68)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:29

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (76)..(76)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:29

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (77)..(77)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:29

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (81)..(81)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:29

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (82)..(82)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:29

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (87)..(87)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:29

```

24

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (112)..(112)
 <223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:29

<400> 30

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

Xaa Val Xaa Xaa Ser Cys Xaa Xaa Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Ile
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Xaa Gln Xaa Pro Xaa Xaa Gly Leu Glu Trp Xaa
 35 40 45

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

Gln Gly Xaa Xaa Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Xaa Xaa Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 31
 <211> 117
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> консенсусная последовательность 2 VH гуманизированного 16B5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Хаа представляет собой Q или E

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Хаа представляет собой V или Q

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Хаа представляет собой гидрофильную аминокислоту

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> Хаа представляет собой К или V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> Хаа представляет собой нейтральную гидрофобную аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19)..(19)
<223> Хаа представляет собой основную аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
<223> Хаа представляет собой гидрофильную аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (23)..(23)
<223> Хаа представляет собой К или Т

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(24)
<223> Хаа представляет собой V или Т

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (38)..(38)
<223> Хаа представляет собой основную аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (40)..(40)
<223> Хаа представляет собой А или R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (42)..(42)
<223> Хаа представляет собой G или E

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (43)..(43)
<223> Хаа представляет собой основную аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (48)..(48)
<223> Хаа представляет собой гидрофильную аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (67)..(67)
<223> Хаа представляет собой основную аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (68)..(68)
<223> Хаа представляет собой гидрофильную аминокислоту

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (76)..(76)
<223> Хаа представляет собой нейтральную гидрофобную аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (77)..(77)
<223> Хаа представляет собой D или N

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (81)..(81)
<223> Хаа представляет собой гидрофильную аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (82)..(82)
<223> Хаа представляет собой E или Q

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (87)..(87)
<223> Хаа представляет собой R или T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (112)..(112)
<223> Хаа представляет собой L или S

<400> 31

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

Xaa Val Xaa Xaa Ser Cys Xaa Xaa Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Ile
20          25          30

Tyr Met His Trp Val Xaa Gln Xaa Pro Xaa Xaa Gly Leu Glu Trp Xaa
35          40          45

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

Gln Gly Xaa Xaa Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Xaa Xaa Thr Ala Tyr
65          70          75          80

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

```

<210> 32
 <211> 117
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> консенсусная последовательность 3 VH гуманизированного 16B5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Хаа представляет собой Q или E

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Хаа представляет собой V или Q

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Хаа представляет собой V или L

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 <223> Хаа представляет собой K или V

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> Хаа представляет собой T или S

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19)..(19)
 <223> Хаа представляет собой K или R

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20)..(20)
 <223> Хаа представляет собой I или L

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (23)..(23)
 <223> Хаа представляет собой K или T

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(24)
 <223> Хаа представляет собой V или T

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (38)..(38)
 <223> Хаа представляет собой Q или K

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (40)..(40)
 <223> Хаа представляет собой A или R

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (42)..(42)
<223> Хаа представляет собой G или E

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (43)..(43)
<223> Хаа представляет собой K или Q

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (48)..(48)
<223> Хаа представляет собой M или I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (67)..(67)
<223> Хаа представляет собой R или K

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (68)..(68)
<223> Хаа представляет собой V или A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (76)..(76)
<223> Хаа представляет собой T или S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (77)..(77)
<223> Хаа представляет собой D или N

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (81)..(81)
<223> Хаа представляет собой M или L

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (82)..(82)
<223> Хаа представляет собой E или Q

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (87)..(87)
<223> Хаа представляет собой R или T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (112)..(112)
<223> Хаа представляет собой L или S

<400> 32

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

Xaa Val Xaa Xaa Ser Cys Xaa Xaa Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Ile
          20          25          30

```

Tyr Met His Trp Val Xaa Gln Xaa Pro Xaa Xaa Gly Leu Glu Trp Xaa
35 40 45

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

Gln Gly Xaa Xaa Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Xaa Xaa Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 33
<211> 113
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 21B12 VL мыши

<400> 33

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

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

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ile Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 34
 <211> 113
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> консенсусная последовательность 1 VL гуманизированного 16B5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:33

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:33

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 <223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:33

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18)..(18)
 <223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:33

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19)..(19)
 <223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:33

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21)..(21)
 <223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:33

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:33

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (45)..(45)
 <223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:33

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (49)..(49)

<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:33

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (69)..(69)

<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:33

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (84)..(84)

<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:33

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (85)..(85)

<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:33

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (89)..(89)

<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:33

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (106)..(106)

<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:33

<400> 34

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

Glu Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Xaa Pro Gly Gln
35 40 45

Xaa Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Xaa Xaa Ala Glu Asp Xaa Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ile Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 35
 <211> 113
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> консенсусная последовательность 2 VL гуманизированного 21B12

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Хаа представляет собой нейтральную гидрофобную аминокислоту

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Хаа представляет собой D или S

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 <223> Хаа представляет собой гидрофильную аминокислоту

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18)..(18)
 <223> Хаа представляет собой основную аминокислоту

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19)..(19)
 <223> Хаа представляет собой гидрофильную аминокислоту

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21)..(21)
 <223> Хаа представляет собой гидрофильную аминокислоту

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Хаа представляет собой N или S

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (45)..(45)
 <223> Хаа представляет собой основную аминокислоту

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (49)..(49)
 <223> Хаа представляет собой P или S

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (69)..(69)
 <223> Хаа представляет собой нейтральную гидрофобную аминокислоту

 <220>
 <221> MISC_FEATURE

33

<222> (84)..(84)
 <223> Xaa представляет собой гидрофильную аминокислоту

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (85)..(85)
 <223> Xaa представляет собой основную аминокислоту

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (89)..(89)
 <223> Xaa представляет собой гидрофильную аминокислоту

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (106)..(106)
 <223> Xaa представляет собой Q или G

 <400> 35

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

 Glu Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

 Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Xaa Pro Gly Gln
 35 40 45

 Xaa Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

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

 Ile Ser Ser Xaa Xaa Ala Glu Asp Xaa Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

 Tyr Tyr Ile Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

 Lys

 <210> 36
 <211> 113
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> консенсусная последовательность 3 VL гуманизированного 21B12

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)

34

<223> Хаа представляет собой Т или S

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Хаа представляет собой D или S

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)

<223> Хаа представляет собой L или V

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (18)..(18)

<223> Хаа представляет собой R или K

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (19)..(19)

<223> Хаа представляет собой A или V

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> Хаа представляет собой I или M

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Хаа представляет собой N или S

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (45)..(45)

<223> Хаа представляет собой K или R

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (49)..(49)

<223> Хаа представляет собой P или S

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (69)..(69)

<223> Хаа представляет собой S или T

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (84)..(84)

<223> Хаа представляет собой L или V

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (85)..(85)

<223> Хаа представляет собой Q или K

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (89)..(89)

<223> Хаа представляет собой V или L

<220>

<221> MISC_FEATURE

35

<222> (106)..(106)

<223> Xaa представляет собой Q или G

<400> 36

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

Glu Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Xaa Pro Gly Gln
35 40 45

Xaa Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Xaa Xaa Ala Glu Asp Xaa Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ile Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 37

<211> 118

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> 21B12 VH мыши

<400> 37

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

```

<210> 38
<211> 118
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> консенсусная последовательность 1 VH гуманизированного 21B12

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:37

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:37

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:37

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:37

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:37

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (38)..(38)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:37

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (43)..(43)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с

```

соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:37

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (46)..(46)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:37

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (69)..(69)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:37

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (73)..(73)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:37

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (76)..(76)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:37

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (84)..(84)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:37

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (85)..(85)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:37

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (88)..(88)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:37

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (93)..(93)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:37

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (95)..(95)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:37

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (113)..(113)
<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с
соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:37

<220>
<221> MISC_FEATURE

```

38

<222> (114)..(114)

<223> Хаа представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотной в SEQ ID NO.:37

<400> 38

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

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

Gly Met His Trp Val Xaa Gln Ala Pro Gly Xaa Gly Leu Xaa Trp Met
35 40 45

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

Lys Gly Arg Phe Xaa Phe Ser Leu Xaa Thr Ser Xaa Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Xaa Xaa Leu Lys Xaa Glu Asp Thr Ala Xaa Tyr Xaa Cys
85 90 95

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

Xaa Xaa Thr Val Ser Ser
115

<210> 39

<211> 118

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> консенсусная последовательность 2 VH гуманизированного 21B12

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Хаа представляет собой гидрофильную аминокислоту

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Хаа представляет собой S или P

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Хаа представляет собой A или E

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)
 <223> Хаа представляет собой нейтральную гидрофобную аминокислоту

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20)..(20)
 <223> Хаа представляет собой гидрофильную аминокислоту

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (38)..(38)
 <223> Хаа представляет собой основную аминокислоту

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (43)..(43)
 <223> Хаа представляет собой основную аминокислоту

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (46)..(46)
 <223> Хаа представляет собой Е или К

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (69)..(69)
 <223> Хаа представляет собой гидрофильную аминокислоту

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (73)..(73)
 <223> Хаа представляет собой кислотную аминокислоту

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (76)..(76)
 <223> Хаа представляет собой гидрофильную аминокислоту

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (84)..(84)
 <223> Хаа представляет собой S или N

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (85)..(85)
 <223> Хаа представляет собой S или N

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (88)..(88)
 <223> Хаа представляет собой А или N

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (93)..(93)
 <223> Хаа представляет собой V или T

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (95)..(95)
 <223> Хаа представляет собой ароматическую аминокислоту

 <220>

40

<221> MISC_FEATURE
 <222> (113)..(113)
 <223> Xaa представляет собой L или T

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (114)..(114)
 <223> Xaa представляет собой гидрофильную аминокислоту

 <400> 39

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

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

 Gly Met His Trp Val Xaa Gln Ala Pro Gly Xaa Gly Leu Xaa Trp Met
 35 40 45

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

 Lys Gly Arg Phe Xaa Phe Ser Leu Xaa Thr Ser Xaa Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

 Leu Gln Ile Xaa Xaa Leu Lys Xaa Glu Asp Thr Ala Xaa Tyr Xaa Cys
 85 90 95

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

 Xaa Xaa Thr Val Ser Ser
 115

 <210> 40
 <211> 118
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> консенсусная последовательность 3 VH гуманизированного 21B12

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa представляет собой V или I

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa представляет собой S или P

 <220>
 <221> MISC_FEATURE

41

<222> (16)..(16)
 <223> Хаа представляет собой А или Е

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> Хаа представляет собой S или T

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20)..(20)
 <223> Хаа представляет собой V или I

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (38)..(38)
 <223> Хаа представляет собой R или K

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (43)..(43)
 <223> Хаа представляет собой Q или K

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (46)..(46)
 <223> Хаа представляет собой E или K

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (69)..(69)
 <223> Хаа представляет собой V или A

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (73)..(73)
 <223> Хаа представляет собой D или E

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (76)..(76)
 <223> Хаа представляет собой V или A

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (84)..(84)
 <223> Хаа представляет собой S или N

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (85)..(85)
 <223> Хаа представляет собой S или N

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (88)..(88)
 <223> Хаа представляет собой A или N

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (93)..(93)
 <223> Хаа представляет собой V или T

<220>

42

<221> MISC_FEATURE
 <222> (95)..(95)
 <223> Xaa представляет собой Y или F

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (113)..(113)
 <223> Xaa представляет собой L или T

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (114)..(114)
 <223> Xaa представляет собой V или L

 <400> 40

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

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

 Gly Met His Trp Val Xaa Gln Ala Pro Gly Xaa Gly Leu Xaa Trp Met
 35 40 45

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

 Lys Gly Arg Phe Xaa Phe Ser Leu Xaa Thr Ser Xaa Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

 Leu Gln Ile Xaa Xaa Leu Lys Xaa Glu Asp Thr Ala Xaa Tyr Xaa Cys
 85 90 95

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

 Xaa Xaa Thr Val Ser Ser
 115

 <210> 41
 <211> 113
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> человеческая модель 16B5 VL

 <400> 41

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

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

43

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Tyr Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 42
<211> 117
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> человеческая модель 16B5 VH

<400> 42

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

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

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

Gly Leu Val Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp 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 Ile Pro Leu Phe Gly Arg Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

44

Val Thr Val Ser Arg
115

<210> 43
<211> 113
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> человеческая модель 21B12 VL

<400> 43

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

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

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Tyr Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 44
<211> 8
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 16B5 CDRH1

<400> 44

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Ile Tyr
1 5

<210> 45
<211> 8
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

45

<220>
 <223> 16B5 CDRH2

<400> 45

Ile Asp Pro Ala Tyr Gly Asn Thr
 1 5

<210> 46
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 16B5 CDRH3

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Хаа представляет собой A

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа представляет собой R

<400> 46

Xaa Xaa Arg Tyr Asp Thr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 47
 <211> 12
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 16B5 CDRL1

<400> 47

Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr
 1 5 10

<210> 48
 <211> 435
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<300>
 <308> NP_001822
 <309> 1991-05-01
 <313> (1)..(435)

<400> 48

Trp Glu Ser Gly Gln Val Leu Gly Asp Gln Thr Val Ser Asp Asn Glu
 1 5 10 15

46

Leu Gln Glu Met Ser Asn Gln Gly Ser Lys Tyr Val Asn Lys Glu Ile
 20 25 30

Gln Asn Ala Val Asn Gly Val Lys Gln Ile Lys Thr Leu Ile Glu Lys
 35 40 45

Thr Asn Glu Glu Arg Lys Thr Leu Leu Ser Asn Leu Glu Glu Ala Lys
 50 55 60

Lys Lys Lys Glu Asp Ala Leu Asn Glu Thr Arg Glu Ser Glu Thr Lys
 65 70 75 80

Leu Lys Glu Leu Pro Gly Val Cys Asn Glu Thr Met Met Ala Leu Trp
 85 90 95

Glu Glu Cys Lys Pro Cys Leu Lys Gln Thr Cys Met Lys Phe Tyr Ala
 100 105 110

Arg Val Cys Arg Ser Gly Ser Gly Leu Val Gly Arg Gln Leu Glu Glu
 115 120 125

Phe Leu Asn Gln Ser Ser Pro Phe Tyr Phe Trp Met Asn Gly Asp Arg
 130 135 140

Ile Asp Ser Leu Leu Glu Asn Asp Arg Gln Gln Thr His Met Leu Asp
 145 150 155 160

Val Met Gln Asp His Phe Ser Arg Ala Ser Ser Ile Ile Asp Glu Leu
 165 170 175

Phe Gln Asp Arg Phe Phe Thr Arg Glu Pro Gln Asp Thr Tyr His Tyr
 180 185 190

Leu Pro Phe Ser Leu Pro His Arg Arg Pro His Phe Phe Phe Pro Lys
 195 200 205

Ser Arg Ile Val Arg Ser Leu Met Pro Phe Ser Pro Tyr Glu Pro Leu
 210 215 220

Asn Phe His Ala Met Phe Gln Pro Phe Leu Glu Met Ile His Glu Ala
 225 230 235 240

Gln Gln Ala Met Asp Ile His Phe His Ser Pro Ala Phe Gln His Pro
 245 250 255

Pro Thr Glu Phe Ile Arg Glu Gly Asp Asp Asp Arg Thr Val Cys Arg
 260 265 270

47

Glu Ile Arg His Asn Ser Thr Gly Cys Leu Arg Met Lys Asp Gln Cys
 275 280 285

Asp Lys Cys Arg Glu Ile Leu Ser Val Asp Cys Ser Thr Asn Asn Pro
 290 295 300

Ser Gln Ala Lys Leu Arg Arg Glu Leu Asp Glu Ser Leu Gln Val Ala
 305 310 315 320

Glu Arg Leu Thr Arg Lys Tyr Asn Glu Leu Leu Lys Ser Tyr Gln Trp
 325 330 335

Lys Met Leu Asn Thr Ser Ser Leu Leu Glu Gln Leu Asn Glu Gln Phe
 340 345 350

Asn Trp Val Ser Arg Leu Ala Asn Leu Thr Gln Gly Glu Asp Gln Tyr
 355 360 365

Tyr Leu Arg Val Thr Thr Val Ala Ser His Thr Ser Asp Ser Asp Val
 370 375 380

Pro Ser Gly Val Thr Glu Val Val Val Lys Leu Phe Asp Ser Asp Pro
 385 390 395 400

Ile Thr Val Thr Val Pro Val Glu Val Ser Arg Lys Asn Pro Lys Phe
 405 410 415

Met Glu Thr Val Ala Glu Lys Ala Leu Gln Glu Tyr Arg Lys Lys His
 420 425 430

Arg Glu Glu
 435

<210> 49
 <211> 8
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 16B5 CDRL3

<400> 49

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Trp Thr
 1 5

<210> 50
 <211> 8
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

48

<220>
 <223> 21B12 CDRH1

<400> 50

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly
 1 5

<210> 51
 <211> 8
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 21B12 CDRH2

<400> 51

Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro
 1 5

<210> 52
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 21B12 CDRH3

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Хаа представляет собой A

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа представляет собой R

<400> 52

Xaa Xaa Asp Gly Phe Leu Tyr Phe Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 53
 <211> 12
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 21B12 CDRL1

<400> 53

Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr
 1 5 10

<210> 54
 <211> 435

49

<212> Белок
 <213> Mus musculus

<300>
 <308> NP_038520
 <309> 1989-09-01
 <313> (1)..(435)

<400> 54

Trp Asp Asn Gly Met Val Leu Gly Glu Gln Glu Val Ser Asp Asn Glu
 1 5 10 15

Leu Gln Glu Leu Ser Thr Gln Gly Ser Arg Tyr Ile Asn Lys Glu Ile
 20 25 30

Gln Asn Ala Val Gln Gly Val Lys His Ile Lys Thr Leu Ile Glu Lys
 35 40 45

Thr Asn Ala Glu Arg Lys Ser Leu Leu Asn Ser Leu Glu Glu Ala Lys
 50 55 60

Lys Lys Lys Glu Asp Ala Leu Glu Asp Thr Arg Asp Ser Glu Met Lys
 65 70 75 80

Leu Lys Ala Phe Pro Glu Val Cys Asn Glu Thr Met Met Ala Leu Trp
 85 90 95

Glu Glu Cys Lys Pro Cys Leu Lys His Thr Cys Met Lys Phe Tyr Ala
 100 105 110

Arg Val Cys Arg Ser Gly Ser Gly Leu Val Gly Gln Gln Leu Glu Glu
 115 120 125

Phe Leu Asn Gln Ser Ser Pro Phe Tyr Phe Trp Met Asn Gly Asp Arg
 130 135 140

Ile Asp Ser Leu Leu Glu Ser Asp Arg Gln Gln Ser Gln Val Leu Asp
 145 150 155 160

Ala Met Gln Asp Ser Phe Ala Arg Ala Ser Gly Ile Ile Asp Thr Leu
 165 170 175

Phe Gln Asp Arg Phe Phe Ala Arg Glu Leu His Asp Pro His Tyr Phe
 180 185 190

Ser Pro Ile Gly Phe Pro His Lys Arg Pro His Phe Leu Tyr Pro Lys
 195 200 205

Ser Arg Leu Val Arg Ser Leu Met Ser Pro Ser His Tyr Gly Pro Pro
 210 215 220

Ser Phe His Asn Met Phe Gln Pro Phe Phe Glu Met Ile His Gln Ala
 225 230 235 240
 Gln Gln Ala Met Asp Val Gln Leu His Ser Pro Ala Phe Gln Phe Pro
 245 250 255
 Asp Val Asp Phe Leu Arg Glu Gly Glu Asp Asp Arg Thr Val Cys Lys
 260 265 270
 Glu Ile Arg Arg Asn Ser Thr Gly Cys Leu Lys Met Lys Gly Gln Cys
 275 280 285
 Glu Lys Cys Gln Glu Ile Leu Ser Val Asp Cys Ser Thr Asn Asn Pro
 290 295 300
 Ala Gln Ala Asn Leu Arg Gln Glu Leu Asn Asp Ser Leu Gln Val Ala
 305 310 315 320
 Glu Arg Leu Thr Glu Gln Tyr Lys Glu Leu Leu Gln Ser Phe Gln Ser
 325 330 335
 Lys Met Leu Asn Thr Ser Ser Leu Leu Glu Gln Leu Asn Asp Gln Phe
 340 345 350
 Asn Trp Val Ser Gln Leu Ala Asn Leu Thr Gln Gly Glu Asp Lys Tyr
 355 360 365
 Tyr Leu Arg Val Ser Thr Val Thr Thr His Ser Ser Asp Ser Glu Val
 370 375 380
 Pro Ser Arg Val Thr Glu Val Val Val Lys Leu Phe Asp Ser Asp Pro
 385 390 395 400
 Ile Thr Val Val Leu Pro Glu Glu Val Ser Lys Asp Asn Pro Lys Phe
 405 410 415
 Met Asp Thr Val Ala Glu Lys Ala Leu Gln Glu Tyr Arg Arg Lys Ser
 420 425 430
 Arg Ala Glu
 435

<210> 55
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

51

<223> 21B12 CDRL3

<400> 55

Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Arg Thr
 1 5

<210> 56

<211> 435

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> вариант кластера

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную замену

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную замену

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную замену

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную замену

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (26)..(26)

<223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную замену

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (28)..(28)
 <223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную замену

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (37)..(37)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (41)..(41)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (51)..(51)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (55)..(55)
 <223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную замену

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (58)..(58)
 <223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную замену

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (59)..(59)
 <223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную замену

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (72)..(72)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (73)..(73)
 <223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную замену

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (76)..(76)
 <223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную замену

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (79)..(79)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (83)..(83)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (84)..(84)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (86)..(86)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (105)..(105)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (124)..(124)
<223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную
замену

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (151)..(151)
<223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную
замену

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (156)..(156)
<223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную
замену

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (157)..(157)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (158)..(158)
<223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную
замену

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (161)..(161)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (165)..(165)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (167)..(167)
<223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную
замену

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (171)..(171)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (175)..(175)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (183)..(183)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (186)..(186)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (187)..(187)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (189)..(189)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (190)..(190)
<223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную
замену

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (191)..(191)
<223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную
замену

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (192)..(192)
<223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную
замену

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (193)..(193)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (195)..(195)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (196)..(196)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (197)..(197)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

```

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (200)..(200)
 <223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную замену

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (205)..(205)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (206)..(206)
 <223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную замену

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (211)..(211)
 <223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную замену

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (217)..(217)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (218)..(218)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (220)..(220)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (222)..(222)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (224)..(224)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (225)..(225)
 <223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную замену

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (228)..(228)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (234)..(234)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (239)..(239)
<223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную
замену

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (246)..(246)
<223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную
замену

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (247)..(247)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (248)..(248)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (255)..(255)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (257)..(257)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (258)..(258)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (259)..(259)
<223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную
замену

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (261)..(261)
<223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную
замену

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (265)..(265)
<223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную
замену

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (272)..(272)
<223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную
замену

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (276)..(276)

```

<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (283)..(283)
 <223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную замену

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (286)..(286)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (289)..(289)
 <223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную замену

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (292)..(292)
 <223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную замену

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (305)..(305)
 <223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную замену

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (308)..(308)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (311)..(311)
 <223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную замену

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (314)..(314)
 <223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную замену

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (315)..(315)
 <223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную замену

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (325)..(325)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (326)..(326)
 <223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную замену

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (328)..(328)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (332)..(332)
<223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную
замену

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (334)..(334)
<223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную
замену

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (336)..(336)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (350)..(350)
<223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную
замену

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (357)..(357)
<223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную
замену

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (367)..(367)
<223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную
замену

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (373)..(373)
<223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную
замену

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (376)..(376)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (377)..(377)
<223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную
замену

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (379)..(379)
<223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную
замену

```

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (383)..(383)
 <223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную замену

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (387)..(387)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (404)..(404)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (405)..(405)
 <223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную замену

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (407)..(407)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (411)..(411)
 <223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную замену

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (412)..(412)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (418)..(418)
 <223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную замену

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (430)..(430)
 <223> Хаа представляет собой представляет собой консервативную аминокислотную замену

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (432)..(432)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (434)..(434)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<400> 56

Trp	Xaa	Xaa	Gly	Xaa	Val	Leu	Gly	Xaa	Gln	Xaa	Val	Ser	Asp	Asn	Glu
1				5				10						15	

60

Leu Gln Glu Xaa Ser Xaa Gln Gly Ser Xaa Tyr Xaa Asn Lys Glu Ile
 20 25 30

Gln Asn Ala Val Xaa Gly Val Lys Xaa Ile Lys Thr Leu Ile Glu Lys
 35 40 45

Thr Asn Xaa Glu Arg Lys Xaa Leu Leu Xaa Xaa Leu Glu Glu Ala Lys
 50 55 60

Lys Lys Lys Glu Asp Ala Leu Xaa Xaa Thr Arg Xaa Ser Glu Xaa Lys
 65 70 75 80

Leu Lys Xaa Xaa Pro Xaa Val Cys Asn Glu Thr Met Met Ala Leu Trp
 85 90 95

Glu Glu Cys Lys Pro Cys Leu Lys Xaa Thr Cys Met Lys Phe Tyr Ala
 100 105 110

Arg Val Cys Arg Ser Gly Ser Gly Leu Val Gly Xaa Gln Leu Glu Glu
 115 120 125

Phe Leu Asn Gln Ser Ser Pro Phe Tyr Phe Trp Met Asn Gly Asp Arg
 130 135 140

Ile Asp Ser Leu Leu Glu Xaa Asp Arg Gln Gln Xaa Xaa Xaa Leu Asp
 145 150 155 160

Xaa Met Gln Asp Xaa Phe Xaa Arg Ala Ser Xaa Ile Ile Asp Xaa Leu
 165 170 175

Phe Gln Asp Arg Phe Phe Xaa Arg Glu Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Xaa
 180 185 190

Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Pro His Xaa Arg Pro His Phe Xaa Xaa Pro Lys
 195 200 205

Ser Arg Xaa Val Arg Ser Leu Met Xaa Xaa Ser Xaa Tyr Xaa Pro Xaa
 210 215 220

Xaa Phe His Xaa Met Phe Gln Pro Phe Xaa Glu Met Ile His Xaa Ala
 225 230 235 240

Gln Gln Ala Met Asp Xaa Xaa Xaa His Ser Pro Ala Phe Gln Xaa Pro
 245 250 255

Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Arg Glu Gly Xaa Asp Asp Arg Thr Val Cys Xaa
 260 265 270

Glu Ile Arg Xaa Asn Ser Thr Gly Cys Leu Xaa Met Lys Xaa Gln Cys
275 280 285

Xaa Lys Cys Xaa Glu Ile Leu Ser Val Asp Cys Ser Thr Asn Asn Pro
290 295 300

Xaa Gln Ala Xaa Leu Arg Xaa Glu Leu Xaa Xaa Ser Leu Gln Val Ala
305 310 315 320

Glu Arg Leu Thr Xaa Xaa Tyr Xaa Glu Leu Leu Xaa Ser Xaa Gln Xaa
325 330 335

Lys Met Leu Asn Thr Ser Ser Leu Leu Glu Gln Leu Asn Xaa Gln Phe
340 345 350

Asn Trp Val Ser Xaa Leu Ala Asn Leu Thr Gln Gly Glu Asp Xaa Tyr
355 360 365

Tyr Leu Arg Val Xaa Thr Val Xaa Xaa His Xaa Ser Asp Ser Xaa Val
370 375 380

Pro Ser Xaa Val Thr Glu Val Val Val Lys Leu Phe Asp Ser Asp Pro
385 390 395 400

Ile Thr Val Xaa Xaa Pro Xaa Glu Val Ser Xaa Xaa Asn Pro Lys Phe
405 410 415

Met Xaa Thr Val Ala Glu Lys Ala Leu Gln Glu Tyr Arg Xaa Lys Xaa
420 425 430

Arg Xaa Glu
435

<210> 57
<211> 435
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> вариант кластера

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(3)
<223> Xaa представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (26)..(26)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (28)..(28)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (37)..(37)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (41)..(41)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (51)..(51)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (55)..(55)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (58)..(59)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (72)..(73)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (76)..(76)

<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (79)..(79)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (83)..(84)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (86)..(86)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (105)..(105)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (124)..(124)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (151)..(151)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (156)..(158)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (161)..(161)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (165)..(165)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (167)..(167)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (171)..(171)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (175)..(175)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту
 <220>
 <221> MISC_FEATURE

```

<222> (183)..(183)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (186)..(187)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (189)..(193)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (195)..(197)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (200)..(200)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (205)..(206)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (211)..(211)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (217)..(218)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (220)..(220)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (222)..(222)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (224)..(225)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (228)..(228)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (234)..(234)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>

```

```

<221> MISC_FEATURE
<222> (239)..(239)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (246)..(248)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (255)..(255)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (257)..(259)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (261)..(261)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (265)..(265)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (272)..(272)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (276)..(276)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (283)..(283)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (286)..(286)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (289)..(289)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (292)..(292)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (305)..(305)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (308)..(308)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (311)..(311)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (314)..(315)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (325)..(326)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (328)..(328)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (332)..(332)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (334)..(334)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (336)..(336)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (350)..(350)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (357)..(357)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (367)..(367)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (373)..(373)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (376)..(377)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (379)..(379)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (383)..(383)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (387)..(387)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (404)..(405)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (407)..(407)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (411)..(412)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (418)..(418)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (430)..(430)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (432)..(432)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (434)..(434)
<223> Хаа представляет собой любую аминокислоту

<400> 57

Trp Xaa Xaa Gly Xaa Val Leu Gly Xaa Gln Xaa Val Ser Asp Asn Glu
1          5          10          15

Leu Gln Glu Xaa Ser Xaa Gln Gly Ser Xaa Tyr Xaa Asn Lys Glu Ile
          20          25          30

Gln Asn Ala Val Xaa Gly Val Lys Xaa Ile Lys Thr Leu Ile Glu Lys
          35          40          45

```

68

Thr Asn Xaa Glu Arg Lys Xaa Leu Leu Xaa Xaa Leu Glu Glu Ala Lys
 50 55 60

Lys Lys Lys Glu Asp Ala Leu Xaa Xaa Thr Arg Xaa Ser Glu Xaa Lys
 65 70 75 80

Leu Lys Xaa Xaa Pro Xaa Val Cys Asn Glu Thr Met Met Ala Leu Trp
 85 90 95

Glu Glu Cys Lys Pro Cys Leu Lys Xaa Thr Cys Met Lys Phe Tyr Ala
 100 105 110

Arg Val Cys Arg Ser Gly Ser Gly Leu Val Gly Xaa Gln Leu Glu Glu
 115 120 125

Phe Leu Asn Gln Ser Ser Pro Phe Tyr Phe Trp Met Asn Gly Asp Arg
 130 135 140

Ile Asp Ser Leu Leu Glu Xaa Asp Arg Gln Gln Xaa Xaa Xaa Leu Asp
 145 150 155 160

Xaa Met Gln Asp Xaa Phe Xaa Arg Ala Ser Xaa Ile Ile Asp Xaa Leu
 165 170 175

Phe Gln Asp Arg Phe Phe Xaa Arg Glu Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Xaa
 180 185 190

Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Pro His Xaa Arg Pro His Phe Xaa Xaa Pro Lys
 195 200 205

Ser Arg Xaa Val Arg Ser Leu Met Xaa Xaa Ser Xaa Tyr Xaa Pro Xaa
 210 215 220

Xaa Phe His Xaa Met Phe Gln Pro Phe Xaa Glu Met Ile His Xaa Ala
 225 230 235 240

Gln Gln Ala Met Asp Xaa Xaa Xaa His Ser Pro Ala Phe Gln Xaa Pro
 245 250 255

Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Arg Glu Gly Xaa Asp Asp Arg Thr Val Cys Xaa
 260 265 270

Glu Ile Arg Xaa Asn Ser Thr Gly Cys Leu Xaa Met Lys Xaa Gln Cys
 275 280 285

Xaa Lys Cys Xaa Glu Ile Leu Ser Val Asp Cys Ser Thr Asn Asn Pro
 290 295 300

69

Xaa Gln Ala Xaa Leu Arg Xaa Glu Leu Xaa Xaa Ser Leu Gln Val Ala
305 310 315 320

Glu Arg Leu Thr Xaa Xaa Tyr Xaa Glu Leu Leu Xaa Ser Xaa Gln Xaa
325 330 335

Lys Met Leu Asn Thr Ser Ser Leu Leu Glu Gln Leu Asn Xaa Gln Phe
340 345 350

Asn Trp Val Ser Xaa Leu Ala Asn Leu Thr Gln Gly Glu Asp Xaa Tyr
355 360 365

Tyr Leu Arg Val Xaa Thr Val Xaa Xaa His Xaa Ser Asp Ser Xaa Val
370 375 380

Pro Ser Xaa Val Thr Glu Val Val Val Lys Leu Phe Asp Ser Asp Pro
385 390 395 400

Ile Thr Val Xaa Xaa Pro Xaa Glu Val Ser Xaa Xaa Asn Pro Lys Phe
405 410 415

Met Xaa Thr Val Ala Glu Lys Ala Leu Gln Glu Tyr Arg Xaa Lys Xaa
420 425 430

Arg Xaa Glu
435

<210> 58
<211> 121
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> человеческая модель 21B12 VH

<400> 58

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

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

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

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

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr

70

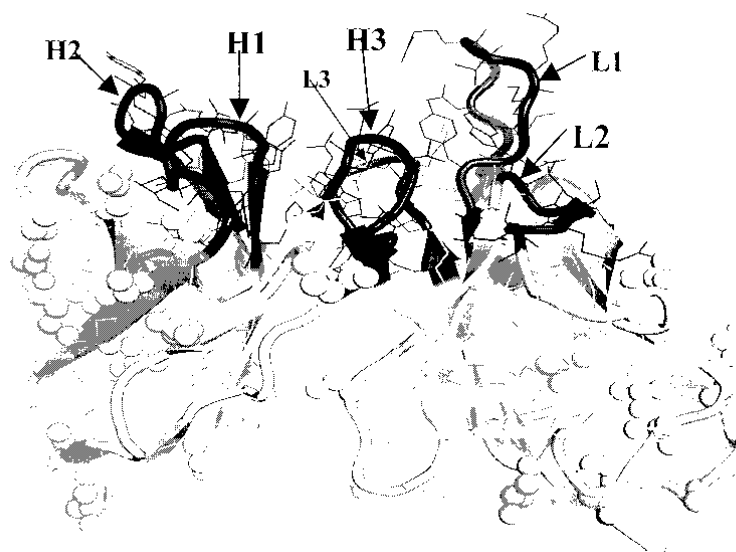
65 70 75 80

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

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

Thr Ile Asp Glu Asn Trp Phe Asp Pro
 115 120

Фиг. 1



Фиг. 2

VL

[illegible]

VH

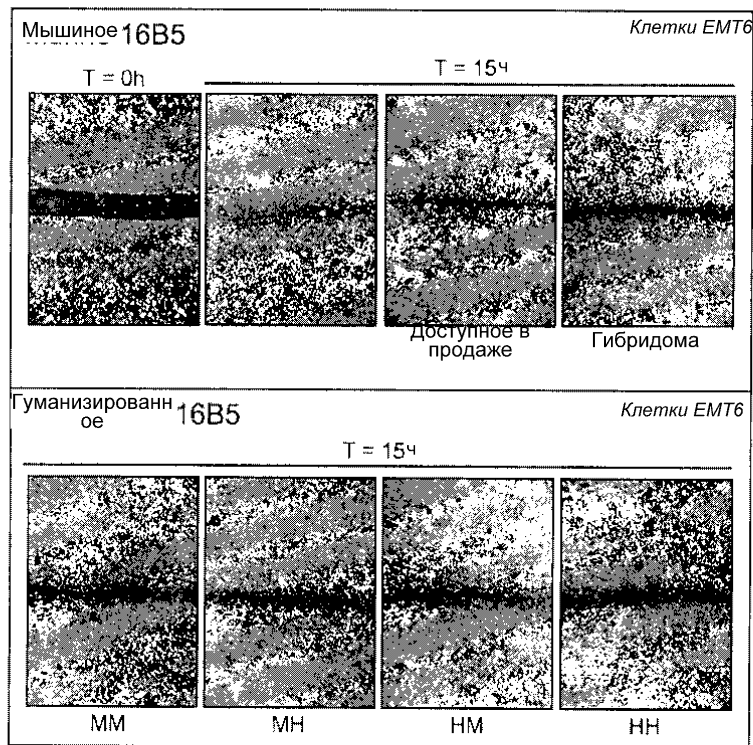
[illegible]

16B5 мышиное VL = SEQ ID NO.:25 (Выделены области, определяющие комплементарность)
16B5 гуманизированное VL = SEQ ID NO.:8 (Выделены области, определяющие комплементарность)
Человеческая модель 16B5 VL = SEQ ID NO.:41
16B5 мышиное VH = SEQ ID NO.:29 (Выделены области, определяющие комплементарность)
15B5 гуманизированное VH = SEQ ID NO.:7 (Выделены области, определяющие комплементарность)
Человеческая модель 16B5 VH = SEQ ID NO.:42

Фиг. 3

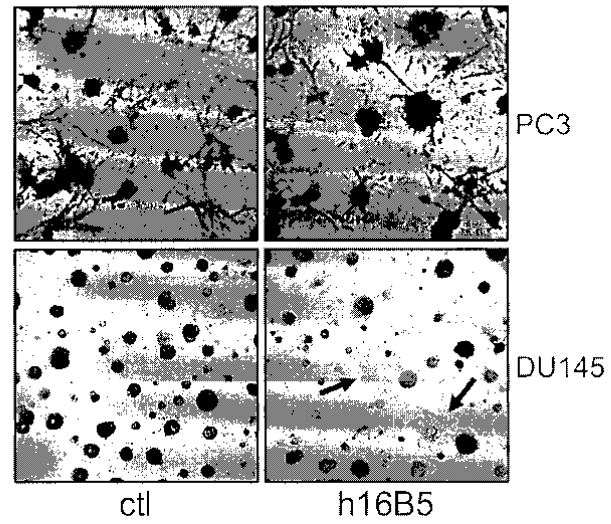
	K_a (1/Ms)		K_d (1/s)		K_D (M)	
	Среднее	Стандартное отклонение	Среднее	Стандартное отклонение	Среднее	Стандартное отклонение
16B5 Fab	7.41e+04	2.03e+04	0.0030	0.0006	4.16e-08	7.87e-09
16B5	3.29e-05	1.16e+05	0.0017	0.0005	6.64e-09	4.66e-09
HH16B5 Fab	1.59e+05	1.89e+04	0.0027	0.0004	1.72e-08	2.97e-09
HH16B5	3.45e+05	4.89e-04	0.0015	0.0005	4.49e-09	8.65e-10

Фиг. 4

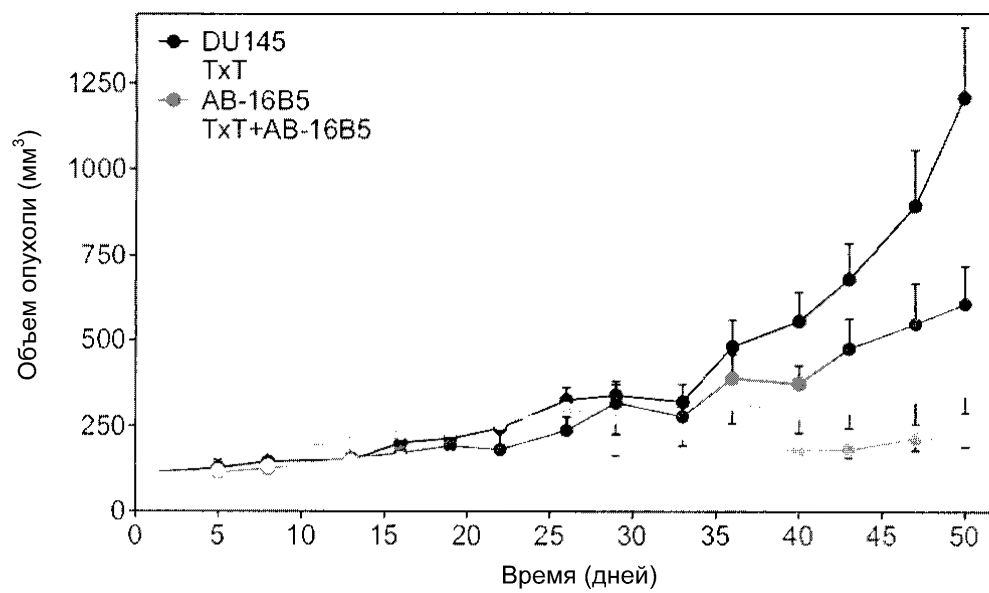


5/15

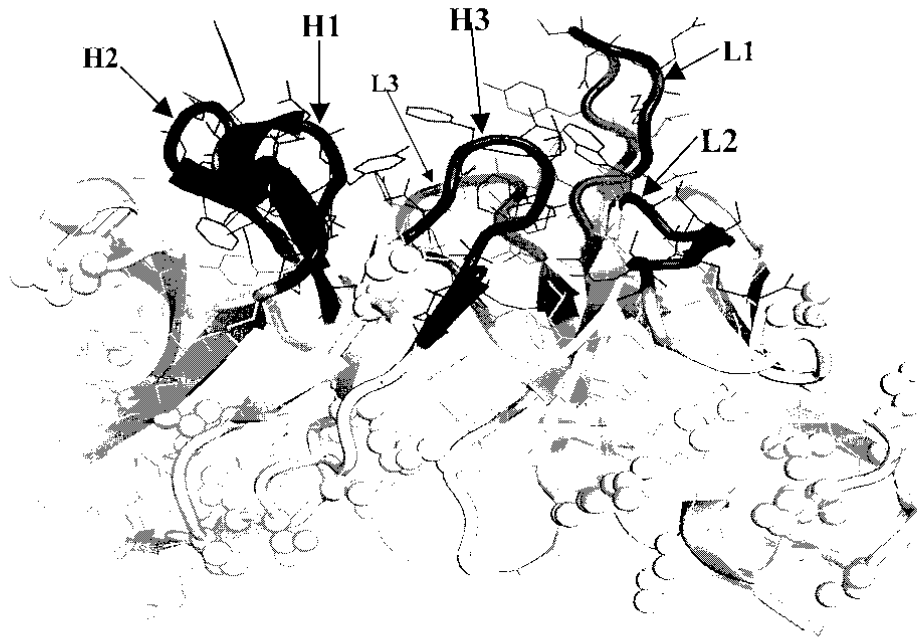
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



21B12 humanization

VL (14 мутаций, 100% гуманизирование каркасной области)

[illegible]

VN (18 мутаций, 100% гуманизирование каркасной области)

Скрытое
В пределах 5А от области, определяющей
комplementарность (определение Kabat)
Близко к VH
Близко к VL

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/1730075>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/3170803>

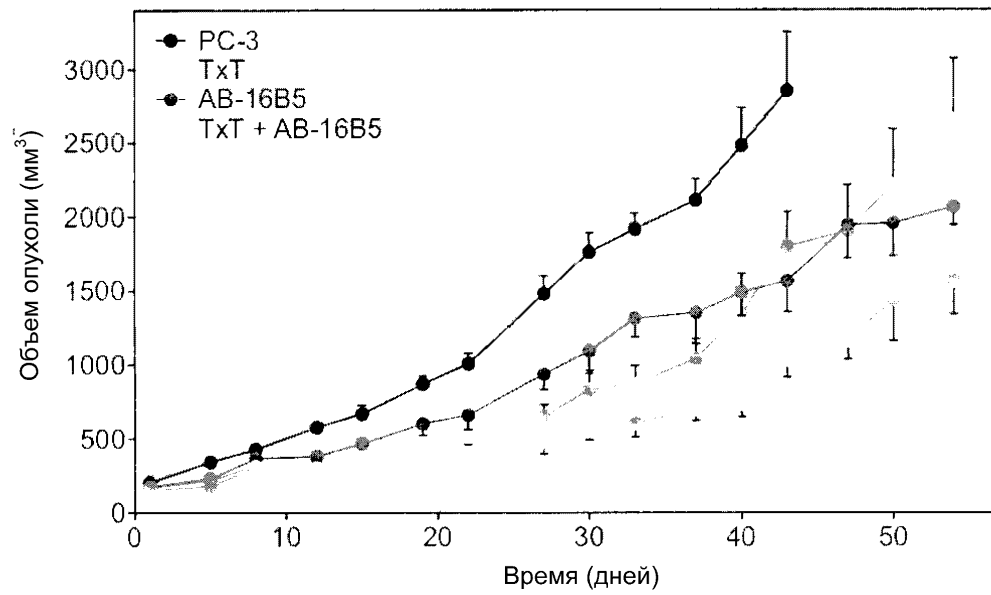
21B12 Машинное VL= SEQ ID NO.:33 (Выделены области, определяющие комплементарность)
21B12 Гуанинзирова VL= SEQ ID NO.:18 (Выделены области, определяющие комплементарность)
Человеческая модель:21B12 VI= SEQ ID NO.:43
21B12 Машинное VH=SEQ ID NO.:37 (Выделены области, определяющие комплементарность)
21B12 Гуанинзирова VH=SEQ ID NO.:17 (Выделены области, определяющие комплементарность)
Человеческая модель:21B12 VH= SEQ ID NO.:58

Фиг. 9

	K _a (1/Ms)		K _d (1/s)		K _D (M)	
	Среднее	Стандартное отклонение	Среднее	Стандартное отклонение	Среднее	Стандартное отклонение
21B12 Fab	2.15e+05	4.56e+04	0.00352	0.00092	2.53e-08	8.26e-09
21B12	3.62e+05	1.27e+5	0.0015	0.00074	5.09e-09	3.98e-09
HH21B12	3.74e+05		0.00083		2.23e-09	

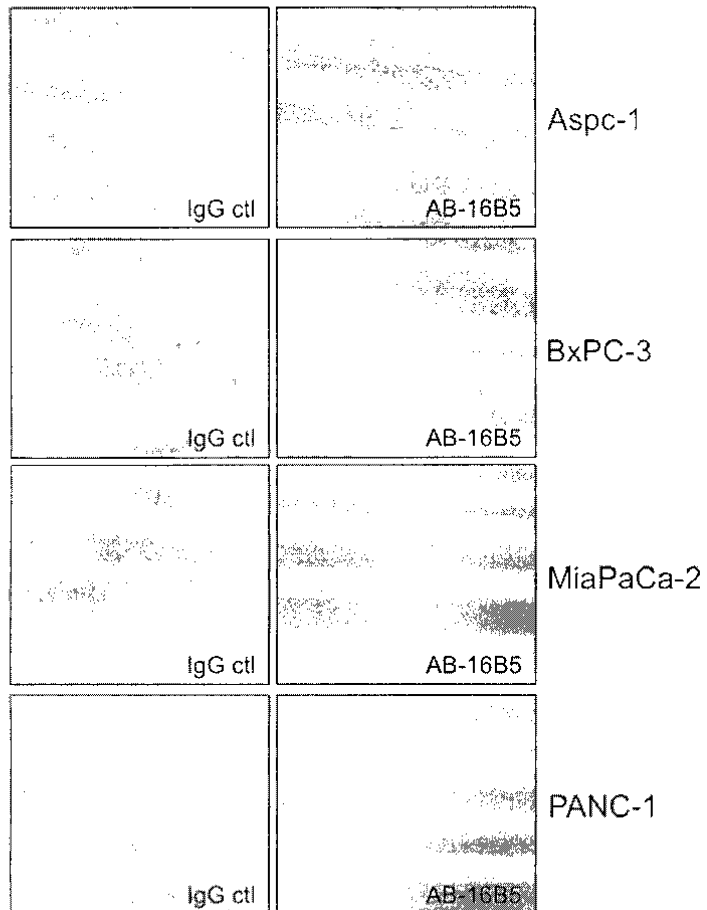
9/15

Фиг. 10

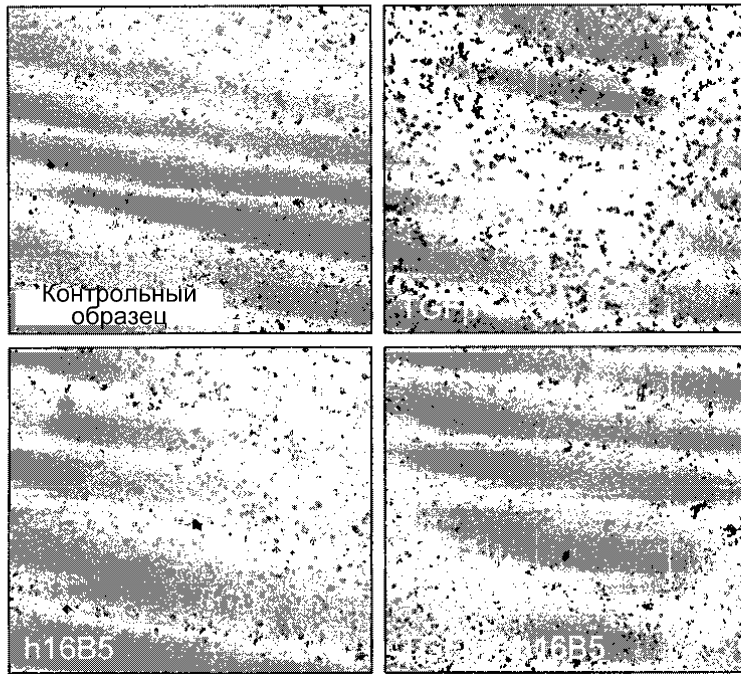


10/15

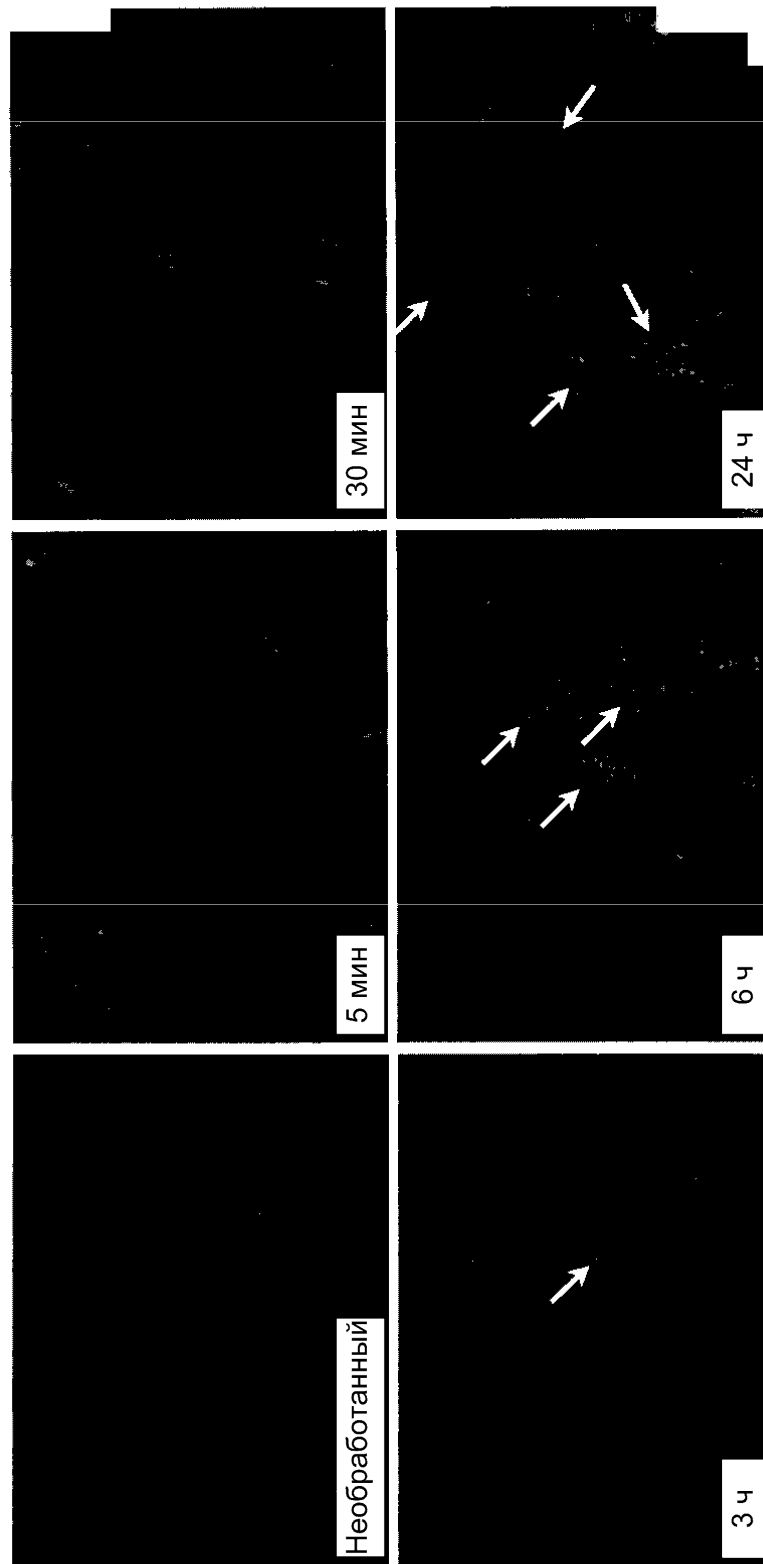
Фиг. 11



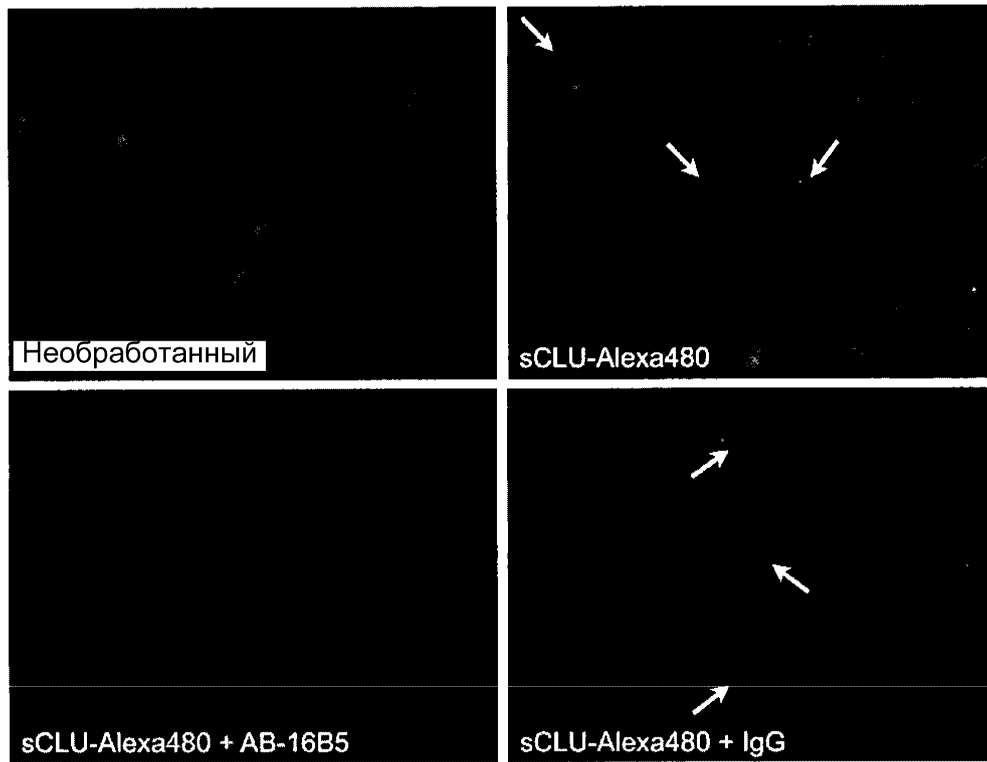
Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15

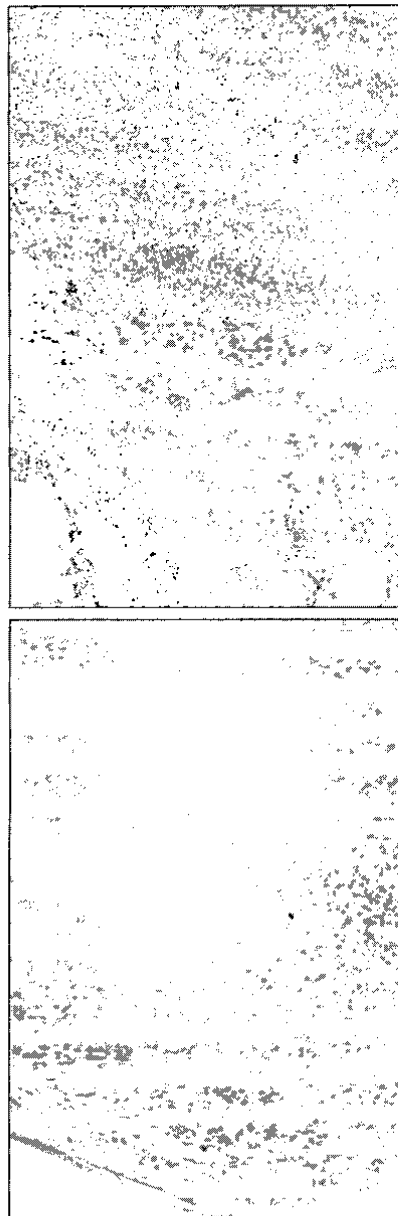
Поисковая последовательность - человеческий кластерин (NP_001822)

Субъективная последовательность - мышинный кластерин (NP_038520)

Совпадений = 334/435 (77%), положительных = 384/435 (89%), брешей = 0/435 (0%)

Query 67	WESGQVLGDQTVSDNELQEMSNQGSKYVNKEIQNAVNGVKQIKTLIEKTNEERKTLLSNL	126
SEQ NO.56	W++G VLG+Q VSDNELQE+S QGS+Y+NKEIQNAV GVK IKTLEKTN ERK+LL++L	
SEQ NO.57	W G VLG Q VSDNELQE S QGS Y NKEIQNAV GVK IKTLEKTN ERK LL L	
Sbjct 14	WDNGMVLGEQEVSDNELQELSTQGSRYNKEIQNAVQGVKHIKTLEKTNAERKSLNLSL	73
Query 127	EEAKKKKEDALNETRESETKLKELPGVCNETMMALWEECKPCLKQTCMKFYARVCRSGSG	186
SEQ NO.56	EEAKKKKEDAL +TR+SE KLK P VCNETMMALWEECKPCLK TCMKFYARVCRSGSG	
SEQ NO.57	EEAKKKKEDAL TR SE KLK P VCNETMMALWEECKPCLK TCMKFYARVCRSGSG	
Sbjct 74	EEAKKKKEDALETRDSEMKLKAFPEVCNETMMALWEECKPCLKHTCMKFYARVCRSGSG	133
Query 187	LVGRQLEEFNLQSSPFYFWMNGDRIDSLLLENLRQOTHMLDVMQDHFSSRASSIIDELFQDR	246
SEQ NO.56	LVG+QLEEFNLQSSPFYFWMNGDRIDSLE+LRQQ+ +LD MQD F+RAS IID LFQDR	
SEQ NO.57	LVG QLEEFNLQSSPFYFWMNGDRIDSLE LRQQ LD MQD F RAS IID LFQDR	
Sbjct 134	LVGQLEEFNLQSSPFYFWMNGDRIDSLES LRQQS QVLDAMQDSFARASGIIDTLFQDR	193
Query 247	FFTREPQDTYHYLPFSLPHRRPHFFFPKSRIVRSLMPFSPYEPLNFHAMFQPFLEMIHEA	306
SEQ NO.56	FF RE D +++ P PH+RPHF +PKSR+VRSLM S Y P +FH MFQPF EMIH+A	
SEQ NO.57	FF RE D P PH RPHF PKSR VRSLM S Y P FH MFQPF EMIH A	
Sbjct 194	FFARELHDPHYFSPIGFPHKRPHFLYPKSRLVRSLMSPSHYGPPSFHNMFPFFEMIHQA	253
Query 307	QQAMDIHFHSPAFQHPPTEFIREGDDRTVCFEIRHNSTGCLRMKDQCDKCREILSVDCS	366
SEQ NO.56	QQAMD+ HSPAFQ P +F+REG+DDRTVC+EIR NSTGCL+MK QC+KC+EILSVDCS	
SEQ NO.57	QQAMD HSPAFQ P F REG DDRTVC EIR NSTGCL MK QC KC EILSVDCS	
Sbjct 254	QQAMDVQLHSPAFQFPDVDFLREGEDRTVCFEIRRNSTGCLMKMGQCEKCQEILSVDCS	313
Query 367	TNNPSQAKLRRELDLQVAERLTRKYNELLSYQWKMLNTSSLLEQLNEQFNWVSRLAN	426
SEQ NO.56	TNNP+QA LR+EL++SLQVAERLT +Y ELL+S+Q KMLNTSSLLEQLN+QFNWVS+LAN	
SEQ NO.57	TNNP QA LR EL SLQVAERLT Y ELL S Q KMLNTSSLLEQLN QFNWVS LAN	
Sbjct 314	TNNPAQANLRQELNDSLQVAERLTEQYKELLCSFQSKMLNTSSLLEQLNDQFNWVSQLAN	373
Query 427	LTQGEDQYYLRVTTVASHTSDSDVPSGVTEVVVKLFSDPITVTVPVEVSRKNPKFMETV	486
SEQ NO.56	LTQGED+YYLRV+TV +H+SDS+VPS VTEVVVKLFSDPITV +P EVS+ NPKFM+TV	
SEQ NO.57	LTQGED YYLRV TV H SDS VPS VTEVVVKLFSDPITV P EVS NPKFM TV	
Sbjct 374	LTQGEDKYLRVSTVTTTHSSDSEVPSRVTEVVVKLFSDPITVVLPPEVSKDNPKFMDTV	433
Query 487	AEKALQEYRKKHREE	501
SEQ NO.56	AEKALQEYR+K R E	
SEQ NO.57	AEKALQEYR K R E	
Sbjct 434	AEKALQEYRRKSRAE	448

Фиг. 16



4T1 - AB-16B5

4T1 - ctrl