


 ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
 ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2006134477/10, 29.03.2005

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
29.03.2005

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
30.03.2004 GB 0407197.3
30.03.2004 GB 0407193.2

(43) Дата публикации заявки: 10.05.2008 Бюл. № 13

(45) Опубликовано: 20.09.2011 Бюл. № 26

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: WO 1999048523, 30.09.1999. OGATA I, ET
AL. "Oncostatin M is produced during pregnancy
by decidual cells and stimulates the release of
HCG". Mol Hum Reprod. 2000 Aug; 6(8):750-757.
CARROLL G, ET AL. "Antagonism of the IL-6
cytokine subfamily--a potential strategy for more
effective therapy in rheumatoid arthritis". Inflamm
Res. 1998 Jan; 47(1):1-7. (см. прод.)(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 30.10.2006(86) Заявка РСТ:
GB 2005/001147 (29.03.2005)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2005/095457 (13.10.2005)Адрес для переписки:
191036, Санкт-Петербург, а/я 24,
"НЕВИНПАТ", пат.пов. А.В.Поликарпову

(72) Автор(ы):

ЭЛЛИС Джонатан Генри (GB),
ЭОН-ДЮВАЛЬ Александр (GB),
ГЕРМАШЕВСКИ Фолькер (GB),
ПЛАМПТОН Кристофер (GB),
РЭПСОН Николас Тимоти (GB),
УЭСТ Майкл Роберт (GB)

(73) Патентообладатель(и):

Глаксо Груп Лимитед (GB)

(54) ИММУНОГЛОБУЛИНЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и
представляет собой антитела, которые
специфически связывают сайт II онкостатина М
человека (hOSM) и ингибируют взаимодействие
между hOSM и gp130. Также представленыполинуклеотид, клетка-хозяин, вектор, способы
лечения и другие применения антител.
Изобретение можно эффективно использовать
для лечения заболеваний, опосредованных
взаимодействием между hOSM и gp130. 16 н. и 15
з.п. ф-лы, 37 ил., 5 табл.

(56) (продолжение):

ТУПИЦЫН Н.Н. Новое о трансдучерном рецепторе цитокинов gp130 в онкогематологии.

RU 2 4 2 9 2 4 5 C 2

RU 2 4 2 9 2 4 5 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2006134477/10, 29.03.2005**

(24) Effective date for property rights:
29.03.2005

Priority:

(30) Priority:
30.03.2004 GB 0407197.3
30.03.2004 GB 0407193.2

(43) Application published: **10.05.2008 Bull. 13**

(45) Date of publication: **20.09.2011 Bull. 26**

(85) Commencement of national phase: **30.10.2006**

(86) PCT application:
GB 2005/001147 (29.03.2005)

(87) PCT publication:
WO 2005/095457 (13.10.2005)

Mail address:
191036, Sankt-Peterburg, a/ja 24, "NEVINPAT",
pat.pov. A.V.Polikarpovu

(72) Inventor(s):

EhLLIS Dzhonatan Genri (GB),
EhON-DJuVAL' Aleksandr (GB),
GERMAShevSKI Fol'ker (GB),
PLAMPTON Kristofer (GB),
REhPSON Nikolas Timoti (GB),
UEhST Majkl Robert (GB)

(73) Proprietor(s):

Glakso Grup Limited (GB)

(54) **IMMUNOGLOBULINS**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: disclosed are antibodies which specifically bind the human Oncostatin M (hOSM) site II and inhibit reaction between hOSM and gp130. The invention also discloses a polynucleotide, a host

cell, a vector, treatment methods and other uses of antibodies.

EFFECT: invention can be effectively used to treat diseases mediated by the reaction between hOSM and gp130.

31 cl, 52 dwg, 5 tbl, 16 ex

Текст описания приведен в факсимильном виде.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к иммуноглобулинам, которые специфически связывают онкостатин М (OSM) и, в частности, онкостатин М человека (hOSM). Более конкретно, настоящее изобретение относится к антителам, которые специфически связывают hOSM. Настоящее изобретение также относится к способам лечения заболеваний или расстройств указанными иммуноглобулинами, к фармацевтическим композициям, содержащим указанные иммуноглобулины, и к способам изготовления. Другие аспекты настоящего изобретения следуют из приведенного ниже описания.

Предшествующий уровень техники

Онкостатин М представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 28 кДа, который принадлежит к цитокиновому семейству интерлейкина 6 (IL-6), которое включает IL-6, фактор ингибирования лейкоза (LIF), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), кардиотрофин-1 (CT-1) и цитокин типа кардиотрофина-1 (см. Kishimoto T et al (1995) Blood 86: 1243-1254), которые имеют общий рецептор gp130 для трансмембранной передачи сигналов (см. Taga and Kishimoto T (1997) Annu. Rev. Immunol. 15: 797-819). OSM был первоначально обнаружен по его способности ингибировать рост меланомной клеточной линии A375 (см. Malik N (1989) et al Mol Cell Biol 9: 2847-2853). Впоследствии было обнаружено больше эффектов, и было найдено, что он является многофункциональным медиатором, как и другие члены семейства IL-6. OSM продуцируется в ряде клеток разного типа, включая макрофаги, активированные Т-клетки (см. Zarling JM (1986) PNAS (USA) 83: 9739-9743), полиморфоядерные нейтрофилы (см. Grenier A et al (1999) Blood 93:1413-1421), эозинофилы (см. Tamura S et al (2002) Dev. Dyn. 225: 327-31), дендритные клетки (см. Suda et al (2002) Cytokine 17:335-340) в поджелудочной железе, почках, семенниках, селезенке, желудке и мозге (см. Znoyko I et al (2005) Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 283:182-186) и костном мозге (см. Psenak O et al (2003) Acta Haematol 109: 68-75). Его основные биологические эффекты включают активацию эндотелия (см. Brown TJ et al (1993) Blood 82: 33-7),

активацию острофазной реакции (см. Benigni F et al (1996) Blood 87: 1851-1854),
 индукцию клеточной пролиферации или дифференцировки, модуляцию
 высвобождения медиаторов воспаления и гематопозз (см. Tanaka M et al (2003)
 102: 3154-3162), перестройку кости (см. de Hooge ASK (2002) Am J Pathol 160:
 1733-1743), стимуляцию ангиогенеза (см. Vasse M et al (1999) Arterioscler
 Thromb Vasc Biol 19:1835-1842) и заживление ран.

Рецепторы для OSM (β -рецепторы для онкостатина M, "OSMR β ")
 экспрессируются в широком ряде клеток, включая эпителиальные клетки,
 хондроциты, фибробласты (см. Langdon C et al (2003) J Immunol 170: 548-555),
 нейрональные клетки, гладкомышечные клетки, клетки лимфатических узлов,
 кости, сердца, тонкого кишечника, легких и почек (см. Tamura S et al (2002) Mech
 Dev 115: 127-131) и эндотелиальные клетки. Ряд данных подтверждает, что
 эндотелиальные клетки представляют собой главную мишень для OSM. Эти
 клетки экспрессируют в 10-20 раз большее число рецепторов как высокой, так и
 низкой аффинности и проявляют сильные и долговременные изменения
 фенотипа после стимуляции OSM (см. Modur V et al (1997) J Clin Invest 100: 158-
 168). В дополнение, OSM является главным аутокринным фактором роста для
 клеток саркомы Капоши, которые, как считают, имеют эндотелиальное
 происхождение (см. Murakami-Mori K et al (1995) J Clin Invest 96:1319-1327).

Как и другие цитокины семейства IL-6, OSM связывается с
 гликопротеином gp130 для трансмембранной передачи сигналов. Ключевым
 свойством цитокинов gp130 является образование олигомерных рецепторных
 комплексов, которые содержат gp130 и один или более чем один из
 корецепторов, в зависимости от лиганда (см. обзор в Heinrich PC et al (2003)
 Biochem J. 374:1-20). Как результат, эти цитокины могут быть медиаторами как
 общих, так и уникальных биологических активностей *in vitro* и *in vivo*, в
 зависимости от состава образованного рецепторного комплекса. Человеческий
 OSM (hOSM) отличается от других IL-6 цитокинов тем, что он может
 образовывать комплексы с gp130 и с одним из двух корецепторов, LIFR
 (рецептором фактора ингибирования лейкоза) или рецептором онкостатина
 (OSMR). Фиг. 1 иллюстрирует взаимодействие между hOSM и gp130, LIFR и
 OSMR. Кристаллическая структура hOSM была расшифрована, и было
 показано, что она содержит четыре α -спиральных пучка с двумя

потенциальными сайтами гликозилирования. Два отдельных сайта связывания лиганда были идентифицированы на молекуле hOSM сайт-направленным мутагенезом (см. Deller MC et al (2000) Structural Fold Des. 8:863-874). Первый, обозначенный как сайт II (иногда "сайт 2"), взаимодействует с gp130, а второй сайт, обозначенный как сайт III (иногда "сайт 3"), на противоположном конце молекулы взаимодействует либо с LIFR, либо с OSMR. Эксперименты по мутагенезу показали, что сайты связывания для LIFR и OSMR почти идентичны, но их можно различить по мутации единственной аминокислоты.

OSM синтезируется в виде белка-предшественника, содержащего гидрофобную N-концевую сигнальную последовательность из 25 аминокислот (АК) и С-концевой пропептид из 33 АК, оба из которых отщепляются с образованием зрелого OSM. Белок-предшественник OSM не имеет биологической активности, но она значительно повышается при отщеплении С-концевого пропептида (см. Bruce A.G. et al (1992) Progr. Growth Factor Res. 4: 157-170, Malik N et al (1989) Mol. Cell Biol. 9: 2847-2853). OSM был описан как "компактная бочковидная молекула" с размерами приблизительно $20\text{\AA} \times 27\text{\AA} \times 56\text{\AA}$. Имеются четыре альфа-спиральные области (спираль А 10-37АК, спираль В 67-90АК, спираль С 105-131АК и спираль D 159-185АК, нумерация АК начинается после удаления сигнальной последовательности). Спирали А и С содержат "перегибы". Эти спирали соединены двумя выступающими петлями (петля АВ: 38-66АК; петля CD: 130-158АК) и расположены в виде двух антипараллельных пар (А-D и В-С) (см. Deller M.C. et al (2000) Structure 8; 863-874).

Оказалось, что связывание OSM через сайт II с gp130 делает возможным связывание другой молекулы OSM с gp130 путем взаимодействия с сайтом III. OSM также будет связываться либо с LIFR, либо с OSMR через сайт III. Таким образом, OSM образует комплекс с его рецептором, состоящий из: одного gp130, одного LIFR или OSMR и двух молекул OSM (см. Sporeno E (1994) J.Biol.Chem. 269:10991-10995, Staunton D et al (1998) Prot. Engineer 11:1093-1102 и Gearing DP (1992) Science 225:306-312).

При использовании мутагенеза важными остатками для связывания OSM-gp130 по сайту II являются Gln20, Gly120, Gln16 и Asn124. Для связывания OSM-OSMR по сайту III важными остатками являются Phe160 и Lys163.

Поэтому взаимодействие OSM по сайту II зависит от Gln20, Gly120, Asn124 и в меньшей степени от Gln16 на hOSM. Три комплементарных остатка в gp130 (Phe169, Tyr196 и Glu282) были идентифицированы как особенно характерные во взаимодействии между OSM и gp130 (см. Deller M *et al* (2000) Structure 8:863-874, Aasland D *et al* (2002) J. Mol. Biol, 315: 637-646, Timmermann A *et al* (2000) FEBS Lett, 468:120-124).

Аминокислотная последовательность, начинающаяся в положении 1 для hOSM, описана как SEQ ID NO: 13

```
MGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMAAIGSCSKEYRVLLGQLQLKQTDLMQD
TSRLLDPYIRIQGLDVPKLREHCRERPGAFPSEETLRGLGRRGFLQTLNAT
LGCVLHRLADLEQRLPKAQDLERSGLNIEDLEKLQMARPNILGLRNNIYCM
AQLLDNSDTAEPTKAGRGASQPPTPTPASDAFQRKLEGCRFLHGYHRFMHS
VGRVFSKWGESPNRSRRHSPHQALRKGVRRTRPSRKGKRLMTRGQLPR.
(SEQ ID NO: 13).
```

Особенно характерные остатки в сайте II выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

кДНК, кодирующая hOSM, описана в SEQ ID NO: 14.

```
ATGGGGGGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTC
CTGTTTCCAAGCATGGCGAGCATGGCGGCTATAGGCAGCTGCTCGAAAGAG
TACCGCGTGCTCCTTGGCCAGCTCCAGAAGCAGACAGATCTCATGCAGGAC
ACCAGCAGACTCCTGGACCCCTATATACGTATCCAAGGCCTGGATGTTCTCCT
AAACTGAGAGAGCACTGCAGGGAGCGCCCCGGGGCCTTCCCCAGTGAGGAG
ACCCCTGAGGGGGCTGGGCAGGCGGGGCTTCCTGCAGACCCTCAATGCCACA
CTGGGCTGCGTCTGCACAGACTGGCCGACTTAGAGCAGCGCCTCCCCAAG
GCCCAGGATTTGGAGAGGTCTGGGCTGAACATCGAGGACTTGGAGAAGCTG
CAGATGGCGAGGCCGAACATCCTCGGGCTCAGGAACAACATCTACTGCATG
GCCCAGCTGCTGGACAACCTCAGACACGGCTGAGCCACGAAGGCTGGCCGG
GGGGCCTCTCAGCCGCCACCCCCACCCCTGCCTCGGATGCTTTTCAGCGC
AAGCTGGAGGGCTGCAGGTTCTTCATGGCTACCATCGCTTCATGCACTCA
GTGGGGCGGGTCTTCAGCAAGTGGGGGAGAGCCCGAACCGGAGCCGAGACCGGAGA
CACAGCCCCCACCAGGCCCTGAGGAAGGGGGTGCGCAGGACCAGACCCTCC
AGGAAAGGCAAGAGACTCATGACCAGGGGACAGCTGCCCCGGTAG
(SEQ ID NO:14)
```

Ревматоидный артрит (РА) включает синдром из отдельных, но взаимосвязанных патогенных процессов. Ими являются: локальное и системное воспаление, пролиферация синовиальных клеток, ангиогенез и отложение матрикса, приводящее к образованию ткани паннуса, которая вторгается в

хрящ и кость и разрушает их, что приводит к деформации и недееспособности. В основе этой патологии лежит хроническое высвобождение цитокинов и медиаторов воспаления из клеток, которые проникают в воспаленный сустав и остаются в нем, и из эндогенных клеток суставной ткани (см. Firestein G (2003) in Rheumatology. Eds Hochberg, Silman, Smolen, Weinblatt and Weisman. Pub. Mosby. 855-854). Иницирующие события в РА неизвестны, но из многочисленных данных следует, что они включают активацию Т-лимфоцитов либо чужеродным, либо аутологичным "собственным" антигеном (см. Firestein G (2004) J Clin Invest 114: 471-4). Степень, в которой Т-клетки требуются для поддержания текущих процессов заболевания, с тех пор как они были инициированы, также не определена, хотя терапевтические агенты, такие как CTLA4Ig, которые специфически нацелены на Т-клетки, могут быть эффективными при развившемся заболевании (см. Kremer JM et al (2003) New Engl J Med 349: 1907-15, Moreland L et al (2004) Annual meeting of the American College of Rheumatology Abstract 1475).

Самые ранние события в развитии ревматоидного синовита включают рекрутирование моноклеарных и полиморфоядерных клеток для прохождения через эндотелий в капиллярах в синовиальном выстилающем слое. В то время как полиморфы мигрируют в синовиальную жидкость (СЖ), лимфоциты остаются близко к капиллярам и могут впоследствии сформироваться в эктопические лимфоидные фолликулы. За этим притоком иммунных клеток следует пролиферация фибробластоподобных синовиоцитов (ФПС). В отличие от их нормальных аналогов, ФПС при РА оказываются ускользнувшими от регуляторных процессов, что вызывает остановку пролиферации и апоптоз, приводя к их непрерывному накоплению (см. Yamanishi Y et al (2004) Arthritis Res Ther 7: 12-18). Более того, возникающая ткань паннуса теперь вызывает образование новых кровеносных сосудов, поддерживаемых внеклеточным матриксом, что делает возможной ее дополнительную экспансию. Этот процесс, вовлекающий пролиферацию фибробластов, перестройку матрикса и ангиогенез, близко напоминает неконтролируемое заживление раны. Моноциты мигрируют в развивающуюся ткань паннуса и претерпевают дифференцировку в макрофаги с хронически активированным фенотипом. Аналогичным образом В-клетки претерпевают

конечную дифференцировку с образованием долгоживущих плазматических клеток, которые секретируют антитела, в том числе ревматоидные факторы. Способность воспаленной синовиальной оболочки поддерживать локальную дифференцировку миелоидных и лимфоидных клеток основана, отчасти, на локальной продукции факторов роста, таких как гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) и IL-6. Как ФПС, так и резидентные мононуклеарные лейкоциты высвобождают растворимые факторы, которые стимулируют дополнительное рекрутирование воспалительных клеток из крови и, что немаловажно, запускают следующую стадию в процессе заболевания - разрушение суставного хряща и перестройку кости. Ткань паннуса является инвазивной. Ее передний край секретирует разрушающие ферменты, такие как матриксные металлопротеиназы (ММР), и цитокины, изменяющие фенотип клеток, которые поддерживают структурную целостность хряща и кости. Как результат, происходит потеря протеогликанов и необратимое расщепление коллагена типа II, что приводит к ослаблению и потере хряща. Кость также претерпевает множество глубоких изменений, которые включают фокальные эрозии и подхрящевый остеопороз. В итоге, эти изменения приводят к характерной деформации и подвывиху суставов, наблюдаемым при развившемся РА (см. Gordon D and Hastings D (2003) in Rheumatology. Eds Hochberg, Silman, Smolen, Weinblatt and Weisman. Pub. Mosby. 765-780).

РА представляет собой системное заболевание, возможно являющееся результатом проникновения медиаторов воспаления из сустава в кровь. Это влияет на многие системы органов в организме, в том числе на кожу, глаза, печень, почки, мозг и выстилку сосудов, что приводит к повышенной болезненности и смертности (см. Matteson EL (2003) in Rheumatology. Eds Hochberg, Silman, Smolen, Weinblatt and Weisman. Pub. Mosby. 781-792). Большое количество смертельных исходов является следствием сердечно-сосудистого заболевания, вызванного атеросклерозом, поскольку многие из патогенных процессов, вовлеченных в развитие ревматоидного синовита, являются общими с образованием атеросклеротических бляшек.

Средства лечения РА направлены на контроль боли, снижение воспаления и остановку процессов, которые приводят к разрушению тканей.

Традиционно РА лечат нестероидными противовоспалительными лекарственными средствами (НПВС), низкими дозами стероидов и так называемыми модифицирующими заболевание противоревматическими лекарственными средствами (DMARDS). Низкие уровни эффективности, медленное начало действия, токсичность, плохая переносимость и повышение резистентности с течением времени мешают применению этих средств лечения, которые включают метотрексат (MTX), сульфасалазин, золото и лефлуномид. Недавно значительным достижением стало внедрение биологических лекарственных средств, таких как Enbrel™, Remicide™ и Humira™, которые ингибируют цитокин фактор некроза опухолей (ФНО) (см. Roberts L and McColl GJ (2004) Intern Med J 34:687-93).

Поэтому задача настоящего изобретения состоит в том, чтобы предложить терапевтический подход к лечению РА и других заболеваний и расстройств, в частности хронических воспалительных заболеваний и расстройств, таких как остеоартрит и псориаз. В частности, задача настоящего изобретения состоит в том, чтобы предложить иммуноглобулины, особенно антитела, которые специфически связывают OSM (например hOSM, в частности его сайт II) и модулируют (то есть, ингибируют или блокируют) взаимодействие между OSM и gp130, в лечении заболеваний и расстройств, чувствительных к модуляции этого взаимодействия.

Возрастает количество данных в подтверждение гипотезы, согласно которой модулирование взаимодействия OSM-gp130 может быть полезным в лечении таких заболеваний и расстройств.

Клинические доказательства

OSM обнаружен в СЖ пациентов с РА (см. Hui W et al (1997) 56: 184-7). Эти уровни коррелируют с числом нейтрофилов в СЖ, уровнями ФНО-альфа (иногда "ФНО") в СЖ и маркерами разрушения хряща (Manicourt DH et al (2000) Arthritis Rheum 43: 281-288). Более того, синовиальная ткань от пациентов с РА секретирует OSM спонтанно *ex vivo* (см. Okamoto H et al (1997) Arthritis and Rheumatism 40: 1096-1105). Также продемонстрировано, что OSM присутствует в синовиальных макрофагах (Cawston TE et al (1998) Arthritis Rheum 41: 1760-1771) и, как обсуждено ранее, рецепторы OSM и gp130 экспрессируются на эндотелиальных клетках, синовиальных фибробластах, хондроцитах и

остеобластах. Более того, клетки, инфильтрующие атеросклеротические бляшки и аневризмы аорты, экспрессируют OSM, подтверждая связь этого цитокина с хроническим воспалением (см. Mirshahi F et al (2001) Ann NY Acad Sci 936: 621-4).

Доказательства in vitro

Эндотелиальные клетки экспрессируют в десять-двадцать раз большее число рецепторов OSM, чем другие типы клеток (см. Brown TJ et al (1991) J Immunol 147: 2175-2180, Linsley PS et al (1989) J Biol Chem 264: 4282-4289). OSM, в отдельности или синергически в комбинации с другими цитокинами, активирует эндотелий для высвобождения цитокинов и хемокинов и связывания нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов, опосредуя их трансудацию в синовиальную ткань (см. Modur V et al (1997) J Clin Invest 100: 158-168). Также показано, что OSM является сильным стимулятором ангиогенеза (см. Vasse M et al (1999) Arterioscler Thromb Vasc Biol 19: 1835-1842) и активации и пролиферации клеток, представляющих собой синовиальные фибробласты (ФПС) (таким образом способствуя образованию ткани паннуса и высвобождению IL-6 и MMP), и действуют синергически с ФНО и IL-1, чтобы индуцировать высвобождение этого медиатора (см. Langdon C et al (2000) Am J Pathol 157: 1187-1196). Также было показано, что OSM индуцирует (вместе с IL-1) высвобождение коллагена и протеогликана из хряща (см. Cawston T et al (1995). Biochem Biophys Res Commun 215: 377-385). Более того, OSM индуцирует высвобождение белков острой фазы и продукцию рецептора IL-6 из гепатоцитов (см. Cichy J et al (1997) J Immunol 159: 5648-5643, Kurash JK (2004) Exp Cell Res 292: 342-58) и поэтому может вносить вклад в системные эффекты ревматоидного воспаления, в том числе усталость. В дополнение, OSM индуцирует дифференцировку и активность остеокластов in vitro (см. Palmqvist P et al (2002) J Immunol 169: 3353-3362).

Доказательства in vivo

Аденовирусная экспрессия мышинного OSM (mOSM) в суставах нормальных мышей приводит к тяжелому воспалительному и эрозивному артриту (см. Langdon C et al (2000) Am J Pathol 157: 1187-1196). Аналогичным образом, после аденовирусной доставки mOSM агрессивное заболевание наблюдали у нокаут-мышей, не имеющих ФНО, IL-1, IL-6 и индуцибельной

синтазы оксида азота (iNOS) (см. de Hooge ASK et al (2003) Arthritis and Rheumatism 48:1750-1761), демонстрируя, что OSM может опосредовать все аспекты артритной патологии. Экспрессия мышинового OSM при использовании аденовирусно экспрессируемого mOSM вектора вызывает повреждение ростовой пластинки, типичное для юношеского идиопатического артрита (см. de Hooge ASK et al (2003) Arthritis and Rheumatism 48:1750-1761). В экспериментальной модели коллаген-индуцированного артрита антитела против OSM, терапевтически введенные мышам, предотвращали полностью дальнейшую прогрессию заболевания. Подобные результаты наблюдали, когда анти-OSM вводили профилактически мышам с пристан-индуцированным артритом, представляющим собой модель рецидивирующего/затихающего состояния, напоминающего заболевание человека (см. Plater-Zyberk C et al (2001) Arthritis and Rheumatism 44: 2697-2702). У обезьян инъецированный подкожно OSM индуцирует острофазный ответ и локальное хроническое воспаление (см. Loy JK et al (1999) Toxicol Pathol 27: 151-155). Показано, что OSM при инъекции в суставы козы индуцирует инфильтрацию мононуклеарными и полиморфоядерными нейтрофилами и высвобождение протеогликана (см. Bell MC et al (1999) Arthritis Rheum 42: 2543-2551). Трансгенная сверхэкспрессия mOSM в лимфатических узлах мышцы приводит к созреванию Т-клеток вне тимуса, пролиферации Т-клеток памяти и неспособности уменьшать аутоиммунные Т-клетки (см. Louis I et al (2003) Blood 102: 1397-1404). Трансгенная сверхэкспрессия OSM в поджелудочной железе вызывает обширный фиброз, подобно тому как наблюдается в синовиальной оболочке при развившемся РА (см. Malik N et al (1995) Mol Cell Biol 15: 2349-2358).

В WO99/48523 авторы раскрывают применение антагонистов OSM в лечении воспалительных заболеваний и расстройств. В этом описании в мышинной модели артрита использованы антитела против мышинового OSM.

Все ссылки на патенты и литературу, раскрытые в настоящем описании, прямо и полностью включены посредством ссылки.

Краткое изложение сущности изобретения

Авторы настоящего изобретения постулируют, что модулирование (в частности блокирование) взаимодействия между сайтом II hOSM и gp130

антителом, которое специфически связывается с hOSM, будет модулировать передачу сигнала всеми потенциальными комплексами OSM с рецептором, эффективно нейтрализуя биологическую активность цитокина до терапевтически значительной степени. При этом авторы настоящего изобретения обнаружили, что блокирование обоих сайтов hOSM, сайта II и сайта III, неожиданно улучшает нейтрализацию этого цитокина. Более того, авторы настоящего изобретения обнаружили, что гликозилирование hOSM играет неожиданную роль в акте связывания между hOSM и антителом, которое специфически связывает hOSM.

Таким образом, в настоящем изобретении предложено терапевтическое антитело 15E10 или 10D3 (которое может быть химерным, человеческим, гуманизированным, биспецифичным или представлять собой их антигенсвязывающие фрагменты), которое специфически связывает hOSM и взаимодействует с сайтом II hOSM. Смотри Таблицу А ниже.

В одном из воплощений настоящего изобретения предложено терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(ый) специфически связывает hOSM и модулирует (то есть, ингибирует или блокирует) взаимодействие между сайтом II hOSM и gp130. В некоторых воплощениях терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает сайт II hOSM.

В еще одном воплощении предложено терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(ый) специфически связывает hOSM и содержит следующие CDRH3: SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 42.

В еще одном воплощении настоящего изобретения предложено терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(ый) специфически связывается с hOSM и содержит следующие CDRs:

CDRH1: SEQ ID NO: 1,
 CDRH2: SEQ ID NO: 2,
 CDRH3: SEQ ID NO: 3,
 CDRL1: SEQ ID NO: 4,
 CDRL2: SEQ ID NO: 5,
 CDRL3: SEQ ID NO: 6.

В еще одном воплощении настоящего изобретения предложено терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(ый) специфически связывается с hOSM и содержит следующие CDRs:

CDRH1: SEQ ID NO: 40,
 CDRH2: SEQ ID NO: 41,
 CDRH3: SEQ ID NO: 42,
 CDRL1: SEQ ID NO: 43,
 CDRL2: SEQ ID NO: 44,
 CDRL3: SEQ ID NO: 45.

Во всем этом описании термины "CDR", "CDRL1", "CDRL2", "CDRL3", "CDRH1", "CDRH2", "CDRH3" следуют системе нумерации Кабата (Kabat), как изложено в Kabat *et al*; *Sequences of proteins of Immunological Interest* NIH, 1987.

Поэтому следующее определяет CDRs в соответствии с этим изобретением:

CDR:	Остатки
CDRH1:	31-35B
CDRH2:	50-65
CDRH3:	95-102
CDRL1:	24-33
CDRL2:	49-55
CDRL3:	88-96

В еще одном воплощении этого изобретения предложено терапевтическое антитело мыши или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее(ий) V_H-домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 7, и V_L-домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 8.

В еще одном воплощении этого изобретения предложено терапевтическое антитело мыши или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее(ий) V_H-домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 46, и V_L-домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 47.

В одном из воплощений этого изобретения предложено гуманизированное терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее(ий) V_H-цепь, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 9, и V_L-домен, имеющий последовательность, указанную в SEQ ID NO: 10.

В одном из воплощений этого изобретения предложено гуманизированное терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее(ий) V_H-цепь, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 48, и V_L-домен, имеющий последовательность, указанную в SEQ ID NO: 49.

В еще одном воплощении этого изобретения предложено гуманизированное терапевтическое антитело, которое содержит тяжелую цепь, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 11, и легкую цепь, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 12.

В еще одном воплощении этого изобретения предложено гуманизированное терапевтическое антитело, которое содержит тяжелую цепь, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 50, и легкую цепь, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 51.

В еще одном воплощении этого изобретения предложено гуманизированное терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(ый) модулирует (то есть, ингибирует или блокирует) взаимодействие между hOSM и gp130.

В еще одном воплощении этого изобретения предложен выделенный V_H-домен антитела, содержащий (или состоящий по существу из) SEQ ID NO: 7, или SEQ ID NO: 9, или SEQ ID NO: 46, или SEQ ID NO: 48.

В еще одном воплощении этого изобретения предложено терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее(ий) V_H-домен, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48.

В еще одном воплощении настоящего изобретения предложено терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(ый) конкурентно ингибирует связывание терапевтического антитела, содержащего CDRH3 с SEQ ID NO: 3.

В еще одном воплощении этого изобретения предложено терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(ый) конкурентно ингибирует связывание терапевтического антитела, содержащего CDRs с SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6, с hOSM.

В еще одном воплощении предложено терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(ый) конкурентно ингибирует связывание терапевтического антитела, содержащего тяжелую цепь с SEQ ID NO: 11 и легкую цепь с SEQ ID NO: 12, с hOSM.

В еще одном воплощении этого изобретения предложен способ лечения пациента человека, страдающего заболеванием или расстройством, чувствительным к модуляции взаимодействия между hOSM и gp130, включающий стадию введения указанному пациенту терапевтически эффективного количества терапевтического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано здесь.

В еще одном воплощении настоящего изобретения предложен способ лечения пациента человека, страдающего воспалительным заболеванием или расстройством, включающий стадию введения указанному пациенту терапевтически эффективного количества терапевтического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано здесь.

В еще одном воплощении настоящего изобретения предложен способ лечения пациента человека, страдающего артритным заболеванием, в частности ревматоидным артритом, ювенильным артритом или остеоартритом, включающий стадию введения указанному пациенту терапевтически эффективного количества терапевтического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано здесь.

В еще одном воплощении этого изобретения предложен способ снижения или предотвращения разрушения хряща у пациента человека, страдающего от такого разрушения (или подверженного ему), включающий стадию введения указанному пациенту терапевтически эффективного количества терапевтического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано здесь.

В еще одном воплощении настоящего изобретения предложен способ снижения продуцирования ФНО-альфа у пациента, страдающего заболеванием или расстройством, чувствительным к снижению ФНО-альфа, включающий введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества терапевтического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано здесь.

В еще одном воплощении этого изобретения предложен способ лечения внесуставных проявлений артритного заболевания или расстройства, включающий стадию введения пациенту человеку, страдающему внесуставными проявлениями артритного заболевания или расстройства, терапевтически эффективного количества терапевтического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано здесь.

В еще одном воплощении настоящего изобретения предложен способ лечения пациента человека, страдающего заболеванием эндотелиально-клеточной природы, включающий стадии введения указанному пациенту терапевтически эффективного количества терапевтического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано здесь.

Также предложено применение терапевтического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано здесь, в изготовлении лекарства для лечения заболеваний и расстройств, описанных здесь.

В еще одном воплощении этого изобретения предложен способ получения терапевтического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного здесь.

В еще одном воплощении этого изобретения предложен анализ (в частности твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA)) для исследования взаимодействия между OSM (в частности hOSM) и партнером взаимодействия (таким как gp130, LIFR, OSMR), включающий стадию предоставления для указанного исследования образца гликозилированного OSM (типично гликозилированного клеткой-хозяином позвоночного животного, такой как клетка-хозяин млекопитающего, например гликозилированного клеткой яичника китайского хомячка (линия CHO)).

В дополнительном воплощении настоящего изобретения авторы предлагают терапевтическое антитело, которое специфически связывает нативный гликозилированный hOSM и модулирует (то есть, ингибирует или блокирует) взаимодействие между нативным гликозилированным hOSM и партнером взаимодействия, выбранным из группы, состоящей из gp130, LIFR, OSMRβ.

Авторы изобретения дополнительно предлагают способ получения фармацевтической композиции, содержащей терапевтическое антитело,

которое специфически связывает hOSM и модулирует (то есть, ингибирует или блокирует) взаимодействие между hOSM и gp130, включающий стадии:

(а) предоставления антитела-кандидата;

(б) предоставления гликозилированного OSM (в частности hOSM, продуцируемого рекомбинантно трансформированной или трансфицированной клеткой-хозяином млекопитающего, такой как рекомбинантно трансформированная клетка CHO, и/или нативного гликозилированного hOSM);

(в) приведения в контакт антитела со стадии (а) с hOSM со стадии (б) в условиях, допускающих связывание;

(г) определения того, модулирует ли антитело со стадии (в) взаимодействие между hOSM и gp130;

(д) возможно, гуманизацию указанного антитела со стадии (а) или (г);

(е) включения указанного антитела со стадии (г) или (д) в фармацевтическую композицию.

Другие аспекты, задачи и преимущества настоящего изобретения должны быть очевидными из приведенного ниже описания.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 представляет собой схематическую иллюстрацию взаимодействия между OSM и gp130, LIFR и OSMR β .

Фиг. 2 иллюстрирует ELISA-анализ ингибирования gp130 с использованием hOSM (верхняя панель) и онкостатина М обезьян Cynomolgus (сOSM) (нижняя панель) согласно протоколу изложенных ниже примеров с использованием химерных антител 15E10 и 10D3. См. дополнительные подробности в описании ниже.

Фиг. 3 иллюстрирует анализ на клетках KB с использованием hOSM (верхняя панель) и сOSM (нижняя панель) согласно протоколу примеров с использованием химерных антител 15E10 и 10D3 по этим примерам.

Фиг. 4 иллюстрирует ELISA-анализ ингибирования gp130 с использованием антител против hOSM (верхняя панель) и сOSM (нижняя панель), где % ингибирования представлен как функция концентрации антитела для четырех гуманизированных антител (B1L1, B1L2, B4L1, B4L2) и химерного 15E10.

Фиг. 5 иллюстрирует ELISA-анализ ингибирования gp130 в примерах, где различные гуманизированные антитела (B2L2, B3L2, B4L2) сопоставлены с химерным 15E10 по связыванию с CHO-продуцированным hOSM.

Фиг. 6 иллюстрирует анализ из Фиг. 5 с использованием cOSM вместо hOSM.

Фиг. 7 иллюстрирует анализ из Фиг. 5 с использованием CHO-продуцированного hOSM в 25%-ной человеческой сыворотке группы AB.

Фиг. 8 иллюстрирует анализ из Фиг. 7 с использованием cOSM вместо hOSM.

Фиг. 9 иллюстрирует ELISA-анализ ингибирования gp130 с использованием OSM нейтрофилов из четырех разных человеческих образцов с использованием гуманизированных антител B2L2, B3L2, B4L2 и химерного 15E10.

Фиг. 10 иллюстрирует ELISA-анализ ингибирования gp130 с использованием трех гуманизированных антител (B2L2, B3L2 и B4L2) и химерного антитела 15E10 против hOSM, выделенного из синовиальной жидкости пациентов с РА.

Фиг. 11-16 иллюстрируют результаты условий из Фиг. 5-10 в анализе на клетках KB вместо ELISA ингибирования gp130, за исключением того, что в анализе OSM нейтрофилов на клетках KB по Фиг. 15 использован один образец OSM нейтрофилов человека. Таким образом, Фиг. 11 иллюстрирует KB-анализ CHO-продуцируемого hOSM, Фиг. 12 иллюстрирует KB-анализ CHO-продуцированного cOSM, Фиг. 13 иллюстрирует KB-анализ CHO-продуцированного hOSM в 25%-ной человеческой сыворотке группы AB, Фиг. 14 иллюстрирует KB-анализ CHO-продуцированного cOSM в 25%-ной человеческой сыворотке группы AB, Фиг. 15 иллюстрирует KB-анализ OSM нейтрофилов, Фиг. 16 иллюстрирует KB-анализ OSM, выделенного из клеток СЖ пациентов с РА.

Фиг. 17 иллюстрирует ELISA-анализ ингибирования gp130 родительскими мышиными 15E10, химерными 15E10, конструктором B3L2, представляющим собой гуманизированное антитело, и Fc-литическим мутантом B3L2 против CHO-продуцированного hOSM. См. более подробно в описании.

Фиг. 18 иллюстрирует анализ из Фиг. 17 с использованием cOSM.

Фиг. 19 иллюстрирует анализ на клетках KB родительского мышинного 15E10, химерных 15E10, гуманизированного конструктора B3L2 и Fc-литического мутанта B3L2 против CHO-продуцируемого hOSM.

Фиг. 20 представляет собой схематическую иллюстрацию конкурентного анализа из примеров.

Фиг. 21 иллюстрирует ингибирование 15E10 (гуманизированный конструктор B3L2) мышинным конкурирующим антителом 10D3 из примеров. Процент ингибирования 15E10 конкурирующим 10D3 при эквимоллярности (0,15 мкг/мл): 62,3%.

Фиг. 22а иллюстрирует типичную стандартную кривую в gp130-OSM ELISA-анализе с использованием негликозилированного GSM, где концентрация gp130 для покрытия на планшете для ELISA равна 1 мкг/мл.

Фиг. 22б иллюстрирует повышенную чувствительность gp130-OSM ELISA-анализа, где концентрация gp130 для покрытия на планшете для ELISA повышена до 4 мкг/мл.

Фиг. 22в иллюстрирует то, что gp130-OSM ELISA-анализ работает как с гликозилированным, так и с негликозилированным OSM. Негликозилированный OSM: закрашенные кружки; гликозилированный OSM: незакрашенные треугольники. Следует отметить, что чувствительность ELISA выше для негликозилированного OSM, вероятно в результате гликозилирования маскирующих эпитопов, распознаваемых использованным детектирующим антителом.

Фиг. 23а иллюстрирует эффект антитела, нейтрализующего OSM, (Mab295, R&D Systems) в gp130-OSM ELISA. Только OSM: незакрашенные кружки; OSM + Mab296: закрашенные треугольники; OSM + Mab295, но без gp130 на планшете для ELISA: закрашенные квадратики.

Фиг. 23б представляет собой схематическую иллюстрацию того, как Mab295 может усиливать сигнал от OSM в gp130-OSM ELISA.

Фиг. 24 иллюстрирует данные из анализа на клетках KB, показывающие эффективность нейтрализации OSM посредством Mab 295. Клетки были стимулированы только при использовании 1 нг/мл OSM, или до анализа эту концентрацию OSM смешивали с различными концентрациями Mab295. Только

OSM: закрашенные треугольники; OSM + Mab295: незакрашенные кружки; без стимуляции OSM: закрашенные квадратики.

Фиг. 25 иллюстрирует эффект антитела OM4-11.31, специфичного к сайту III OSM, в gr130-OSM ELISA. Только OSM: незакрашенные кружки; OSM + изотипический контрольный IgG: закрашенные перевернутые треугольники; OSM + антитело, специфичное к сайту II OSM: незакрашенные квадратики; OSM + OM4-11.31: закрашенные кружки.

Фиг. 26 иллюстрирует ингибирование связывания комплекса OSM с антителом OM4-11.17, специфичным к сайту III, с gr130, антителом OM4-5.3, специфичным к сайту II OSM. Только OSM (12,5 нг/мл): сплошной столбик; OSM+OM4-11.17: диагонально заштрихованный столбик, OSM+OM4-11.17+ контрольные IgG: перекрестно заштрихованный столбик: OSM+OM4-11.17+ OM4-5.3: пунктирно заштрихованный столбик.

Фиг. 27 иллюстрирует появление антител, специфичных и неспецифичных к сайту II OSM, в сыворотках мышей, иммунизированных человеческим OSM, как обнаружено при использовании gr130-OSM ELISA. Анализ сывороток после первичной, вторичной и третичной бустер-иммунизации человеческим OSM: а, b и c, соответственно. OSM+доиммунная сыворотка: незакрашенные кружки. OSM+антисыворотки от иммунизированной мыши: закрашенные перевернутые треугольники. OSM+антисыворотка от иммунизированной мыши, но без gr130 на планшете для ELISA: перевернутый незакрашенный треугольник.

Фиг. 28 иллюстрирует синергизм в нейтрализации OSM между антителом, специфичным к сайту II OSM ("hum 15E10", гуманизированное 15E10), и антителом, специфичным к сайту III OSM (17H10), как измерено в анализе на клетках KB. Нейтрализация OSM посредством 17H10 в отдельности (a) или hum 15E10 в отдельности (b): закрашенные кружки; нейтрализация OSM комбинацией антител: незакрашенные треугольники.

Фиг. 29 иллюстрирует эффективность гуманизированного антитела 15E10 в ингибировании стимулированной OSM секреции IL-6 из синовиальных фибробластов при РА. Каждый символ относится к фибробластам, полученным от разных пациентов.

Фиг. 30 иллюстрирует ингибирование связывания OSM с gp130 антителом OM4-5.3 против OSM. OSM (25 нг/мл) предварительно инкубировали с указанными концентрациями OM4-5.3 до добавления к планшету для ELISA. Только OSM: закрашенные кружки; OSM+OM4-5.3: незакрашенные кружки.

Фиг. 31а иллюстрирует различие в эффективности OM4-41.5 по ингибированию связывания гликозилированного и негликозилированного OSM с gp130. Негликозилированный OSM: закрашенные кружки; гликозилированный OSM: незакрашенные треугольники.

Фиг. 31б иллюстрирует различие в эффективности OM4-5.3.1 по ингибированию связывания гликозилированного и негликозилированного OSM с gp130. Негликозилированный OSM: закрашенные кружки; гликозилированный OSM: незакрашенные треугольники.

Фиг. 32 показывает активность двух антител, специфичных к сайту II OSM (a: 15E10; b: 5H2) против гликозилированного (закрашенные кружки) и негликозилированного (незакрашенные треугольники) в gp130-OSM ELISA.

Фиг. 33 иллюстрирует корреляцию между [OSM] в сыворотке и синовиальной жидкости в парных образцах сыворотки и СЖ, взятых от пациентов с РА.

Фиг. 34а, 34б и 35 иллюстрируют концентрации OSM, измеренные в синовиальной жидкости ОА при использовании OSM ELISA по примерам. Фиг. 34б показывает, что два образца имели особенно высокие концентрации OSM в синовиальной жидкости.

Фиг. 36 иллюстрирует концентрацию OSM, обнаруженную в сыворотке пациента с РА в течение 12-месячного периода клинического исследования. Номер # является идентификатором пациента.

Фиг. 37 иллюстрирует типичную стандартную кривую для OSM в 25%-ной человеческой сыворотке группы АВ.

Подробное описание изобретения

1. Структуры антител

1.1 Интактные антитела

Интактные антитела обычно представляют собой гетеромультимерные гликопротеины, содержащие по меньшей мере две тяжелые и две легкие цепи. За исключением IgM, интактные антитела представляют собой

гетеротетрамерные гликопротеины массой приблизительно 150 кДа, состоящие из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. В типичных случаях каждая легкая цепь соединена с тяжелой цепью одной ковалентной дисульфидной связью, в то время как число дисульфидных связей между тяжелыми цепями иммуноглобулинов разных изотипов варьирует. Каждая тяжелая и легкая цепь также имеет внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая тяжелая цепь имеет на одном конце переменный домен (V_H), за которым следует ряд константных областей. Каждая легкая цепь имеет переменный домен (V_L) и константную область на ее другом конце; константная область легкой цепи выровнена с первой константной областью тяжелой цепи, и переменный домен легкой цепи выровнен с переменным доменом тяжелой цепи. Легкие цепи антител из большинства видов позвоночных можно отнести к одному из двух типов, названных Каппа и Лямбда, на основании аминокислотной последовательности константной области. В зависимости от аминокислотной последовательности константной области их тяжелых цепей, человеческие антитела можно отнести к пяти разным классам: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. IgG и IgA можно дополнительно подразделить в подклассы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 и IgA1 и IgA2. Существуют видовые варианты, причем мышь и крыса имеют по меньшей мере IgG2a, IgG2b. Переменный домен антитела придает антителу специфичность связывания с определенными областями, проявляющими особую переменность, называемыми участками, определяющие комплементарность (complementarity determining regions (CDRs)). Более стабильные участки переменной области называют каркасными участками (framework regions, FR). Переменные домены интактных тяжелых и легких цепей содержат, каждый, четыре FR, соединенные тремя CDRs. CDRs в каждой цепи удерживаются вместе в тесной близости FR-областями и вместе с CDRs из другой цепи вносят вклад в образование антигенсвязывающего сайта антител. Константные области не вовлечены непосредственно в связывание антитела с антигеном, но выполняют различные эффекторные функции, такие как участие в зависимой от антител клеточной цитотоксичности (antigen dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC), в фагоцитозе через связывание Fc γ -рецепторов, в периоде полувыведения/скорости выведения через неонатальный Fc-рецептор (FcRn) и

в зависимой от комплемента цитотоксичности через компонент C1q каскада комплемента.

Таким образом, в одном из воплощений авторы изобретения предлагают интактное терапевтическое антитело, которое специфически связывает hOSM, причем это антитело модулирует взаимодействие между hOSM и gp130. Антитело может специфически связывать сайт II hOSM и ингибировать или блокировать взаимодействие между hOSM и его соответствующими остатками на gp130, вовлеченными во взаимодействие с OSM. Приведенную в примерах методику ELISA можно использовать для определения того, модулирует ли любое конкретное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент взаимодействие между hOSM и gp130. Интактное терапевтическое антитело может содержать константную область (тяжелую или легкую) любого изотипа или его подкласса, описанного выше. В одном из воплощений антитело представляет собой изотип IgG, в частности IgG1. Антитело может представлять собой антитело крысы, мыши, кролика, обезьяны или человека. В одном типичном воплощении антитело представляет собой антитело обезьяны (такой как обезьяны *Cynomolgus*, низшие узконосые обезьяны или человекообразные приматы, см. например WO99/55369, WO93/02108) или человека.

В еще одном воплощении предложено интактное терапевтическое антитело, содержащее CDRH3 с SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 42. В еще одном воплощении предложено интактное терапевтическое антитело, содержащее переменную область, имеющую CDRs с SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6 или переменную область с SEQ ID NO: 40, 41, 42, 43, 44 и 45.

В еще одном воплощении предложено интактное мышиное терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее(ий) V_H-домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 7, и V_L-домен с последовательностью SEQ ID NO: 8.

В еще одном воплощении предложено интактное мышиное терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее(ий) V_H-домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 46, и V_L-домен с последовательностью SEQ ID NO: 47.

1.1.2 Человеческие антитела

Человеческие антитела можно продуцировать многими способами, известными специалистам в данной области. Человеческие антитела можно получать гибридомным способом с использованием клеточных линий человеческой миеломы или мышинной-человеческой гетеромиеломы, см. Kozbor J. Immunol 133, 3001, (1984) и Brodeur, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp51-63 (Marcel Dekker Inc, 1987). Альтернативные способы включают применение фаговых библиотек или трансгенных мышей, оба из которых используют совокупности человеческой V-области (см. Winter G, (1994), Annu.Rev.Immunol 12,433-455, Green LL (1999), J.Immunol.Methods 231, 11-23).

В настоящее время доступны несколько линий трансгенных мышей, у которых их локусы мышинных иммуноглобулинов заменены генами сегментов человеческого иммуноглобулина (см. Tomizuka K, (2000) PNAS 97,722-727; Fishwild D.M (1996) Nature Biotechnol. 14,845-851, Mendez MJ, 1997, Nature Genetics, 15,146-156). При стимуляции антигеном такие мыши способны продуцировать совокупность человеческих антител, из которой можно отобрать антитела, представляющие интерес.

Особенно следует отметить систему TrimerTM (см. Eren R et al., (1998) Immunology 93:154-161), где человеческие лимфоциты трансплантируют в облученных мышей, систему Selected Lymphocyte Antibody System (SLAM, см. Babcook et al, PNAS (1996) 93:7843-7848), где лимфоциты человека (или других видов) эффективно проводят через процедуру генерирования *in vitro* большого количества объединенных в пул антител с последующей деконвуляцией, предельным разведением и селекцией, и Xenomouse IITM (Abgenix Inc). Альтернативный подход доступен от Morphotek Inc при использовании технологии MorphodomaTM.

Для продуцирования человеческих антител (и их фрагментов) можно использовать технологию фагового дисплея, см. McCafferty; Nature, 348, 552-553 (1990) и Griffiths AD et al (1994) EMBO 13:3245-3260. В соответствии с этой методикой гены V-домена антитела клонируют в рамке в ген либо главного, либо минорного белка оболочки нитчатого бактериофага, такого как M13 или fd, и воспроизводят (обычно с помощью фага-помощника) в виде функциональных

фрагментов антитела на поверхности фаговой частицы. Процедуры селекции на основе функциональных свойств антитела приводят к селекции гена, кодирующего антитело, которое проявляет эти свойства. Методику фагового дисплея можно использовать для селекции антигенспецифичных антител из библиотек, полученных из человеческих В-клеток, взятых от индивидов, страдающих заболеванием или расстройством, описанным выше, или альтернативно, от неиммунизированных людей доноров (Marks; J.Mol.Biol. 222,581-597, 1991). Если желательным является интактное человеческое антитело, содержащее Fc-домен, необходимо снова клонировать фрагмент, полученный при использовании фагового дисплея, в экспрессионных векторах млекопитающих, содержащих желаемые константные области, и получить стабильно экспрессирующие клеточные линии. Для улучшения аффинности связывания можно использовать методику вызревания аффинности (Marks; Biotechnol 10,779-783 (1992)), при которой аффинность первичного человеческого антитела улучшают последовательной заменой V-области H- и L-цепи вариантами естественного происхождения и селекцией на основании улучшенных аффинностей связывания. В настоящее время доступны также варианты этой методики, такие как "импринтинг эпитопа", см. WO 93/06213. См. также Waterhouse; Nucl.Acids Res 21, 2265-2266 (1993).

Таким образом, в еще одном воплощении предложено человеческое интактное терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(ый) специфически связывает hOSM и модулирует (то есть, ингибирует или блокирует) взаимодействие между hOSM и gp130. В еще одном воплощении предложено интактное человеческое терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(ый) специфически связывает сайт II hOSM и модулирует (то есть, ингибирует или блокирует) взаимодействие между hOSM и gp130.

В другом аспекте предложено человеческое интактное терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее(ий) CDRH3 с SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 42, которое(ый) специфически связывает hOSM и модулирует (то есть, ингибирует или блокирует) взаимодействие между hOSM и gp130. В еще одном воплощении предложено человеческое интактное терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,

содержащее(ий) переменную область, имеющую CDRs с SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6, или переменную область, имеющую SEQ ID NO: 40, 41, 42, 43, 44 и 45.

1.2 Химерные и гуманизированные антитела

Применение интактных антител, не являющихся человеческими, в лечении заболеваний или расстройств человека несет в себе хорошо известные в настоящее время проблемы потенциальной иммуногенности, особенно при повторном введении антитела, то есть иммунная система пациента может распознавать интактное антитело, не являющееся человеческим, как не свое и давать нейтрализующий ответ. В дополнение к разработке полностью человеческих антител (см. выше), различные методики разрабатывались годами для преодоления этих проблем и обычно включающие восстановление состава последовательностей аминокислот, не являющихся человеческими, в интактном терапевтическом антителе при сохранении относительной легкости получения антител, не являющихся человеческими, от иммунизированного животного, например мыши, крысы или кролика. В широком смысле, для достижения этого были использованы два подхода. Первый представляет собой химерные антитела, которые обычно содержат переменный домен, не являющийся человеческим, (например грызуна, такого как мышь), конденсированный с человеческой константной областью. Поскольку антигенсвязывающий сайт антитела локализован в переменных областях, химерное антитело сохраняет его аффинность связывания с антигеном, но приобретает эффекторные функции человеческой константной области и поэтому способно осуществлять эффекторные функции, такие как описано выше. Химерные антитела в типичных случаях продуцируют, используя способы на основе рекомбинантной ДНК. Выделяют ДНК, кодирующую антитело (например, кДНК) и секвенируют ее, используя общепринятые методики (например, используя олигонуклеотидные зонды, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими H- и L-цепи антитела по этому изобретению, например, с ДНК, кодирующей SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6, описанные выше). В качестве типичного источника такой ДНК служат клетки гибридомы. После выделения ДНК помещают в экспрессионные векторы, которыми затем трансфицируют клетки-хозяева,

такие как *E.Coli*, клетки COS, клетки CHO или клетки миеломы, которые не продуцируют иным образом иммуноглобулиновый белок, для достижения синтеза антитела. ДНК можно модифицировать путем замены кодирующей последовательности для человеческих L- и H-цепей соответствующими H- и L-константными областями, не являющимися человеческими, (например мышинными), см. например Morrison; PNAS 81, 6851 (1984).

Второй подход включает генерирование гуманизированных антител, в которых компонент антитела, не являющийся человеческим, восстанавливают путем гуманизации вариабельных областей. Две методики гуманизации завоевали популярность. Первая представляет собой гуманизацию путем вставки CDR. CDRs образуют петли вблизи N-конца антитела, где они формируют поверхность, встраиваемую в клеточный каркас, обеспечиваемый каркасными участками. Специфичность связывания антитела с антигеном в основном определяется топографией и химическими характеристиками его CDR-поверхности. Эти признаки в свою очередь определяются конформацией индивидуальных CDRs, относительным расположением CDRs и природой и расположением боковых цепей остатков, составляющих CDRs. Большого снижения иммуногенности можно достичь вставкой только CDRs антител ("донорных" антител), не являющихся человеческими, (например мышинных), в подходящие человеческие каркасные участки ("акцепторные каркасные участки") и константные области (см. Jones *et al* (1986) Nature 321,522-525 и Verhoeven M *et al* (1988) Science 239, 1534-1536). Однако вставка CDR сама по себе может не привести к полному сохранению антигенсвязывающих свойств, и часто обнаруживают, что некоторые каркасные остатки донорного антитела необходимо сохранить в гуманизированной молекуле (что иногда называют "обратными мутациями"), если нужно получить значительную аффинность связывания с антигеном (см. Queen C *et al* (1989) PNAS 86, 10,029-10,033, Co, M *et al* (1991) Nature 351, 501-502). В этом случае, для того чтобы обеспечить человеческие каркасные участки (FR), можно выбрать из базы данных человеческие V-области, проявляющие наибольшую гомологию их последовательности (в типичных случаях 60% или более) в отношении донорного антитела, не являющегося человеческим. Селекцию человеческих FR можно осуществлять либо из человеческого консенсуса, либо из

индивидуальных человеческих антител. При необходимости, в каркасные человеческие акцепторные участки вводят замены на ключевые остатки из донорного антитела для сохранения конформации CDR. Чтобы помочь
5 идентифицировать такие структурно важные остатки, можно использовать компьютерное моделирование антитела, см. WO99/48523.

Альтернативно, гуманизацию можно осуществить способом "маскировки".
10 Статистический анализ уникальных переменных областей тяжелых и легких цепей человеческих и мышиных иммуноглобулинов выявил то, что точные картины экспонированных остатков являются разными в человеческих и
15 мышиных антителах, и в большей части индивидуальных поверхностных положений имеется сильное предпочтение к малому числу разных остатков (см. Padlan E.A. *et al*; (1991) *Mol.Immunol*, 28, 489-498 и Pedersen J.T. *et al* (1994) *J.Mol.Biol.* 235; 959-973). Поэтому возможно снижение иммуногенности Fv, не
20 являющегося человеческим, путем замены экспонированных остатков в его каркасных участках, которые отличаются от обычно обнаруживаемых в человеческих антителах. Поскольку антигенность белка может коррелировать с
25 доступностью поверхности, замена поверхностных остатков может быть достаточной, чтобы сделать мышиную переменную область "невидимой" для иммунной системы человека (см. также Mark G.E. *et al* (1994) в *Handbook of*
30 *Experimental Pharmacology vol. 113: The pharmacology of monoclonal antibodies*, Springer-Verlag, pp105-134). Эту процедуру гуманизации называют "маскировкой", так как изменяют только поверхность антитела, несущие остатки
35 остаются ненарушенными. Дополнительный альтернативный подход изложен в WO04/006955.

Таким образом, в еще одном воплощении этого изобретения предложено химерное терапевтическое антитело, содержащее переменный домен, не
40 являющийся человеческим, (например грызуна), конденсированный с человеческой константной областью (которая может соответствовать изотипу IgG, например IgG1), который специфически связывает hOSM и модулирует
45 взаимодействие между сайтом II hOSM и gp130.

В еще одном воплощении предложено химерное терапевтическое антитело, содержащее переменный участок, не являющийся человеческим,
50 (например грызуна), и человеческую константную область (которая может

соответствовать изотипу IgG, например IgG1), который специфически связывает hOSM, причем это антитело дополнительно содержит CDRH3 с SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 42. Такие антитела могут дополнительно содержать

5 человеческую константную область, относящуюся к изотипу IgG, например IgG1.

В еще одном воплощении предложено химерное терапевтическое антитело, содержащее переменный участок, не являющийся человеческим, (например грызуна), и человеческую константную область (которая может соответствовать изотипу IgG, например IgG1), который специфически связывает hOSM, имеющий CDRs с SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6 или SEQ ID NO: 40, 41, 42, 43, 44 и 45.

10 15

В еще одном воплощении предложено гуманизированное терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(ый) специфически связывает hOSM и модулирует (то есть, ингибирует или блокирует) взаимодействие между сайтом II hOSM и gp130.

20

В еще одном воплощении предложено гуманизированное терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(ый) специфически связывает hOSM и содержит CDRH3 с SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 42. Такие антитела могут содержать человеческую константную область, относящуюся к изотипу IgG, например IgG1.

25 30

В еще одном воплощении предложено гуманизированное терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(ый) специфически связывает hOSM и содержит CDRs с SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6 или SEQ ID NO: 40, 41, 42, 43, 44 и 45. Такие антитела могут содержать человеческую константную область, относящуюся к изотипу IgG, например IgG1.

35

В еще одном воплощении предложено гуманизированное терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(ый) специфически связывает hOSM и модулирует взаимодействие между hOSM и gp130 и содержит тяжелую цепь с SEQ ID NO: 11 и легкую цепь с SEQ ID NO: 12 (или состоит по существу из них).

40 45

В еще одном воплощении предложено гуманизированное терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(ый)

50

специфически связывает hOSM и модулирует взаимодействие между hOSM и gp130 и содержит тяжелую цепь с SEQ ID NO: 50 и легкую цепь с SEQ ID NO: 51 (или состоит по существу из них).

В еще одном воплощении предложено гуманизированное терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(ый) специфически связывает hOSM и модулирует взаимодействие между hOSM и gp130, причем указанное антитело или его фрагмент содержит CDRH3 с SEQ ID NO: 3, возможно дополнительно содержащий CDRs с SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5 и 6, где остатки в положениях 28, 29, 30, 71 и 94 каркасного участка человеческой акцепторной тяжелой цепи и положениях 48 и 70 каркасного участка человеческой акцепторной легкой цепи заменены соответствующими остатками, обнаруживаемыми в каркасном участке донорного антитела, из которого происходит CDRH3.

В еще одном воплощении предложено гуманизированное терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(ый) специфически связывает hOSM и модулирует взаимодействие между hOSM и gp130, причем указанное антитело или его фрагмент содержит CDRH3 с SEQ ID NO: 42, возможно дополнительно содержащий CDRs с SEQ ID NO: 40, 41, 43, 44, 45, где остатки в положениях 28, 44, 48, 67, 69, 71, 73 каркасного участка человеческой акцепторной тяжелой цепи и положениях 36, 38, 46, 47, 71 каркасного участка человеческой акцепторной легкой цепи заменены соответствующими остатками, обнаруживаемыми в каркасном участке донорного антитела, из которого происходит CDRH3.

Специалистам должно быть очевидно, что термин "происходит" предназначен для определения не только источника в смысле *физического* происхождения вещества, но также определения вещества, которое является структурно идентичным этому веществу, но не происходит из указанного источника. Таким образом "остатки, обнаруживаемые в донорном антителе, из которого происходит CDRH3" не обязательно являются очищенными из этого донорного антитела.

В еще одном воплощении предложено гуманизированное терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(ый) специфически связывает hOSM, причем указанное антитело или его фрагмент

содержит CDRH3 с SEQ ID NO: 3, возможно дополнительно содержащий CDRs с SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5 и 6, где каркасный участок человеческой тяжелой цепи содержит один или более чем один (например все) из следующих остатков (или их консервативных замен):

Положение	Остаток
28	S
29	L
30	T
71	K
94	K,

и человеческая легкая цепь содержит любой или оба из следующих остатков (или их консервативных замен):

Положение	Остаток
48	E
70	Y.

В еще одном воплощении предложено гуманизированное терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(ый) специфически связывает hOSM, причем указанное антитело или его фрагмент содержит CDRs с SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6, где каркасный участок человеческой тяжелой цепи содержит один или более чем один (например все) из следующих остатков (или их консервативных замен):

Положение	Остаток
28	S
29	L
30	T
71	K
94	K,

и человеческая легкая цепь содержит любой или оба из следующих остатков (или их консервативных замен):

Положение	Остаток
48	E
70	Y.

В еще одном воплощении предложено гуманизированное терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(ый) специфически связывает hOSM, причем указанное антитело или его фрагмент содержит CDRH3 с SEQ ID NO: 42, возможно дополнительно содержащий CDRs с SEQ ID NO: 40, 41, 43, 44, 45, где каркасный участок человеческой тяжелой цепи содержит один или более чем один (например все) из следующих остатков (или их консервативных замен):

Положение	Остаток
28	I
48	I
44	K
67	A
69	L
71	V
73	K,

и человеческая легкая цепь содержит один или более чем один (например все) из следующих остатков (или их консервативных замен):

Положение	Остаток
36	F
38	K
46	R
47	W
71	Y.

В еще одном воплощении предложено гуманизированное терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(ый) специфически связывает hOSM, причем указанное антитело или его фрагмент содержит CDRs с SEQ ID NO: 40, 41, 42, 43, 44, 45, где каркасный участок человеческой тяжелой цепи содержит один или более чем один (например все) из следующих остатков (или их консервативных замен):

Положение	Остаток
28	I
48	I
44	K

67	A
69	L
71	V
73	K,

и человеческая легкая цепь содержит один или более чем один (например все) из следующих остатков (или их консервативных замен):

Положение	Остаток
36	F
38	K
46	R
47	W
71	Y.

В данной области хорошо известно, что определенные замены аминокислот считаются "консервативными". Аминокислоты разделены по группам на основании общих свойств боковой цепи, и замены в пределах групп, сохраняющие полностью или по существу полностью аффинность связывания антитела по этому изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента, считаются консервативными заменами, см. таблицу ниже:

Боковая цепь	Члены
Гидрофобная	met, ala, val, leu, ile
Нейтральная гидрофильная	cys, ser, thr
Кислотная	asp, glu
Основная	asn, gln, his, lys, arg
Остатки, которые влияют на ориентацию цепи	gly, pro
Ароматическая	trp, tyr, phe

1.3 Биспецифичные антитела

Биспецифичное антитело представляет собой антитело, обладающее специфичностями связывания для по меньшей мере двух разных эпитопов. Способы получения таких антител известны в данной области. Традиционно рекомбинантное получение биспецифичных антител основано на коэкспрессии двух пар Н-цепей и L-цепей иммуноглобулина, где две Н-цепи имеют разные специфичности связывания, см. Millstein *et al*, Nature 305 537-539 (1983),

WO93/08829 и Traunecker *et al*, EMBO, 10, 1991, 3655-3659. Ввиду случайного выбора Н- и L-цепей получают потенциальную смесь десяти разных структур антител, из которых только одна имеет желаемую специфичность связывания.

Альтернативный подход включает слияние переменных доменов, имеющих желаемую специфичность связывания, с константной областью тяжелой цепи, содержащей по меньшей мере часть шарнирной области, CH2- и CH3-области.

Предпочтительно, чтобы была CH1-область, содержащая сайт, необходимый для связывания легкой цепи, присутствующей в по меньшей мере одном из продуктов слияния. ДНК, кодирующая эти продукты слияния и, если желательно, L-цепь, встраивают в отдельные экспрессионные векторы и затем котрансфицируют ими подходящий организм-хозяин. Однако возможно встроить кодирующие последовательности для двух или всех трех цепей в один экспрессионный вектор. В одном предпочтительном подходе биспецифичное антитело состоит из Н-цепи с первой специфичностью связывания в одной ветви и пары Н-L-цепи, обеспечивающей вторую специфичность связывания, в другой ветви, см. WO94/04690. См. также Suresh *et al* Methods in Enzymology 121, 210, 1986.

В одном из воплощений этого изобретения предложено биспецифичное терапевтическое антитело, причем по меньшей мере одна специфичность связывания указанного антитела относится к hOSM, где указанное антитело модулирует (то есть, ингибирует или блокирует) взаимодействие между сайтом II hOSM и gp130. Такие антитела могут дополнительно содержать человеческую константную область, относящуюся к изотипу IgG, например IgG1.

В одном из воплощений этого изобретения предложено биспецифичное терапевтическое антитело, причем по меньшей мере одна специфичность связывания указанного антитела относится к hOSM, где указанное антитело содержит по меньшей мере один CDRH3 с SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 42. Такие антитела могут дополнительно содержать человеческую константную область, относящуюся к изотипу IgG, например IgG1.

В одном из воплощений этого изобретения предложено биспецифичное терапевтическое антитело, причем по меньшей мере одна специфичность связывания указанного антитела относится к hOSM, где указанное антитело содержит по меньшей мере CDRs с SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6 или SEQ ID NO:

40, 41, 42, 43, 44 и 45. Такие антитела могут дополнительно содержать человеческую константную область, относящуюся к изотипу IgG, например IgG1.

1.4 Фрагменты антител

В некоторых воплощениях этого изобретения предложены терапевтические фрагменты антител, которые модулируют взаимодействие между OSM (в частности hOSM) и gp130. Такие фрагменты могут быть функциональными антигенсвязывающими фрагментами интактных, и/или гуманизированных, и/или химерных антител, такими как Fab-, Fd-, Fab'-, F(ab')₂-, Fv-, ScFv-фрагменты антител, описанных выше. Традиционно такие фрагменты получают путем протеолитического расщепления интактных антител, например путем расщепления папаином (см. например, WO 94/29348), но их можно получать непосредственно из рекомбинантно трансформированных клеток-хозяев. Получение ScFv см. в Bird *et al*; (1988) Science, 242, 423-426. В дополнение, фрагменты антител можно получать, используя ряд методик конструирования, как описано ниже.

У Fv-фрагментов энергия взаимодействия их двух цепей оказывается ниже, чем у Fab-фрагментов. Для стабилизации ассоциации V_H- и V_L-доменов их связывали с использованием пептидов (Bird *et al*, (1988) Science 242, 423-426, Huston *et al*, PNAS, 85, 5879-5883), дисульфидных мостиков (Glockshuber *et al*, (1990) Biochemistry, 29, 1362-1367) и мутаций типа "выступ к впадине" (Zhu *et al* (1997), Protein Sci., 6, 781-788). ScFv-фрагменты можно получать способами, хорошо известными специалистам в данной области, см. Whitlow *et al* (1991) Methods Companion Methods Enzymol, 2, 97-105 и Huston *et al* (1993) Int.Rev.Immunol 10, 195-217. ScFv можно продуцировать в бактериальных клетках, таких как *E.Coli*, но в более типичных случаях их продуцируют в эукариотических клетках. Одним из недостатков ScFv является одновалентность продукта, которая делает невозможным повышение авидности благодаря поливалентному связыванию, и их короткое время полужизни. Попытки преодолеть эти проблемы включают получение бивалентных (ScFv')₂ из ScFV, содержащих дополнительный C-концевой цистеин, путем химического сочетания (Adams *et al* (1993) Can.Res 53, 4026-4034 и McCartney *et al* (1995) Protein Eng. 8, 301-314) или путем спонтанной

сайт-специфической димеризации ScFv, содержащих неспаренный С-концевой остаток цистеина (см. Kipriyanov *et al* (1995) Cell Biophys 26, 187-204). Альтернативно, ScFv можно подвергнуть образованию мультимеров путем укорочения пептидного линкера до между остатками от 3 до 12 с образованием "диател", см. Holliger *et al* PNAS (1993), 90, 6444-6448. Дальнейшее редуцирование линкера может приводить к тримерам ScFV ("триатела", см. Koitt *et al* (1997) Protein Eng, 10, 423-433) и тетрамерам ("тетратела", см. Le Gall *et al* (1999) FEBS Lett, 453, 164-168). Конструирование бивалентных молекул ScFV можно также осуществлять генетическим слиянием с мотивами димеризации белков с образованием "миниантител" (см. Pack *et al* (1992) Biochemistry 31, 1579-1584) и "минител" (см. Hu *et al* (1996), Cancer Res. 56, 3055-3061). Также можно получать тандемы ScFv-Sc-Fv ((ScFV)₂) путем связывания двух единиц ScFv третьим пептидным линкером, см. Kurucz *et al* (1995) J. Immunol., 154, 4576-4582. Биспецифичные диатела можно получать нековалентной ассоциацией двух одноцепочечных продуктов слияния, состоящих из V_H-домена одного антитела, соединенного коротким линкером с V_L-доменом другого антитела, см. Kipriyanov *et al* (1998), Int.J.Can 77,763-772. Стабильность таких биспецифичных диател можно усиливать введением дисульфидных мостиков или мутаций "выступ к впадине", как описано выше, или образованием одноцепочечных диател (ScDb), где два гибридных ScFv-фрагмента соединены через пептидный линкер, см. Kontermann *et al* (1999) J.Immunol.Methods, 226, 179-188. Четырехвалентные биспецифичные молекулы доступны, например, при использовании слияния ScFv-фрагмента с CH3-доменом молекулы IgG или с Fab-фрагментом через шарнирную область, см. Coloma *et al* (1997) Nature Biotechnol. 15, 159-163. Альтернативно, четырехвалентные биспецифичные молекулы были созданы путем слияния биспецифичных одноцепочечных диател (см. Alt *et al*, (1999) FEBS Lett 454, 90-94). Меньшие четырехвалентные биспецифичные молекулы можно также образовывать димеризацией либо тандемов ScFv-ScFv линкером, содержащим мотив спираль-петля-спираль (DiBi-миниантитела, см. Muller *et al* (1998) FEBS Lett 432, 45-49), либо одноцепочечной молекулы, содержащей четыре переменных домена (V_H и V_L) антитела в ориентации, предотвращающей внутримолекулярное спаривание (тандемное диатело, см. Kipriyanov *et al*,

(1999) J.Mol.Biol. 293, 41-56). Биспецифичные $F(ab')_2$ -фрагменты можно создавать химическим сочетанием Fab'-фрагментов или гетеродимеризацией через лейциновые зацепы (см. Shalaby et al, (1992) J.Exp.Med. 175, 217-225 и Kostelny et al (1992), J.Immunol. 148, 1547-1553). Также доступны выделенные домены V_H и V_L (Domantis plc), см. US 6248516; US 6291158; US 6172197.

В одном из воплощений предложен терапевтический фрагмент антитела (например ScFv, Fab, Fd, Fab', $F(ab')_2$ или фрагмент антитела, сконструированного как описано выше), который специфически связывает hOSM и модулирует (то есть, ингибирует или блокирует) взаимодействие между сайтом II hOSM и gp130. Терапевтический фрагмент антитела может содержать CDRH3, имеющий последовательность с SEQ ID NO: 3, возможно вместе с CDRs, имеющими последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5 и 6, или фрагмент терапевтического антитела, содержащий CDRH3 с SEQ ID NO: 42, возможно вместе с CDRs, имеющими последовательность, указанную в SEQ ID NO: 40, 41, 43, 44 и 45.

1.5 Гетероконъюгатные антитела

Гетероконъюгатные антитела также образуют воплощение настоящего изобретения. Гетероконъюгатные антитела состоят из двух ковалентно соединенных антител, образованных при использовании любых удобных способов поперечного сшивания. См. US 4676980.

1.6 Другие модификации

Взаимодействие между Fc-областью антитела и различными Fc-рецепторами (FcγR) считается опосредующим эффекторные функции антитела, которые включают зависимую от антител клеточную цитотоксичность (ADCC), фиксацию комплемента, фагоцитоз и период полувыведения/клиренс антитела. Различные модификации Fc-области антитела по этому изобретению можно осуществлять в зависимости от желаемого эффекторного свойства. Например, конкретные мутации в Fc-области, для того чтобы сделать литическое в иных случаях антитело нелитическим, подробно описаны в EP 0629240B1 и EP 0307434B2, или можно включить в антитело эпитоп связывания с «рецептором-спасателем» (salvage receptor) для увеличения периода полужизни в сыворотке, см. US 5739277. В настоящее время распознано пять человеческих Fcγ-рецепторов: FcγR (I), FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa и неонатальные FcRn. В Shields et

al (2001) J.Biol.Chem 276, 6591-6604 показано, что в связывание всех FcγR вовлечена общая совокупность IgG1 остатков, в то время как FcγRII и FcγRIII используют отдельные сайты вне этой общей совокупности. Одна группа IgG1 остатков снижала связывание со всеми FcγR, когда на аланин меняли: Pro-238, Asp-265, Asp-270, Asn-297 и Pro-239. Все они находятся в CH2-домене IgG и образуют кластер около шарнирного сочленения CH1 и CH2. В то время как FcγRI использует для связывания только общую совокупность IgG1 остатков, FcγRII и FcγRIII взаимодействуют с отдельными остатками в дополнение к этой общей совокупности. Изменение некоторых остатков снижало связывание только с FcγRII (например Arg-292) или FcγRIII (например Glu-293). Некоторые варианты показали улучшенное связывание с FcγRII или FcγRIII, но не влияли на связывание с другим рецептором (например Ser-267Al улучшал связывание с FcγRII, но связывание с FcγRIII было незатронутым). Другие варианты проявляли улучшенное связывание с FcγRII или FcγRIII при снижении связывания с другим рецептором (например Ser-298Ala улучшал связывание с FcγRIII и снижал связывание с FcγRII). Для FcγRIIIa, наилучшие по связыванию с IgG1 варианты имели комбинированные замены аланином по Ser-298, Glu-333 и Lys-334. Неонатальный рецептор FcRn считается вовлеченным как в клиренс антител, так и трансцитоз через ткани (см. Junghans R.P (1997) Immunol.Res 16. 29-57 и Ghetie et al (2000) Annu.Rev.Immunol. 18, 739-766). Остатки в человеческих IgG1, определенные для взаимодействия непосредственно с человеческим FcRn, включают Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 и His435. Поэтому настоящее изобретение относится к антителам по этому изобретению, имеющим любое одно (или более чем одно) из изменений остатков, подробно описанных выше, для модификации периода полужизни/клиренса и/или эффекторных функций, таких как ADCC и/или комплементзависимый лизис. В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложено гуманизированное терапевтическое антитело, которое специфически связывает hOSM и модулирует взаимодействие между hOSM и gp130, имеющее замену аланином (или другое нарушение) по положениям 235 (например L235A) и 237 (например G237A). В дополнительном воплощении этого изобретения предложено гуманизированное

терапевтическое антитело, которое специфически связывает hOSM и содержит тяжелую цепь с SEQ ID NO: 61 и легкую цепь с SEQ ID NO: 12.

Другие модификации включают варианты гликозилирования антител по этому изобретению. Известно, что гликозилирование антител по консервативным положениям в их константных областях оказывает сильное влияние на функции антител, в частности эффекторные функции, такие как описанные выше, см. например, Body *et al* (1996), Mol.Immunol. 32, 1311-1318. Предусмотрены варианты гликозилирования терапевтических антител или их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению, где добавлена, замещена, удалена или модифицирована одна или более чем одна углеводная группировка. Введение мотива аспарагин-Х-серин или аспарагин-Х-треонин создает потенциальный сайт для ферментативного присоединения углеводной группировки и поэтому может быть использовано для манипуляции гликозилированием антител. В Raju *et al* (2001) Biochemistry 40, 8868-8876 концевое сиалилирование иммуноадгезина ФНО α -IgG было увеличено процессом повторного галактозилирования и/или сиалилирования с использованием бета-1,4-галактозилтрансферазы и/или альфа-2,3-сиалилтрансферазы. Увеличение концевого сиалилирования, как считается, увеличивает время полужизни иммуноглобулинов. Антитела, как и большинство гликопротеинов, в типичных случаях продуцируются в природе в виде смеси гликоформ. Эта смесь является особенно очевидной, когда антитела продуцируются в эукариотических клетках, в частности клетках млекопитающих. Для получения определенных гликоформ было разработано множество способов, см. Zhang *et al* Science (2004), 303, 371, Sears *et al*, Science, (2001) 291, 2344, Wacker *et al* (2002) Science, 298 1790, Davis *et al* (2002) Chem.Rev. 102, 579, Hang *et al* (2001) Acc.Chem.Res 34, 727. Таким образом, это изобретение относится к совокупности терапевтических (в типичных случаях моноклональных) антител (которые могут относиться к изотипу IgG, например IgG1), описанных здесь, которые содержат определенное число (например 7 или менее, например 5 или менее, например две или одну) гликоформ указанных антител или его антигенсвязывающих фрагментов.

Дополнительные воплощения этого изобретения включают терапевтические антитела по этому изобретению или их антигенсвязывающие

фрагменты, сопряженные с небелковым полимером, таким как полиэтиленгликоль (ПЭГ), полипропиленгликоль или полиоксиалкилен. Конъюгация белков с ПЭГ является признанной методикой для увеличения полужизни белков, а также снижения антигенности и иммуногенности белков. Применение ПЭГилирования с разными молекулярными массами и формами (линейная или разветвленная) было исследовано с интактными антителами, а также Fab'-фрагментами, см. Koumenis I.L. *et al* (2000) *Int.J.Pharmaceut.* 198:83-95.

Доставка терапевтических белков в мозг затруднена присутствием гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Если желательно доставлять антитело по этому изобретению или фрагмент антитела по этому изобретению через ГЭБ, предложены различные стратегии для усиления такой доставки при необходимости.

Для получения требуемых питательных веществ и факторов из крови ГЭБ имеет некоторые специфические рецепторы, которые транспортируют соединения из циркулирующей крови в мозг. Исследования показали, что некоторые соединения, такие как инсулин (см. Duffy KR *et al* (1989) *Brain Res.* 420:32-38), трансферрин (см. Fishman JB *et al* (1987) *J.Neurosci* 18:299-304) и инсулиноподобные факторы роста 1 и 2 (см. Pardridge WM (1986) *Endocrine Rev*, 7:314-330 и Duffy KR *et al* (1986) *Metabolism* 37:136-140) пересекают ГЭБ посредством опосредованного рецепторами трансцитоза. Рецепторы для этих молекул, таким образом, дают для антител по этому изобретению и/или фрагментов антител по этому изобретению потенциальные средства для доступа в мозг с использованием так называемых "направленных" антител (см. Pardridge WM (1999) *Advanced Drug Delivery Review* 36:299-321). Например, было показано, что антитело к рецептору трансферрина динамически транспортируется в паренхиму мозга (см. Friden PM *et al* (1991) *PNAS* 88:4771-4775 и Friden PM *et al* (1993) *Science* 259:373-377). Таким образом, одним из потенциальных подходов является получение биспецифичного антитела или биспецифичного фрагмента, такого как описано выше, с первой специфичностью к сайту II hOSM (например, первая специфичность содержит CDRH3 с SEQ ID NO: 3, возможно вместе с CDRs с SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5 и 6, или содержит CDRH3 с SEQ ID NO: 42, возможно вместе с CDRs с SEQ ID NO: 40,

41, 43, 44, 45) и второй специфичностью к транспортному рецептору, локализованному на ГЭБ, например второй специфичностью к транспортному рецептору трансферрина.

2. Конкурирующие иммуноглобулины

В настоящем изобретении также предложены иммуноглобулины, антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител и другие белковые агенты, такие как иммуноадгезины, которые специфически связывают hOSM и конкурентно ингибируют связывание между hOSM и терапевтическим антителом по этому изобретению или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим тяжелую цепь с SEQ ID NO: 11 и легкую цепь с SEQ ID NO: 12. Конкурирующий иммуноглобулин, антитело и антигенсвязывающие фрагменты антител и другие белковые агенты, такие как иммуноадгезин, проявляют при эквимоллярных концентрациях по меньшей мере 25%-ное ингибирование, в типичных случаях 35%-ное или больше, в более типичных случаях по меньшей мере 50%-ное ингибирование.

Таким образом, в одном из воплощений этого изобретения предложен способ скрининга антитела-кандидата или фрагмента антитела-кандидата для определения того, является ли антитело-кандидат или фрагмент антитела-кандидата конкурирующим антителом, как описано здесь, включающий стадии:

(а) инкубирования антитела-кандидата или фрагмента антитела-кандидата с терапевтическим антителом, содержащим тяжелую цепь с SEQ ID NO: 11 и легкую цепь с SEQ ID NO: 12, или его антигенсвязывающим фрагментом;

(б) определения того, является ли антитело-кандидат или его фрагмент со стадии (а) конкурентным ингибитором связывания терапевтического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с OSM, в частности hOSM. В типичных случаях используют анализы ELISA, такие как ELISA, указанный в примерах. В типичных случаях OSM и/или hOSM являются гликозилированными. В типичных случаях OSM и/или hOSM гликозилированы клеткой млекопитающего, такой как рекомбинантно трансформированная клетка CHO, NS0 или человеческая клетка. В других воплощениях OSM и hOSM гликозилированы нативной клеткой, из которой они происходят, то есть hOSM

гликозилирован человеческой клеткой (например, hOSM может быть выделенным из человеческого организма).

Таким образом, также предложено конкурирующее терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(ый) конкурентно ингибирует связывание терапевтического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, причем терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6.

Также предложено конкурирующее терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое(ый) конкурентно ингибирует связывание терапевтического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, причем терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь с SEQ ID NO: 11 и легкую цепь с SEQ ID NO: 12.

Конкурирующее терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может иметь любую из указанных структур антитела. Например, конкурирующее терапевтическое антитело может представлять собой антитело обезьяны, или человеческое интактное антитело, или гуманизированное антитело, в типичных случаях относящееся к изотипу IgG, например IgG1 или IgG4. Фрагментами конкурирующих терапевтических антител могут быть Fab, Fab', Fd, F(ab')₂, cFv и тому подобные. Конкурирующее терапевтическое антитело можно получать в соответствии со способами, раскрытыми в настоящем описании изобретения.

Типичный протокол способа скрининга, описанного выше, изложен ниже в примерах.

10D3 представляет собой пример конкурирующего антитела по этому изобретению. См. ниже Таблицу А.

2.1 Другие способы скрининга

Дополнительный аспект настоящего изобретения отчасти основан на обнаружении того, что гликозилирование hOSM играет неожиданную роль в акте связывания между антителом против hOSM и hOSM. Поэтому настоящее изобретение распространяется на способ скрининга антитела, которое специфически связывает hOSM, включающий инкубирование указанного

антитела с гликозилированным OSM, в частности hOSM, в условиях, допускающих связывание, и измерение аффинности связывания антитела. Протокол ELISA, подробно описанный ниже, делает такой способ возможным.

5 Антитела (которые могут быть любой структуры, подробно описанной выше) могут быть отобраны на основании наличия аффинности связывания (K_d) более чем 1 мкМ, в типичных случаях более чем 100 нМ, в более типичных случаях более чем 1 нМ, например 100 пМ или более.

Антитела могут быть дополнительно отобраны на основании их способности связывать негликозилированный OSM, например hOSM. Таким образом, антитела в типичных случаях отбирают на основании того, что они способны связывать гликозилированный OSM, например hOSM, и дополнительно также способны связывать негликозилированный OSM, например hOSM, в такой же или подобной степени (например, имеют такую же или подобную аффинность связывания при измерении в анализе Biacore™).

Антитела, отобранные в соответствии с настоящим способом, можно подвергать дополнительной инженерии (например, гуманизации, если необходимо, например, манипулированием полинуклеотидами, кодирующими антитело) и включать в фармацевтическую композицию. Антитела, отобранные настоящим способом, и полинуклеотиды, кодирующие такие антитела, образуют воплощение настоящего изобретения. Таким образом, в настоящем изобретении предложен способ скрининга антитела, которое предположительно связывает OSM, в частности hOSM, (например антитело, которое индуцировано против OSM/hOSM), включающий:

- (а) инкубацию указанного антитела с гликозилированным OSM, в частности гликозилированным hOSM, в условиях, допускающих связывание;
- (б) измерение аффинности связывания указанного антитела;
- 40 (в) отбор указанного антитела, если указанное антитело имеет аффинность связывания более чем 1 мкМ, в типичных случаях более чем 100 нМ;
- 45 (г) предоставление полинуклеотида, кодирующего указанное антитело со стадии (в), и трансформацию или трансфекцию клетки-хозяина млекопитающего вектором, содержащим указанный полинуклеотид;

(д) культивирование указанной клетки-хозяина со стадии (г) в условиях, допускающих секрецию указанного антитела в культуральную среду;

(е) возможно, очистку культуральной среды со стадии (д);

(ж) включение антитела со стадии (д) или (е) в фармацевтическую композицию.

Также предложено применение антитела, идентифицированного этим способом, в изготовлении лекарства для лечения заболеваний или расстройств, подробно описанных ниже.

Также предложено применение антитела (например интактного, человеческого, гуманизированного, химерного), которое специфически связывает нативный гликозилированный hOSM (в частности, связывает эпитоп сайта II нативного гликозилированного hOSM) и модулирует взаимодействие между указанным нативным гликозилированным hOSM и gp130, в изготовлении лекарства для лечения заболевания или расстройства, подробно описанного ниже. Дополнительно предложены антитела, которые специфически связывают нативный гликозилированный hOSM с той же самой или подобной аффинностью связывания, как и негликозилированный hOSM в тех же самых экспериментальных условиях. Одним из воплощений этого изобретения являются антитела, которые специфически связывают гликозилированный OSM, в частности антитела, которые связывают нативный гликозилированный hOSM. Антитело 15E10 представляет собой пример антитела, которое специфически связывает гликозилированный hOSM.

В некоторых воплощениях способа используют hOSM, гликозилированный клеткой-хозяином млекопитающего, такой как CHO или NS0. В других воплощениях способа используют hOSM, гликозилированный человеческой клеткой, например рекомбинантно трансформированной или трансфицированной человеческой клеткой-хозяином, или нативный hOSM, выделенный из человеческого организма (например, hOSM, продуцированный клетками, обнаруживаемыми в синовиальной жидкости человека, больного артритом, например РА).

3. Способы получения

Антитела по этому изобретению могут быть продуцированы в виде поликлональной популяции, но в более типичных случаях их продуцируют в

виде моноклональной популяции (то есть, в виде по существу гомогенной популяции идентичных антител, направленных против конкретного антигенного сайта связывания). Антитела по настоящему изобретению могут быть

5 продуцированы в трансгенных организмах, таких как козы (см. Pollock *et al* (1999), J.Immunol.Methods 231:147-157), куры (см. Morrow KJJ (2000) Genet.Eng.News 20:1-55), мыши (см. Pollock *et al* *ibid*) или растения (см. Doran

10 PM, (2000) Curr.Opinion Biotechnol. 11, 199-204, Ma JK-C (1998), Nat.Med. 4; 601-606, Baez J *et al*, BioPharm (2000) 13: 50-54, Stoger E *et al*; (2000) Plant Mol.Biol. 42:583-590). Антитела можно также получать химическим синтезом. Однако в

15 типичных случаях антитела по этому изобретению продуцируют с использованием технологии культивирования рекомбинантных клеток, хорошо известной специалистам в данной области техники. Полинуклеотид, кодирующий антитело, выделяют и встраивают в реплицируемый вектор, такой

20 как плазмида, для дополнительного клонирования (амплификации) или экспрессии. Одной из полезных экспрессионных систем является глутаматсинтетазная система (например, поставляемая Lonza Biologics),

25 особенно если клеткой-хозяином является CHO или NS0 (см. ниже). Полинуклеотид, кодирующий антитело, легко выделять и секвенировать, используя общепринятые способы (например, с олигонуклеотидными зондами).

30 Векторы, которые могут быть использованы, включают плазмиду, вирус, фаг, транспозоны, мини-хромосомы, причем плазмиды представляют собой типичное воплощение. Обычно такие векторы дополнительно включают

35 сигнальную последовательность, точку инициации репликации, один или более чем один маркерный ген, энхансерный элемент, промотор и последовательности терминирования транскрипции, функциональным образом связанные с полинуклеотидом легкой и/или тяжелой цепи, чтобы

40 способствовать экспрессии. Полинуклеотид, кодирующий легкие и тяжелые цепи, может быть встроен в отдельные векторы и введен (например электропорацией) в ту же самую клетку-хозяина, или, если желательно, обе

45 цепи, тяжелую и легкую, могут быть встроены в один и тот же вектор для трансфекции клетки-хозяина. Таким образом, в соответствии с одним из воплощений настоящего изобретения предложен способ конструирования вектора, кодирующего легкие и/или тяжелые цепи терапевтического антитела

50

или его антигенсвязывающего фрагмента по этому изобретению, включающий встраивание полинуклеотида, кодирующего легкую цепь и/или тяжелую цепь терапевтического антитела по этому изобретению, в вектор. См. Таблицу А ниже.

В другом воплощении этого изобретения предложен полинуклеотид, кодирующий мышинный V_H -домен, имеющий последовательность, указанную как SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 52.

В еще одном воплощении этого изобретения предложен полинуклеотид, кодирующий мышинный V_L -домен, имеющий последовательность, указанную как SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 53.

В еще одном воплощении предложен полинуклеотид, кодирующий гуманизированный V_H -домен, имеющий последовательность, указанную как SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 54.

В еще одном воплощении предложен полинуклеотид, кодирующий гуманизированную V_L -цепь, имеющую последовательность, указанную как SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 55.

В еще одном воплощении предложен полинуклеотид, кодирующий гуманизированную тяжелую цепь, имеющую последовательность, указанную как SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 56.

В еще одном воплощении предложен полинуклеотид, кодирующий гуманизированную легкую цепь, имеющую последовательность, указанную как SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 57.

Специалистам в данной области должно быть непосредственно очевидно, что из-за избыточности генетического кода также доступны альтернативные раскрытым здесь полинуклеотиды, которые будут кодировать полипептиды по этому изобретению.

3.1 Сигнальные последовательности

Антитела по настоящему изобретению могут быть продуцированы в виде слитого белка с гетерологической сигнальной последовательностью, имеющей специфический сайт расщепления на N-конце зрелого белка. Сигнальная последовательность должна распознаваться и процессироваться клеткой-хозяином. Для прокариотической клетки-хозяина сигнальными последовательностями могут быть лидерные последовательности щелочной

фосфатазы, пенициллиназы или термостабильного энтеротоксина II. Для секреции дрожжами сигнальными последовательностями могут быть лидерная последовательность дрожжевой инвертазы, лидерная последовательность фактора α или лидерная последовательность кислой фосфатазы, см. например WO90/13646. В системах клеток млекопитающих доступны вирусные секреторные лидерные последовательности, такие как сигнальная последовательность gD простого герпеса и сигнальная последовательность нативного иммуноглобулина (такого как тяжелая цепь человеческого Ig). В типичных случаях сигнальную последовательность лигируют в рамке считывания в ДНК, кодирующей антитело по этому изобретению.

3.2 Точка инициации репликации

Точки инициации репликации хорошо известны в данной области, причем pBR322 является подходящей для большинства грамотрицательных бактерий, плазида 2 μ для большинства дрожжей, и точки инициации репликации различных вирусов, таких как SV40, вируса полиомы, аденовируса, VSV или BHV, для большинства клеток млекопитающих. Обычно компонент, представляющий собой точку инициации репликации, не нужен для экспрессионных векторов для млекопитающих, но может быть использован SV40, поскольку он содержит ранний промотор.

3.3 Селекционный маркер

Типичные селекционные гены кодируют белки, которые (а) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину, или (б) восполняют ауксотрофные дефициты или поставляют питательные вещества, недоступные в комплексных средах. Селекционная схема может включать остановку роста клетки-хозяина. Клетки, которые были успешно трансформированы генами, кодирующими терапевтическое антитело по настоящему изобретению, выживают, например, из-за устойчивости к лекарственному средству, придаваемой селекционным маркером. Другим примером является так называемый дигидрофолатредуктазный (DHFR) селекционный маркер, где трансформанты культивируют в присутствии метотрексата. Клетки CHO представляют собой особенно полезную клеточную линию для DHFR-селекции. Способы амплификации и селекции клеток-хозяев при использовании DHFR-системы

полностью признаны в данной области, см. Kaufman R.J. et al J.Mol.Biol. (1982) 159, 601-621; обзор, см. в Werner RG, Noe W, Kopp K, Schluter M, "Appropriate mammalian expression systems for biopharmaceuticals", Arzneimittel-Forschung. 48(8):870-80, 1998 Aug. Дополнительным примером является глутаматсинтезная экспрессионная система (Lonza Biologics). Подходящим селекционным геном для использования в дрожжах является ген *trp1*; см. Stinchcomb et al Nature 282, 38, 1979.

3.4 Промоторы

Подходящие промоторы для экспрессии антител по этому изобретению функциональным образом связаны с ДНК/полинуклеотидом, кодирующим антитело. Промоторы для прокариотических хозяев включают промотор *rhoA*, промоторные системы бета-лактамазы и лактозы, щелочной фосфатазы, триптофана и гибридные промоторы, такие как *Tac*. Промоторы, подходящие для экспрессии в дрожжевых клетках, включают промоторы 3-фосфоглицераткиназы или других гликолитических ферментов, например енолазы, глицеральдгид-3-фосфатдегидрогеназы, гексокиназы, пируватдекарбоксилазы, фосфофруктокиназы, глюкозо-6-фосфатизомеразы, 3-фосфоглицератмутаза и глюкокиназы. Индуцибельные дрожжевые промоторы включают промоторы алкогольдегидрогеназы-2, изоцитохрома C, кислой фосфатазы, металлотионеина и ферментов, ответственных за метаболизм азота или утилизацию мальтозы/галактозы.

Промоторы для экспрессии в системах клеток млекопитающих включают промоторы вирусов, таких как вирус полиомы, птичьей оспы и аденовирусы (например аденовирус 2), вирус бычьей папилломы, вирус птичьей саркомы, цитомегаловирус (в частности, промотор непосредственно раннего гена), ретровирус, вирус гепатита В, актина, промотор вируса саркомы Рауса (RSV) и ранний или поздний промотор вируса Simian virus 40. Разумеется, выбор промотора основан на подходящей совместимости с клеткой-хозяином, используемой для экспрессии.

3.5 Энхансерный элемент

Когда целесообразно, например, для экспрессии в высших эукариотах, можно использовать энхансерный элемент, функциональным образом связанный с промоторным элементом в векторе. Подходящие энхансерные

последовательности млекопитающих включают энхансерные элементы из глобина, эластазы, альбумина, фетопротеина и инсулина. Альтернативно, можно использовать энхансерный элемент из вируса эукариотических клеток, такой как энхансер SV40 (пары оснований (п.о.) 100-270), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер вируса полиомы, энхансер бакуловируса или локус мышинного IgG2 (см. WO04/009823). Энхансер в типичных случаях локализован в векторе в сайте до промотора.

3.6 Клетки-хозяева

Подходящие клетки-хозяева для векторов клонирования или экспрессии, кодирующих антитела по этому изобретению, представляют собой клетки прокариот, дрожжей или высших эукариот. Подходящие клетки прокариот включают эубактерии например, энтеробактерии, такие как *Escherichia*, например *E.Coli* (например ATCC 31446; 31537; 27325), *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella proteus*, *Salmonella*, например *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, например *Serratia marcescans*, и *Shigella*, а также бациллы, такие как *B.subtilis* и *B.licheniformis* (см. DD 266710), псевдомонады, такие как *P.aeruginosa*, и *Streptomyces*. Из дрожжевых клеток-хозяев также предусмотрены *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluuyveromyces* (например ATCC 16045; 12424; 24178; 56500), *Yarrowia* (EP402226), *Pichia pastoris* (EP 183070, см. также Peng et al J.Biotechnol. 108 (2004) 185-192), *Candida*, *Trichoderma reesia* (EP244234), *Penicillin*, *Tolypocladium* и хозяева, представляющие собой *Aspergillus*, такие как *A.nidulans* и *A.niger*.

Хотя в этом изобретении конкретно предусмотрены прокариотические и дрожжевые клетки-хозяева, тем не менее, в типичных случаях клетки-хозяева по настоящему изобретению являются клетками позвоночных животных. Подходящие клетки-хозяева позвоночных животных включают клетки млекопитающих, такие как COS-1 (ATCC № CRL 1650), COS-7 (ATCC CRL 1651), линию эмбриональной человеческой почки 293, клетки почки детеныша хомячка (ВНК) (ATCC CRL.1632), ВНК 570 (ATCC NO: CRL 10314), 293 (ATCC № CRL 1573), клетки яичника китайского хомячка CHO (например CHO-K1, ATCC NO: CCL 61, клеточная линия DHFR-CHO, такая как DG44 (см. Urlaub et al, (1986) Somatic Cell Mol.Genet,12, 555-556)), в частности те клеточные линии CHO, которые адаптированы для суспензионной культуры, мышинные клетки

Сертоли, клетки почки обезьяны, клетки почки африканской зеленой мартышки (ATCC CRL-1587), клетки HeLa, клетки почки собаки (ATCC CCL 34), клетки легкого человека (ATCC CCL 75), Нер G2 и клетки миеломы или лимфомы, например NS0 (см. US 5807715), Sp2/0, Y0.

Таким образом, в одном из воплощений этого изобретения предложена стабильно трансформированная клетка-хозяин, содержащая вектор, кодирующий тяжелую цепь и/или легкую цепь терапевтического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного здесь. В типичных случаях такие клетки-хозяева содержат первый вектор, кодирующий легкую цепь, и второй вектор, кодирующий указанную тяжелую цепь.

Бактериальная ферментация

Бактериальные системы особенно подходят для экспрессии фрагментов антител. Такие фрагменты локализованы внутри клеток или в периплазме. Нерастворимые периплазматические белки можно экстрагировать и подвергать рефолдингу с образованием активных белков в соответствии со способами, известными специалистам в данной области, см. Sanchez *et al* (1999) J.Biotechnol. 72, 13-20 и Cupit PM *et al* (1999) Lett Appl Microbiol, 29, 273-277.

3.7 Способы культивирования клеток

Клетки-хозяева, трансформированные векторами, кодирующими терапевтические антитела по этому изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты, можно культивировать любым способом, известным специалистам в данной области. Клетки-хозяева можно культивировать во вращающихся колбах, роллерных флаконах или системах полых волокон, но предпочтительным для крупномасштабного производства является использование реакционных аппаратов с мешалкой, особенно для суспензионных культур. В типичных случаях реакционные аппараты с мешалкой адаптированы для аэрации с использованием, например, разбрызгивателей, дефлекторов или импеллеров низкого сдвига. Для барботажных колонн и эрлифтных реакторов можно использовать прямую аэрацию пузырьками воздуха или кислорода. Если клетки-хозяева культивируют в бессывороточных культуральных средах, предпочтительно, когда эти среды обогащают агентом защиты клеток, таким как pluronic F-68, чтобы помочь предотвратить повреждение клетки в результате процесса аэрации. В зависимости от

характеристик клетки-хозяина, можно либо применять микроносители для использования в качестве субстратов роста для зависимых от культуральной подложки клеточных линий, либо адаптировать клетки к суспензионной культуре (что является типичным). При культивировании клеток-хозяев, в частности клеток-хозяев позвоночных, можно использовать ряд различных режимов работы, таких как периодический процесс с подпиткой (см. Drapeau *et al* (1994) *Cytotechnology* 15: 103-109), продолжительный периодический процесс или проточная культура. Хотя рекомбинантно трансформированные клетки-хозяева млекопитающего можно культивировать в средах, содержащих сыворотку, причем такие среды содержат фетальную телячью сыворотку (FCS), предпочтительно, когда такие клетки-хозяева культивируют в синтетических бессывороточных средах, таких как раскрытые в Keen *et al* (1995) *Cytotechnology* 17:153-163, или имеющихся в продаже средах, таких как ProCHO-CDM или UltraCHO™ (Cambrex NJ, USA), обогащенных при необходимости источником энергии, таким как глюкоза, и синтетическими факторами роста, такими как рекомбинантный инсулин. Бессывороточное культивирование клеток-хозяев может требовать адаптации этих клеток к росту в бессывороточных условиях. Один из способов адаптации состоит в том, чтобы культивировать такие клетки-хозяева в среде, содержащей сыворотку, и повторно заменять 80% культуральной среды бессывороточными средами так, чтобы обучать клетки-хозяева адаптироваться к бессывороточным условиям (см. например Scharfenberg *K et al* (1995) в *Animal Cell Technology: Developments towards the 21st century* (Beuvery E. C. *et al* eds), pp 619-623, Kluwer Academic publishers).

Антитела по этому изобретению, секретируемые в среду, можно извлекать и очищать из среды, используя ряд различных методик с достижением степени очистки, подходящей для предназначенного применения. Например, применение терапевтических антител по этому изобретению для лечения пациентов людей в типичных случаях требует по меньшей мере 95%-ной чистоты, в более типичных случаях 98%-ной или 99%-ной чистоты по сравнению с культуральными средами, содержащими терапевтические антитела. В первом случае, клеточные остатки из культуральной среды обычно удаляют с использованием центрифугирования с последующей стадией

осветления супернатанта с использованием, например, микрофльтрации, ультрафльтрации и/или глубокой фильтрации. Имеется ряд других методик, таких как диализ и гель-электрофорез и хроматографические методики, такие как аффинная хроматография на гидроксиапатите (НА) (возможно с применением системы аффинного мечения, такой как полигистидин) и/или хроматография на основе гидрофобных взаимодействий (HIC) (см. US 5429746). В одном из воплощений антитела по этому изобретению после различных стадий осветления улавливают белком А или G с использованием аффинной хроматографии с последующими дополнительными стадиями хроматографии, такой как ионообменная хроматография и/или хроматография на НА, анионный или катонный обмен, гельфльтрационная хроматография, и осаждения сульфатом аммония. В типичных случаях используют стадии удаления вирусов (например, нанофльтрация с использованием, например, фильтра DV-20). Следуя этим различным стадиям, получают очищенный (в типичных случаях моноклональный) препарат, содержащий по меньшей мере 75 мг/мл или более, например 100 мг/мл или более, антитела по этому изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента, которое предложено и образует таким образом одно из воплощений этого изобретения. Подходящим образом, такие препараты по существу свободны от агрегированных форм антител по этому изобретению.

4. Фармацевтические композиции

Очищенные препараты антител по этому изобретению (в частности моноклональные препараты), описанные выше, можно включать в фармацевтические композиции для применения в лечении заболеваний и расстройств человека, таких как описанные выше. В типичных случаях такие композиции дополнительно содержат фармацевтически приемлемый (то есть, инертный) носитель, как это известно и требуется согласно принятой фармацевтической практике, см. например Remingtons Pharmaceutical Sciences, 16th ed, (1980), Mack Publishing Co. Примеры таких носителей включают стерилизованный носитель, такой как физиологический раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы, забуференный подходящими буферами до pH в диапазоне от 5 до 8. Фармацевтические композиции для инъекции (например внутривенной, внутрибрюшинной, внутрикожной, подкожной, внутримышечной

или в воротную вену) или непрерывной инфузии являются соответственно свободными от видимых частиц и могут содержать от 0,1 нг до 100 мг антитела, в типичных случаях от 5 мг до 25 мг антитела. Способы изготовления таких фармацевтических композиций хорошо известны специалистам в данной области. В одном из воплощений фармацевтические композиции содержат от 0,1 нг до 100 мг терапевтических антител по этому изобретению в стандартной лекарственной форме, возможно вместе с инструкциями по применению. Фармацевтические композиции по этому изобретению можно лиофилизировать (подвергать сублимационной сушке) для разведения перед введением в соответствии со способами, хорошо известными или очевидными специалистам в данной области. Если воплощения этого изобретения содержат антитела по изобретению, относящиеся к изотипу IgG1, к фармацевтической композиции может быть добавлен хелатор меди, такой как цитрат (например цитрат натрия), или этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), или гистидин, для снижения степени опосредованного медью разложения антител этого изотипа, см. EP 0612251.

Эффективные дозы и режимы лечения для введения антитела по этому изобретению обычно определяют эмпирически, и они зависят от таких факторов, как возраст, масса и состояние здоровья пациента, а также от заболевания или расстройства, подлежащего лечению. Такие факторы находятся в пределах компетенции лечащего врача. Руководство по выбору надлежащих доз можно найти, например, в Smith *et al* (1977) *Antibodies in human diagnosis and therapy*, Raven Press, New York, но в общем они должны составлять от 1 мг до 1000 мг. В одном из воплощений режим введения для лечения пациента человека, страдающего РА, представляет собой 100 мг или около 100 мг (то есть, от 50 мг до 200 мг) антитела по этому изобретению (или его антигенсвязывающего фрагмента), вводимого подкожно каждую неделю или каждые две недели. Композиции по настоящему изобретению можно также использовать в профилактике.

В зависимости от заболевания или расстройства, подлежащего лечению, фармацевтические композиции, содержащие терапевтически эффективное количество антитела по этому изобретению, можно использовать одновременно, отдельно или последовательно с эффективным количеством

другого лекарства, такого как противовоспалительный агент, например нестероидное противовоспалительное средство (НПВС), метотрексат, буцилламин, тиомалат натрия, или одно или более чем одно средство лечения, направленное против ФНО-альфа, такое как Enbrel™ (этанерцепт), Remicade™ (инфликсимаб), Humira™ (адалимумаб) и/или CDP870. Антитела по этому изобретению можно использовать в комбинации с эффективным количеством антитела против рецептора ФНО-альфа, см. Davis MW et al (2000) Ann Rheum Dis 59 (Suppl 1): 41-43. В других воплощениях можно использовать антитела по этому изобретению в комбинации с эффективным количеством агента, направленного против: IL-1/IL-1R (например Kineret™), CTLA4-Ig, IL-6 (см. Choy et al, (2002) Ann.Rheum.Dis 61 (suppl 1): 54), IL-8, IL-15, VEGF, IL-17, IL-18 (см. Taylor et al (2001) Curr.Opin.Immunol,13: 611-616), антител против ICAM и/или против CD4, агентов, направленных против члена семейства MMP, например MMP-1, 2, 3 и/или 13. Антитела по этому изобретению можно также использовать в комбинации с агентом, который уничтожает клетки, про которые известно, что они вовлечены в воспалительный процесс, например, CD20-позитивные В-клетки, при использовании, например, Mabthera™. Другие терапии в комбинации с антителами по этому изобретению включают антиангиогенные средства терапии, такие как антагонисты интегрина $\alpha_v\beta_3$, Kringles 1-5 (см. Sumariwalla P et al (2003), Arthritis Res Ther 5:R32-R39.), растворимый Flt-1 (см. Miotla et al, (2000) Lab.Invest. 80:1195-1205) или агент против циклооксигеназы-2 (COX-2). Соответственно, фармацевтическая композиция, содержащая набор компонентов, представляющих собой антитело по этому изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент вместе с таким другим лекарственным средством, возможно вместе с инструкциями по применению, также предусмотрена настоящим изобретением. В этом изобретении, кроме того, предложена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество моноклонального терапевтического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных здесь, для применения в лечении заболеваний, чувствительных к модуляции взаимодействия между сайтом II OSM и gp130. Также предложена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество моноклонального терапевтического антитела, которое содержит

тяжелую цепь, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 11, и легкую цепь, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 12.

Также предложена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество моноклонального терапевтического антитела, которое содержит тяжелую цепь, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 50, и легкую цепь, имеющую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 51.

4.1 Фармацевтические композиции для модуляции взаимодействия как сайта II, так и сайта III

Один из аспектов настоящего изобретения основан, по меньшей мере отчасти, на том неожиданном обнаружении, что модулирование взаимодействия как сайта II, так и сайта III hOSM с их соответствующими партнерами взаимодействия (то есть, для сайта II с gp130, для сайта III с OSMR β и/или LIFR, и/или с gp130 для связывания второй молекулы OSM) проявляет синергизм по сравнению с модулированием взаимодействия любого из этих двух сайтов по отдельности.

Следовательно, в настоящем изобретении предложен способ модулирования взаимодействия между hOSM и gp130 и LIFR и/или OSMR β , включающий предоставление антагониста сайта II, способного модулировать (то есть, ингибировать или блокировать) взаимодействие сайта II hOSM с gp130, и предоставление антагониста сайта III, способного модулировать (то есть, ингибировать или блокировать) взаимодействие сайта III hOSM с OSMR и/или LIFR и с gp130 (для связывания второй молекулы OSM), которое проявляет синергизм по сравнению с модулированием взаимодействия любого из этих двух сайтов по отдельности.

Следовательно, в настоящем изобретении предложен способ модулирования взаимодействия между hOSM и gp130 и LIFR и/или OSMR β , включающий предоставление антагониста сайта II, способного модулировать (то есть, ингибировать или блокировать) взаимодействие сайта II hOSM с gp130, и предоставление антагониста сайта III, способного модулировать (то есть, ингибировать или блокировать) взаимодействие между сайтом III hOSM и OSMR и/или LIFR.

В одном из воплощений предложена фармацевтическая композиция, содержащая первое терапевтическое антитело, которое специфически связывает hOSM и модулирует взаимодействие между hOSM и gp130 (антитело против сайта II, примеры которого даны в этом описании), и второе терапевтическое антитело, которое специфически связывает hOSM и модулирует взаимодействие между hOSM и OSMR и/или LIFR (антитело против сайта III, пример которого представляет собой антитело, имеющееся в продаже как MAB295, R&D Systems). Второе терапевтическое антитело можно распознавать по его способности модулировать (то есть, ингибировать или блокировать) взаимодействие между hOSM и OSMR β и/или LIFR в анализе на основе ELISA или как указано в примерах, то есть, по его способности нейтрализовать OSM в KB-анализе по примерам и не ингибировать связывание OSM с gp130 в ELISA-анализе по примерам.

Антитело к сайту II можно распознавать по его способности ингибировать связывание OSM в ELISA-анализе по примерам. В типичных случаях как первое, так и второе терапевтическое антитело являются моноклональными. Конечно, специалистам в данной области должно быть очевидно, что нет необходимости в том, чтобы фармацевтическая композиция содержала два антагонистических начала (например два терапевтических антитела), поскольку возможно предоставление, например, биспецифичного антитела, которое специфически связывает hOSM и модулирует как взаимодействие сайта II, так и сайта III с их соответствующими партнерами взаимодействия.

В еще одном воплощении предложен набор компонентов, содержащий первую фармацевтическую композицию, содержащую терапевтическое антитело, которое специфически связывает hOSM и модулирует взаимодействие между сайтом II hOSM и gp130, и вторую фармацевтическую композицию, содержащую терапевтическое антитело, которое специфически связывает hOSM и модулирует взаимодействие между сайтом III hOSM и OSMR β и/или LIFR, возможно вместе с инструкциями по применению.

В еще одном воплощении также предложен способ лечения пациента человека, страдающего заболеванием или расстройством, чувствительным к модуляции взаимодействия между hOSM и его партнерами взаимодействия (например gp130 и OSMR β и/или LIFR), таким как воспалительное заболевание

или расстройство (например артритные заболевания, такие как ревматоидный артрит или остеоартрит), включающий введение одновременно, последовательно или раздельно терапевтически эффективного количества первого терапевтического антагониста (например антитела), который специфически связывает hOSM и модулирует взаимодействие между сайтом II hOSM и gp130, и терапевтически эффективное количество второго антагониста (например антитела), который специфически связывает hOSM и модулирует взаимодействие между сайтом III hOSM и OSMR β и/или LIFR.

Конечно, специалистам в данной области должно быть очевидным то, что по меньшей мере первый антагонист (такой как антитело), который связывает gp130 и модулирует (например блокирует) взаимодействие между (а) gp130 и hOSM, а также (б) OSMR β и/или LIFR и hOSM может достичь ту же самую цель, какая указана выше.

5. Клинические применения

Антитела по этому изобретению могут быть использованы для лечения ряда заболеваний или расстройств, чувствительных к лечению, которое модулирует взаимодействие между сайтом II hOSM и gp130. Особо следует отметить заболевания или расстройства, в которые вовлечена продукция патологических уровней ФНО-альфа (то есть, заболевания или расстройства, опосредованного ФНО-альфа), и те заболевания или расстройства, которые характеризуются распадом или разрушением хряща, в частности суставного хряща. Как подробно описано выше, антитела по этому изобретению можно использовать в лечении воспалительных артропатий, таких как РА, либо в качестве монотерапии, либо в комбинации с другим лечением такой артропатии. Антитела по этому изобретению можно использовать для лечения клинически развившейся формы данного заболевания, или для предотвращения его начала у подверженных пациентов, или для замедления или остановки прогрессирования заболевания к клинически значимому. Для лечения РА антитела по этому изобретению можно использовать для предотвращения рецидива после того, как наступила ремиссия заболевания. Если пациент страдает интермиттирующей формой заболевания, антитела по этому изобретению можно использовать для удлинения интервалов времени между острыми фазами заболевания. Антитела по этому изобретению можно

также использовать для лечения внесуставных проявлений РА, например синдрома Фелти, и/или для лечения образования атеросклеротических бляшек. Для лечения РА можно использовать описанные выше комбинации антител по этому изобретению вместе с лекарственными средствами. Другие артритные заболевания, при которых может быть получена польза от введения антитела по этому изобретению, включают ювенильный артрит, псориатический артрит и анкилозирующий спондилоартрит.

Остеоартрит (ОА) является хроническим дегенеративным заболеванием неизвестного происхождения, характеризующимся постепенной потерей суставного хряща и функции сустава. В настоящее время его классифицируют на две группы. Первичный ОА может быть локальным или генерализованным, причем последний более чем обычно обнаруживается у постклимактерических женщин, с развитием узелков Гебердена. Вторичный ОА имеет такие основополагающие причины, как травма, ожирение, болезнь Педжета или воспалительный артрит. Потеря суставного хряща часто сопровождается гипертрофическими изменениями кости с образованием остеофита, подхрящевым утолщением кости и воспалением синовиальной оболочки. Особое беспокойство вызывает недееспособность суставов, несущих весовую нагрузку, таких как коленные, кистевые и бедренные. ОА является чрезвычайно инвалидизирующим заболеванием, при котором в его самых тяжелых формах требуется замена сустава для восстановления подвижности и прекращения боли в суставе. Остеоартрит бедра подразделяют на гипертрофические и атрофические формы (см. Solomon L (1976) J Bone Joint Surg 58,176) на основании склонности пациента к развитию крупных остеофитов; другие суставы могут реагировать на наличие заболевания аналогичным образом. Гипертрофический ОА может быть ассоциирован с отложением кристаллов пирофосфата и диффузным идиопатическим скелетным гиперостозом. Существующие в настоящее время средства лечения включают применение неопиоидных анальгетиков, таких как ацетаминофен и трамадол, НПВС, таких как специфический ингибитор СОХ-2, например целекоксиб, рофекоксиб, опиоидных анальгетиков и глюкозамин- и хондроитинсульфата. Таким образом, в одном из воплощений этого изобретения предложен способ лечения остеоартрита (например, первичного или вторичного) у пациента человека,

страдающего таким заболеванием, включающий введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества описанного здесь терапевтического антитела или его фрагмента по этому изобретению. Это изобретение также относится к комбинации терапевтического антитела по этому изобретению вместе с другим лечением, в частности с одним или более чем одним из лечений ОА, описанным выше.

Псориаз является хроническим кожным заболеванием со значительной распространенностью, которое поражает приблизительно 2% популяции представителей белой европеоидной расы. В то время как для многих он может быть относительно легким заболеванием, он может оказывать на пораженных им сильнейшее действие. Показано, что недееспособность пациентов с псориазом, лечащихся в клинике, такая же, как у пациентов со стенокардией, и близка к таковой у пациентов с сердечной недостаточностью (Finlay *et al*, (1990); Br.J.Dermatol, 123, 751). Самой распространенной формой псориаза является хроническое бляшечное заболевание. Оно проявляется в виде четко определенных красных чешуйчатых бляшек, в типичных случаях распределенных по коже головы, нижней части спины и разгибательной поверхности конечностей. Клинические варианты включают каплевидный псориаз, себопсориаз и пустулезные формы заболевания. У меньшинства пациентов также развивается серонегативный воспалительный артрит. В микроскопическом отношении, пораженная кожа проявляет повышенную пролиферацию и аномальную дифференцировку кератиноцитов, инфильтрацию активированными Т-хелперными лимфоцитами и нейтрофилами и активацию кожной сосудистой сети. Эти изменения соответствуют сверхэкспрессии факторов роста и их рецепторов, провоспалительных цитокинов и ангиогенных пептидов. Однако, несмотря на интенсивные исследования, этиология и патогенез этого заболевания остаются неясными, хотя в модельных системах на животных было продемонстрировано, что центральную роль играют активированные Т-клетки в (см. Nickoloff *et al* (1999) Arch.Dermatol, 135, 546-552). Существующие в настоящее время средства лечения включают в себя местные средства лечения, такие как аналоги витамина D, кортикостероиды, дитранол и ретиноиды, такие как гель Тазаротен. Фототерапия включает применение ультрафиолета В или псоралена и

ультрафиолета А и воздействие эксимерным лазером. Системные ретиноидные средства лечения включают этретинат и ацитретин, изотретиноин, лиарозол. Другие средства лечения включают метотрексат, гидроксимочевину, циклоспорин и антагонисты кальцинейрина, 6-тиогуанин, азатиоприн, сульфасалазин и эфиры фумаровой кислоты. Недавно были предложены или продемонстрированы как полезные в лечении этого заболевания биологические средства лечения, такие как Ontak™ (Денилейкин, Дифтитокс), Zenarax™ (Даклизумаб), Базиликсимаб, антитела против CD4, Эфализумаб, Alefacept™, Сиплизумаб, IDEC-114 и BMS 188667 (CTLA4lg). Более того, в комбинации с антителами по этому изобретению для лечения псориаза (включая его клинические варианты) можно использовать средства лечения против ФНО-альфа, такие как Enbrel™ (этанерцепт), Remicade™ (инфликсимаб), Humira™ (адалимумаб) и/или CDP870.

Свидетельство роли OSM в псориатических патологических изменениях найдено в работе Boifati *et al* (1998) Arch.Dermatol. Res 290:9, 13. Онкостатин М спонтанно секретируется кратковременными органами культурами патологически измененной псориатической кожи (см. Bonifati C *et al*, там же). Более того, конститутивная активация STAT3, главных сигнальных молекул пути передачи сигнала от рецептора OSM, в кератиноцитах мыши приводит к спонтанному развитию псориатических патологических изменений (см. Sano S *et al* (2005) Nature Medicine 11:43-49).

Поэтому антитела по настоящему изобретению можно использовать в лечении псориаза (представляющего собой хронические бляшки, каплевидного, себопсориаза, пустулезного, псориаза, ассоциированного с серонегативным воспалительным артритом), атопического дерматита/экземы, акне, ихтиоза, пузырчатки, вирусных бородавок либо в качестве монотерапии, либо в комбинации со средствами лечения, описанными выше.

Системная красная волчанка (СКВ) является системным аутоиммунным заболеванием, характеризующимся продукцией аутоантител, образованием иммунных комплексов и иммунологически опосредованным повреждением тканей (см. обзор в Rheumatology (2003). Eds Hochberg, Silman, Smolen, Weinblatt and Weisman. Pub. Mosby, 1291-1430). Патологические проявления включают фиброидный некроз, гематоксилиновые тельца, повреждение

сосудов и нарушение дермально-эпидермального соединения кожи, воспалительный артрит и гломерулонефрит. СКВ может иметь место в любом возрасте, включая новорожденных. Она является одним из наиболее распространенных расстройств, поражающих женщин детородного возраста, значительно более распространена у женщин, чем у мужчин, и поражает людей африканского происхождения значительно более часто, чем белой европеоидной расы. Заболеваемость ею в США оценивается величиной от 1,8 до 7,6 случаев на 100000 человек в год. СКВ ассоциирована с повышенной смертностью, главным образом от инфекций и осложнений на почки и ЦНС. Лечение волчанки и ее осложнений определяют индивидуальными потребностями пациента. Нестероидные противовоспалительные лекарственные средства представляют собой важную первоочередную терапию для скелетно-мышечных симптомов, системных признаков и легкого серозита. Противомаларийные средства (например гидроксихлорохин, хлорохин и хинакрин) используют для лечения от скелетно-мышечных симптомов и системных признаков, которые являются устойчивыми к нестероидным средствам и низким дозам стероидных средств. Большинство клинических проявлений СКВ чувствительно к лечению стероидами, но побочные эффекты этих лекарственных средств могут ограничивать как дозу, так и длительность лечения. Иммуносупрессорные лекарственные средства, в особенности азатиоприн, можно использовать при более тяжелом заболевании. Недавно многообещающие результаты при СКВ показало лечение снижающим уровень В-клеток антителом Ритуксан (см. обзор в Looney RJ et al (2005) Curr Dir Autoimmune 8:193-205). Онкостатин М в повышенных уровнях был обнаружен в сыворотке пациентов с СКВ, и было показано, что эти уровни коррелируют с активностью заболевания (см. Robak E et al (1997) Eur Cytokin Netw 8: 281-286). Таким образом, это изобретение относится к применению антител по этому изобретению в лечении СКВ (либо в виде монотерапии, либо в комбинации с одним или более чем одним существующим в настоящее время средством лечения СКВ, подробно описанным выше).

Системный склероз (СС), который включает варианты склеродермии и феномена Рейно, представляет собой генерализованное расстройство кожи и внутренних органов. Он характеризуется накоплением внеклеточного матрикса

5 в коже и внутренних органах. Онкостатин М может стимулировать избыточное накопление внеклеточного матрикса (см. Bamber B et al (1997) J Mol Med Abstract Vol 76: 61-69). Онкостатин М спонтанно продуцируется
10 культивируемыми мононуклеарными клетками пациентов с системным склерозом (см. Hasegawa M et al (1999) Rheumatology (Oxford) 38: 612-617), и он обнаружен в бронхоальвеолярной смывной жидкости из легочного фиброза при
15 склеродермии (см. обзор в Atama SP и White B (2003) Cytokine Growth Factor Rev 14: 537-550). Таким образом, это изобретение относится к применению антитела по изобретению в лечении СС и его вариантов либо в виде монотерапии, либо в комбинации с другим лекарственным средством.

OSM был обнаружен в бронхоальвеолярной смывной жидкости
20 пациентов при остром повреждении легкого, в частности в случаях пневмонии (Tamura S et al (2002) Develop Dyman 225:327-331). Клеточным источником OSM у этих пациентов оказались нейтрофилы, и концентрация OSM в
25 бронхоальвеолярной смывной жидкости (БСЖ) коррелирует с числом полиморфоядерных нейтрофилов (ПМН). Поскольку нейтрофилы являются источником OSM и при активации секретируют OSM, вероятно, что OSM будет присутствовать в легких любого пациента, где нейтрофилы являются
30 существенным компонентом воспаления дыхательных путей, включая ХОЗЛ и тяжелую астму. В дополнение, OSM также экспрессируют (мышинные) тканевые эозинофилы, и они могут быть существенным источником OSM при воспалении см. Tamura, там же).

35 Сверхэкспрессия OSM в дыхательных путях мыши при использовании аденовирусного вектора индуцировала сильнейшее эозинофильное воспаление и отложение матрикса (см. Langdon C et al (2003) J.Immunol. 170:548-555), а также экспрессию тканевого ингибитора металлопротеиназ-1 (TIMP-1) (см. Kerr
40 C et al (1999) J. Interfer.Cytokin Res., 19:1195-1205). Подвергание фибробластов легкого мыши воздействию OSM стимулировало высвобождение эотаксина, сильнодействующего хемоаттрактанта для эозинофилов. Более того, OSM
45 стимулирует пролиферацию, индуцирует продукцию коллагена и предотвращает апоптоз фибробластов легкого у человека (см. Scaffidi, A.K. et al (2002) Brit.J.Pharmacol 136:793-801). Хотя механизмы в основе этих наблюдений неизвестны, отложение матрикса может отчасти быть результатом сильного
50

специфичного повышения синтеза ингибитора протеиназы α_1 (см. Cichy, J. *et al* (1998) *Biochem.J* 329:335-339). Также было обнаружено, что OSM способствует зависимой от фибробластов пролиферации тучных клеток и заметному увеличению содержания гистамина (см. Gyotoku E *et al* (2001) *Arch.Dermatol.Res* 293:508-514). Непосредственное вливание OSM в изолированные легкие крысы индуцировало быструю и постоянную секрецию IL-6 (см. Li, H.L. (2002) *J.Drug Targ* 10:55-62). Таким образом, настоящее изобретение относится к применению антител по этому изобретению (либо в виде монотерапии, либо в комбинации с другим лекарственным средством) в лечении воспалительных заболеваний легких, таких как астма и ХОЗЛ (хроническое обструктивное заболевание легких).

OSM был обнаружен в головном мозге пациентов рассеянным склерозом (РС), где он локализуется в микроглие, астроцитах и инфильтрирующих лейкоцитах (см. Ruprecht K *et al* *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 60(11): 1087-98, 2001 Nov). OSM индуцирует секрецию IL-6 и MCP-1 из церебральных эндотелиальных клеток, и добавление ФНО α вместе с OSM вызывает синергический ответ. OSM также индуцирует экспрессию внутриклеточной молекулы адгезии-1 (ICAM1) на эндотелиальных клетках церебральных микрососудов, что может усиливать инфильтрацию лейкоцитов в ткань головного мозга (Ruprecht K *et al*, *там же*). В дополнение к усилению воспаления в мозге, OSM может непосредственно вносить вклад в потерю нейронов. Супернатанты моноцитов больных ВИЧ-инфекцией вызывают сильнейшее ингибирование роста нейробластов, а также гибель нейрональных клеток, и было показано, что медиатором этих эффектов является онкостатин М. Поскольку многие больные ВИЧ-инфекцией страдают атрофией мозга, вызванной потерей нейрональных клеток, OSM может быть одним из медиаторов этой патологии. Ясно, что OSM может также играть роль в других заболеваниях ЦНС, при которых происходит потеря нейронов. Интересно, что при болезни Альцгеймера (БА) одним из белков, ассоциированных с амилоидом, является антихимотрипсин (АХТ), и его экспрессия чрезвычайно увеличена в пораженных заболеванием областях, что вероятно способствует отложению аномальных белков в амилоидных бляшках и нейрофибриллярных сплетениях. OSM, про который известно, что он секретируется как

инфильтрирующими активированными Т-клетками и моноцитами, так и микроглиоцитами, является сильнодействующим индуктором АХТ и может тем самым вносить вклад в патологию БА (см. Kordula T *et al* (1998) J Biol.Chem. 273:4112-4118 и Kordula T Journal of Neuroscience. 20(20): 7510-6, 2000).

Из работы Tamura *et al* следует, что OSM может быть вовлечен в развитие и поддержание невропатической боли (см. Tamura S. *et al* (2003) Eur.J.Neurosci. 17:2287-2298). Их исследования выявили подсовокупность ноцицептивных сенсорных нейронов, которые экспрессируют рецептор OSM β . Все положительные по OSM β R нейроны также экспрессируют VR1- и P2X3-рецепторы, которые, как было показано, являются критическими для развития как невропатической, так и воспалительной боли (см. Jarvis M.F. *et al* (2002) PNAS 99:179-184 и Walker K.M *et al* (2003) J. Pharmacol. Exp. Ther 304, 56-62). Более того, мыши OSM-/- имели сниженные болевые реакции на химическую, температурную, висцеральную и механическую боль, что коррелирует со снижением числа малых нейронов, положительных по VR1 и P2X3^{ve} (см. Morikawa, Y. *et al* (2004): J Neurosci 24, 1941-1947).

Таким образом, настоящее изобретение также относится к применению (либо в виде монотерапии, либо в комбинации с другим лекарственным средством) антител по этому изобретению в лечении заболеваний центральной нервной системы или расстройств, таких как описанные выше, таких как рассеянный склероз (РС), болезнь Альцгеймера (БА) и другие деменции, и, кроме того, относится к применению в лечении боли, в частности невропатической и/или воспалительной боли.

OSM обнаружен в тканевых макрофагах при атеросклеротических поражениях (см. Modur V. *et al* J.Clin invest. 100, 158-168) и в качестве ангиогенного фактора может способствовать неоваскуляризации, характерной для атеросклеротических бляшек, что считают вносящим вклад в ломкость стенок сосудов. OSM вызывает как ангиогенную реакцию, так и индукцию секреции IL-6 в эндотелиальных клетках, где его эффекты являются аддитивными или синергическими с IL-1 и ФНО α , соответственно, и экспрессию COX-2 (см. Brown J.T *et al* (1991) J.Immunol,147: 2175-2180). Индукция COX-2 в эндотелиальных клетках необходима для ангиогенных свойств OSM (см. Brown J.T *et al*, там же). Однако, OSM также индуцирует экспрессию других

ангиогенных факторов в эндотелиальных клетках: фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) (Vasse, M *et al* (1999) *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19:1835-1842) и основного фактора роста фибробластов (bFGF) (Wijeloh E.S. *et al* (1997) *J.Cell Sci* 110:871-879) Интересно, что человеческие эндотелиальные клетки имеют примерно в 10-20 раз бóльшую плотность рецепторов OSM, чем другие клетки (см. Modur V. *et al*, там же).

В дополнение к эффектам в эндотелии, OSM также индуцирует экспрессию IL-6 и COX-2 в сосудах гладкомышечных клетках (VSMC), а также вызывает резкие изменения в клеточной морфологии (Bernard C. *et al* (1999) *Circ.Res.* 85:1124-1131). При развитых атеросклеротических поражениях, где преобладающими воспалительными клетками являются макрофаги, обычно находят отложения кальция. Макрофаги являются главным источником OSM, и интересно, что этот цитокин может индуцировать щелочную фосфатазу костного типа и отложение кальция в культурах VSMC (Shioi A. *et al* (2002) *Circ.Res.* 91:9-16). OSM также индуцирует и подавляет, соответственно, секрецию тканевого фактора (TF) и ингибитора TF-пути (TFPI) из VSMC, что приводит к сильной прокоагулянтной активности в супернатантах культур VSMC (Mirshahi F. *et al* (2002) *Blood Coag.Fibrinol.* 13:449-455). Более того, OSM влияет на секрецию фактора фон Виллебранда, активатора плазминогена тканевого типа и ингибитора-1 активатора плазминогена (PAI-1) из эндотелиальных клеток так, что из этого следует, что "OSM может играть ключевую роль в развитии атеросклеротических поражений" (Portau J *et al* (1998) *Blood Coag.Fibrinol.* 9,609-615).

Важным сосудистым фактором риска являются уровни фибриногена в плазме, и OSM является сильнодействующим индуктором секреции фибриногена в исследованиях на линии клеток гепатомы (Vasse M *et al* (1996) *Haemostasis* 26, Suppl 4, 331-339). Однако в высоких концентрациях (50 нг/мл) OSM также повышал экспрессию человеческого рецептора липопротеинов низкой плотности (LDL) (Liu *et al* (2003) *Arterio.Thromb.Vasc.Biol.* 23:90-96). Наконец, OSM способствует этерификации холестерина в моноцитах-макрофагах J774 и поэтому может вносить вклад в этот процесс во время развития пенистых клеток (Foam cell) при атеросклеротических поражениях (Maziere C *et al* (1996) *Biochem. Biophys Acta* 1300, 30-34).

Таким образом, настоящее изобретение относится к применению антител по этому изобретению в лечении заболеваний или расстройств сердечно-сосудистой системы. Также предусмотрено применение антител по этому изобретению в лечении атеросклероза и заболеваний, имеющих эндотелиально-клеточную природу. Дополнительно предусмотрено применение антител по этому изобретению в лечении пациентов, страдающих ВИЧ-инфекцией, особенно для лечения состояний, являющихся результатом инфекции этим вирусом, таких как саркома Капоши.

Антитела по этому изобретению можно также использовать при заболеваниях регуляции клеточного цикла, например рака (такого как рак простаты), миеломы.

Хотя настоящее изобретение было описано главным образом в отношении лечения заболеваний или расстройств человека, настоящее изобретение может также иметь применение в лечении таких же заболеваний или расстройств у млекопитающих кроме людей.

Таблица А

Белок или полинуклеотид (PN)	Антитело 15E10	Антитело 10D3
CDRH1	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 40
CDRH2	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 41
CDRH3	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 42
CDRL1	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 43
CDRL2	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 44
CDRL3	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 45
V _H -домен (мышиный)	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 46
V _L -домен (мышиный)	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 47
V _H -домен (гуманизированный, B3)	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 48
V _L -домен (гуманизированный, L2)	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 49
Тяжелая цепь (гуманизированная)	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 50
Легкая цепь (гуманизированная)	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 51
V _H -домен (мышиный, PN)	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 52
V _L -домен (мышиный, PN)	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 53
V _H -домен (гуманизированный, PN, B3)	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 54

V _L -домен (гуманизированный, PN, L2)	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 55
Тяжелая цепь (гуманизированная, PN)	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 56
Легкая цепь (гуманизированная, PN)	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 57
V _H -домен (B4, гуманизированный)	SEQ ID NO: 21	NA
Тяжелая цепь (гуманизированная, Fc мутирован)	SEQ ID NO: 61	NA
Тяжелая цепь (гуманизированная, Fc мутирован, PN)	SEQ ID NO: 62	NA

Далее настоящее изобретение будет представлено только примерами. Прилагаемая формула изобретения может включать в себя обобщение одного или более чем одного из следующих примеров.

Примеры

Примеры 1-6 относятся к получению и конструированию антитела 15E10. Пример 7 относится к получению и конструированию антитела 10D3.

1. Генерирование моноклональных антител

Моноклональные антитела продуцируются клетками гибридомы, обычно в соответствии со способом, изложенным в E Harlow and D Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Результат слияния клеток мышинной миеломы с В-лимфоцитами из мышей, иммунизированных целевым антигеном. Клетки гибридомы иммортализуют партнером слияния, представляющим собой миелому, в то время как способность продуцировать антитела обеспечивается В-лимфоцитом.

Четырех мышей SJL иммунизировали внутрибрюшинной инъекцией гликозилированного человеческого OSM (hOSM), продуцированного в клетках CHO, суспендированных в адъюванте RIBI (Sigma). Мышей повторно иммунизировали через 2 недели введением только hOSM, затем еще через 2 недели введением hOSM, нейтрализованного моноклональным антителом против сайта III (OM4/11.17; OSM: Mab 1:1,5 масс/масс), для того чтобы направить иммунный ответ на сайт II, затем еще через 2,5 недели снова введением комплекса OSM-MAb и, наконец, через 5 недель введением только OSM. Через три месяца после первоначальной иммунизации удаляли селезенки и проводили слияние В-лимфоцитов с клетками мышинной миеломы,

5 происходящей из клеток Р3Х, при использовании PEG1500 (Boehringer) для генерирования гибридом. Индивидуальные гибридомные клеточные линии клонировали методом серийных разведений (E Harlow and D Lane). Лунки, содержащие отдельные колонии, идентифицировали микроскопией и супернатанты тестировали на активность. Клетки из наиболее активных клонов размножали для криоконсервации, продуцирования антител и так далее. 10 Исходная селекция по антителу против OSM была основана на специфичности и эффективности в нейтрализации человеческого гликозилированного OSM, оцениваемой по ингибированию gp130 в ELISA и в анализе на клетках KB (см. ниже), причем последний позволил оценить специфичность в отношении OSM. 15 После идентификации антител с достаточной эффективностью и соответствующей специфичностью применяли дополнительные критерии селекции:

- 20 1) перекрестная реактивность с OSM обезьян *Cynomolgus*;
- 2) сохранение активности против человеческого OSM в присутствии объединенной в пул человеческой сыворотки группы АВ;
- 25 3) сохранение активности против библиотеки OSM человеческих нейтрофилов и против OSM, происходящего из клеток синовиальной жидкости при РА.

30 Проводили скрининг 1920 гибридом на ингибирование gp130 в ELISA. Из них 43 давали более чем 50%-ное ингибирование, и 15 подвергали экспериментам, лимитированным по дозе и ответу, из которых 6 были выбраны для дополнительного исследования. Проводили субклонирование и выбирали 35 главные клоны. Два антитела, клон 15E10 и клон 10D3 (см. пример 7), были выбраны на основании эффективности. Мышиное антитело 15E10 было постоянно более эффективным в ингибировании gp130 в ELISA, но у него была 40 такая же эффективность, как и у 10D3, в анализе на клетках KB, когда целевым антигеном был человеческий OSM. Однако мышиное антитело 15E10 было гораздо более эффективным, чем 10D3, против OSM обезьян *Cynomolgus* в 45 обоих анализах.

2. КЛОНИРОВАНИЕ ВАРИАБЕЛЬНЫХ ОБЛАСТЕЙ КЛОНА 15E10

Суммарную РНК экстрагировали из клеток гибридомы клона 15E10 и кДНК тяжелых и легких вариабельных доменов продуцировали путем обратной 50

транскрипции с использованием праймеров, специфичных к мышинной лидерной последовательности и к константным областям антитела в соответствии с predetermined изотипом (IgG2a/κ). Затем клонировали кДНК

2.1 Экстракция РНК

Суммарную РНК экстрагировали из осадка 10^6 клеток гибридомы клона 15E10 с использованием системы SV Total RNA Isolation System от Promega в соответствии с инструкциями изготовителя.

2.2 Обратная транскрипция

РНК подвергали обратной транскрипции с получением кДНК переменных тяжелых и легких доменов с использованием праймеров, специфичных к мышинным лидерным последовательностям и константным областям мышинных IgGγ2a/κ. Используемая смесь праймеров описана в Jones ST and Bendig MM Biotechnology 9:88-89 (1991).

Пулы прямых праймеров для лидерной последовательности мышинных V_H и V_L получали в концентрации 50 мкМ. Растворы обратных праймеров для константных областей мышинных γ2a и κ также получали в концентрации 50 мкМ.

2.3 Обратнотранскриптазная ПЦР (ОТ-ПЦР)

Обратную транскрипцию с РНК, кодирующей переменные тяжелые и легкие участки, осуществляли в двух параллельных опытах с использованием системы Access RT-PCR от Promega в соответствии с инструкциями изготовителя. Прямые и обратные праймеры для V_H и V_L были такими, как описано выше.

3. Клонирование продукта ПЦР по 2.3

3.1 Очистка на геле

Продукты ОТ-ПЦР ($2 \times V_H$ и $2 \times V_L$) в растворе для нанесения на гель наносили на препаративный 1%-ный агарозный гель, содержащий 0,01% бромид этидия, пропускали в буфере TAE при 100 В в течение 1 часа и полосы V-области вырезали. Также пропускали в геле серию стандартов ДНК до 100 п.о., чтобы сделать возможной идентификацию полос V_H и V_L .

Фрагменты ДНК экстрагировали и очищали из геля, используя набор QIAquick™ Extraction Kit от Qiagen в соответствии с инструкциями изготовителя.

3.2 Лигирование

Очищенные ОТ-ПЦР фрагменты ($2 \times V_H$ и $2 \times V_L$) клонировали в векторе pCR2.1, используя набор для клонирования TA от Invitrogen в соответствии с инструкциями изготовителя.

3.3 Трансформация

Лигированными плазмидами трансформировали клетки TOP10F' в соответствии с инструкциями к набору для клонирования TA. 50 мкл и 200 мкл трансформированных клеток распределяли на L-агаровых планшетах, содержащих 100 мкг/мл ампициллина, и наслаивали 8 мкл раствора 500 мМ IPTG и 16 мкл раствора 50 мг/мл X-Gal в ДМФ. Планшеты инкубировали в течение ночи при 37°C.

3.4 Секвенирование

5 белых колоний культивировали в течение ночи при 37°C в 5 мл среды LB с добавлением 100 мкг/мл ампициллина.

Плазмиды pCR2.1, содержащие V_H - и V_L -домены 15E10, экстрагировали и очищали, используя набор Qiagen QIAprep Spin Miniprep в соответствии с инструкциями изготовителя.

V_H - и V_L -домены секвенировали с использованием прямых праймеров T7, M13 и обратного праймера M13.

Последовательность аминокислот V_H -домена 15E10 (консенсус 10 клонов из 2 реакций ОТ-ПЦР): SEQ ID NO: 7.

Последовательность аминокислот V_L -домена 15E10 (консенсус 10 клонов из 2 реакций ОТ-ПЦР): SEQ ID NO: 8.

4. Химерное антитело

Химерное антитело, состоящее из родительских мышиных V-областей по 3.4, перенесенных на C-области человеческого IgG1/κ дикого типа, было сконструировано для подтверждения клонирования соответствующих мышиных V-областей, а также для использования в качестве эталона при тестировании гуманизированных конструкторов. Это химерное антитело экспрессировали в клетках CHO, очищали и тестировали на аффинность к сайту II OSM в ингибировании gp130 в ELISA и в анализе на клетках KB (см. ниже). Клонированные мышиные V-области амплифицировали путем ПЦР для введения рестрикционных сайтов, требуемых для клонирования в

экспрессионных векторах Rld и Rln для млекопитающих. Сайты Hind III и Spe I были разработаны для встраивания в рамку V_H-домена и создания возможности клонирования в модифицированный вектор Rld, содержащий человеческую C-область $\gamma 1$ дикого типа. Сайты Hind III и BsiW I были разработаны для встраивания в рамку V_L-домена и создания возможности клонирования в модифицированный вектор Rln, содержащий C-область человеческой κ .

4.1 ПЦР-амплификация

Прямой праймер для V_H:

5'-GAT GAA GCT TGC CAC CAT GGC TGT CCT AGG GCT ACT C-3'

(SEQ ID NO: 22)

Рестрикционный сайт Hind III подчеркнут, и последовательность Козака выделена жирным шрифтом.

Обратный праймер для V_H:

5'-GAT GGA CTA GTG TCC CTG TGC CCC AGA C-3' (SEQ ID NO: 23)

Рестрикционный сайт Spe I подчеркнут.

Прямой праймер для V_L:

5'-GAT GAA GCT TGC CAC CAT GGA TTT TCA GGT GCA GAT T-3'

(SEQ ID NO: 24)

Рестрикционный сайт Hind III подчеркнут, и последовательность Козака выделена жирным шрифтом.

Обратный праймер для V_L:

5'-GAT GCG TAC GTT TGA TTT CCA ACT TTG TCC C-3' (SEQ ID NO:

25)

Рестрикционный сайт BsiW I подчеркнут.

Реакционная среда для ПЦР:	вода	66 мкл
	10× буфер для ПЦР	10 мкл
	dНТФ (2мМ)	10 мкл
	праймер 1 (5 мкМ)	4 мкл
	праймер 2 (5 мкМ)	4 мкл
	полимераза AmpliTaq	2 мкл
	очищенная плазмида	4 мкл
	суммарный объем	100 мкл

Праймер 1: прямой праймер для V_H или V_L

Праймер 2: обратный праймер для V_H или V_L

Очищенная плазмида: плазмида pCR2.1 с V_H или V_L , очищенная с использованием Qiagen Minipreps (разбавление 200×)

Цикл ПЦР: 1- 95°C в течение 4 мин

2- 9°C в течение 1 мин

3- 55°C в течение 1 мин

4- 72°C в течение 1 мин

5- 72°C в течение 7 мин

Стадии от 2 до 4: повторяли 30 раз.

4.2 Клонирование в экспрессионные векторы для млекопитающего

Продукты ПЦР очищали, используя набор MinElute PCR Purification от Qiagen в соответствии с инструкциями изготовителя.

4.2.1 Рестрикционные фрагменты

Продукт ПЦР с V_H и экспрессионный вектор Rld hC γ 1wt для млекопитающего расщепляли по Hind III-Spe I:

буфер 10× (NEBuffer 2)	5 мкл
BSA 100× (NEB)	0,5 мкл
ДНК	5 мкл
Hind III (Promega)	2 мкл
Spe I (NEB)	2 мкл
вода	35,5 мкл
суммарный объем	50 мкл

ДНК: очищенный продукт ПЦР с V_H или вектор Rld hC γ 1wt (при 0,25 мг/мл).

Инкубировали 2 часа при 37°C.

Продукт ПЦР с V_L и экспрессионный вектор Rln hC κ для млекопитающего расщепляли по Hind III-BsiW I:

буфер 10× (NEBuffer 2)	5 мкл
ДНК	5 мкл
Hind III (Promega)	2 мкл
вода	38 мкл

суммарный объем 50 мкл

ДНК: очищенный продукт ПЦР с V_L или вектор Rln hCк (при 0,25 мг/мл).
Инкубировали 2 ч при 37°C.

Добавляли 2 мкл BsiW I (NEB) и инкубировали 2 ч при 55°C.

4.2.2 Очистка на геле

Продукты рестрикционного расщепления в растворе для нанесения на
гель наносили на препаративный 1%-ный агарозный гель, содержащий 0,01%
бромид этидия, пропускали в буфере TAE при 100 В в течение 1 часа и полосы
векторов Rld и Rln, а также ПЦР-фрагментов V_H и V_L вырезали. Набор
стандартов ДНК до 100 п.о. также пропускали на геле, чтобы сделать
возможной идентификацию полос V_H , V_L и векторов. ДНК экстрагировали и
очищали из геля, используя набор QIAquick Gel Extraction от Qiagen в
соответствии с инструкциями изготовителя.

4.2.3 Лигирование

Отщепленный по Hind III-Spe I V_H -ПЦР-фрагмент лигировали в
расщепленный по Hind III-Spe I вектор Rld hCγ1wt.

Отщепленный по Hind III-BsiW I V_L -ПЦР-фрагмент лигировали в
расщепленный по Hind III - BsiW I вектор hCк.

Лигирование осуществляли с использованием системы LigaFast Rapid
DNA Ligation System от Promega в соответствии с инструкциями изготовителя с
получением:

V_H : вектор: Rld hCγwt, расщепленный по Hind III-Spe I

вставка: отщепленный по Hind III-Spe I V_H -ПЦР-фрагмент

V_L : вектор: Rln hCк, расщепленный по Hind III - BsiW I

вставка: отщепленный по Hind III-BsiW I V_L -ПЦР-фрагмент

4.2.4 Трансформация

Лигированными продуктами трансформировали DH5α-компетентные
клетки:

Оттаивали на льду флаконы с 200 мкл DH5α.

В пробирках для трансформации приготавливали аликвоты по 50 мкл.

Добавляли и осторожно перемешивали наконечником пипетки 2 мкл
смеси для лигирования при последующей инкубации в течение 30 мин на льду.

Смесь инкубировали в течение 45 сек при 42°C без встряхивания.

Затем переносили эту смесь на лед на 2 мин.

Добавляли 450 мкл среды SOC и инкубировали пробирки в течение 1 ч при 37°C на встряхивающем инкубаторе.

Распределяли 100 мкл культуры на L-агаровых планшетах с добавлением 100 мкг/мл ампициллина и инкубировали в течение ночи при 37°C.

4.2.5 Секвенирование

Клоны V_H и V_L культивировали в течение ночи при 37°C в 5 мл среды LB с добавлением 100 мкг/мл ампициллина.

Плазмиды Rld и Rln, содержащие V_H- и V_L-домены, соответственно, экстрагировали и очищали с использованием набора QIAprep Spin Miniprep от Qiagen в соответствии с инструкциями изготовителя.

V_H-область секвенировали с использованием прямых праймеров в векторе Rld и сигнальной последовательности и обратного праймера в человеческой C_γ1-области.

V_L-область секвенировали с использованием прямых праймеров в векторе Rln и сигнальной последовательности и обратного праймера в человеческой C_κ-области.

Идентифицировали клоны с соответствующими последовательностями V_H и V_L и получали плазмиды для экспрессии в клетках CHO.

4.3 Экспрессия химерного антитела в клетках CHO

Плазмидами Rld и Rln, содержащими V_H- и V_L-домены 15E10, соответственно, временно котрансфицировали клетки CHO и экспрессировали. Продуцируемое химерное антитело очищали из супернатанта клеточной культуры аффинной хроматографией на сефарозе с рекомбинантным протеином A и его аффинность к OSM оценивали по ингибированию gp130 в ELISA и в анализе на клетках KB (см. ниже).

4.3.1 Очистка плазмид

Клетки DH5α, содержащие плазмиды Rld-15E10V_H и Rln-15E10V_L, культивировали в 5 мл среды LB с добавлением 100 мкг/мл ампициллина в течение 8 ч при 37°C во встряхивающем инкубаторе.

В 200 мл среды LB с добавлением 100 мкг/мл ампициллина инокулировали 1 мл суточной культуры и проводили инкубацию в течение ночи при 37°C во встряхивающем инкубаторе.

Плазмиды экстрагировали и очищали с использованием набора QIAfilter Plasmid Maxi от Qiagen в соответствии с инструкциями изготовителя. Этанольный осадок снова суспендировали в 200 мкл буфера TE и концентрацию плазмиды измеряли по поглощению при 260 нм после 100-кратного разведения маточного раствора.

4.3.2 Трансфекция

Клетки CHO культивировали до конfluence в среде Dulbecco's MEM с Glutamax-1 (DMEM), обогащенной фетальной бычьей сывороткой Ultra Low Fetal Bovine Serum и 1%-ным пенициллином-стрептомицином в 4×175 см² колбах BD Falcon для тканевых культур при 37°C.

Для каждой колбы, в 50-мл пробирку Falcon добавляли и смешивали следующие компоненты:

8 мл Optimem 1 с Glutamax-1,

20 мкг очищенной плазмиды RId-15E10V_H,

20 мкг очищенной плазмиды RIn-15E10V_L,

240 мкл трансфекционного реагента TransFast при вихревом перемешивании.

Смесь инкубировали в течение 10-15 мин при комнатной температуре (КТ).

Из колбы удаляли среду DMEM, затем смесь подвергали вихревому перемешиванию и добавляли в колбу.

Смесь инкубировали при 37°C в течение 1 ч. В колбу добавляли 32 мл Optimem и инкубировали при 37°C в течение 48-72 ч.

4.3.3 Очистка химерного антитела

Среды из всех 175-см² колб объединяли в пул и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 3 мин на MSE Mistral 2000 и супернатант пропускали через 500-мл фильтровальную систему CA с 0,22-мкм порами.

Антитело очищали из осветленного супернатанта на Amersham Biosciences Akta Explorer с использованием программного обеспечения Unicorn.

Используемая колонка представляла собой 1-мл HiTrap rProtein A Sepharose FF.

Скорость потока составляла 1 мл/мин.

Колонку уравнивали с забуференным фосфатами физраствором Дульбекко (10 объемов колонки), затем наносили на нее через насос А осветленный супернатант.

Колонку промывали забуференным фосфатами физраствором Дульбекко (20 объемов колонки), насос А промывали до пустой промывной жидкости и через колонку пропускали дополнительный забуференным фосфатами физраствор Дульбекко (10 объемов колонки) для обеспечения полного вымывания супернатанта.

Антитело элюировали буфером для элюции ImmunoPure от Pierce (10 объемов колонки) и собирали в виде 1-мл фракций, содержащих 100 мкл 1 М нейтрализующего буфера Trizma-HCl, pH 8,0.

Колонку снова уравнивали с забуференным фосфатами физраствором Дульбекко (5 объемов колонки).

Антитело во фракциях элюата количественно определяли считыванием поглощения при 280 нм против контрольного раствора, содержащего 10 объемов буфера для элюции ImmunoPure IgG Elution Buffer + 1 объем 1М Trizma-HCl, pH 8,0, и фракции с достаточными количествами чистого антитела объединяли в пул и хранили в виде 100-мкл аликвот при -20°C.

4.4 Анализ химерного антитела

Очищенные химерные антитела 15E10 и 10D3 (см. ниже) анализировали на ингибирование gp130 в ELISA и в анализе на клетках KB на их эффективность в нейтрализации OSM человека и обезьян *Сynomolgus* (hOSM и cOSM). Протоколы для ингибирования gp130 в ELISA и анализа на клетках KB приведены ниже.

Таблица 1: Величины IC50 (мкг/мл) для мышинных и химерных антител 15E10 и 10D3

	gp130 в ELISA	анализ на клетках KB
15E10, мышинное	0,059	0,195
15E10, химерное	0,036	0,110
10D3, мышинное	0,107	0,114
10D3, химерное	0,057	0,107

Оба химерных антитела 15E10 и 10D3 нейтрализовали hOSM и cOSM в ингибировании gp130 в ELISA (Фиг. 2) и в анализе на клетках KB (Фиг. 3). У химерного 15E10 аффинность к OSM обезьян *Cynomolgus* выше, чем у химерного 10D3, как наблюдали с родительским мышинным антителом. У обоих химерных антител профили кривых и величины IC50 такие же, как у родительских мышинных антител (Таблица 1). Аминокислотная последовательность и последовательность кДНК для OSM обезьян *Cynomolgus* (cOSM) указаны как SEQ ID NO: 63 и 64, соответственно:

SEQ ID NO: 63:

MGVPLTRRTL⁵LSLILALLFP¹⁰SMASMAAMGSCSKBYRMLLGQLQKQTDLMQDTSR
LLDPFYIRIQGLDIPK¹⁵LRHCRESPGAFPS²⁰EETLRGLGRGFLQTLNATLGCVLH
RLADLEQHLPKAQD²⁵LRSGLNIEDLEKLMARPNVLGLRNNVY³⁰CMAQLLNSDM
TEPTKAGRGT³⁵PQPTPTPTSDV⁴⁰FQSKLEGCSFLRGYH⁴⁵RFMH⁵⁰SVGRIFSKWGESP
NRSRHS⁵⁵PHQALRKGVRRTRPS⁶⁰RKGNRLMPRGQLPR

SEQ ID NO: 64:

ATGGGGGTACCGCTCACACGGAGGACGCTGCTCAGTCTGATCCTTGCACTCCTG⁵
TTTCCAAGCATGGCAAGCATGGCGGCTATGGGCAGCTGCTCGAAAGAGTACCGC¹⁰
ATGCTCCTTGCCAGCTCCAGAAGCAGACAGATCTCATGCAGGACACCAGCAGG¹⁵
CTCCTGGACCCCTATATACGTATCCAAGGCCTGGATATTCCTAAACTGAGAGAG²⁰
CACTGCAGAGAGAGCCCTGGGGCCTTCCCCAGCGAGGAGACCCTGAGGGGGCTG²⁵
GGCAGGCGGGGCTTCCTACAGACGCTCAATCCCACTGGGCTGCGTCTCTGCAC³⁰
AGACTGGCCGACTTAGAGCAGCATCTCCCCAAGGCCAGGACTTGGAGAGGTCT³⁵
GGGCTGAACATAGAGGACTTAGAGAAGCTGCAGATGGCGAGGCCGAATGTCCTC⁴⁰
GGGCTCAGGAACAACGTCTACTGCATGGCCCAGCTGCTGGACAACTCAGACATG⁴⁵
ACTCAGCCCAAGAGGCCGGCCGGGGACCCCTCAGCCGCCCAACCCCAACCCCT⁵⁰
ACCTCAGATGTTTTTCAGCGCAAGCTGGAGGGCTGCAGTTTCCTGCGTGGCTAC⁵⁵
CATCGCTTCATGCACTCAGTGGGGCCGATCTTCAGCAAGTGGGGGGAGAGCCCG⁶⁰
AACCGGAGCCGGAGACACAGCCCCCACCAGGCCCTGCGGAAGGGGGTGGCGAGG⁶⁵
ACGAGACCCCTCCAGGAAAGGCAATAGACTCATGCCAGGGGACAGCTGCCCCGG⁷⁰
TAG⁷⁵

Эти результаты подтверждают, что соответствующие переменные области 15E10 были успешно клонированы с получением антигенсвязывающего химерного антитела, способного связывать сайт II как

OSM человека, так и OSM обезьян *Synomolgus*. Вариабельные тяжелые и легкие домены 15E10 могут теперь быть гуманизированы.

5.1.1 Поиск в базе данных мышинных последовательностей

15 мышинных последовательностей, имеющих наивысшую гомологию с аминокислотной последовательностью V_H из 15E10, и 10 мышинных последовательностей, имеющих наивысшую гомологию с аминокислотной последовательностью V_L , идентифицировали поиском в пептидной базе данных.

Аминокислотную последовательность V_H из 15E10 сравнили со всеми 15-ю мышинными последовательностями из поиска в базе данных и следующие каркасные остатки идентифицировали как существенные:

Положение	V_H 15E10	мышь	встречаемость
75	R	K	15/15
105	T	Q	14/15

Положение соответствует системе нумерации Kabat *et al*, см. выше. Аминокислотную последовательность V_L из 15E10 сравнили с 10-ю мышинными последовательностями из поиска в базе данных и следующие каркасные остатки идентифицировали как существенные:

Положение	V_L 15E10	мышь	встречаемость
9	T	A	8/10
38	E	Q	10/10
49	E	Y	10/10
60	A	V	10/10

5.1.2. Поиск в базе данных человеческих последовательностей

Человеческие последовательности каркасных участков, имеющие наивысшую гомологию с рамками V_H и V_L из 15E10, идентифицировали в пептидной базе данных при использовании EasyBlast.

Две совокупности человеческих последовательностей идентифицировали для V_H из 15E10:

Группа А, в которой для гуманизации были выбраны следующие каркасные участки:

QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYS
GSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSPSSGSYYYYY
YGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ.I.D.NO:26)

CDRs подчеркнуты;

и

Группа В, в которой для гуманизации было выбрано следующее:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYD
GSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLGGPLYWYF
DLWGRGTLTVTVSS (SEQ.I.D.NO:27)

CDRs подчеркнуты.

Следующие остатки в каркасных участках идентифицировали как потенциально важные в сохранении аффинности, которые могут требовать обратной мутации:

Положение (№ по Kabat)	V _H 15E10	Группа А	Группа В
27	F	G	F
28	S	S	T
29	L	I	F
30	T	S	S
48	L	I	V
49	G	G	A
67	L	V	F
71	K	V	R
73	N	T	N
78	V	F	L
94	K	R	R

Сконструировали 8 гуманизированных V_H-конструктов с разными обратными мутациями, 4 на основании человеческих каркасных участков группы А (А1, А2, А3 и А4) и 4 на основании человеческих каркасных участков группы В (В1, В2, В3 и В4).

Для V_L из 15E10 идентифицировали одну совокупность человеческих последовательностей, из которых для гуманизации была выбрана следующая:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSKYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR
 ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISNLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKLEI
 (SEQ.I.D.NO:28)

CDRs подчеркнуты.

Следующие остатки идентифицировали как потенциально важные в
 сохранении аффинности, которые могут требовать обратной мутации:

Положение (№ по Kabat)	V _L 15E10	Человеческий V _L
48	E	Y
70	Y	F

Сконструировали два конструкта, один для прямой вставки (L1), другой с
 обратными мутациями по обоим остаткам (L2).

Гуманизированный V_H-конструкт A1:

QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGVHWIRQPPGKGLEWIGVIWRG
 GSTDYNAAFMSRVTISVDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKSPNSNFYWYFD
 VWGQGTTS (SEQ.I.D.NO:29)

Гуманизированный V_H-конструкт A2:

QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGVHWIRQPPGKGLEWIGVIWRG
 GSTDYNAAFMSRVTISKDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKSPNSNFYWYFD
 VWGQGTTS (SEQ.I.D.NO:30)

Гуманизированный V_H-конструкт A3:

QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGVHWIRQPPGKGLEWIGVIWRG
 GSTDYNAAFMSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKSPNSNFYWYFD
 VWGQGTTS (SEQ.I.D.NO:31)

Гуманизированный V_H-конструкт A4:

QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGVHWIRQPPGKGLEWIGVIWRG
 GSTDYNAAFMSRSLTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKSPNSNFYWYFD
 VWGQGTTS (SEQ.I.D.NO:32)

Гуманизированный V_H-конструкт B1:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRG
 GSTDYNAAFMSRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARSPNSNFYWYFD
 VWGRGTLV (SEQ.I.D.NO:33)

Гуманизированный V_H-конструкт B2:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRG
 GSTDYNAAFMSRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWYFD
 VWGRGTLV (SEQ.I.D.NO:34)

Гуманизированный V_H-конструкт B3:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRG
 GSTDYNAAFMSRFTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWFYFD
 VWGRGTLV (SEQ.I.D.NO:35)

Гуманизированный V_H-конструкт B4:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRG
 GSTDYNAAFMSRFTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWFYFD
 VWGRGTLV (SEQ.I.D.NO:36)

Гуманизированный V_L-конструкт L1:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSGSSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYDTSNLA
 SGIPARFSGSGSGTDFTLTISNLEPEDFAVYYCQQWSSYPPTFGQGTKLEIK
 (SEQ.I.D.NO:37)

Гуманизированный V_L-конструкт L2:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSGSSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIEDTSNLA
 SGIPARFSGSGSGTDYTLTISNLEPEDFAVYYCQQWSSYPPTFGQGTKLEIK
 (SEQ.I.D.NO:38)

5.2 Гуманизация 15E10

Гуманизированные V_H- и V_L-конструкты получали de novo путем сборки
 перекрывающихся олигонуклеотидов, включающих рестрикционные сайты для
 клонирования в экспрессионные векторы для млекопитающего Rld и Rln, а
 также человеческую сигнальную последовательность. Рестрикционные сайты
 Hind III и Spe I вводили для встраивания в рамку V_H-домена, содержащего
 человеческую сигнальную последовательность для клонирования в Rld,
 содержащем константную область человеческой $\gamma 1$ дикого типа.
 Рестрикционные сайты Hind III и BsiW I вводили для встраивания в рамку V_L-
 домена, содержащего человеческую сигнальную последовательность для
 клонирования в Rln, содержащем константную область человеческой каппа.

Человеческая сигнальная последовательность: MGWSCIILFLVATATGVHS
 (SEQ ID NO: 39).

Сконструировали восемь гуманизированных V_H-конструктов и два
 гуманизированных V_L-конструкта. Это должно приводить к 16 разным
 комбинациям цепей. Поскольку сборка олигонуклеотидов переменных
 областей требует много времени, было принято решение сначала получить
 конструкты для V_H-домена только с наименьшей и наибольшей обратной
 мутацией (A1, A4, B1 и B4) и продуцировать гуманизированные антитела в
 комбинации с двумя гуманизированными V_L-конструктами.

Для сборки были сконструированы 10 олигонуклеотидов длиной 60 оснований с перекрытием минимум в 18 оснований.

5.2.1 Сборка олигонуклеотидов

Растворы пула олигонуклеотидов получали из 5 мкл каждого маточного раствора олигонуклеотидов при 100 мкМ. Синтез гуманизированных генов V_H и V_L путем сборки перекрывающихся олигонуклеотидов обычно осуществляли согласно Stemmer WP et al (1995) Gene 164(1):49-53 с использованием программного обеспечения, описанного в Ertl PF et al (2003) Methods 31:199-206.

5.2.1.1 Реакционная смесь для сборки путем ПЦР:

вода	41,5 мкл
буфер для ПЦР 10×ProofStart	5 мкл
dНТФ (10 мМ)	1,5 мкл
пул олигонуклеотидов	1 мкл
ДНК-полимераза ProofStart	1 мкл
суммарный объем	50 мкл

Цикл сборки путем ПЦР: 1- 94°C в течение 2 мин

2- 94°C в течение 30 сек

3- 40°C в течение 2 мин

4- 72°C в течение 10 сек

5- 94°C в течение 15 сек

6- 40°C в течение 30 сек

7- 72°C в течение 20 сек + 3 сек/цикл

стадии от 4 до 7 повторяли 25 раз.

5.2.1.2 Продуктивная ПЦР

Праймерами 1 и 2 были первые верхние и нижние олигонуклеотиды, использованные в сборке путем ПЦР. Продуктивная ПЦР делает возможной амплификацию полного V-гена.

Реакционная смесь для продуктивной ПЦР:

вода	42 мкл
буфер для ПЦР 10×ProofStart	4 мкл
dНТФ (10мМ)	1,5 мкл
праймер 1 (100 мкМ)	0,5 мкл

праймер 2 (100 мкМ)	0,5 мкл
реакционная смесь для сборки путем ПЦР	1 мкл
ДНК-полимераза ProofStart	0,5 мкл
суммарный объем	50 мкл

	праймер 1	праймер 2
15E10-A1/A4	15E10-A4-U1	15E10-A4-L1
15E10-B1	15E10-B1-U1	15E10-B1-L1
15E10-B4	15E10-B1-U1	15E10-B4-L1
15E10-L1/L2	15E10-L1-U1	15E10-L1-L1

Цикл продуктивной ПЦР: 1- 94°C в течение 2 мин

2- 94°C в течение 45 сек

3- 60°C в течение 30 сек

4- 72°C в течение 2 мин

5- 72°C в течение 4 мин

стадии от 2 до 4 повторяли 25 раз.

Продукты продуктивной ПЦР очищали с использованием набора MinElute PCR Purification от Qiagen в соответствии с инструкциями изготовителя.

5.2.2 Рестрикционные фрагменты

Гуманизированные конструкторы 15E10 V_H A1, A4, B1 расщепляли по Hind III-Spe I и два гуманизированных 15E10 V_L расщепляли по Hind III-BsiW I как описано в 4.2.1.

5.2.3 Очистка в геле

Продукты рестрикционного расщепления очищали как в 4.2.2.

5.2.4 Лигирование

Гуманизированные V_H-фрагменты 15E10, отщепленные по Hind III-Spe I, лигировали в вектор Rld hCγ1wt, расщепленный по Hind III-Spe I.

Гуманизированные V_L-фрагменты 15E10, отщепленные по Hind III-BsiW I, лигировали в вектор Rln hCκ, расщепленный по Hind III-BsiW I.

Лигирование осуществляли с использованием системы LigaFast Rapid DNA Ligation System от Promega соответствии с инструкциями изготовителя.

5.2.5 Трансформация

Как в 4.2.5.

5.2.6 Секвенирование

Колонии из каждого реакционного планшета культивировали в течение ночи при 37°C в 5 мл среды LB с добавлением 100 мкг/мл ампициллина. Плазмиды экстрагировали и очищали с использованием набора QIAprep Spin Miniprep от Qiagen в соответствии с инструкциями изготовителя и секвенировали с использованием праймеров, описанных в 4.2.5.

Идентифицировали клоны с соответствующими гуманизированными V_H- и V_L-последовательностями и получали плазмиды для экспрессии в клетках CHO.

6. Экспрессия гуманизированных антител в клетках CHO

Четыре гуманизированных V_H-конструкта (A1, A4, B1 и B4) и два гуманизированных V_L-конструкта (L1 и L2) получали в экспрессионных векторах для млекопитающего Rld hCγ1wt и Rln hCκ. Восемь плазмид с комбинациями тяжелой цепи и легкой цепи (A1L1, A1L2, A4L2, B1L2, B4L1 и B4L2) временно котрансфицировали в клетки CHO и экспрессировали в малом масштабе с получением 8 разных гуманизированных антител. Антитела, продуцированные в супернатант, анализировали на ингибирование gp130 в ELISA (см. ниже).

6.1 Очистка плазмид

Клетки DH5α, содержащие одну из плазмид по разделу 6, культивировали в 5 мл среды LB с добавлением 100 мкг/мл ампициллина в течение 8 ч при 37°C во встряхивающем инкубаторе.

В 200 мл среды LB с добавлением 100 мкг/мл ампициллина инокулировали 1 мл суточной культуры и инкубировали в течение ночи при 37°C во встряхивающем инкубаторе.

Плазмиды экстрагировали и очищали с использованием набора QIAfilter Plasmid Maxi от Qiagen в соответствии с инструкциями изготовителя. Этанольный осадок ресуспендировали в 200 мкл TE-буфера и концентрацию плазмиды измеряли по поглощению при 260 нм после 100-кратного разведения маточного раствора.

6.2 Трансфекция

В 9 лунок 6-луночных планшетов Corning Costar 3506 высевали по 10⁶ клеток CHO и культивировали их в течение ночи в среде Dulbecco's MEM с Glutamax-1 (DMEM) с добавлением с Ultra Low Fetal Bovine Serum и 1%-ного пенициллина-стрептомицина при 37°C.

Для каждой лунки добавляли следующие компоненты в 5 мл Biiou:

1 мл Optimem 1 с Glutamax-1,

5 мкг плазмиды, несущей гуманизированный V_H,

5 мкг плазмиды, несущей гуманизированный V_L,

30 мкг реагента TransFast для трансфекции при вихревом перемешивании,

так, что каждая трансфекция включала отличную от других комбинацию легких и тяжелых цепей. Инкубация происходила в течение 10-15 мин при комнатной температуре. Из лунок удаляли среду DMEM, затем смесь подвергали вихревому перемешиванию и добавляли к соответствующей лунке.

Инкубация происходила при 37°C в течение 1 ч.

Добавляли по 2 мл Optimem на лунку и инкубировали при 37°C в течение 48-72 ч.

6.3 Анализ гуманизированных антител

Среду из каждой лунки извлекали и центрифугировали при 13000 об/мин в течение 1 мин на настольной центрифуге Eppendorf 5415R и супернатант пропускали через 25-мм шприцевой фильтр Pall с 0,2-мкм порами.

8 гуманизированных антител (4 на основании человеческих каркасных участков группы А и 4 на основании человеческих каркасных участков группы В) и химерные антитела 15E10 анализировали по ингибированию gp130 в ELISA на их эффективность в нейтрализации как hOSM, так и cOSM (см. Фиг. 4).

Таблица 2: Величины IC₅₀ для гуманизированных антител B1L1, B1L2, B4L1 и B4L2 в ингибировании gp130 в ELISA

	OSM человека	OSM обезьян Cynomolgus
B1L1	NA	NA
B1L2	0,334	0,110
B4L1	NA	0,167
B4L2	0,048	0,040
химеры 15E10	0,070	0,060

Величины IC₅₀ выражены в мкг/мл

NA: ингибирование меньше, чем 50%

Уровень обратных мутаций в экспрессированных гуманизированных антителах оказывал прямое влияние на аффинность к OSM человека и обезьян

Супомолгус в ингибировании gp130 в ELISA. Антитело с наименьшим уровнем обратной мутации (B1L1) не имело детектируемой аффинности к OSM обезьян Супомолгус и имело аффинность к OSM человека чуть выше фона. С другой стороны, антитело с наибольшим уровнем обратной мутации (B4L2) имело аффинность к OSM человека и обезьян Супомолгус по меньшей мере эквивалентную таковой химерного антитела 15E10. У 2-х гуманизированных антител, содержащих легкую цепь с обратными мутациями, аффинность была выше, чем у 2-х гуманизированных антител, содержащих прямо вставленную легкую цепь.

Ни одно из четырех гуманизированных антител на основе человеческих каркасных участков группы А не давало ингибиторный сигнал в gp130 ELISA-анализе. Фактически, ни одно из этих антител нельзя было выявить в ELISA на полное человеческое антитело IgG1 (где иммобилизованное антитело является поликлональным, индуцированным у козы против человеческой тяжелой цепи γ , и детектирующее антитело является поликлональным, индуцированным у козы против человеческой легкой цепи κ). Дополнительный анализ супернатанта, содержащего эти четыре антитела, в анализах ELISA, специфических к тяжелой цепи и специфических к легкой цепи человеческих IgG, давал позитивный сигнал в обоих анализах. Оба ELISA использовали иммобилизованное антитело против тяжелых и легких цепей человеческого IgG, индуцированное у козы, в то время как детектирующее антитело было индуцировано против γ -цепи человеческих IgG для ELISA, специфического к тяжелой цепи, и против κ -цепи человеческих IgG в ELISA, специфического к легкой цепи. Из этих результатов следует, что гуманизированные антитела, где тяжелая цепь сконструирована из человеческих каркасных участков группы А, экспрессируют как тяжелые, так и легкие цепи, но эти две цепи не объединены для продуцирования жизнеспособного антитела.

Имеющий наибольший уровень обратной мутации V_H -конструкт на основе человеческих каркасных участков Группы В (B4) в комбинации с имеющей обратные мутации легкой цепью (L2) оказался наиболее эффективным гуманизированным антителом. Три гуманизированных антитела, содержащих V_H из Группы В (B2L2, B3L2 и B4L2), были получены, очищены и

проанализированы для определения гуманизированного антитела, наиболее подходящего для отбора кандидатов.

6.4 Получение гуманизированных V_H-конструктов по 6.3

Два гуманизированных конструкта B2 и B3 получали как в 5.2.1-5.2.6.

6.5 Экспрессия гуманизированных антител в клетках CHO

Тремя гуманизированными V_H-содержащими плазмидами (B2, B3 и B4) в комбинации с плазмидой, содержащей имеющую наибольший уровень обратной мутации гуманизированную V_L-содержащую плазмиду (L2) из раздела 6, временно котрансфицировали клетки CHO и экспрессировали. Полученные 3 гуманизированных антитела очищали из супернатанта клеточной культуры путем аффинной хроматографии на Сефарозе с рекомбинантным белком A и их аффинность к OSM оценивали по ингибированию gp130 в ELISA и в анализе на клетках KB с использованием химерного антитела 15E10 в качестве стандарта.

Очистку плазмид осуществляли как в 4.3.1. Трансфекцию осуществляли как в 4.3.2. Очистку гуманизированных антител осуществляли как в 4.3.3.

6.6 Анализ гуманизированных антител из раздела 6.5

Очищенные гуманизированные антитела из раздела 6.5 анализировали на ингибирование gp130 в ELISA и в анализе на клетках KB (см. ниже) в отношении их эффективности в нейтрализации OSM человека и обезьян *Сynomolgus*. Анализы осуществляли с человеческими OSM из ряда источников, в том числе клеток CHO, клеток CHO с 25%-ной человеческой сывороткой AB, нейтрофилов и синовиальной жидкости пациентов с РА.

ингибирование gp130 в ELISA: данные экспериментов проиллюстрированы на Фиг. 5-10.

Анализ на клетках KB: данные экспериментов проиллюстрированы на Фиг. 11-16.

Эти результаты показывают, что у гуманизированных антител (B3L2 и B4L2) эффективность эквивалентна химерному антителу 15E10, но более высокая, чем у гуманизированного антитела B2L2. Это указывает на то, что стратегия гуманизации, особенно выбор обратных мутаций, привел в результате к полному восстановлению аффинности к антигену.

Аминокислотная последовательность V_H-цепи B4 представляет собой

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRG
 GSTDYNAAFMSRLTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWFYFD
 VWGRGTLVTVSS
 (SEQ.ID.NO: 21)

и V_L-цепь представляет собой SEQ ID NO: 12.

Терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее(ий) V_H-цепь с SEQ ID NO: 21 и V_L-цепь с SEQ ID NO: 12, можно считать конкурирующим антителом по этому изобретению, и поэтому оно образует воплощение этого изобретения.

6.7 Сравнение гуманизированного антитела B3L2 с химерными и родительскими мышиными антителами

Гуманизированное антитело B3L2 сравнивали с химерными 15E10 и родительскими мышиными антителами в ингибировании gp130 в ELISA и в анализе на клетках KB (см. ниже) с использованием OSM человека и обезьян Cynomolgus в качестве целевого антигена. Гуманизированное антитело B3L2, несущее 2 точечных мутации в константной тяжелой цепи (Ala заменяет Leu в положении 235 и Gly в положении 237), было сконструировано, экспрессировано в клетках CHO и очищено. Мутации снижают способность антитела выполнять эффекторные функции, особенно рекрутирование факторов комплемента. На Фиг. 17-19 гуманизированное антитело-кандидат B3L2 с интактной тяжелой цепью обозначено как B3L2 wt (дикого типа), тогда как мутированное антитело B3L2 обозначено как B3L2 mut.

Таблица 4: Величины IC₅₀ для гуманизированного B3L2 дикого типа в сравнении с родительскими мышиными и химерными антителами в ингибировании gp130 в ELISA и в анализе на клетках KB

	gp130 в ELISA	Анализ на клетках KB
Мышиное 15E10	0,009	0,053
Химерное 15E10	0,019	0,079
B3L2 wt	0,035	0,123

Величины IC₅₀ приведены в мкг/мл.

Эти результаты подтверждают, что гуманизированное антитело B3L2 имеет эффективность, эквивалентную родительскому мышиному антителу 15E10.

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи гуманизированного B3L2 указана в SEQ ID NO: 11 и легкой цепи гуманизированного B3L2 указана в SEQ ID NO: 12.

Пример 7 - Антитело 10D3

7.1. Генерирование моноклональных антител

Гибридому 10D3 генерировали, как подробно описано выше в Примере 1.

7.2. КЛОНИРОВАНИЕ ВАРИАБЕЛЬНЫХ ОБЛАСТЕЙ КЛОНА 10D3

Суммарную РНК экстрагировали из клона 10D3 клеток гибридомы и кДНК тяжелых и легких переменных доменов получали обратной транскрипцией с использованием праймеров, специфичных для мышиной лидерной последовательности и константных областей антитела в соответствии с predetermined изотипом (IgG1/κ). кДНК переменных тяжелых и легких доменов затем клонировали в вектор pCR2.1 для секвенирования.

7.2.1 Экстракция РНК

Суммарную РНК экстрагировали из осадка 10^6 клеток гибридомы клона 10D3 с использованием набора SV Total RNA Extraction System от Promega в соответствии с инструкциями изготовителя.

7.2.2 Обратная транскрипция

РНК подвергали обратной транскрипции с получением кДНК переменных тяжелых и легких доменов с использованием праймеров, специфичных для мышиных лидерных последовательностей и константных областей мышиных IgGγ2a/κ. Используемая смесь праймеров описана в Jones ST and Bendig MM Bio/technology 9:88-89 (1991).

Пулы прямых праймеров лидерных последовательностей мышиных V_H и V_L получали при 50 мкМ. Растворы обратных праймеров константных областей мышиных γ2a и κ также получали при 50 мкМ.

7.2.3 Обратнотранскриптазная ПЦР (ОТ-ПЦР)

Обратную транскрипцию РНК, кодирующей переменные тяжелые и легкие области, осуществляли в двух параллельных опытах с использованием системы Access RT-PCR от Promega в соответствии с инструкциями изготовителя. Прямые и обратные праймеры V_H и V_L были такими, как описано выше.

7.3. Клонирование продукта ПЦР по 7.2.3

7.3.1 Очистка в геле

Продукты ОТ-ПЦР ($2 \times V_H$ и $2 \times V_L$) в растворе для нанесения на гель наносили на препаративный 1%-ный агарозный гель, содержащий 0,01% бромид этидия, и пропускали в буфере TAE при 100 В в течение 1 часа и полосы V-области вырезали. Также в геле пропускали набор стандартов ДНК до 100 п.о., чтобы сделать возможной идентификацию V_H - и V_L -полос.

Фрагменты ДНК экстрагировали и очищали из геля с использованием набора QIAquick™ Gel Extraction от Qiagen в соответствии с инструкциями изготовителя.

7.3.2 Лигирование

Очищенные фрагменты из ОТ-ПЦР ($2 \times V_H$ и $2 \times V_L$) клонировали в вектор pCR2.1 с использованием набора для клонирования TA от Invitrogen в соответствии с инструкциями изготовителя.

7.3.3 Трансформация

Лигированными плазмидами трансформировали клетки TOP10F' в соответствии с инструкциями к набору TA для клонирования. 50 мкл и 200 мкл трансформированных клеток распределяли по L-агаровым планшетах, содержащим 100 мкг/мл ампициллина, и наслаивали 8 мкл раствора 500 мМ IPTG и 16 мкл раствора X-Gal в ДМФ (50 мг/мл). Планшеты инкубировали в течение ночи при 37°C.

7.3.4 Секвенирование

5 белых колоний культивировали в течение ночи при 37°C в 5 мл среды LB с добавлением 100 мкг/мл ампициллина.

Плазмиды pCR2.1, содержащие V_H - и V_L -домены 10D3, экстрагировали и очищали с использованием набора Qiagen QIAprep Spin Miniprep в соответствии с инструкциями изготовителя.

V_H - и V_L -домены секвенировали с использованием прямых праймеров T7, M13 и обратного праймера M13.

Аминокислотная последовательность V_H -домена 10D3 (консенсус 10 клонов из 2 ОТ-ПЦР): SEQ ID NO: 46.

Аминокислотная последовательность V_L -домена 10D3 (консенсус 10 клонов из 2 ОТ-ПЦР): SEQ ID NO: 47.

7.4. Химерное антитело

Химерное антитело, состоящее из исходных родительских V-областей по 7.3.4, вставленных в С-области человеческого IgG1/κ дикого типа, было сконструировано для подтверждения клонирования соответствующих мышиных V-областей, а также для использования в качестве эталона при тестировании гуманизированных конструкторов. Это химерное антитело экспрессировали в клетках CHO, очищали и тестировали на аффинность к сайту II OSM в ингибировании gp130 в ELISA и в анализе на клетках KB. Клонированные мышиные V-области амплифицировали путем ПЦР для введения рестрикционных сайтов, требуемых для клонирования в экспрессионных векторах Rld и Rln для млекопитающего. Сайты Hind III и Spe I были разработаны для встраивания в рамку V_H-домена и возможности клонирования в модифицированном векторе Rld, содержащем С-область человеческой γ1 дикого типа. Сайты Hind III и BsiW I были разработаны для встраивания в рамку V_L-домена и возможности клонирования в модифицированном векторе Rln, содержащем С-область человеческой κ.

7.4.1 Амплификация путем ПЦР

Прямой праймер для V_H:

Рестрикционный сайт Hind III подчеркнут, и последовательность Козака выделена жирным шрифтом.

V_H прямой: 5'-GAT GAA GCT TGC CAC CAT GGG ATG GAG CTG GGT CTT T-3' (SEQ ID NO: 58)

V_H обратный: 5'-GAT GGA CTA GTG TGC CTT GGC CCC AAT A-3' (SEQ ID NO: 65)

Рестрикционный сайт Spe1 подчеркнут.

Прямой праймер для V_L:

V_L прямой: 5'-GAT GAA GCT TGC CAC CAT GGA TTT ACA GGT GCA GAT T-3' (SEQ ID NO: 59)

Рестрикционный сайт Hind III подчеркнут, и последовательность Козака выделена жирным шрифтом.

V_L обратный: 5'-GAT GCG TAC GTT TCA GCT CCA GCT TGG TCC C-3' (SEQ ID NO: 60)

Рестрикционный сайт BsiW I подчеркнут.

Реакционная смесь для ПЦР:	вода	66 мкл
	10×буфер для ПЦР	10 мкл
	dНТФ (2 мМ)	10 мкл
	праймер 1 (5 мкМ)	4 мкл
	праймер 2 (5 мкМ)	4 мкл
	полимераза AmpliTaq	2 мкл
	очищенная плазмида	4 мкл
	суммарный объем	100 мкл

Праймер 1: прямой праймер V_H или V_L

Праймер 2: обратный праймер V_H или V_L

Очищенная плазмида: pCR2.1 V_H или плазмида для V_L , очищенная с использованием Qiagen Miniprep (разбавлена 200×)

Цикл ПЦР: 1- 95°C в течение 4 мин

2- 95°C в течение 1 мин

3- 55°C в течение 1 мин

5- 72°C в течение 7 мин

стадии от 2 до 4: повторяли 30 раз

7.4.2 Клонирование в экспрессионных векторах для млекопитающего

Продукты ПЦР очищали с использованием набора MinElute PCR Purification от Qiagen в соответствии с инструкциями изготовителя.

7.4.2.1 Рестрикционные фрагменты

Продукт ПЦР V_H и экспрессионный вектор Rld hCγ1wt для млекопитающего расщепляли по Hind III-Spe I:

10×буфер (NEBuffer 2)	5 мкл
100×BSA (NEB)	0,5 мкл
ДНК	5 мкл
Hind III (Promega)	2 мкл
Spe I (NEB)	2 мкл
вода	35,5 мкл
суммарный объем	50 мкл

ДНК: очищенный продукт ПЦР V_H или вектор Rld hCγ1wt (при 0,25 мг/мл).

Инкубировали 2 ч при 37°C.

Продукт ПЦР V_L и экспрессионный вектор для млекопитающего Rln hCк расщепляли по Hind III-BsiW I:

10×буфер (NEBuffer 2)	5 мкл
ДНК	5 мкл
Hind III (Promega)	2 мкл
вода	38 мкл
суммарный объем	50 мкл

ДНК: очищенный продукт ПЦР V_L или вектор Rln hCк (при 0,25 мг/мл)

Инкубировали 2 ч при 37°C.

Добавляли 2 мкл BsiW I (NEB) и инкубировали 2 ч при 55°C.

7.4.2.2 Очистка в геле

Продукты рестрикционного расщепления в растворе для нанесения на гель наносили на препаративный 1%-ный агарозный гель, содержащий 0,01% бромида этидия, и пропускали в буфере TAE при 100 В в течение 1 часа и полосы векторов Rld и Rln, а также ПЦР-фрагменты V_H и V_L вырезали. Также в геле пропускали набор стандартов ДНК до 100 п.о., чтобы сделать возможной идентификацию V_H - и V_L -полос.

ДНК экстрагировали и очищали из геля с использованием набора для экстракции QIAquick Gel от Qiagen в соответствии с инструкциями изготовителя.

7.4.2.3 Лигирование

Отщепленный по Hind III-Spe I ПЦР-фрагмент V_H лигировали в расщепленный по Hind III-Spe I вектор Rld hCγ1wt.

Отщепленный по Hind III-BsiW I ПЦР-фрагмент V_L лигировали в расщепленный по Hind III-BsiW I вектор hCк.

Лигирование осуществляли с использованием системы LigaFast Rapid DNA Ligation System от Promega в соответствии с инструкциями изготовителя с получением:

V_H :	вектор:	Rld hCγ1wt, расщепленный по Hind III-Spe I
	вставка:	фрагмент ПЦР V_H , отщепленный по Hind III-Spe I
V_L :	вектор:	Rln hCк, расщепленный по Hind III-BsiW I
	вставка:	фрагмент ПЦР V_L , отщепленный по Hind III-BsiW I

7.4.2.4 Трансформация

Лигированными продуктами трансформировали компетентные клетки DH5 α :

Оттаивали на льду флаконы по 200 мкл DH5 α .

Приготавливали в пробирках для трансформации аликвоты по 50 мкл.

Добавляли 2 мкл смеси для лигирования и осторожно перемешивали наконечником пипетки с последующей инкубацией в течение 30 мин на льду.

Смесь инкубировали в течение 45 сек при 42°C без встряхивания.

Затем эту смесь переносили на лед на 2 мин.

Добавляли 450 мкл среды SOC и инкубировали пробирки в течение 1 ч при 37°C на встряхивающем инкубаторе.

Распределяли 100 мкл культуры по L-агаровому планшету с добавлением 100 мкг/мл ампициллина и инкубировали в течение ночи при 37°C.

7.4.2.5 Секвенирование

Клоны V_H и V_L культивировали в течение ночи при 37°C в 5 мл среды LB с добавлением 100 мкг/мл ампициллина.

Плазмиды Rld и Rln, содержащие V_H- и V_L-домены, соответственно, экстрагировали и очищали с использованием набора QIAprep Spin Miniprep от Qiagen в соответствии с инструкциями изготовителя.

V_H-область секвенировали с использованием прямых праймеров в векторе Rld и сигнальной последовательности и обратного праймера в человеческой C γ 1-области.

V_L-область секвенировали с использованием прямых праймеров в векторе Rln и сигнальной последовательности и обратного праймера в человеческой C κ -области.

Идентифицировали клоны с соответствующими последовательностями V_H и V_L и получали плазмиды для экспрессии в клетках CHO.

7.4.3 Экспрессия химерного антитела в клетках CHO

Плазмидами Rld и Rln, содержащими V_H- и V_L-домены 10D3, соответственно, временно котрансфицировали клетки CHO и экспрессировали. Продуцируемое химерное антитело очищали из супернатанта клеточной культуры аффинной хроматографией на Сефарозе с рекомбинантным белком А

и его аффинность к OSM оценивали по ингибированию gp130 в ELISA и в анализе на клетках KB (см. ниже).

7.4.3.1 Очистка плазмиды

Клетки DH5 α , содержащие плазмиды Rld-10D3V_H и Rln-10D3V_L, культивировали в 5 мл среды LB с добавлением 100 мкг/мл ампициллина в течение 8 ч при 37°C во встряхивающем инкубаторе.

В 200 мл среды LB с добавлением 100 мкг/мл ампициллина инокулировали 1 мл суточной культуры и инкубировали в течение ночи при 37°C во встряхивающем инкубаторе.

Плазмиды экстрагировали и очищали с использованием набора QIAFilter Plasmid Maxi от Qiagen в соответствии с инструкциями изготовителя. Этанольный осадок ресуспендировали в 200 мкл буфера TE и концентрацию плазмид измеряли по поглощению при 260 нм после 100-кратного разведения маточного раствора.

7.4.3.2 Трансфекция

Клетки CHO культивировали до конfluence в среде Dulbecco's MEM с добавлением Glutamax-1 (DMEM) и фетальной бычьей сыворотки Ultra Low Fetal Calf Serum и 1%-ного пенициллина-стрептомицина в 4 \times 175-см² колбах BD Falcon для клеточных культур при 37°C.

Для каждой колбы в 50-мл пробирку Falcon добавляют и перемешивают следующее:

8 мл Optimem 1 с Glutamax-1

20 мкг очищенной плазмиды Rld-10D3V_H

20 мкг очищенной плазмиды Rln-10D3V_L

240 мкл трансфекционного реагента TransFast при вихревом перемешивании.

Смесь инкубировали в течение 10-15 мин при КТ.

Среду DMEM удаляли из колбы, затем смесь встряхивали и добавляли в колбу.

Смесь инкубировали при 37°C в течение 1 ч.

В колбу добавляли 32 мл Optimem и инкубировали при 37°C в течение 48-72 ч.

7.4.3.3 Очистка химерного антитела

Среды из всех 175-см² колб объединяли в пул и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 3 мин на MSE Mistral 2000 и супернатант пропускали через 500-мл фильтровальную систему 0,22 мкм СА.

Антитело очищали из осветленного супернатанта на Amersham Biosciences Akta Explorer с использованием программного обеспечения Unicorn.

Используемая колонка представляла собой 1-мл HiTrap rProteinA Sepharose FF.

Скорость потока составляла 1 мл/мин.

Колонку уравнивали с 10 объемами Dulbecco's PBS, затем наносили на нее осветленный супернатант через насос А.

Колонку промывали 20 объемами Dulbecco's PBS, насос А промывали до чистой промывной жидкости и через колонку пропускали дополнительно 10 объемов Dulbecco's PBS для обеспечения полного вымывания супернатанта.

Антитело элюировали 10 объемами буфера ImmunoPure IgG Elution (Pierce) и собирали в виде 1-мл фракций, содержащих по 100 мкл 1 М нейтрализующего буфера Trizma-HCl, pH 8,0.

Колонку снова уравнивали с 5 объемами Dulbecco's PBS.

Антитело во фракциях элюата количественно определяли считыванием поглощения при 280 нм против контрольного раствора, содержащего 10 объемов буфера ImmunoPure IgG Elution + 1 объем 1 М Trizma-HCl, pH8,0, и фракции с достаточными количествами чистого антитела объединяли в пул и хранили в аликвотах по 100 мкл при -20°C.

7.4.4 Анализ химерного антитела

Химерное антитело 10D3 анализировали на ингибирование gp130 в ELISA и в анализе на клетках KB (см. ниже) на их эффективность в нейтрализации как OSM человека, так и OSM обезьян *Cynomolgus*.

Протоколы для ингибирования gp130 в ELISA и для анализа на клетках KB приведены ниже.

Химерные антитела 10D3 нейтрализуют OSM в ингибировании gp130 в ELISA и в анализе на клетках KB.

Эти результаты подтверждают, что были успешно клонированы соответствующие переменные области с получением антигенсвязывающего

химерного антитела, способного связывать сайт II OSM человека и обезьян *Cynomolgus*.

Вариабельные тяжелые и легкие домены 10D3 теперь могут быть гуманизированы.

Мышинные вариабельные области клонировали и секвенировали, затем вставляли в человеческие константные области $\gamma 1/\kappa$ с получением химерного антитела. Химерное антитело 10D3 показало эффективность против OSM человека и обезьян *Cynomolgus*, эквивалентную таковой родительского мышиного антитела, в ингибировании gp130 в ELISA и в анализе на клетках KB (см. ниже).

Мышиное антитело гуманизировали, используя стратегию "наилучшего соответствия". Для вариабельного тяжелого домена выбирали последовательность с 65%-ной идентичностью и вставляли мышинные CDRs в человеческие каркасные участки. Сконструировали ряд конструкторов с различными обратными мутациями в каркасных участках для восстановления аффинности. Этими конструкторами являются:

Конструктор	Обратные мутации
A	T28I
B	T28I, R71V, T73K
C	T28I, V67A, M69L, R71V, T73K
D	T28I, M48I, G44K, V67A, M69L, R71V, T73K

Для вариабельного легкого домена выбирали последовательность с 60,0%-ной идентичностью и вставляли мышинные CDRs в человеческие каркасные участки. Сконструировали ряд конструкторов с различными обратными мутациями в каркасных участках для восстановления аффинности. Этими конструкторами являются:

Конструктор	Обратные мутации
LA	отсутствуют (прямая вставка)
LB	L46R, L47W
LC	Y36F, Q38K
LD	Y36F, Q38K, L46R, L47W
LE	Y36F, Q38K, L46R, L47W, F71Y

Только конструируя с наименьшими и наибольшими обратными мутациями (A, D, LA, LE) синтезировали путем сборки перекрывающихся олигонуклеотидов. Четыре комбинации гуманизированных антител (ALA, ALE, DLA, DLE) экспрессировали в малом масштабе в клетках CHO и супернатант анализировали на аффинность антитела в ингибировании gp130 в ELISA.

Только гуманизированные антитела ALE и DLE показали ингибирование в gp130 ELISA, но ингибирование со стороны ALE было недостаточным ввиду низкой концентрации антитела в супернатанте, поэтому выбрали DLE. Продукцию гуманизированного антитела DLE осуществили в клетках CHO в большем масштабе и антитело очистили и проанализировали в gp130 ELISA и в анализе на клетках KB с использованием химерного антитела 10D3 в качестве контроля.

Величины IC50 (gp130 ELISA) (мкг/мл):

	hOSM	cOSM
химера	0,032	0,246
DLE	0,021	0,059

Гуманизированное антитело 10D3 DLE является по меньшей мере настолько же эффективным, если не более эффективным, при сравнении с химерным антителом против OSM человека и OSM обезьян *Cynomolgus* в gp130 ELISA.

Гуманизированные химерные антитела 10D3 DLE и 10D3 анализировали в анализе на клетках KB. 10D3 DLE давало величины IC50 0,205 мкг/мл против человеческого OSM и 0,07 мкг/мл против OSM обезьян *Cynomolgus*.

В заключение, антитело 10D3 против сайта II человеческого OSM было успешно гуманизировано и показывало эффективность, эквивалентную таковой родительского мышиного антитела.

Материалы

Система SV для выделения суммарной РНК: Promega 23100

Система Access для ОТ-ПЦР: Promega A1250

Набор QIAquick для экстракции из геля: Qiagen 28704

Раствор для нанесения на гель: Sigma G7654

Агароза: Invitrogen 15510-019

Бромид этидия: Sigma E1510

Буфер TAE: приготавливали самостоятельно

Стандарты ДНК до 100 п.о.: New England Biolabs N3231S

Набор TA для клонирования: Invitrogen 45-0046

Клетки TOP10F': Invitrogen 44-0300

L-агар + ампициллин (100 мкг/мл): приготавливали самостоятельно

X-Gal, 50 мг/мл в ДМФ: Promega V394A

ДНК-полимераза AmpliTaq: Applied Biosystems

10× буфер для ПЦР: Applied Biosystems

Гель для электрофореза, 1,2%-ный агарозный: Invitrogen G501801

Среда LB + ампициллин (100 мкг/мл): приготавливали самостоятельно

Набор QIAprep Spin Miniprep: Qiagen 27106

Набор MinElute для очистки продуктов ПЦР: Qiagen 28004

Буфер NEBuffer2, конц. 10×: New England Biolabs B7002S

Очищенный бычий сывороточный альбумин (BSA), конц. 100×: New England Biolabs B9001S

BsiW I: New England Biolabs R0553L

Hind III: Promega R604A

Spe I: New England Biolabs R0133S

Система для лигирования ДНК LigaFast Rapid DNA Ligation: Promega M8225

Химически компетентные клетки MAX Efficiency DH5α: Invitrogen 18258-012

Среда SOC: приготавливали самостоятельно

Набор QIAfilter Plasmid Maxi: Qiagen 12263

Среда Dulbecco's MEM с Glutamax-1: Invitrogen 31966-021

Среда Optimem 1 с Glutamax-1: Invitrogen 51985-026

Реагент для трансфекции TransFast: Promega E2431

1-мл колонка FF с рекомбинантным белком A на сефарозе: Amersham Biosciences 17-5079-01

Забуференный фосфатами физраствор Dulbecco's PBS: Sigma D8537

Буфер для элюции IgG ImmunoPure: Pierce 21009

1 M Trizma-HCl, pH8,0: Sigma T2694

ДНК-полимераза ProofStart: Qiagen 1016816

Буфер для ПЦР ProofStart: Qiagen 1016961

Пример 8. Ингибирование gp130 в ELISA

OSM связывает последовательно gp130 и либо рецептор OSM, либо рецептор LIF. Описанный здесь анализ делает возможным измерение OSM (например hOSM), связанного с gp130 на планшете для ELISA. В дополнение, этот анализ делает возможным измерение ингибирования связывания OSM с gp130 рецептором антителами, индуцированными против сайта II OSM.

8.1 Материалы

1. Планшет Nunc Immunoplate 1 F96 Maxisorp (Life Technologies, 4-39454A)
2. Человеческий gp130-Fc, 100 мкг/мл (R&D Systems, 671-GP-100)
3. Забуференный фосфатами физраствор (PBS)
4. Бычий сывороточный альбумин (BSA) (Sigma A7030)
5. Человеческий рекомбинантный OSM, 10 мкг/л (R&D Systems, не гликозилированный)
6. Биотинилированные антитела против человеческого OSM, 50 мкг/мл (R&D Systems, BAF295)
7. Стрептавидин-пероксидаза хрена (HPR) (Amersham RPN4401)
8. 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (TMB) (Sigma)
9. Серная кислота
10. Tween 20 (Sigma P7949)

8.2 Приготовление реагентов

1. Приготовление планшетов: разбавляют человеческий gp130-Fc до 1 мкг/мл в PBS. Добавляют по 50 мкл на лунку, накрывают и инкубируют в течение ночи при 4°C.
2. Промывочный буфер: к 1 л PBS добавляют 500 мкл Tween 20 (0,05%).
3. Блокирующий буфер: к 500 мл PBS добавляют 5 г BSA (1%).

8.3 Методика

1. Промывают планшет, используя стандартный протокол промывки планшетов, и осушают.
2. Добавляют в лунки по 200 мкл блокирующего буфера и инкубируют в течение 1 часа при КТ.
3. Промывают как на стадии 1.

4. Добавляют в лунки по 50 мкл стандарта OSM или образца. Накрывают и встряхивают в течение 2 часов при КТ.

(OSM разбавлен до 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,563 и 0 нг/мл в блокирующем буфере или среде для тканевой культуры, в зависимости от образца)

5. Промывают как на стадии 1.

6. Добавляют в лунки по 50 мкл биотинилированного антитела против человеческого OSM, разбавленного до 30 нг/мл в блокирующем буфере. Накрывают и встряхивают в течение 1 часа при КТ.

7. Промывают как на стадии 1.

8. Добавляют в лунки по 50 мкл конъюгированной со стрептавидин-HRP, разбавленной 1/4000 в блокирующем буфере. Накрывают и встряхивают в течение 30 мин при КТ.

9. Промывают как на стадии 1.

10. Добавляют в лунки по 100 мкл субстрата TMB. Накрывают и встряхивают в течение 30 минут при комнатной температуре.

11. Добавляют в лунки по 50 мкл 1M H₂SO₄.

12. Считывают оптическую плотность (OD) при 450 нм.

8.4 Применение анализа для оценки опосредованного антителом ингибирования связывания gp130-OSM

1) Смешивают 25 нг/мл OSM с различными концентрациями антитела против OSM или различными разведениями антисыворотки, содержащей антитела против OSM. Инкубируют в течение 1 ч при КТ.

2) Добавляют 50 мкл/лунку смеси антитело-OSM в лунки 96-луночного планшета, содержащего связанный gp130, приготовленного как описано выше.

3) Проводят анализ, как описано выше.

9. КВ-анализ

Введение

Клетки KB (человеческая эпителиальная клеточная линия) экспрессируют mPHK для gp130 вместе с LIF и OSM рецепторами (Mosley, J.Biol Chem., 271 (50) 32635-32643). Как OSM, так и LIF индуцируют высвобождение IL-6 из клеток

KB. Эту клеточную линию использовали для идентификации моноклональных антител, модулирующих взаимодействие между OSM и gp130.

9.1 Методика

Клетки KB получали из Европейской коллекции культивируемых клеток животных (ECACC) (регистрационный номер 94050408) и поддерживали в DMEM + 10%-ной инактивированной нагреванием фетальной телячьей сыворотке (FCS) с добавлением глутамина ("среда KB "). Клетки выращивали в монослое и пересеивали дважды в неделю. Для открепления клеток использовали среду Sigma для неферментативной диссоциации клеток или Versene.

1. Добавляют по 2×10^4 клеток в 100 мкл в лунки 96-луночного планшета и инкубируют в течение ночи (37°C , 5% CO_2).

2. Приготавливают стандарты OSM в культуральной среде.

3. Приготавливают разведения OSM (1 нг/мл) + антитело/сыворотка. Инкубируют в течение 1 ч при КТ.

4. Осторожно удаляют среду из планшета с клетками KB и добавляют стандарт OSM и смеси OSM-антитело.

5. Инкубируют в течение 16-18 ч при 37°C .

6. Удаляют культуральную среду и проводят анализ на IL-6.

Примечание:

- Культуральную среду можно держать замороженной до готовности к анализу.

- Культуральную среду следует разбавлять для анализа в 20 раз.

- При скрининге гибридом соотношение среды для клонирования и среды KB должно быть постоянным, и стандартны OSM следует приготавливать в этой смеси.

- Стимуляция клеток KB концентрацией OSM около 100 нг/мл дает максимальный выход IL-6, но для выявления нейтрализующей активности антитела достаточно 1 нг/мл.

10. Конкурентный анализ

Этот анализ делает возможным измерение ингибирования связывания гуманизированного антитела, имеющего тяжелую цепь с SEQ ID NO: 11 и имеющего легкую цепь с SEQ ID NO: 12 (для целей этого примера

обозначенного как 15E10-B3L2), с растворимым гликозилированным hOSM антителом-кандидатом, не являющимся человеческим, которое специфически связывается с сайтом II hOSM. Схематическая иллюстрация анализа по этому примеру показана на Фиг. 20.

Планшет покрывают моноклональным антителом против сайта III (обозначено здесь как OM4-11.31).

Для стандартной кривой: очищенный стандарт 15E10-B3L2, серийно разбавленный из 1 мкг/мл, инкубируют с растворимым гликозилированным человеческим OSM при 50 нг/мл.

Антитело связывается с OSM через сайт II, и этот комплекс затем иммобилизуют на планшете первичным антителом против сайта III.

Для конкурентного анализа: антитело-кандидат, серийно разбавленное из 1 мкг/мл, инкубируют с растворимым гликозилированным человеческим OSM при 50 нг/мл, и 15E10-B3L2 при 150 нг/мл.

Присутствие конъюгированного 15E10-B3L2 детектируют по вторичному антителу против человеческой гамма-цепи.

Методика:

1) Нанесение покрытия

Планшет Nunc Maxisorp Immunoplate покрывали антителом против сайта III человеческого OSM (OM4-11.31, получено самостоятельно) по 50 мкл на лунку при 4 мкг/мл в PBS. Планшет инкубировали в течение ночи при 4°C.

2) Блокирование

Планшет промывали 3 раза, используя PBS + 0,05% Tween (PBST). К каждой лунке добавляли 100 мкл 1%-ного BSA (Sigma A7030) в PBS. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч при встряхивании.

3) Предварительная инкубация

Стандарт 15E10B3L2:

Приготавливали раствор антитела 15E10-B3L2 при 1 мкг/мл в растворе человеческого OSM (50 нг/мл) в блокирующем буфере и добавляли по 67 мкл к 2 лункам в ряду А несорбирующего 96-луночного планшета. Антитело серийно разбавляли 1:3 в 50 мкл раствора человеческого OSM (50 нг/мл) в блокирующем буфере в рядах от В до G.

Конкурирующее антитело:

Приготавливали раствор конкурирующего антитела при 1 мкг/мл в растворе 15E10-B3L2 (150 нг/мл) и hOSM (50нг/мл) в блокирующем буфере и добавляли по 100 мкл к 2 лункам в ряду А несорбирующего 96-луночного планшета. Антитело серийно разбавляли 1:1 в 50 мкл раствора 15E10-B3L2 (150 нг/мл) и человеческого OSM (50 нг/мл) в блокирующем буфере в рядах от В до Г. Два лунки инкубировали с разбавителем без конкурирующего антитела.

Планшет для предварительной инкубации инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч в статических условиях.

4) Инкубация

Покрытый планшет промывали 3 раза, используя PBST.

По 45 мкл каждого стандарта и образца переносили из планшета для предварительной инкубации в эквивалентные лунки покрытого планшета. В контрольные лунки добавляли PBS.

Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч при встряхивании.

5) Вторичное антитело

Планшет промывали 3 раза, используя PBST.

К каждой лунке добавляли 50 мкл комплекса пероксидазы с антителом козы против человеческой γ -цепи (Sigma A6029), разбавленного в 2000 раз в блокирующем буфере.

Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч при встряхивании.

6) Субстрат

Планшет промывали 3 раза, используя PBST.

Субстрат OPD (Sigma P9187) приготавливали в воде в соответствии с инструкциями изготовителя.

Добавляли к каждой лунке по 50 мкл.

Планшет инкубировали при комнатной температуре.

7) Остановка

Как только окрашивание было развито в достаточной степени, хромогенное взаимодействие останавливали добавлением 10 мкл 3М H_2SO_4 на лунку.

Планшет считывали при 490 нм в планшет-ридере, используя контрольные лунки в качестве нулевого поглощения.

Строили стандартную кривую поглощения при 490 нм против концентрации 15E10.

Концентрацию конъюгированного 15E10 в образцах, содержащих конкурирующее антитело, считывали по стандартной кривой. % ингибирования вычисляли как:

$$100 - [(\text{конц. 15E10 в образце в нг/мл} \div 150 \text{ нг/мл}) \times 100].$$

Строили кривую % ингибирования против концентрации конкурирующего антитела и считывали с этой кривой % ингибирования 15E10 при эквимоларности конкурирующего антитела (150 нг/мл конкурирующего антитела).

Пример 10.1: 10D3 в качестве конкурирующего антитела

В качестве конкурента 15E10 использовали антитело E9 из мышинового клона 10D3 при 267 мкг/мл (маточный раствор). 10D3 имеет CDRs легких и тяжелых цепей, как указано выше в Таблице А.

Результаты:

10D3 (мкг/мл)	Конъюгированное 15E10 (мкг/мл)	% ингибирования
1	0,019	87,3
0,5	0,029	80,7
0,25	0,044	70,7
0,125	0,062	58,7
0,062	0,092	38,7
0,031	0,132	12,0
0,016	0,146	2,7

% ингибирования 15E10 конкурентом, представляющем собой 10D3, при эквимоларности (0,15 мкг/мл): 62,3%. См. Фиг. 21.

Пример 11 - Идентификация антител, которые связывают OSM и являются специфичными для сайта II или сайта III OSM

Для биологической функции OSM должен взаимодействовать как с gp130, так и с LIFR или OSMR β . В исходное взаимодействие OSM с gp130 вовлечен сайт II OSM, в то время как взаимодействие OSM с OSMR β или LIFR

происходит по сайту III. Следовательно, антитела, которые направлены на последовательности или эпитопы либо сайта II, либо сайта III OSM достаточно близко к этим сайтам, так что связывание антитела будет перекрывать эти сайты, должны нейтрализовать активность OSM.

Анализ для измерения связывания OSM-gr130 изложен в Примере 8. Типичная стандартная кривая (при 1 мкг/мл, gr130) указана на Фиг. 22.

Изменяя условия анализа (до 4 мкг/мл), чувствительность можно значительно улучшить, как проиллюстрировано на Фиг. 22б.

Более того, хотя указанные выше данные были получены при использовании негликозилированного OSM, гликозилированный OSM также связывается с gr130 в этом анализе. См. Фиг. 22в.

В этом анализе использовали имеющееся в продаже нейтрализующее антитело против OSM (Mab 295, R&D Systems), чтобы проверить, блокирует ли оно взаимодействие OSM-gr130. Неожиданно оказалось, что оно усиливает сигнал от OSM, как проиллюстрировано на Фиг. 23.

Когда к OSM добавляют Mab 295 (30 мкг/мл), оно приблизительно удваивает результаты считывания OD в ELISA при сравнении с OSM в отдельности для концентраций OSM >10 нг/мл. Если gr130 не вносят в планшет, то сигнал, который генерируют OSM + Mab295, снижается до фона. Авторы данного изобретения постулируют следующую интерпретацию: Mab295 не связывает или не блокирует сайт II OSM. При низких концентрациях OSM молекулы антитела MAB295 связывают только один OSM, который, однако, не связывается также с gr130, поскольку сайт II доступен. При более высоких концентрациях молекулы антитела связывают две молекулы OSM, каждая из которых доступна для связывания с gr130, что делает возможным связывание 2 молекул OSM с каждой молекулой gr130, причем одна связывается непосредственно с gr130, а другая присоединяется вследствие двухвалентной природы антитела. Предполагается, что любое антитело не к сайту II OSM должно производить этот эффект, но, поскольку Mab 295 является нейтрализующим антителом (см. Фиг. 24), оно должно связывать или блокировать сайт III OSM. Таким образом, применение gr130-OSM ELISA-анализа по примеру 8 и анализа на клетках KB по примеру 9 делает возможным идентификацию антитела, нейтрализующего OSM, как специфичного к сайту II

или сайту III. Более конкретно, антитело к сайту III будет нейтрализовывать OSM в KB-анализе, но не должно нейтрализовывать связывание OSM-grp130 в анализе ELISA. Антитело к сайту II будет нейтрализовать OSM как в ELISA-анализе, так и в KB-анализе.

grp130-OSM ELISA-анализ использовали в качестве первичного скрининга гибридом для детектирования антител, генерированных по Примеру 1, которые ингибировали взаимодействие grp130-OSM. В дополнение, гибридомы были подвергнуты скринингу для детектирования активности связывания OSM. Супернатанты гибридом, показывающие высокий уровень связывания OSM, но которые не ингибировали связывание OSM-grp130 в анализе ELISA по примеру 8, были протестированы в анализе на клетках KB по примеру 9 на нейтрализацию OSM. Это идентифицировало ряд антител, специфичных к сайту III OSM. Одно такое антитело обозначено как OM4-11,31.

При использовании антител, специфичных к сайту III OSM, в grp130-OSM ELISA они значительно усиливали сигнал от OSM, как показано на Фиг. 25.

Антитело к сайту II, 1B5 (1мкг/мл), полностью ингибирует связывание OSM-grp130. Однако антитело к сайту III OSM, OM4-11.3.1, вызывает двухфазное дозозависимое усиление связывания OSM. При самой высокой использованной концентрации OM4-11.3.1 сигнал приблизительно удвоен относительно сигнала только с OSM, но по мере снижения концентраций антитела сигнал усиливается, предположительно в результате образования комплексов антитело-OSM, которые могут связываться с grp130, пока не достигнет пиковой величины. Изотипический контроль IgG для OM4-11.3.1 не влиял на связывание OSM-grp130. Фиг. 25 демонстрирует значительную чувствительность этого ELISA в различении антител, специфичных к сайту II и не к сайту II, поскольку первые ингибируют, а вторые усиливают связывание OSM.

Пример 11.1 - Эффект антител против OSM, специфичных к сайту II и сайту III в OSM-grp130 ELISA-анализе

Когда антитела против OSM, специфичные к сайту II и сайту III, смешаны вместе, антитела к сайту II имеют преобладающий эффект в grp130-OSM ELISA по Примеру 8, как показано на Фиг. 26.

Сигнал только от OSM значительно усиливается антителом против OSM, специфичным к сайту III (OM4-11.17). В то время как на это усиление не влияет добавление контрольных IgG, добавление антитела против OSM, специфичного к сайту II (OM4-5.3), сильно снижает этот сигнал. Считается, что малый детектируемый сигнал в крайней правой колонке на Фиг. 26 является результатом субоптимального времени инкубации для mAb к сайту II и комплекса сайт III-OSM до добавления к планшету с gp130.

gp130-OSM ELISA делает возможным мониторинг появления антител против OSM, специфичных к сайту II, в антисыворотках мышей, иммунизированных человеческим OSM (см. пример 1), как проиллюстрировано на Фиг. 27а, 27б и 27в.

После первичной бустер-иммунизации генерировались антитела преимущественно не к сайту II, но антитела, специфичные к сайту II, начали появляться после вторичной бустер-иммунизации, а после третичной бустер-иммунизации преобладание антител к сайту II четко наблюдается при более высоких сывороточных концентрациях.

Пример 11.2 - Синергизм между антителами, специфичными к сайту II и сайту III OSM, в нейтрализации OSM

Поскольку сайт II и сайт III OSM необходимы для функции OSM, комбинация антител, которые направлены на оба сайта, может действовать синергически в нейтрализации OSM. Сайт III OSM используется не только для взаимодействия с OSMR β и LIFR, но также в связывании второй молекулы OSM с gp130, и это может вносить вклад в повышенную эффективность антител, специфичных к сайту III, при сравнении с антителами против сайта II.

Фиг. 28а и 28б иллюстрируют KB-анализ, в котором комбинация антитела, специфичного к сайту II и специфичного к сайту III, сильно увеличивает эффективность в нейтрализации OSM при сравнении с любым антителом в отдельности.

Концентрации антител, использованных в комбинациях, показаны ниже в таблице.

[17H100], нг/мл	[hum 15E10], нг/мл
20	120
7	40

2,2	13,3
0,7	4,4
0,3	1,5
0,082	0,5
0,027	0,165
0,0091	0,55

Сравнение наиболее активных антител, специфичных к сайту II и к сайту III, показало, что последние были более эффективными в нейтрализации OSM. Однако перекрестная реактивность антител к сайту II и сайту III с OSM из других видов оказалась иной, поскольку все эффективные антитела к сайту II нейтрализовали OSM обезьян *Cynomolgus* (gp130-OSM ELISA и в анализах на клетках KB), в то время как антитела к сайту III не нейтрализовали (только в KB-анализе).

В основе синергических эффектов антител к сайту II и сайту III в нейтрализации OSM предположительно лежит блокирование взаимодействия OSM как с gp130, так и с OSMR β или LIFR. Однако также возможно, что связывание одного антитела может облегчать связывание другого антитела, направленного на другой сайт.

Пример 11.3 - Оптимизация нейтрализации OSM посредством комбинации антител против OSM, специфичных к сайту II и к сайту III

Поскольку комбинация антител к сайту II и к сайту III OSM сильно повышала эффективность нейтрализации, может быть предусмотрена стратегия разработки оптимальных концентраций, основанная на аффинностях связывания разных антител. Пример 11.3 является теоретическим.

Исходно аффинность антител, специфичных к сайту II или к сайту III, к OSM, предварительно связанному с антителами, специфичными к сайту III или к сайту II, соответственно, следует измерять с использованием технологии плазмонного резонанса. Если константы связывания (K_d) значительно отличаются от таковых для связывания индивидуальных антител с OSM, то происходит кооперативное взаимодействие в связывании антител к сайту II и сайту III.

На основании данных исследования связывания этих антител следует приготовить концентрации антител к сайту II и к сайту III в диапазоне от в 10 раз

больших, чем величины K_d , до в 10 раз меньших, чем K_d , используя удваивающиеся разведения. В дополнение, комбинации обоих антител следует приготовить так, чтобы каждая концентрация антитела к сайту II была объединена с каждой концентрацией антитела к сайту III, что делает возможной исследование идентичных связываний антител к сайту II или сайту III с OSM и преобладания в связывании антитела к сайту II и сайту III. Все разведения и комбинации антител следует тестировать на нейтрализацию OSM в анализе на клетках KB. Данные этого анализа сделают возможным выбор комбинации антител, наиболее эффективной в нейтрализации OSM.

Пример 12 - Способность специфичного антитела против сайта II OSM ингибировать OSM стимуляцию фибробластов синовиальной жидкости при РА

Ранее авторы изобретения показали, что антитела против OSM, специфичные к сайту II и к сайту III, могут ингибировать OSM стимуляцию клеток KB. Однако эти клетки являются эпителиальными, трансформированными и могут не быть репрезентативными для клеток, обнаруживаемых в ревматоидной синовиальной оболочке. Поэтому авторы изобретения исследовали эффективность антител против OSM, специфичных к сайту II, в ингибировании OSM стимуляции синовиальных фибробластов при РА.

Фибробласты высевали в 96-луночные планшеты при 2×10^4 клеток/лунку и культивировали в 10%-ной FCS в DMEM почти до конфлюэнтности, заменяя среду 3 раза в неделю. Культуральную среду затем заменяли свежей культуральной средой либо без OSM, либо с 1 нг/мл OSM, либо с 1 нг/мл OSM, который был предварительно инкубирован в течение 1 ч с разными концентрациями антитела против OSM в среде. Через 48 ч супернатанты культур удаляли и хранили при -20°C до анализа концентраций IL-6 в ELISA.

Фиг. 29 иллюстрирует репрезентативные данные по 4 линиям синовиальных фибробластов больных РА. Антитело против OSM вызывало полное ингибирование OSM-стимулированной секреции IL-6, хотя эффективность антитела несколько варьировала между разными линиями.

Пример 13 - Влияние гликозилирования OSM на эффективность нейтрализации антителами против OSM

Антитела против OSM были индуцированы иммунизацией мышей негликозилированным OSM с использованием способов, описанных ранее. Скрининг этих антител привел к идентификации эффективного нейтрализующего антитела (OM4-5.3), которое препятствовало связыванию OSM с gp130, как показано на Фиг. 30.

Предполагалось, что OM5-5.3 будет иметь такую же эффективность против гликозилированного OSM (гликозилирован клетками CHO). Однако, когда измерили способность субклона этого антитела (OM4-5.3.1) ингибировать связывание гликозилированного OSM (hOSM, гликозилирован клетками CHO) с gp130, наблюдали выраженную потерю эффективности, как показано на Фиг. 31а. Более того, эта потеря эффективности против гликозилированного OSM при сравнении с негликозилированным OSM наблюдалась также с другими антителами, специфичными к сайту II, полученными при иммунизации мыши негликозилированным OSM, как показано на Фиг. 31б.

Более того, антитела к сайту III, полученные при иммунизации негликозилированным OSM, также показали примерно 10-кратное снижение эффективности против гликозилированного OSM при сравнении с негликозилированным OSM в анализе на клетках KB - см. ниже Таблицу 1.

Таблица 1

Антитело	Негликозилированный OSM IC50 нг/мл	Гликозилированный OSM IC50 нг/мл
OM4-11.17	4,1	45,5
OM4-11.31	7,7	89,6

Поскольку иммунизация негликозилированным OSM привела в результате к антителам, которые были более эффективными против негликозилированного OSM, чем против гликозилированной формы, авторы изобретения считают, что иммунизация гликозилированным OSM может давать антитела с повышенной эффективностью против этой формы OSM. Это оказалось действительно так. Фиг. 32а и 32б иллюстрируют активность против

гликозилированного и негликозилированного OSM в gp130-OSM ELISA для двух антител против OSM, специфичных к сайту II (15E10 и 5H2), полученных иммунизацией гликозилированным OSM.

Пример 14 - Корреляция между уровнями OSM в сыворотке и синовиальной жидкости у пациентов РА

Одним из главных мест продуцирования OSM у пациентов с РА являются артритные суставы, поскольку высокие уровни OSM могут быть определены в синовиальной жидкости. Напротив, уровни OSM в сыворотке у пациентов с РА очень низкие, и измерять их точно стало возможно с разработкой высокочувствительного ELISA, как раскрыто ниже в примере 16. Авторы изобретения исследовали возможные взаимосвязи между концентрациями OSM в артритных суставах и кровотоке путем измерения пар образцов синовиальной жидкости и сыворотки пациентов с РА.

Уровни OSM в сыворотках и синовиальных жидкостях, как измерено анализом ELISA, изложенным ниже (иммобилизация OSM антителом OM4-11.31), показаны в таблице ниже, и Фиг. 33 иллюстрирует взаимосвязь между этими двумя измерениями. Образцы замораживали после взятия и оттаивали непосредственно перед этими измерениями. Коэффициент корреляции для этих двух параметров, как определено по линейной регрессии, равен 0,9447.

Пациент	[OSM] в сыворотке, пг/мл	[OSM] в СЖ, пг/мл
1	9,8	43,24
2	13,7	101,445
3	0	0
4	88,56	397
5	22,64	142,12
6	18	147,4
7	13	9,2
8	13,8	29,88
9	10,68	14,76
10	13,8	15,96

Хорошая корреляция между уровнями OSM в сыворотке и в СЖ подтверждает, что места продуцирования OSM, отличные от артритных

суставов, имеют относительно мало влияния на уровни OSM в крови, или что эти места модулируют продуцирование OSM так, что она коррелирует с продуцированием в суставе. В любом случае авторы данного изобретения предполагают, что эта корреляция дает возможность предсказания уровней OSM в суставе на основе измерения OSM в сыворотке и может найти применение в установлении дозы нейтрализующего OSM антитела для лечения пациентов с РА.

Пример 15 - Измерение OSM в синовиальной жидкости (СЖ) и сыворотке от пациентов с ОА

Поскольку деградация хряща является характерным признаком остеоартрита, и OSM, особенно в синергизме с IL-1 и другими цитокинами, может вызывать разрушение хряща, авторы изобретения измеряли уровни OSM в синовиальных жидкостях и сыворотках пациентов с ОА.

Клетки удаляли из образцов СЖ центрифугированием. Супернатанты обрабатывали 0,1 ед/мл гиалуронидазы (Fluka 53725) в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего их центрифугировали при 4000 об/мин в течение 10 минут. Супернатанты отделяли, разделяли на аликвоты и хранили при -80°C до анализа.

Концентрации OSM в СЖ при ОА определяли с использованием анализа ELISA по примеру 16 в двух экспериментах, показанных на Фиг. 34а, 34б и 35.

Хотя 13 из 46 СЖ при ОА не имели детектируемого OSM, многие содержали OSM в относительно высоких уровнях (>200 пг/мл), и концентрации OSM >1000 пг/мл были обнаружены в трех образцах.

Пример 15.1 - Концентрации OSM в сыворотках при ОА

Высокие концентрации OSM в синовиальной жидкости при ОА были неожиданными, поскольку из предыдущих сообщений следует, что уровни OSM в синовиальной жидкости при ОА имеют тенденцию быть ниже, чем в СЖ при РА (см. Manicourt DH et al (2000) Arthritis Rheum. 43(2): 281-88). Авторы изобретения также измеряли уровни OSM в сыворотках пациентов с ОА в клиническом испытании в нескольких разных временных точках на протяжении 12-месячного периода с использованием анализа ELISA по приведенному ниже примеру 16. Фиг. 36 показывает, что у этих пациентов концентрации OSM в сыворотке были либо низкими, либо не детектируемыми. Однако корреляция

между уровнями OSM в сыворотках и синовиальных жидкостях пациентов с ОА не была проведена, поскольку не было пар образцов.

Пример 16 - Чувствительный ELISA-анализ для обнаружения OSM в биологических образцах при низких концентрациях

Авторы изобретения разработали чувствительный ELISA-анализ для измерения OSM в биологических образцах с использованием иммобилизованного антитела OM4-11.31, специфичного к сайту III OSM. Этот ELISA делает возможным обнаружение OSM до < 2 пг/мл, как показано на Фиг. 37, и он был использован для анализа образцов сыворотки и синовиальной жидкости.

Протокол для использования этого ELISA с образцами сыворотки или синовиальных жидкостей приведен ниже.

Протокол OSM ELISA

МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

11. Планшет Nunc Immunoplate F96 maxisorp (Life Technologies 4-39454A)
12. Моноклональные антитела против человеческого OSM (OM4-11.31 GSK)
13. Гликозилированный hOSM, 420 мкг/мл (гликозилирован клетками CHO)
14. Биотинилированные антитела козы против человеческого OSM, 50 мкг/мл (R&D Systems BAF295)
15. Стрептавидин-пероксидаза хрена (HPR) (Amersham RPN4401)
16. PBS (SIGMA D8537, 1 л)
17. BSA (SIGMA A7888, 500 г)
18. Раствор фенола красного 0,5% (SIGMA P0290, 100 мл)
19. TMB (SIGMA T-8665 1L)
20. Пул нормальной мужской сыворотки группы АВ в качестве контроля (SIGMA H4522), партия № 043K0500
21. Серная кислота, 1 М
22. Таблетки PBS (SIGMA P4417, 100 таблеток)
23. Tween 20 (Sigma P7949)
24. Приспособления для заклеивания планшетов

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление планшетов

Разводят моноклональные антитела против человеческого OSM до 4 мкг/мл в PBS.

Добавляют по 50 мкл в лунки, накрывают герметизирующей полоской и инкубируют в течение ночи при 4°C.

Промывочный буфер

К 5 л деионизированной воды добавляют 25 таблеток PBS + 2,5 мл Tween 20 (0,05%).

Блокирующий буфер

К 500 мл PBS добавляют 10 г BSA (2%).

(Добавляют 800 мкл фенола красного и 5 М NaOH, пока pH не станет нейтральным).

Контрольная сыворотка крови АВ

Центрифугируют 100 мл в центрифуге Sorvall @ 16K, 30 мин (используют 4 пробирки Oakridge, уравновешенные до 0,02 г).

Пропускают супернатант через стерильную марлю (все еще мутный, но без частиц).

Разделяют на аликвоты и замораживают.

В день анализа оттаивают сыворотку АВ, центрифугируют на микроцентрифуге 13K в течение 5 мин и разбавляют 1:4 в PBS (сыворотка обычно непрозрачная, но пригодна для использования).

Приготовление стандартов

Для анализа сыворотки готовят стандарты в сыворотке АВ, разбавленной 1:4 в PBS.

Для анализа СЖ готовят стандарты в 1%-ном BSA в PBS.

Если желательна максимальная чувствительность: используют стандарты OSM при 112, 56, 28, 14, 7, 3,5, 1,75 и 0 пг/мл.

МЕТОДИКА

1. Промывают планшет 4× промывочным буфером и осушают.
2. Добавляют по 200 мкл/лунку блокирующего буфера, герметизируют планшет и встряхивают 2 часа при КТ или оставляют статично на ночь при +4.

3. Промывают как на стадии 1.

4. Добавляют по 50 мкл/лунку стандарта или образца. Накрывают и встряхивают 2 часа при комнатной температуре.

(Стандарт разбавляют в 25%-ной объединенной в пул сыворотке АВ, если образцы сыворотки необходимо анализировать).

5. Промывают как на стадии 1.

6. Добавляют по 50 мкл/лунку биотинилированных антител против человеческого OSM, разбавленных до 50 нг/мл в блокирующем буфере с 1%-ной сывороткой козы. Накрывают и встряхивают 1 час при комнатной температуре.

7. Промывают как на стадии 1.

8. Добавляют по 50 мкл/лунку стрептавидина-НPR 1/4000 в блокирующем буфере. Накрывают и встряхивают 30 минут при КТ.

9. Промывают как на стадии 1.

10. Добавляют по 100 мкл субстрата ТМВ. Накрывают и встряхивают 40 минут при КТ.

11. Для остановки анализа добавляют по 50 мкл/лунку 1М H₂SO₄.

12. Считывают немедленно при 450 нм после встряхивания планшета.

5 <110> Глаксо Груп Лимитед
 Эллис, Джонатан Генри
 Эон-Дюваль, Александр
 10 Гермашевски, Фолькер
 Пламптон, Кристофер
 Рэпсон, Николас Тимоти
 15 Уэст, Майкл Роберт

<120> Иммуноглобулины

20 <130> GCN/PB60806

25 <140> PCT/GB2005/001147
 <141> 2005-03-29

30 <150> GB 0407197.3
 <151> 2004-03-30

35 <150> GB 0407193.2
 <151> 2004-03-30

40 <160> 65

<170> PatentIn version 3.1

45 <210> 1
 <211> 5
 <212> ПРТ
 50 <213> Mus sp.

<400> 1
 Asn Tyr Gly Val His
 1 5
 5
 <210> 2
 <211> 16
 <212> ПРТ
 10
 <213> Mus sp.
 <400> 2
 15
 Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met Ser
 1 5 10 15
 <210> 3
 20
 <211> 12
 <212> ПРТ
 <213> Mus sp.
 25
 <400> 3
 Ser Pro Asn Ser Asn Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10
 30
 <210> 4
 <211> 10
 35
 <212> ПРТ
 <213> Mus sp.
 40
 <400> 4
 Ser Gly Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
 1 5 10
 45
 <210> 5
 <211> 7
 <212> ПРТ
 50
 <213> Mus sp.

<400> 5

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

5

<210> 6

<211> 9

<212> ПPT

10

<213> Mus sp.

<400> 6

15

Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> 7

20

<211> 120

<212> ПPT

<213> Mus sp.

25

<400> 7

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

30

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

35

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

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
50 55 60

40

Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Arg Ser Gln Val Phe Phe
65 70 75 80

45

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Lys Ser Pro Asn Ser Asn Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr
100 105 110

50

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8
 <211> 106
 <212> ПРТ
 <213> Mus sp.

 <400> 8
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Gly Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Glu
 35 40 45
 Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

 <210> 9
 <211> 120
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> VH домен (гуманизированный, B3)
 <400> 9
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
 20 25 30

RU 2 429 245 C2

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
 50 55 60
 5
 Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 10
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Lys Ser Pro Asn Ser Asn Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Arg
 100 105 110
 15
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 20
 <210> 10
 <211> 106
 <212> ПРТ
 25
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 30
 <223> VL домен (гуманизированный, L2)
 <400> 10
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 35
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Glu
 35 40 45
 40
 Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 45
 Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr
 85 90 95
 50

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

<210> 11

<211> 450

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тяжелая цепь (гуманизированная)

<400> 11

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

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

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

Ala Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
50 55 60

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Lys Ser Pro Asn Ser Asn Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Arg
100 105 110

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

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

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

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

RU 2 429 245 C2

	180	185	190
5	Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys 195 200 205		
	Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp 210 215 220		
10	Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly 225 230 235 240		
	Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile 245 250 255		
15	Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu 260 265 270		
20	Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His 275 280 285		
	Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg 290 295 300		
25	Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys 305 310 315 320		
	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu 325 330 335		
30	Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr 340 345 350		
35	Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu 355 360 365		
	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp 370 375 380		
40	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val 385 390 395 400		
45	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp 405 410 415		
	Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His 420 425 430		
50	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro 435 440 445		

Gly Lys
450

<210> 12

<211> 213

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Легкая цепь (гуманизированная)

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

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

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

RU 2 429 245 C2

	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	
				180					185					190			
5	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	
			195					200					205				
	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys												
			210														
10																	
	<210> 13																
	<211> 252																
	<212> IIPT																
15	<213> Homo sapiens																
20	<400> 13																
	Met	Gly	Val	Leu	Leu	Thr	Gln	Arg	Thr	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Leu	Ala	
	1				5					10					15		
25	Leu	Leu	Phe	Pro	Ser	Met	Ala	Ser	Met	Ala	Ala	Ile	Gly	Ser	Cys	Ser	
				20					25					30			
	Lys	Glu	Tyr	Arg	Val	Leu	Leu	Gly	Gln	Leu	Gln	Lys	Gln	Thr	Asp	Leu	
			35					40					45				
30																	
	Met	Gln	Asp	Thr	Ser	Arg	Leu	Leu	Asp	Pro	Tyr	Ile	Arg	Ile	Gln	Gly	
		50					55					60					
35	Leu	Asp	Val	Pro	Lys	Leu	Arg	Glu	His	Cys	Arg	Glu	Arg	Pro	Gly	Ala	
	65					70				75						80	
	Phe	Pro	Ser	Glu	Glu	Thr	Leu	Arg	Gly	Leu	Gly	Arg	Arg	Gly	Phe	Leu	
				85						90					95		
40																	
	Gln	Thr	Leu	Asn	Ala	Thr	Leu	Gly	Cys	Val	Leu	His	Arg	Leu	Ala	Asp	
				100					105					110			
45	Leu	Glu	Gln	Arg	Leu	Pro	Lys	Ala	Gln	Asp	Leu	Glu	Arg	Ser	Gly	Leu	
			115					120					125				
	Asn	Ile	Glu	Asp	Leu	Glu	Lys	Leu	Gln	Met	Ala	Arg	Pro	Asn	Ile	Leu	
		130					135					140					
50																	
	Gly	Leu	Arg	Asn	Asn	Ile	Tyr	Cys	Met	Ala	Gln	Leu	Leu	Asp	Asn	Ser	
	145					150					155					160	

	Asp Thr Ala Glu Pro Thr Lys Ala Gly Arg Gly Ala Ser Gln Pro Pro	
	165	170 175
5	Thr Pro Thr Pro Ala Ser Asp Ala Phe Gln Arg Lys Leu Glu Gly Cys	
	180	185 190
	Arg Phe Leu His Gly Tyr His Arg Phe Met His Ser Val Gly Arg Val	
	195	200 205
10	Phe Ser Lys Trp Gly Glu Ser Pro Asn Arg Ser Arg Arg His Ser Pro	
	210	215 220
15	His Gln Ala Leu Arg Lys Gly Val Arg Arg Thr Arg Pro Ser Arg Lys	
	225	230 235 240
	Gly Lys Arg Leu Met Thr Arg Gly Gln Leu Pro Arg	
	245	250
20	<210> 14	
	<211> 759	
	<212> ДНК	
25	<213> Homo sapiens	
	<400> 14	
30	atgggggtac tgctcacaca gaggacgctg ctcaagtctgg tccttgcaact cctgtttcca	60
	agcatggcga gcatggcggc tataggcagc tgctcgaaag agtaccgcgt gctccttggc	120
	cagctccaga agcagacaga tctcatgcag gacaccagca gactcctgga cccctatata	180
35	cgtatccaag gcctggatgt tcctaaactg agagagcact gcagggagcg ccccggggcc	240
	ttccccagtg aggagacct gagggggctg ggcaggcggg gcttcttgca gacctcaat	300
	gccacactgg gctgcgtcct gcacagactg gccgacttag agcagcgcct cccaaggcc	360
40	caggatttg agaggtctgg gctgaacatc gaggacttgg agaagctgca gatggcgagg	420
	ccgaacatcc tcgggctcag gaacaacatc tactgcatgg ccagctgct ggacaactca	480
	gacacggctg agcccacgaa ggctggccgg ggggcctctc agccgcccac cccacccct	540
45	gcctcgatg cttttcagcg caagctggag ggctgcaggt tcctgcatgg ctaccatcg	600
	ttcatgcact cagtggggcg ggtcttcagc aagtgggggg agagcccgaa ccggagccgg	660
	agacacagcc cccaccaggc cctgaggaag ggggtgcgca ggaccagacc ctccaggaaa	720
50	ggcaagagac tcatgaccag gggacagctg ccccggtag	759

	<210>	15	
	<211>	360	
	<212>	ДНК	
5	<213>	Mus sp.	
	<400>	15	
10	caggtgcaac tgaagcagtc aggacctggc ctagtgcagc cctcacagag cctgtccata	60	
	acctgcacag tctctggttt ctcattaact aattatgggtg tacactgggt tcgccagtct	120	
	ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagtg atatggagag gtggaagcac agactacaat	180	
15	gcagctttca tgtccagact gagcatcacc aaggacaact ccaggagcca agttttcttt	240	
	aaaatgaaca gtctacaagc tgatgacact gccatatact actgtgccaa aagtccgaat	300	
	agtaactttt actggtattt cgatgtctgg ggcacaggga ccacggtcac cgtctcctca	360	
20	<210>	16	
	<211>	318	
	<212>	ДНК	
25	<213>	Mus sp.	
	<400>	16	
30	caaattgttc tcacccagtc tccaacaatc atgtotgcat ctccagggga gaaggtcacc	60	
	atgacctgca gtggcagctc aagtgtagt tacatgtatt ggtaccagga gaagccagga	120	
	tcctcccca gactcctgat tgaagacaca tccaacctgg cttctggagt ccctgctcgc	180	
35	ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcaca tcagccgaat ggaggctgaa	240	
	gatgctgcc cttattactg tcaacagtgg agtagttatc caccacggt cggctcgggg	300	
	acaaagttgg aaatcaaa	318	
40	<210>	17	
	<211>	360	
	<212>	ДНК	
45	<213>	Искусственная последовательность	
	<220>		
50	<223>	VH домен (гуманизированный, PN, B3)	
	<400>	17	
	caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc	60	

	tcctgtgcag cgtctggatt ctcattaact aattatgggtg tacactgggt ccgccaggct	120
	ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtg atatggagag gtggaagcac agactacaat	180
5	gcagctttca tgtcccgatt caccatctcc aaggacaatt ccaagaacac gctgtatctg	240
	caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgaa aagtccgaat	300
	agtaactttt actggtattt cgatgtctgg ggccgtggca cactagtcaac agtctcctca	360
10	<210> 18	
	<211> 318	
	<212> ДНК	
15	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
20	<223> VL домен (гуманизированный, PN, L2)	
	<400> 18	
	gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
25	ctctcctgca gtggcagctc aagtgttaagt tacatgtatt ggtaccaaca gaaacctggc	120
	caggctccca ggctcctcat cgaagacaca tccaacctgg cttctggcat ccagccagg	180
	ttcagtggca gtgggtctgg gacagactac actctcacca tcagcaacct agagcctgaa	240
	gattttgcag tttattactg tcaacagtgg agtagttatc caccacggt tggccagggg	300
30	accaagctgg agatcaaa	318
	<210> 19	
35	<211> 1350	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
40	<220>	
	<223> Тяжелая цепь (гуманизированная, PN)	
45	<400> 19	
	caggtgcagc tggcggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc	60
	tcctgtgcag cgtctggatt ctcattaact aattatgggtg tacactgggt ccgccaggct	120
	ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtg atatggagag gtggaagcac agactacaat	180
50	gcagctttca tgtcccgatt caccatctcc aaggacaatt ccaagaacac gctgtatctg	240
	caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgaa aagtccgaat	300

	agtaactttt actggtattt cgatgtctgg ggccgtggca cactagtcac agtctcctca	360
	gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg	420
5	ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg	480
	tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca	540
	ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	600
10	tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc	660
	aaatcttgtg acaaaaactca cacatgccc cctgtcccag cacctgaact cctgggggga	720
	cogtcagtct tctcttccc cccaaaaccc aaggacacc tcatgatctc ccggaccct	780
15	gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	840
	tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac	900
	agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtctctgacc aggactggct gaatggcaag	960
20	gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc	1020
	aaagccaaag ggcagcccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggatgag	1080
	ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc	1140
25	gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg	1200
	ctggactcog acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg	1260
	cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacag	1320
30	cagaagagcc tctccctgtc tcogggtaaa	1350
	<210> 20	
	<211> 639	
35	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
40	<220>	
	<223> Легкая цепь (гуманизированная, PN)	
	<400> 20	
45	gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
	ctctcctgca gtggcagctc aagtgttaagt tacatgtatt ggtaccaaca gaaacctggc	120
	caggctccca ggctcctcat cgaagacaca tccaacctgg cttctggcat ccagccag	180
	ttcagtggca gtgggtctgg gacagactac actctacca tcagcaacct agagcctgaa	240
50	gattttgcag tttattactg tcaacagtgg agtagttatc caccacgtt tggccagggg	300
	accaagctgg agatcaaacg taoggtggct gcaccatctg tcttcatctt ccgccatct	360

gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 420
agagaggcca aagtacagtg gaagggtggac aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 480
5 agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 540
agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg 600
agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgt 639

10 <210> 21
<211> 120
<212> ПРТ

15 <213> Искусственная последовательность

<220>

20 <223> VH домен (B4, гуманизированный)
<400> 21

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

50 <210> 22
<211> 37

	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
5	<220>	
	<223> VH прямой праймер	
	<400> 22	
10	gatgaagctt gccaccatgg ctgtcctagg gctactc	37
	<210> 23	
	<211> 28	
15	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
20	<220>	
	<223> VH обратный праймер	
	<400> 23	
25	gatggactag tgtccctgtg ccccagac	28
	<210> 24	
	<211> 37	
30	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
35	<220>	
	<223> VL прямой праймер	
	<400> 24	
40	gatgaagctt gccaccatgg attttcaggt gcagatt	37
	<210> 25	
	<211> 31	
45	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
50	<220>	
	<223> VL обратный праймер	
	<400> 25	

gatgcgtacg tttgatttcc aactttgtcc c

31

<210> 26

5 <211> 124

<212> NPPT

<213> Homo sapiens

10

<400> 26

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

15

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

20

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

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

25

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

30

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

Arg Ser Pro Ser Ser Gly Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
100 105 110

35

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 27

40

<211> 121

<212> NPPT

<213> Homo sapiens

45

<400> 27

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

50

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20

25

30

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

5

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

10

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

15

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

20

Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 28

25

<211> 106

<212> NPT

<213> Homo sapiens

30

<400> 28

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

35

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

40

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

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

45

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
65 70 75 80

50

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile

100

105

<210> 29

5

<211> 116

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

10

<220>

<223> Гуманизированный VH конструктор A1

15

<400> 29

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

20

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

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

25

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
50 55 60

30

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

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

35

Lys Ser Pro Asn Ser Asn Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

40

Gly Thr Thr Ser
115

<210> 30

<211> 116

45

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

50

<220>

<223> Гуманизированный VH конструктор A2

<400> 30

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

5

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

10

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

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
50 55 60

15

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

20

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

Lys Ser Pro Asn Ser Asn Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

25

Gly Thr Thr Ser
115

<210> 31

30

<211> 116

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

35

<220>

<223> Гуманизированный VH конструктор АЗ

40

<400> 31

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

45

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

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

50

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met

50

55

60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

5

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

10

Lys Ser Pro Asn Ser Asn Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Ser
115

15

<210> 32

<211> 116

20

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

25

<220>

<223> Гуманизированный VH конструктор A4

<400> 32

30

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

35

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

40

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

45

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

50

Lys Ser Pro Asn Ser Asn Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Ser

115

<210> 33

5

<211> 116

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

10

<220>

<223> Гуманизированный VH конструктор B1

15

<400> 33

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

20

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

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

25

Ala Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
50 55 60

30

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

35

Arg Ser Pro Asn Ser Asn Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Arg
100 105 110

40

Gly Thr Leu Val
115

<210> 34

45

<211> 116

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

50

<220>

<223> Гуманизированный VH конструктор B2

<400> 34

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

5

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

10

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

Ala Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
50 55 60

15

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

20

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

Lys Ser Pro Asn Ser Asn Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Arg
100 105 110

25

Gly Thr Leu Val
115

<210> 35

30

<211> 116

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

35

<220>

<223> Гуманизированный VH конструктор В3

40

<400> 35

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

45

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

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

50

Ala Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met

50

55

60

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

5

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

10

Lys Ser Pro Asn Ser Asn Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Arg
100 105 110

Gly Thr Leu Val
115

15

<210> 36

<211> 116

20

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

25

<220>

<223> Гуманизированный VH конструктор В4

<400> 36

30

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

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

35

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

40

Ala Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

45

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

50

Lys Ser Pro Asn Ser Asn Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Arg
100 105 110

Gly Thr Leu Val

115

<210> 37

5 <211> 106

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

10

<220>

<223> Гуманизированный VL конструктор L1

15 <400> 37

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

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

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

25

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

30 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80

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

35

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

<210> 38

40

<211> 106

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

45

<220>

<223> Гуманизированный VL конструктор L2

50 <400> 38

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

RU 2 429 245 C2

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Glu
 5 35 40 45
 Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro Glu
 10 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr
 15 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 39
 <211> 19
 <212> ПРТ
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 39
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 30 1 5 10 15
 Val His Ser
 35 <210> 40
 <211> 5
 40 <213> Mus sp.
 <400> 40
 45 Asp Tyr Asn Met Asp
 1 5
 <210> 41
 50 <211> 17
 <212> ПРТ

<213> Mus sp.

<400> 41

5

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

Asp

10

<210> 42

<211> 12

15

<212> ПРТ

<213> Mus sp.

20

<400> 42

Gly Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser His Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

25

<210> 43

<211> 10

<212> ПРТ

30

<213> Mus sp.

<400> 43

35

Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Val Met His
1 5 10

<210> 44

40

<211> 7

<212> ПРТ

<213> Mus sp.

45

<400> 44

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

50

<210> 45

<211> 9
 <212> ППТ
 <213> Mus sp.
 5
 <400> 45
 10 Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 46
 <211> 121
 15 <212> ППТ
 <213> Mus sp.
 20 <400> 46
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 25 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Lys Leu Glu Trp Ile
 30 35 40 45
 Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ile Asp Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 35 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 40 85 90 95
 Ala Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser His Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 45 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 47
 50 <211> 106
 <212> ППТ

<213> Mus sp.

<400> 47

5

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

10

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

His Trp Phe Gln Lys Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

15

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

20

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

Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
85 90 95

25

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

<210> 48

30

<211> 121

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

35

<220>

<223> VH домен (гуманизированный, B3)

40

<400> 48

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

45

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

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

50

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ile Asp Asn Gln Lys Phe

50

55

60

5

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

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

10

Ala Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser His Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

15

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 49

<211> 106

20

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

25

<220>

<223> VL домен (гуманизированный, L2)

<400> 49

30

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Val Met
20 25 30

35

His Trp Phe Gln Lys Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

40

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

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

45

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
85 90 95

50

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 50

<211> 451

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

5

<220>

<223> Тяжелая цепь (гуманизированная)

10

<400> 50

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

15

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

20

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

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

25

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

30

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

Ala Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser His Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

35

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

40

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

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

45

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

50

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His

RU 2 429 245 C2

	195	200	205
5	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys 210 215 220		
	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly 225 230 235 240		
10	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met 245 250 255		
	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His 260 265 270		
15	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val 275 280 285		
20	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr 290 295 300		
	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly 305 310 315 320		
25	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile 325 330 335		
30	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val 340 345 350		
	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser 355 360 365		
35	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu 370 375 380		
40	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro 385 390 395 400		
	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val 405 410 415		
45	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met 420 425 430		
50	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser 435 440 445		
	Pro Gly Lys		

450

<210> 51

5

<211> 213

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

10

<220>

<223> Легкая цепь (гуманизированная)

15

<400> 51

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

20

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Val Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Lys Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

25

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

30

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
85 90 95

35

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

40

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

45

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

50

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

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala

180

185

190

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

5

Asn Arg Gly Glu Cys
210

10

<210> 52

<211> 363

<212> ДНК

15

<213> Mus sp.

<400> 52

20

gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60

tccctgcaagg cctctggata catattcact gactacaaca tggactgggt gaagcagagc 120

catggaaaaga aacttgagtg gattggagat attaatccta ataatgggtg tactatcgac 180

aaccagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca agtcctccag cacagcctac 240

25

atggagctcc gcagcctgac atctgaggac actgcagtct attactgtgc aagagggatt 300

tattactacg gtagtcacta ctttgactat tggggccaag gcaccactct cacagtctcc 360

tca 363

30

<210> 53

<211> 318

<212> ДНК

35

<213> Mus sp.

<400> 53

40

caaattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60

atgacctgca gtgccacctc aagtgttaagt gtcatgcact ggttccagaa gaagtcaggt 120

acctccccca aaagatggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt cctactcgc 180

45

ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagtagcat ggaggttgaa 240

gatactgcca cttattactg ccagcagtg agtagtaacc cactcacgtt cggttctggg 300

accaagctgg agctgaaa 318

50

<210> 54

<211> 363

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

5

<220>

<223> VH домен (гуманизированный, PN, B3)

<400> 54

10 gaggtccagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
tcctgcaagg catctggata catattcacc gactacaaca tggactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaaa aacttgagtg gattggagat attaatccta ataatgggtg tactatcgac 180
15 aaccagaagt tcaaggacag agccaccttg accgtagaca agtccacgag cacagtctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagggatt 300
tattactacg gtagtacta ctttgactat tggggccagg gaacactagt cacagtctcc 360
20 tca 363

<210> 55

<211> 318

25

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

30

<220>

<223> VL домен (гуманизированный, PN, L2)

<400> 55

35 gaaattgtgt tgacgcagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctggttgaga cagagtcacc 60
atcacttgca gtgccacctc aagtgtgaagt gtcatgcact ggttcagaa gaaaccaggg 120
aaagccccta agagatggat ctatgacaca tccaaactgg cttctggggg cccatcaagg 180
40 ttcagtgga gtggatctgg gacagattac actctacca tcagcagttt gaaacctgaa 240
gattttgcaa cttattactg ccagcagtg agtagtaacc cactcacgtt cggcgagggg 300
accaagtgg atatcaaa 318

45

<210> 56

<211> 1353

<212> ДНК

50

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тяжелая цепь (гуманизированная, PN)

<400> 56

5	gaggtccagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt	60
	tcctgcaagg catctggata catattcacc gactacaaca tggactgggt gcgacaggcc	120
	cctggacaaa aacttgagtg gattggagat attaatecta ataatgggtg tactatcgac	180
10	aaccagaagt tcaaggacag agccaccttg accgtagaca agtccacgag cacagtctac	240
	atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagggatt	300
	tattactacg gtagtcaact ctttgactat tggggccagg gaacactagt cacagtctcc	360
15	tcagcctcca ccaagggccc atcgggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct	420
	gggggacacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacgggtg	480
	tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggtgt cctacagtcc	540
20	tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccacg	600
	acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag	660
	cccaaattctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgctgc cagcaoctga actcctgggg	720
25	ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca cctcatgat ctcccgacc	780
	cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac	840
	tgggtacgtg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agccgcggga ggagcagtac	900
30	aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc	960
	aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc	1020
	tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca cctgcccc atcccgggat	1080
35	gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcttggtca aaggcttcta tcccagcgac	1140
	atgcctgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc	1200
	gtgctggact ccgacggctc cttcttcttc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg	1260
40	tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggcctctgca caaccactac	1320
	acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa	1353

<210> 57

45

<211> 639

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

50

<220>

<223> Легкая цепь (гуманизированная, PN)

<400> 57

gaaattgtgt tgacgcagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgttgagaga sagagtcacc 60
5 atcacttgca gtgccacctc aagtgttaagt gtcattgact gggtccagaa gaaaccaggg 120
aaagccccta agagatggat ctatgacaca tccaaactgg cttctggggg cccatcaagg 180
ttcagtggca gtggatctgg gacagattac actctcacca tcagcagtct gcaacctgaa 240
10 gatttttgcaa cttattactg ccagcagtgg agtagtaacc cactcacgtt cggcggaggg 300
accaagtgg atatcaaagc tacgggtggc gcaccatctg tcttcattct cccgccatct 360
gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 420
15 agagaggcca aagtacagtg gaaggtggac aacgcctcc aatcgggtaa ctcccaggag 480
agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 540
agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgag aagtcaccca tcagggcctg 600
20 agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgt 639

<210> 58

<211> 37

25

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

30

<220>

<223> VH прямой праймер

<400> 58

35 gatgaagctt gccaccatgg gatggagctg ggtcttt 37

<210> 59

<211> 37

40

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

45

<220>

<223> VL прямой праймер

<400> 59

50 gatgaagctt gccaccatgg atttacaggt gcagatt 37

<210> 60

<211> 31
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 5
 <220>
 <223> VL обратный праймер
 10
 <400> 60
 gatgcgtacg tttcagctcc agcttggtcc c 31
 <210> 61
 15
 <211> 450
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 20
 <220>
 <223> Тяжелая цепь (гуманизированная, Fc мутированный)
 25
 <400> 61
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 30
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
 50 55 60
 40
 Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 45 85 90 95
 Lys Ser Pro Asn Ser Asn Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Arg
 100 105 110
 50
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

RU 2 429 245 C2

	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	
	130						135					140					
5	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	
	145					150					155					160	
	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	
					165					170					175		
10	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
				180					185					190			
15	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
			195					200					205				
	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	
	210						215					220					
20	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Ala	Gly	Ala	
	225					230					235					240	
25	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
					245					250					255		
	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
				260					265					270			
30	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
			275					280					285				
35	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
	290						295					300					
	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
	305					310					315					320	
40	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	
					325					330					335		
45	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	
				340					345					350			
	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
			355					360					365				
50	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
	370						375					380					

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

5 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

10 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

15 Gly Lys
450

<210> 62

<211> 1350

20 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

25 <220>

<223> Тяжелая цепь (гуманизированная, Fc мутированный, PN)

<400> 62

30 cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt ctcattaact aattatgggtg tacactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtg atatggagag gtggaagcac agactacaat 180
gcagctttca tgtcccgatt caccatctcc aaggacaatt ccaagaacac gctgtatctg 240
35 caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgaa aagtccgaat 300
agtaactttt actggtattt cgatgtcttg ggccgtggca cactagtcac agtctctca 360
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcacccct cctccaagag cacctctggg 420
40 ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg 480
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctctca 540
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 600
45 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660
aaatcttgtg acaaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaact cgcgggggca 720
ccgtcagttc tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcctgatctc ccggaccctc 780
50 gaggtcacat gcgtgggtggg ggacgtgagc caccgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840
tacgtggagc gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900

agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020
5 aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 1080
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200
10 ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350

15 <210> 63
<211> 252
<212> IIPT
20 <213> Macaca fascicularis

<400> 63

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

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Ala Met Gly Ser Cys Ser
20 25 30

30 Lys Glu Tyr Arg Met Leu Leu Gly Gln Leu Gln Lys Gln Thr Asp Leu
35 40 45

35 Met Gln Asp Thr Ser Arg Leu Leu Asp Pro Tyr Ile Arg Ile Gln Gly
50 55 60

Leu Asp Ile Pro Lys Leu Arg Glu His Cys Arg Glu Ser Pro Gly Ala
65 70 75 80

40 Phe Pro Ser Glu Glu Thr Leu Arg Gly Leu Gly Arg Arg Gly Phe Leu
85 90 95

45 Gln Thr Leu Asn Ala Thr Leu Gly Cys Val Leu His Arg Leu Ala Asp
100 105 110

Leu Glu Gln His Leu Pro Lys Ala Gln Asp Leu Glu Arg Ser Gly Leu
115 120 125

50 Asn Ile Glu Asp Leu Glu Lys Leu Gln Met Ala Arg Pro Asn Val Leu
130 135 140

RU 2 429 245 C2

	Gly	Leu	Arg	Asn	Asn	Val	Tyr	Cys	Met	Ala	Gln	Leu	Leu	Asp	Asn	Ser		
	145					150					155					160		
5	Asp	Met	Thr	Glu	Pro	Thr	Lys	Ala	Gly	Arg	Gly	Thr	Pro	Gln	Pro	Pro		
					165					170					175			
	Thr	Pro	Thr	Pro	Thr	Ser	Asp	Val	Phe	Gln	Arg	Lys	Leu	Glu	Gly	Cys		
					180					185					190			
10	Ser	Phe	Leu	Arg	Gly	Tyr	His	Arg	Phe	Met	His	Ser	Val	Gly	Arg	Ile		
			195					200						205				
15	Phe	Ser	Lys	Trp	Gly	Glu	Ser	Pro	Asn	Arg	Ser	Arg	Arg	His	Ser	Pro		
		210					215					220						
	His	Gln	Ala	Leu	Arg	Lys	Gly	Val	Arg	Arg	Thr	Arg	Pro	Ser	Arg	Lys		
	225					230					235					240		
20	Gly	Asn	Arg	Leu	Met	Pro	Arg	Gly	Gln	Leu	Pro	Arg						
					245					250								
25	<210>	64																
	<211>	759																
	<212>	ДНК																
	<213>	Macaca fascicularis																
30	<400>	64																
	atgggggtac	cgctcacacg	gaggacgctg	ctcagttctga	tccttgcaact	cctgttttcca											60	
35	agcatggcaa	gcatggcggc	tatgggcagc	tgctcgaaag	agtaccgcat	gctccttggc											120	
	cagctccaga	agcagacaga	tctcatgcag	gacaccagca	ggctcctgga	cccctatata											180	
	cgtatccaag	gcttgatat	tcctaaactg	agagagcaact	gcagagagag	cctgggggcc											240	
40	ttccccagcg	aggagaccct	gagggggctg	ggcaggcggg	gcttctctaca	gacgctcaat											300	
	gccacactgg	gctgcgctct	gcacagactg	gccgacttag	agcagcatct	ccccaaggcc											360	
	caggacttgg	agaggtcttg	gctgaacata	gaggacttag	agaagctgca	gatggcgagg											420	
45	ccgaatgtcc	tcgggctcag	gaacaacgtc	tactgcatgg	cccagctgct	ggacaactca											480	
	gacatgactg	agcccacgaa	ggccggccgg	gggacccttc	agccgcccac	ccccaccctt											540	
	acctcagatg	tttttcagcg	caagctggag	ggctgcagtt	tcctgcgtag	ctaccatcgc											600	
50	ttcatgcact	cagtggggcg	gatcttcagc	aagtgggggg	agagcccgaa	ccggagccgg											660	
	agacacagcc	cccaccaggc	cctgcggaag	ggggtgcgca	ggacgagacc	ctccaggaaa											720	

ggcaatagac tcatgcccag gggacagctg ccccggtag

759

<210> 65

5

<211> 28

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

10

<220>

<223> VH обратный праймер

15

<400> 65

gatggactag tgtgccttgg ccccaata

28

20

25

30

35

40

45

50

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ.I.D.NO:1

5

NYGVH

SEQ.I.D.NO:2

10

VIWRGGSTDYNAAFMS

SEQ.I.D.NO:3

15

SPNSNFYWFYFDV

SEQ.I.D.NO:4

20

SGSSSVSYMY

SEQ.I.D.NO:5

25

DTSNLAS

SEQ.I.D.NO:6

QQWSSYPPT

SEQ.I.D.NO:7

30

QVQLKQSGPGLVQPSSQLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWRGG
STDYNAAFMSRLSITKDNSRSQVFFKMNSLQADDTAIYYCAKSPNSNFYWFYFDVW
GTGTTVTVSS

35

SEQ.I.D.NO:8

QIVLTQSPTIMSASPGEKVTMTCSGSSSVSYMYWYQEKPGSSPRLLIEDTSNLAS
GVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWSSYPPTFGSGTKLEIK

40

45

50

SEQ.I.D.NO:9

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRGG
 STDYNAAFMSRFTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWYFDVW
 GRGTLVTVSS

SEQ.I.D.NO:10

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSGSSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIEDTSNLTAS
 GIPARFSGSGSGTDYTLTISNLEPEDFAVYYCQQWSSYPPTFGQGTKLEIK

SEQ.I.D.NO:11

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRGG
 STDYNAAFMSRFTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWYFDVW
 GRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
 LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
 KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
 LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
 SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYT
 QKSLSLSLSPGK

SEQ.I.D.NO:12

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSGSSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIEDTSNLTAS
 GIPARFSGSGSGTDYTLTISNLEPEDFAVYYCQQWSSYPPTFGQGTKLEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
 DSKDSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ.I.D.NO:15

CAGGTGCAACTGAAGCAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCCTCACAGAGCCTGT
CCATAACCTGCACAGTCTCTGGTTTCTCATTAACTAATTATGGTGTACACTGGGT
TCGCCAGTCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTGATATGGAGAGGTGGA
AGCACAGACTACAATGCAGCTTTCATGTCCAGACTGAGCATCACCAAGGACAAC
CCAGGAGCCAAGTTTTCTTTAAATGAACAGTCTACAAGCTGATGACACTGCCAT
ATACTACTGTGCCAAAAGTCCGAATAGTAACTTTTACTGGTATTTTCGATGTCTGG
GGCACAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ.I.D.NO:16

CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAACAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGG
TCACCATGACCTGCAGTGGCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGTATTGGTACCAGGA
GAAGCCAGGATCCTCCCCCAGACTCCTGATTGAAGACACATCCAACCTGGCTTCT
GGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCAAA
TCAGCCGAATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGTCAACAGTGGAGTAG
TTATCCACCCACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATCAAA

SEQ.I.D.NO:17

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGA
GACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCTCATTAACTAATTATGGTGTACACTGGGT
CCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTGATATGGAGAGGTGGA
AGCACAGACTACAATGCAGCTTTCATGTCCCGATTACCATCTCCAAGGACAATT
CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGT
GTATTACTGTGCGAAAAGTCCGAATAGTAACTTTTACTGGTATTTTCGATGTCTGG
GGCCGTGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCA

SEQ.I.D.NO:18

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAG
CCACCCTCTCCTGCAGTGGCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGTATTGGTACCAACA
GAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCGAAGACACATCCAACCTGGCTTCT
GGCATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTACACTCTCACCA
TCAGCAACCTAGAGCCTGAAGATTTTGAGTTTATTACTGTCAACAGTGGAGTAG
TTATCCACCCACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

SEQ.I.D.NO:19

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGA
 GACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCTCATTAACTAATTATGGTGTACACTGGGT
 5 CCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTGATATGGAGAGGTGGA
 AGCACAGACTACAATGCAGCTTTCATGTCCCGATTACCATCTCCAAGGACAATT
 CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGT
 10 GTATTACTGTGCGAAAAGTCCGAATAGTAACTTTTACTGGTATTTTCGATGTCTGG
 GGCCGTGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCT
 TCCCCCTGGCACCcTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG
 CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCC
 CTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCTCAGGACTCTACT
 15 CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACAT
 CTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCC
 AAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGG
 GGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC
 20 CCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAG
 GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
 CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTT
 GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC
 25 CTCCCAGCCCCCAtCGAGAAAACCAtCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC
 CACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGaACCAGGTGAG
 CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG
 AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCG
 30 ACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA
 GGGGAACGTcTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG
 CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ.I.D.NO:20

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAG
 40 CCACCCCTCTCCTGCAGTGGCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGTATTGGTACCAACA

GAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCGAAGACACATCCAACCTGGCTTCT
GGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTACACTCTCACCA
TCAGCAACCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAACAGTGGAGTAG
5 TTATCCACCCACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTACGGTGGCT
GCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGT
CCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTG
GAAGGTGGACAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAG
10 GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAG
ACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTC
GCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

15 SEQ.I.D.NO:21

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRG
GSTDYNAAFMSRLTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWFYFD
20 VWGRGTLVTVSS

SEQ.I.D.NO:40

DYNMD

SEQ.I.D.NO:41

DINPNNGGTIDNQKFKD

30 SEQ.I.D.NO:42

GIYYYGSHYFDY

35 SEQ.I.D.NO:43

SATSSVSVMH

SEQ.I.D.NO:44

40 DTSKLAS

SEQ.I.D.NO:45

QQWSSNPLT

SEQ.I.D.NO:46

5 EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYIFTDYNMDWVKQSHGKKLEWIGDINPNN
GGTIDNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDVAVYYCARGIYYYYGSHYFDY
WGQGTTLTVSS

10 SEQ.I.D.NO:47

QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSATSSVSVMHWFQKKSGTSPKRWIYDTSKLAS
GVPTFRFSGSGSGTSSYSLTISSMEAEDTATYYCQQWSSNPLTFGSGTKLELK

15 SEQ.I.D.NO:48

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYIFTDYNMDWVRQAPGQKLEWIGDINPNN
GGTIDNQKFKDRATLTVDKSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARGIYYYYGSHYFDY
WGQGTTLTVSS

20

SEQ.I.D.NO:49

25 EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCSATSSVSVMHWFQKKPGKAPKRWIYDTSKLAS
GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKVDIK

SEQ.I.D.NO:50

30 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYIFTDYNMDWVRQAPGQKLEWIGDINPNN
GGTIDNQKFKDRATLTVDKSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARGIYYYYGSHYFDY
WGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSCDKHTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
35 ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHY
TQKSLSLSPGK

SEQ.I.D.NO:51

40 EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCSATSSVSVMHWFQKKPGKAPKRWIYDTSKLAS
GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKVDIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

45

50

SEQ.I.D.NO:52

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGA
AGATATCCTGCAAGGCCTCTGGATACATATTCAGTACTACAACATGGACTGGGT
GAAGCAGAGCCATGGAAAGAACTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCTAATAAT
GGTGGTACTATCGACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACA
AGTCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGC
AGTCTATTACTGTGCAAGAGGGATTTATTACTACGGTAGTCACTACTTTGACTAT
TGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

SEQ.I.D.NO:53

CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCAC
CATGACCTGCAGTGCCACCTCAAGTGTAAGTGTATGCACTGGTTCCAGAAGAAGTCAG
GTACCTCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCTACT
CGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGTAGCATGGAGGC
TGAAGATACTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCACTCACGTTTCGGTT
CTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

SEQ.I.D.NO:54

GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT
TTCCTGCAAGGCATCTGGATACATATTCACCGACTACAACATGGACTGGGTGCGACAGG
CCCCTGGACAAAACTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCTAATAATGGTGGTACTATC
GACAACCAGAAGTTCAAGGACAGAGCCACCTTGACCGTAGACAAGTCCACGAGCACAGT
CTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAG
GGATTTATTACTACGGTAGTCACTACTTTGACTATTGGGGCCAGGGAACACTAGTCACA
GTCTCCTCA

SEQ.I.D.NO:55

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTTGGAGACAGAGTCAC
CATCACTTGCAAGTGCCACCTCAAGTGTAAGTGTATGCACTGGTTCCAGAAGAAACCAG
GGAAAGCCCCCTAAGAGATGGATCTATGACACATCCAACTGGCTTCTGGGGTCCCATCA
AGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTACACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACC
TGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCACTCACGTTTCGGCG
GAGGGACCAAAGTGGATATCAAA

SEQ.I.D.NO:56

GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT
TTCCTGCAAGGCATCTGGATACATATTCACCGACTACAACATGGACTGGGTGCGACAGG

CCCCTGGACAAAACTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCTAATAATGGTGGTACTATC
 GACAACCAGAAGTTCAAGGACAGAGCCACCTTGACCGTAGACAAGTCCACGAGCACAGT
 CTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAG
 GGATTTATTACTACGGTAGTCACTACTTTGACTATTGGGGCCAGGGAACACTAGTCA
 GTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCcTCctCCAAGAG
 CACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGG
 TGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGGTGCACACCTTCCCCGCTGTC
 CTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTT
 GGGCACCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACA
 AGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCAACCGTGCCAGCACCT
 GAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCAT
 GATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTG
 AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG
 CGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCCTACCCGTCTGCAACA
 GGAAGTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCC
 CCAcCGAGAAAACCaTCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAAGGTGTACACC
 CTGCCCCCaTCCCGGGATGAGCTGACCAAGaACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAA
 AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCCGAGAAACA
 ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAG
 CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTcTTCTCATGCTCCGTGATGCA
 TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ.I.D.NO:57

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTTGGAGACAGAGTCAC
 CATCACTTGCACTGCCACCTCAAGTGTAAGTGTATGCACTGGTTCAGAAGAAACCAG
 GGAAAGCCCCTAAGAGATGGATCTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGGGTCCCATCA
 AGGTTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTACACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACC
 TGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCACTCACGTTCCGGC
 GAGGGACCAAAGTGGATATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTCTCCCG
 CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTT
 CTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGACAACGCCCTCCAATCGGGTAACT
 CCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACC
 CTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCA
 TCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ.I.D.NO:61

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRG
 GSTDYNAAFMSRFTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWFYFD
 VWGRGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
 KVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
 KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMH
 EALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ.I.D.NO:62

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTG
 AGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCTCATTAACATAATTATGGTGTACACTGG
 GTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTGATATGGAGAGGT
 GGAAGCACAGACTACAATGCAGCTTTTCATGTCCCGATTACCATCTCCAAGGAC
 AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACG
 GCTGTGTATTACTGTGCGAAAAGTCCGAATAGTAACCTTTTACTGGTATTTTCGAT
 GTCTGGGGGCCGTGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCA
 TCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC
 CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAAC
 TCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCTCA
 GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC
 CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG
 AAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCA
 CCTGAACTCGCGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGAC
 ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAATGCGTGGTGGTGACGTGAGC
 CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT
 AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC
 AGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
 AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCC
 AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGATGAG
 CTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC
 GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACC
 ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACC
 GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
 GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA

Формула изобретения

1. Терапевтическое антитело, которое специфически связывает сайт II онкостатина М человека (hOSM) и ингибирует взаимодействие между сайтом II hOSM и gp130, содержащее следующие CDR:

CDRH1 с SEQ ID NO: 1,
 CDRH2 с SEQ ID NO: 2,
 CDRH3 с SEQ ID NO: 3,
 CDRL1 с SEQ ID NO: 4,
 CDRL2 с SEQ ID NO: 5,
 CDRL3 с SEQ ID NO: 6.

2. Антитело по п.1, выбранное из группы, состоящей из интактного, химерного, гуманизированного, биспецифичного, гетероконъюгатного.

3. Антитело по п.2, являющееся гуманизированным.

4. Гуманизированное антитело по п.3, где остатки 28, 29, 30, 71 и 94 каркасного участка человеческой акцепторной вариабельной тяжелой цепи и положения 48 и 70 каркасного участка человеческой акцепторной вариабельной легкой цепи замещены соответствующими остатками в каркасном участке донорного антитела, из которого происходит CDRH3.

5. Антитело по п.4, где каркасный участок человеческой тяжелой цепи содержит следующие остатки (или их консервативные замены):

Положение Остатки

28	S
29	L
30	T
71	K
94	K,

5

и человеческая легкая цепь содержит следующие остатки (или их консервативные замены):

10

Положение Остатки	
48	E
70	Y.

6. Гуманизированное терапевтическое антитело по п.3, содержащее V_H-домен с SEQ ID NO: 9 и V_L-домен с SEQ ID NO: 10.

15

7. Гуманизированное терапевтическое антитело по п.3, содержащее тяжелую цепь с SEQ ID NO: 11 и легкую цепь с SEQ ID NO: 12.

20

8. Терапевтическое антитело по п.1, дополнительно содержащее константную область человеческой тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM.

9. Терапевтическое антитело по п.8, где константная область представляет собой изотип IgG, например IgG1 или IgG4.

10. Терапевтическое антитело по п.9, где константная область представляет собой IgG1.

25

11. Терапевтическое антитело по п.10, где константная область мутирована для того, чтобы сделать антитело нелигандным.

12. Терапевтическое антитело по любому из пп.1-11, где указанное антитело блокирует взаимодействие между сайтом II hOSM и gp130.

30

13. Антигенсвязывающий фрагмент терапевтического антитела по любому из пп.1-12.

14. Фрагмент по п.13, выбранный из группы, состоящей из Fab, Fab', Fd, F(ab)₂, ScFv.

35

15. Фармацевтическая композиция, ингибирующая взаимодействие между OSM и gp130, содержащая терапевтическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-14 в терапевтически эффективном количестве.

16. Способ лечения пациента человека, страдающего заболеванием или расстройством, чувствительным к ингибированию взаимодействия между hOSM и gp130, включающий стадию введения указанному пациенту терапевтически эффективного количества композиции по п.15.

40

17. Способ лечения пациента человека, страдающего хроническим воспалительным заболеванием или расстройством, включающий стадию введения указанному пациенту терапевтически эффективного количества композиции по п.15.

45

18. Способ лечения пациента человека, страдающего артритным заболеванием или расстройством, включающий стадию введения указанному пациенту терапевтически эффективного количества композиции по п.15.

19. Способ по п.18, где указанный пациент страдает ревматоидным артритом и/или остеоартритом.

50

20. Способ лечения пациента человека, страдающего воспалительным заболеванием легких, таким как астма или хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ), включающий стадию введения указанному пациенту терапевтически

эффективного количества композиции по п.15.

21. Способ лечения пациента человека, страдающего псориазом, включающий стадию введения указанному пациенту терапевтически эффективного количества композиции по п.15.

22. Способ лечения пациента человека, страдающего сердечно-сосудистым заболеванием или расстройством, таким как атеросклероз, включающий стадию введения указанному пациенту терапевтически эффективного количества композиции по п.15.

23. Способ лечения пациента человека, страдающего саркомой Капоши, включающий стадию введения указанному пациенту терапевтически эффективного количества композиции по п.15.

24. Применение терапевтического антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-14 в изготовлении лекарства для лечения заболевания, чувствительного к ингибированию взаимодействия между hOSM и gp130, такого как ревматоидный артрит, остеоартрит, псориаз, астма, ХОЗЛ.

25. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь и/или легкую цепь терапевтического антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-14, например содержащий полинуклеотид по п.26.

26. Полинуклеотид, кодирующий вариабельный домен гуманизированного терапевтического антитела по п.6 или 7, содержащий или состоящий по существу из SEQ ID NO: 17, либо содержащий или состоящий по существу из SEQ ID NO: 18, либо содержащий или состоящий по существу из SEQ ID NO: 19, либо содержащий или состоящий по существу из SEQ ID NO: 20.

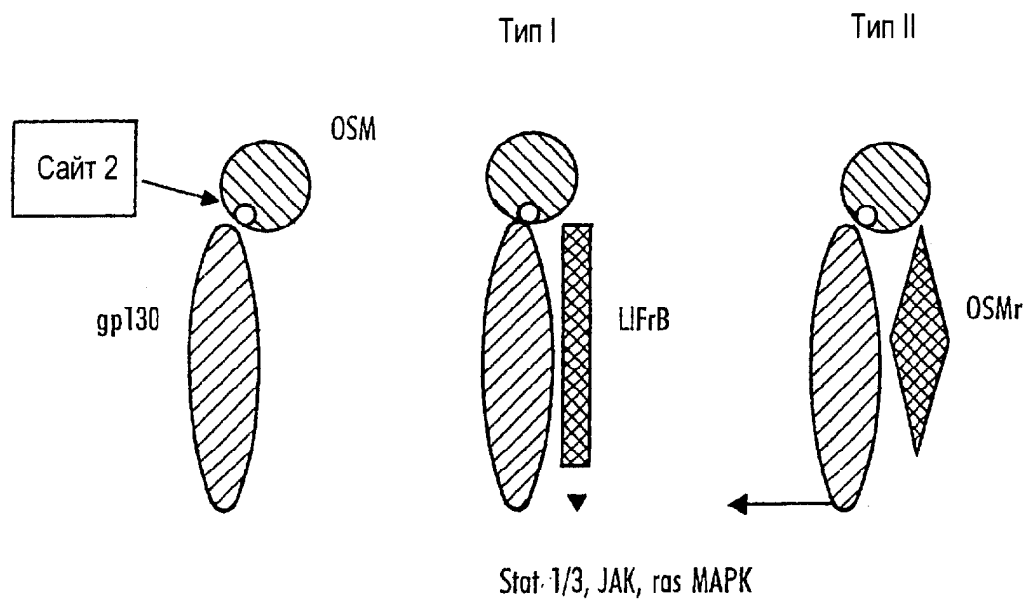
27. Стабильно трансформированная или трансфицированная рекомбинантная продуцирующая клетка-хозяин, содержащая вектор по п.25.

28. Стабильно трансформированная или трансфицированная рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая первый вектор, содержащий полинуклеотид с SEQ ID NO: 17, и второй вектор, содержащий полинуклеотид с SEQ ID NO: 18, либо первый вектор, содержащий полинуклеотид с SEQ ID NO: 19, и второй вектор, содержащий полинуклеотид с SEQ ID NO: 20.

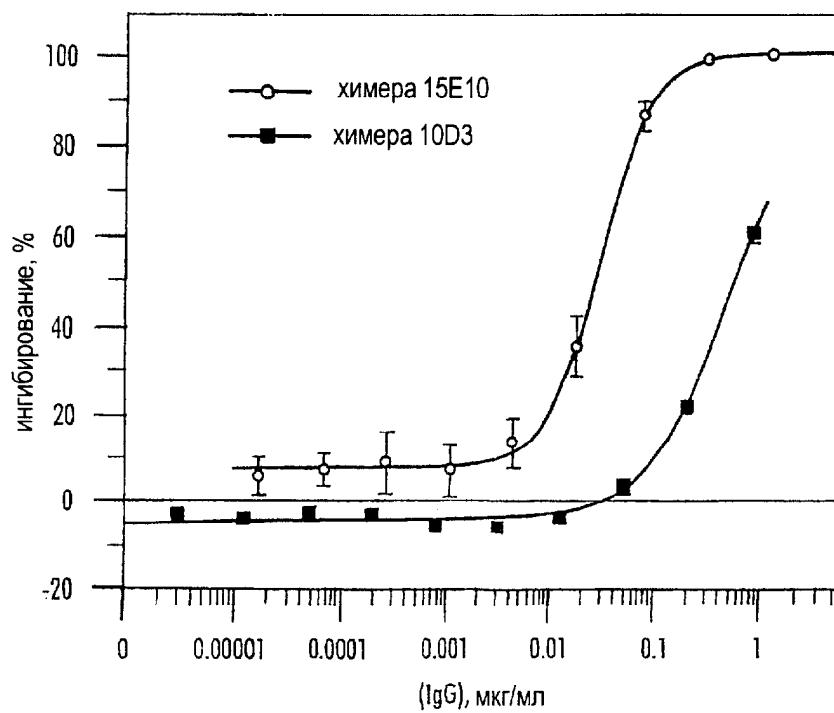
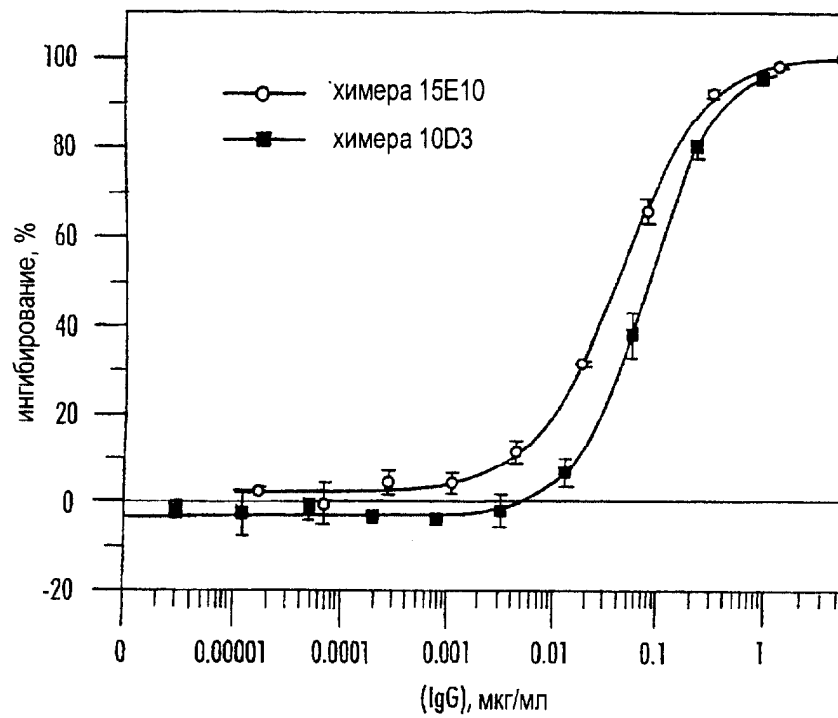
29. Клетка-хозяин по любому из пп.27 или 28, представляющая собой клетку млекопитающего.

30. Клетка-хозяин по п.29, представляющая собой клетку яичника китайского хомячка (линия CHO) или клетку мышины миеломы (линия NSO).

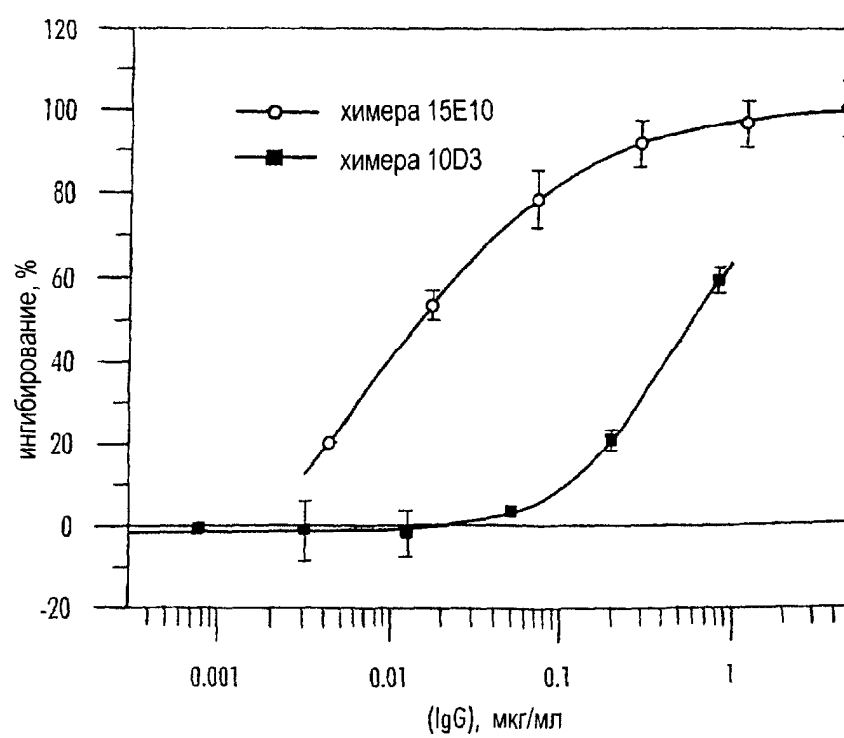
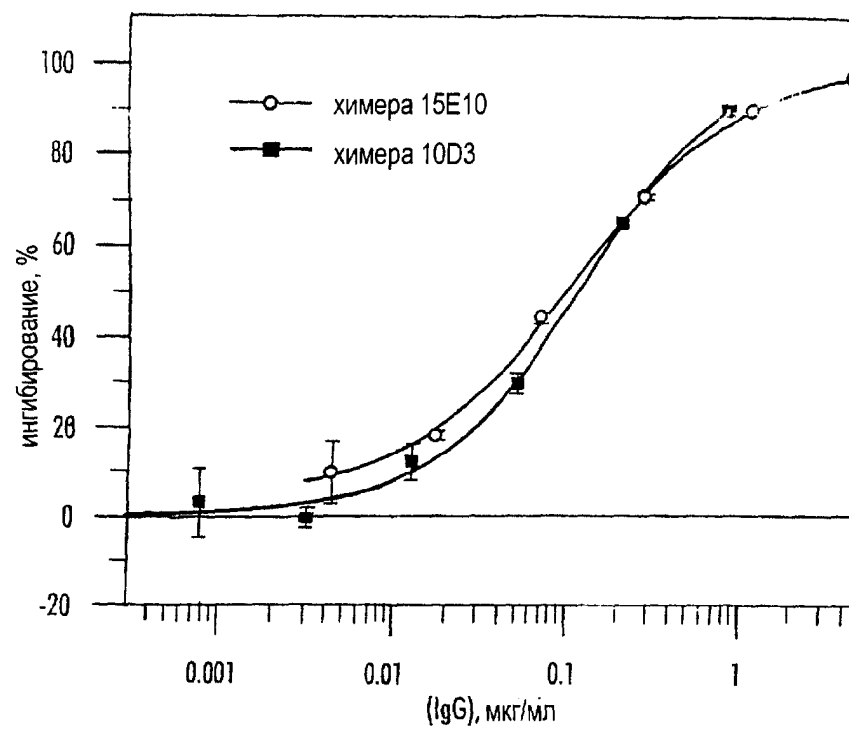
31. Способ получения терапевтического антитела, включающий стадию культивирования клетки-хозяина по любому из пп.27-30.



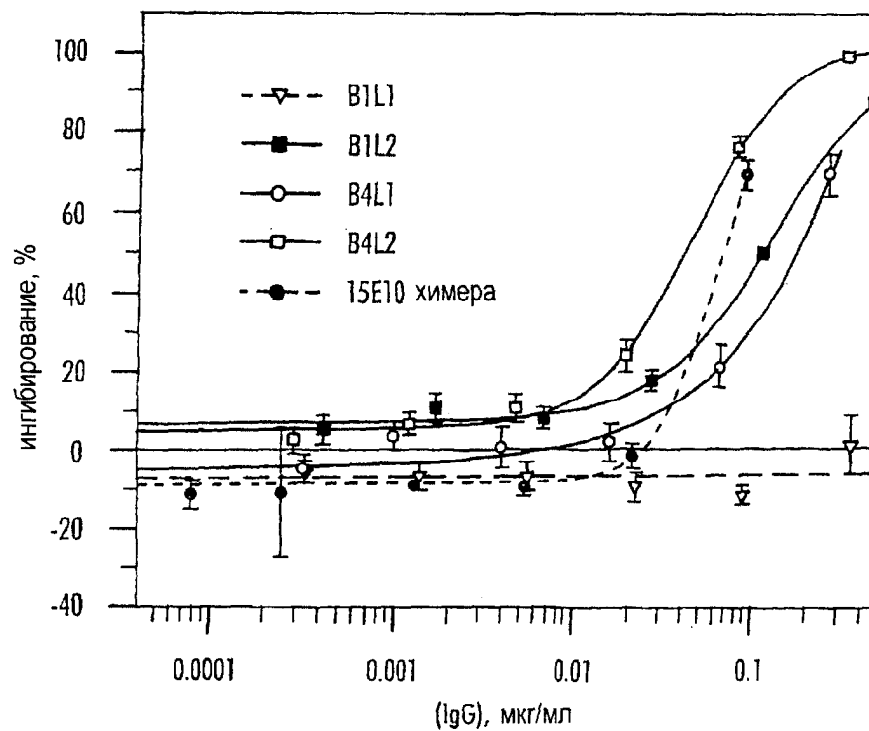
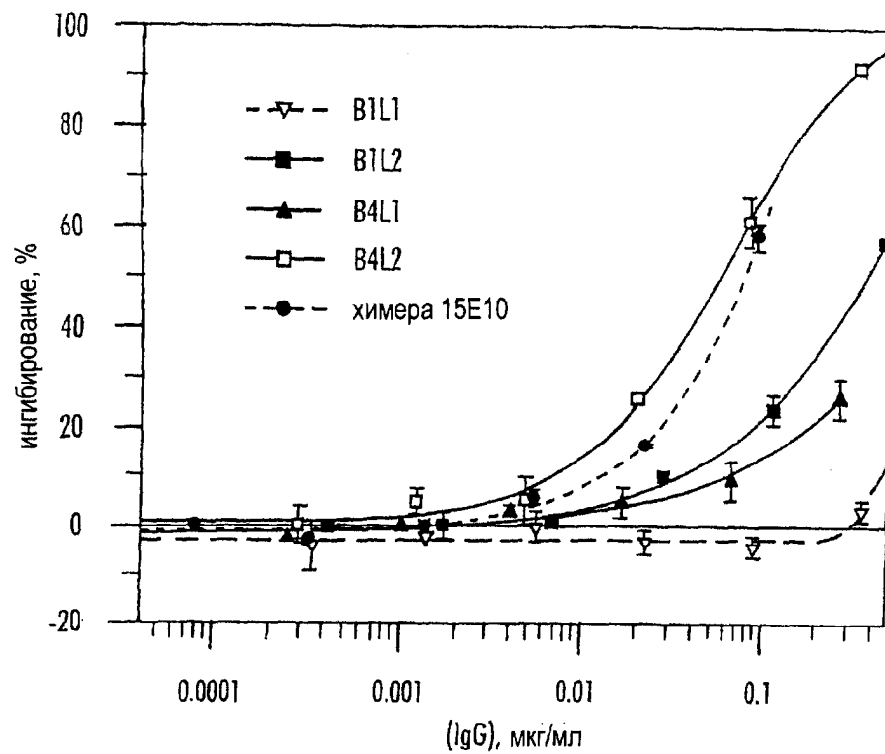
Фиг. 1



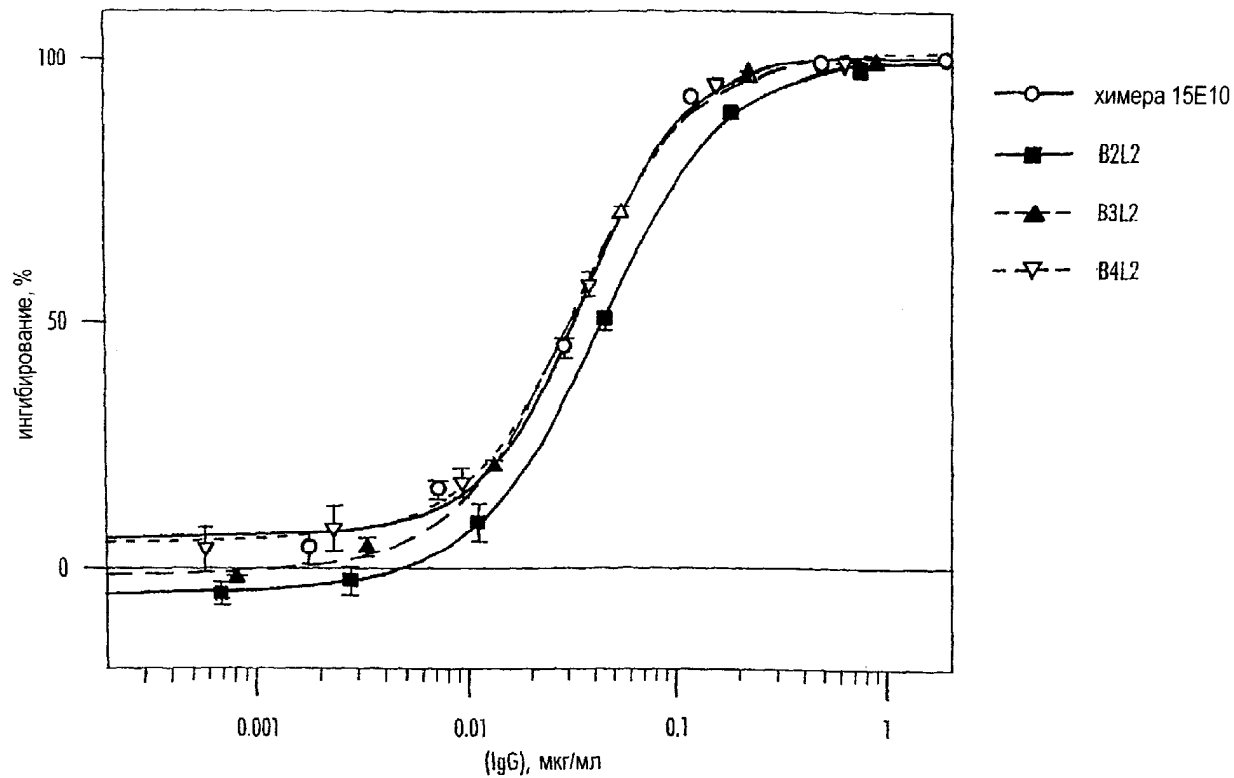
Фиг. 2



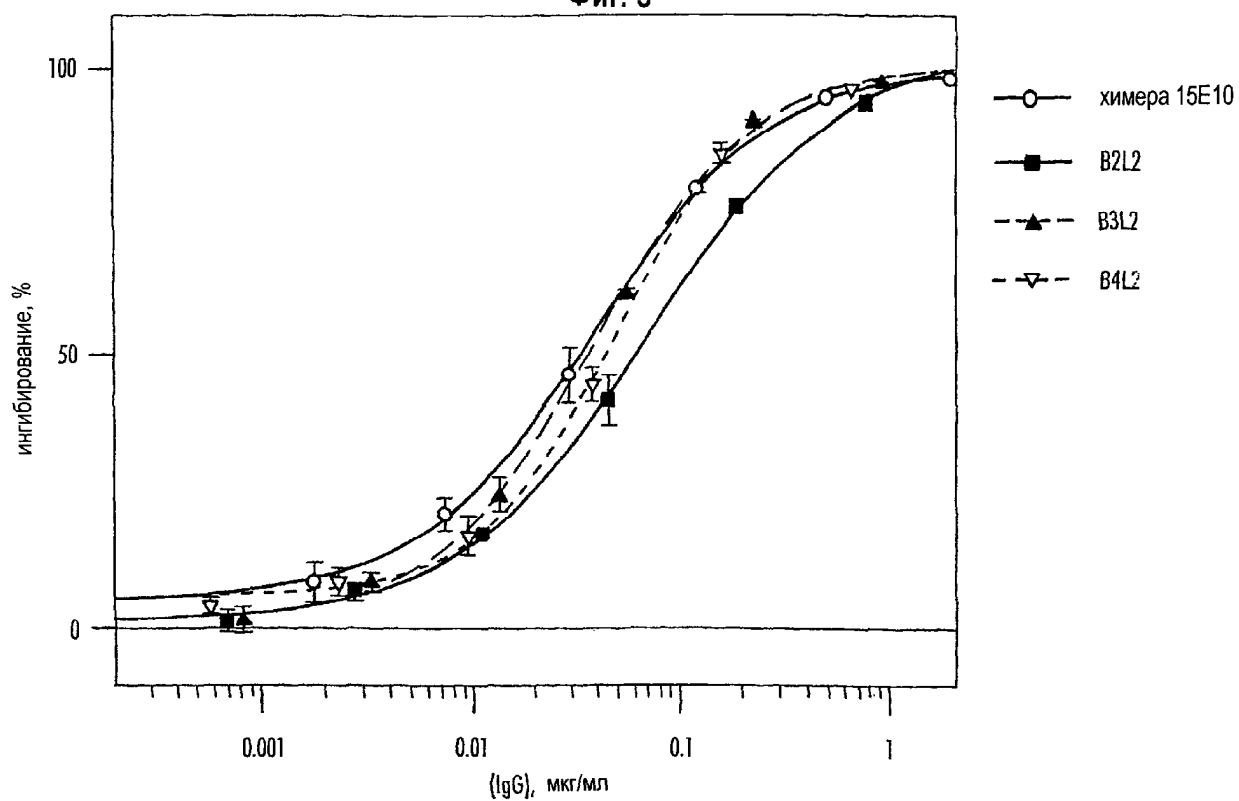
Фиг.3



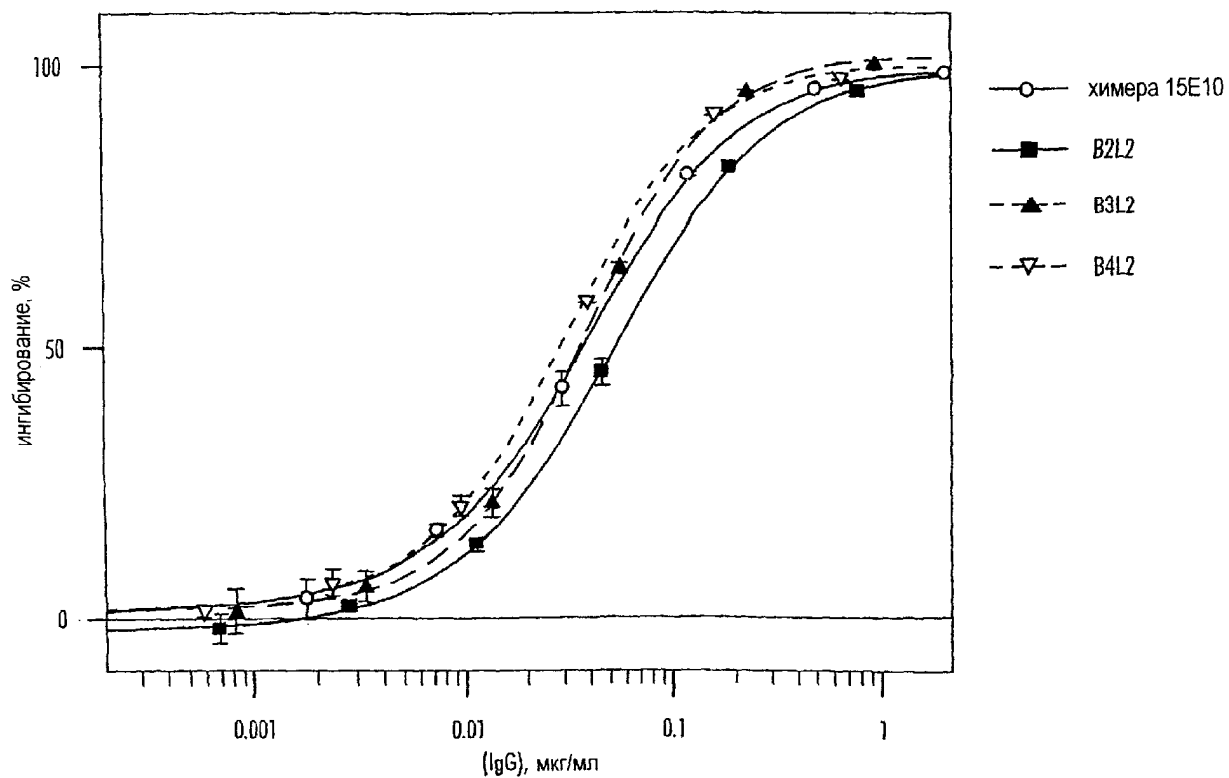
Фиг. 4



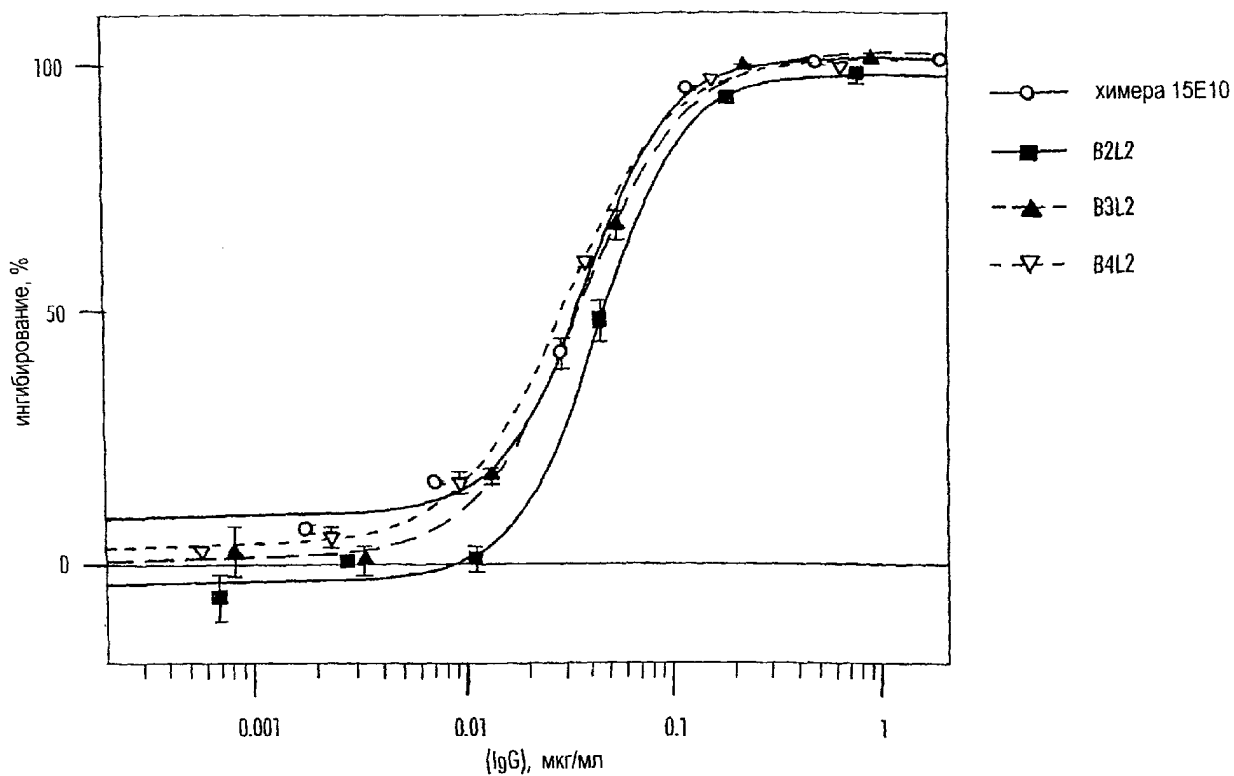
Фиг. 5



Фиг. 6

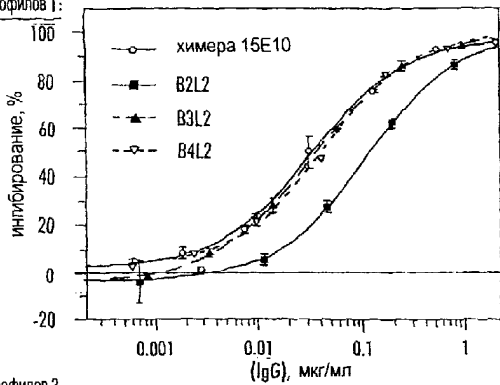


Фиг. 7

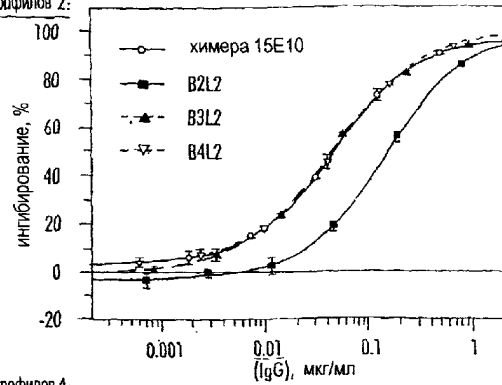


Фиг. 8

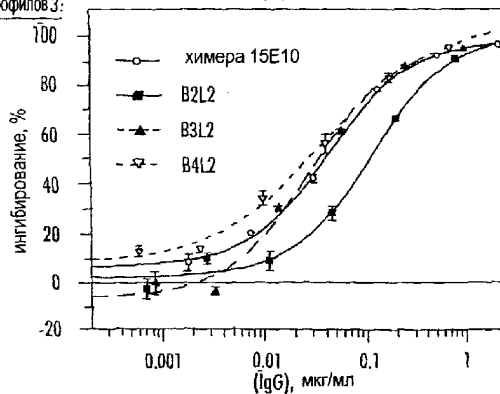
OSM нейтрофилов 1:



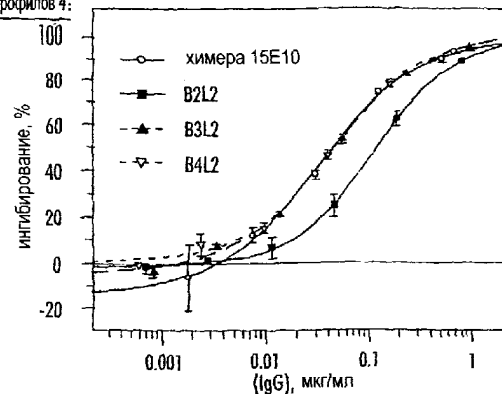
OSM нейтрофилов 2:



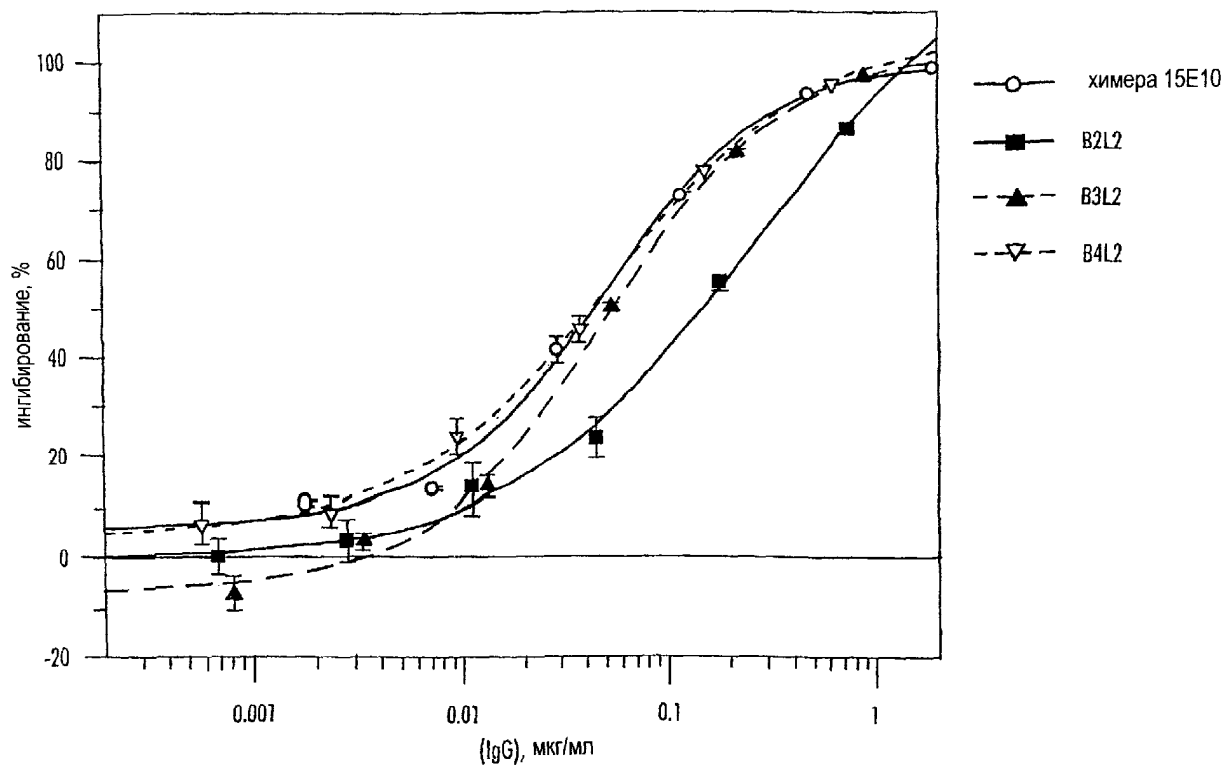
OSM нейтрофилов 3:



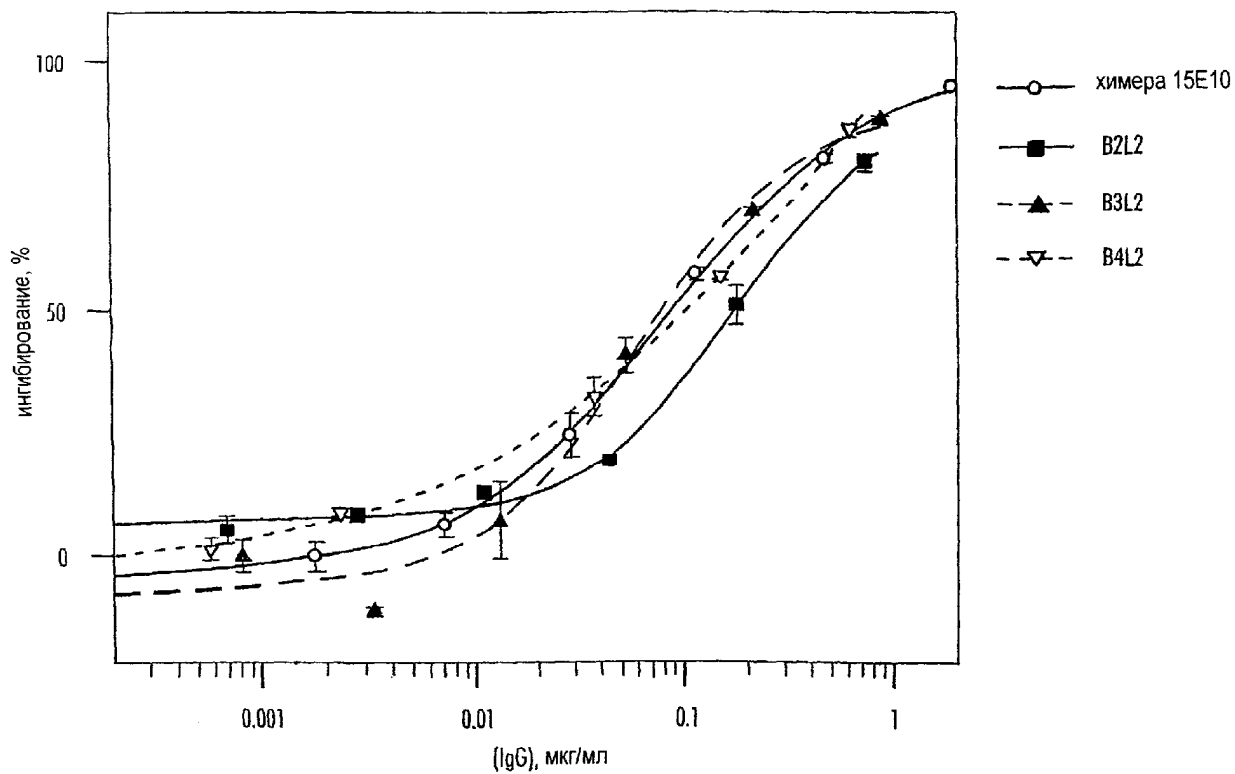
OSM нейтрофилов 4:



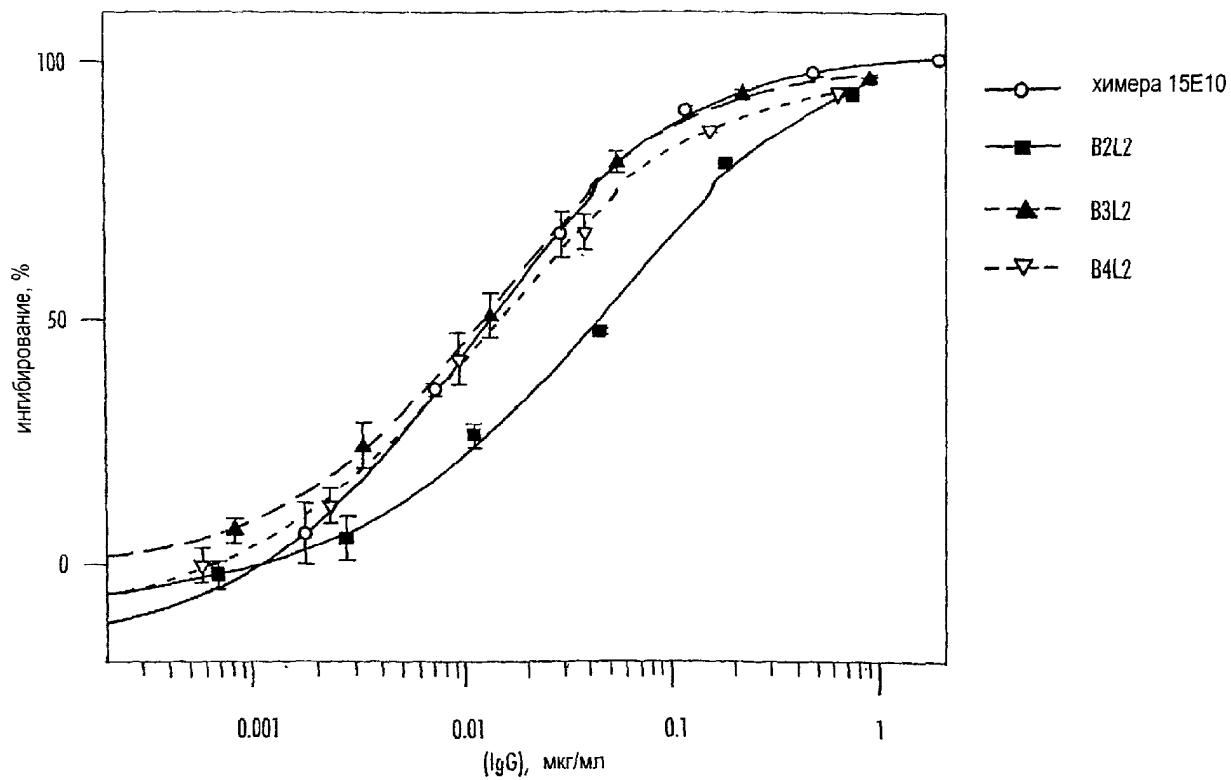
Фиг. 9



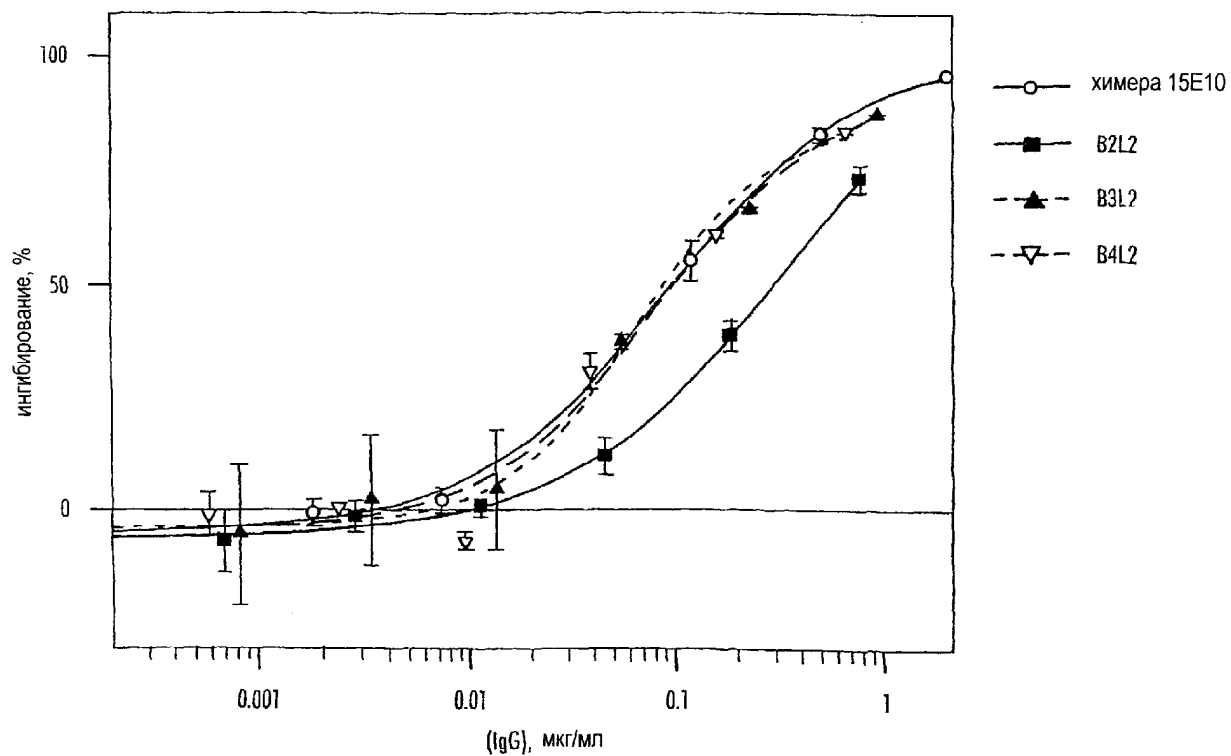
Фиг. 10



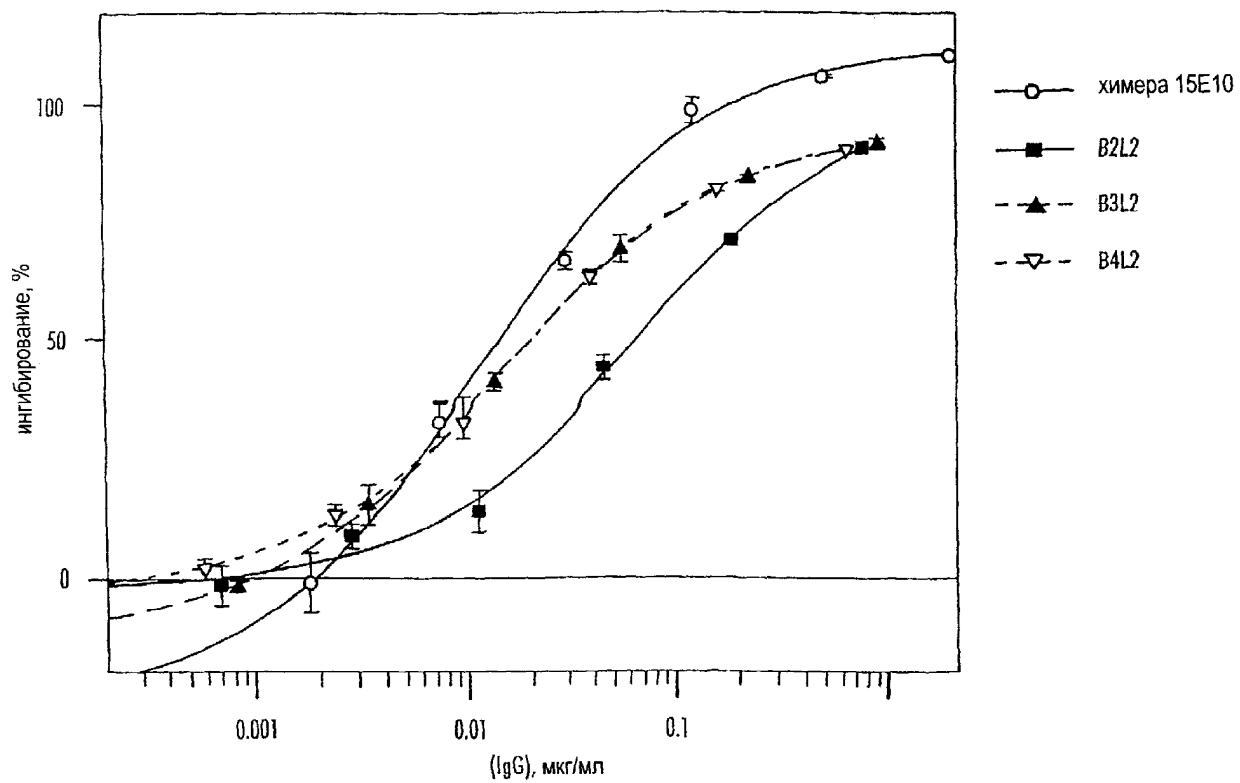
Фиг. 11



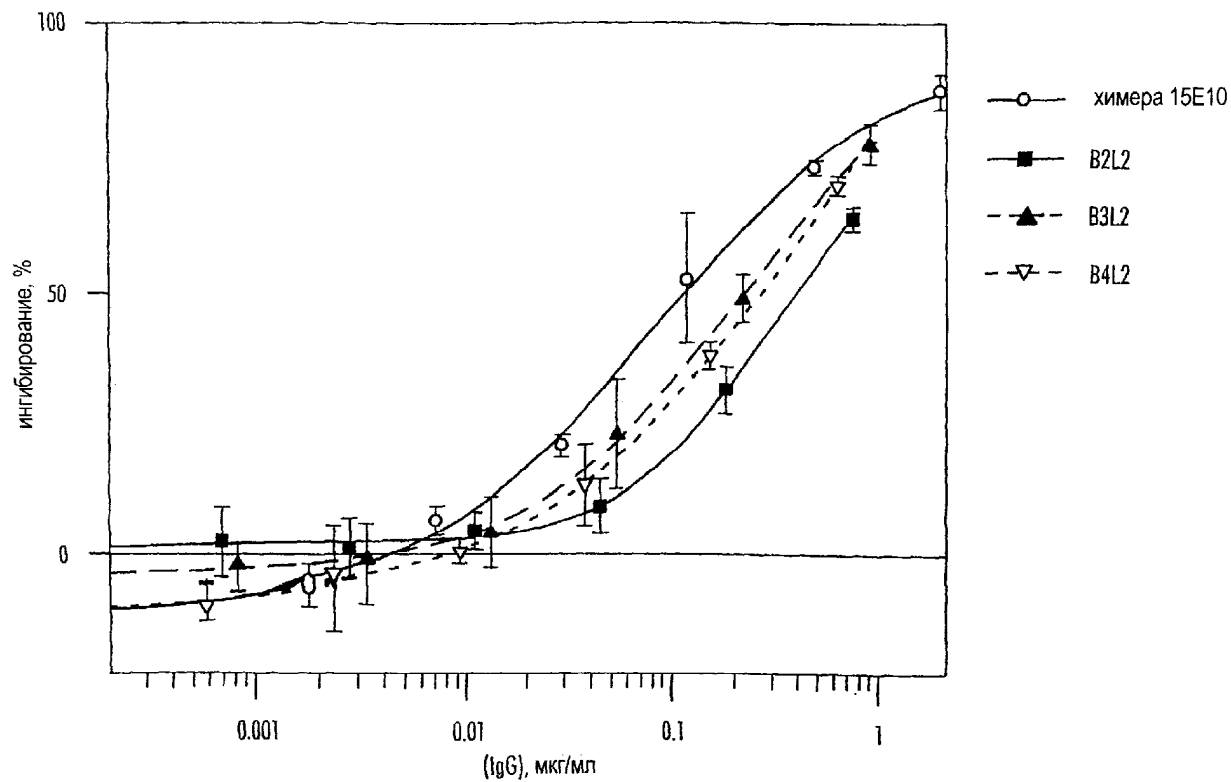
Фиг. 12



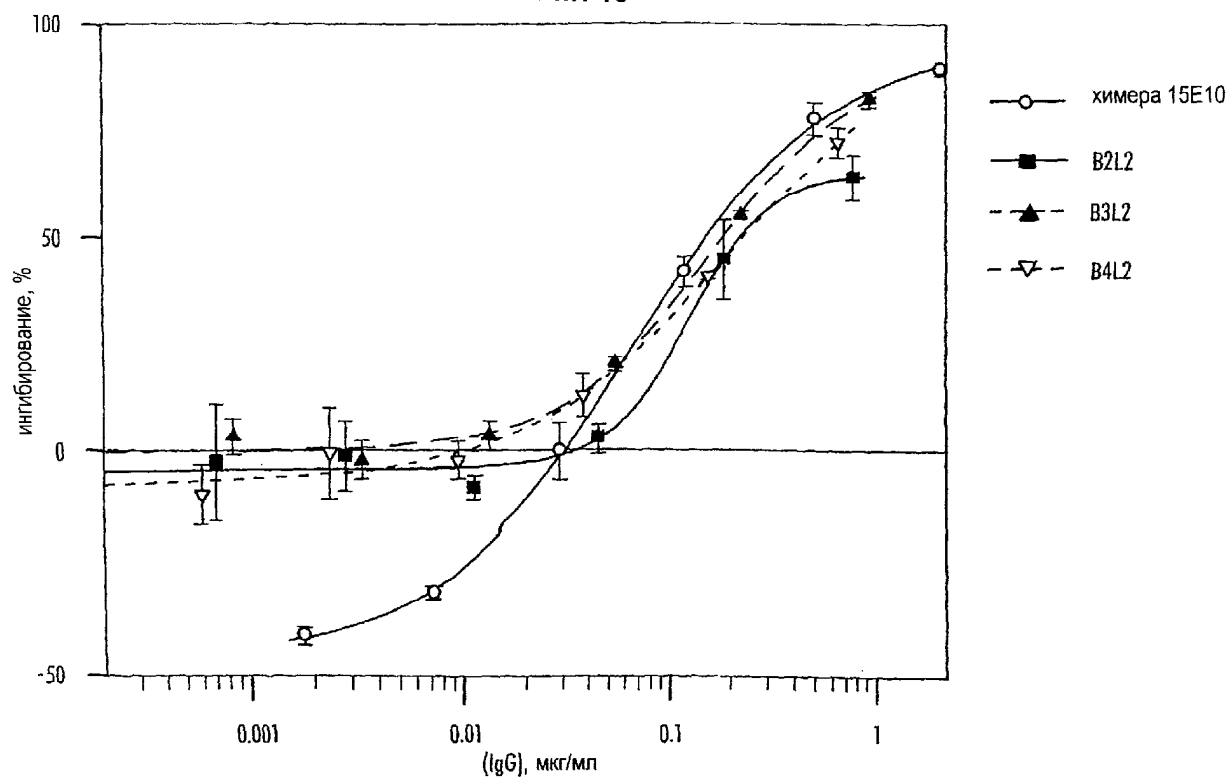
Фиг. 13



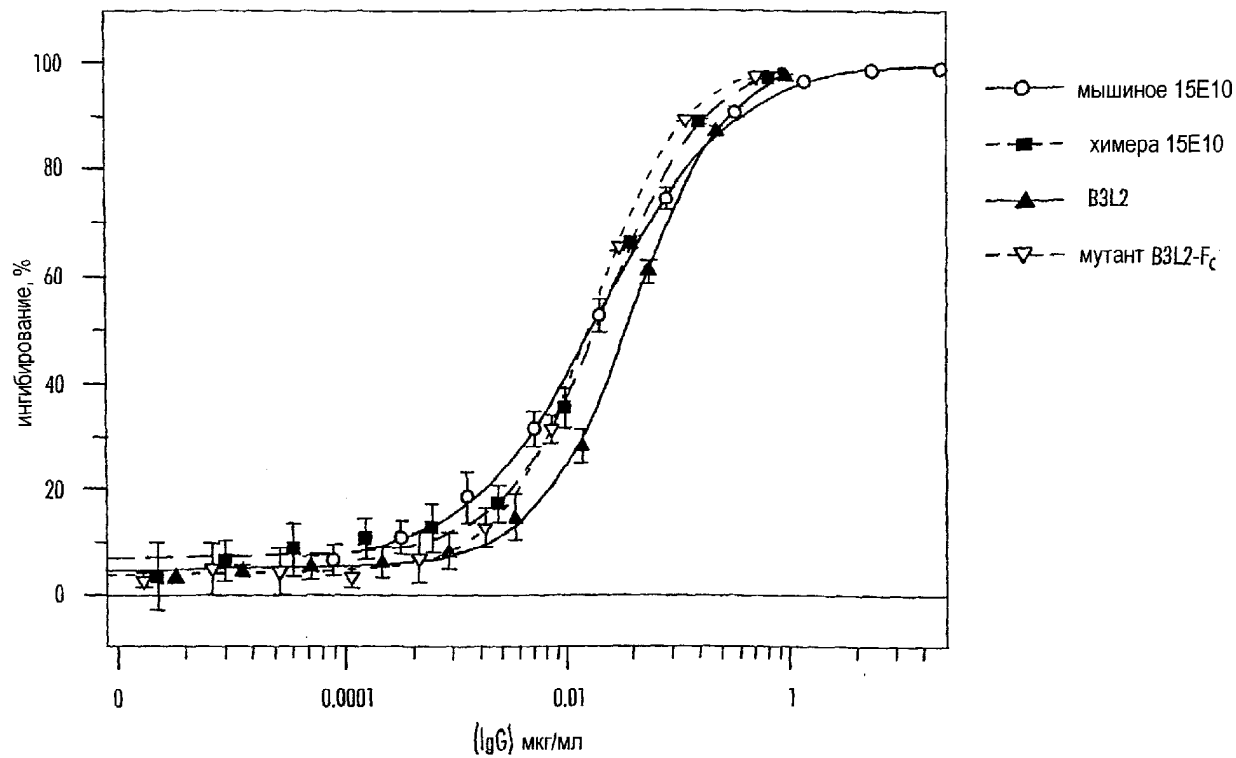
Фиг. 14



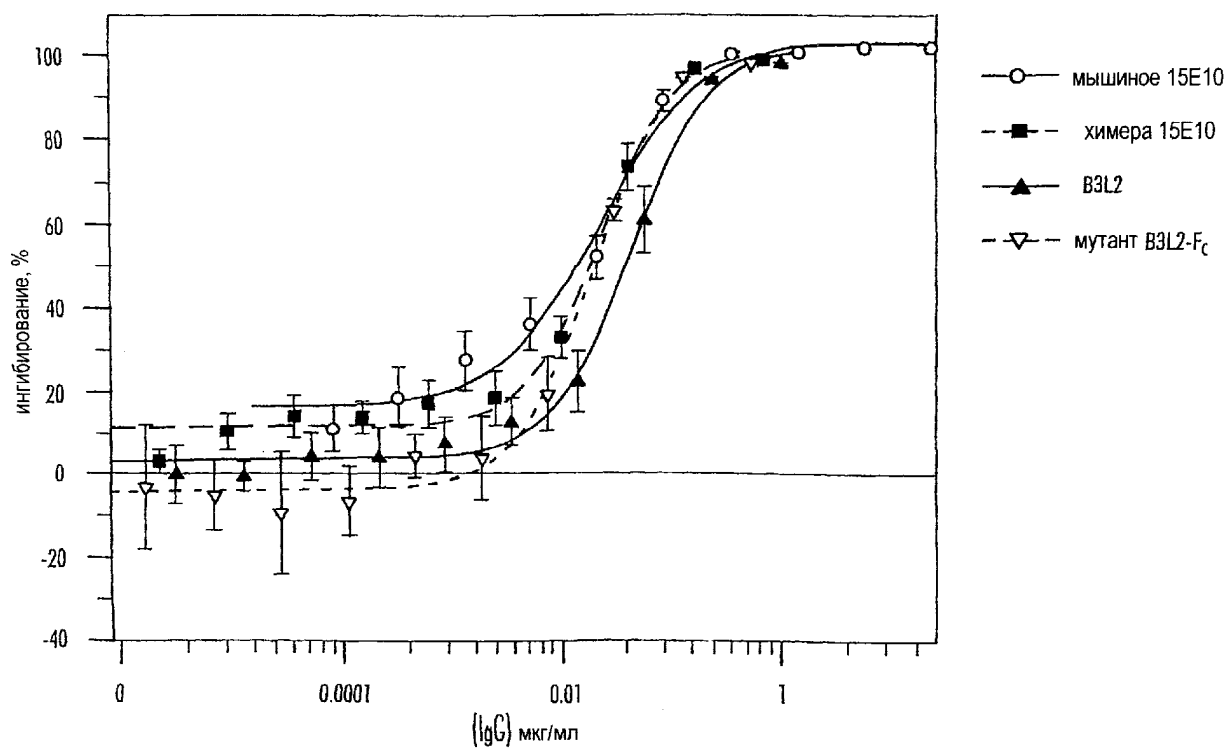
Фиг. 15



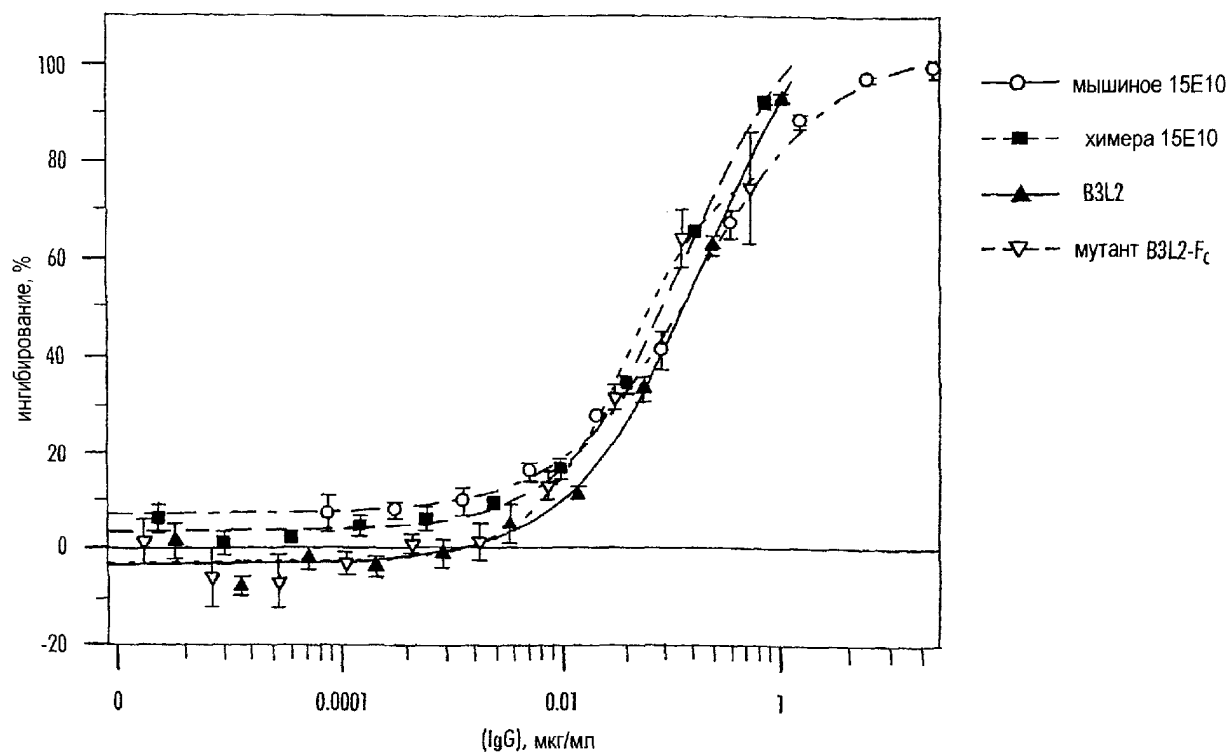
Фиг. 16



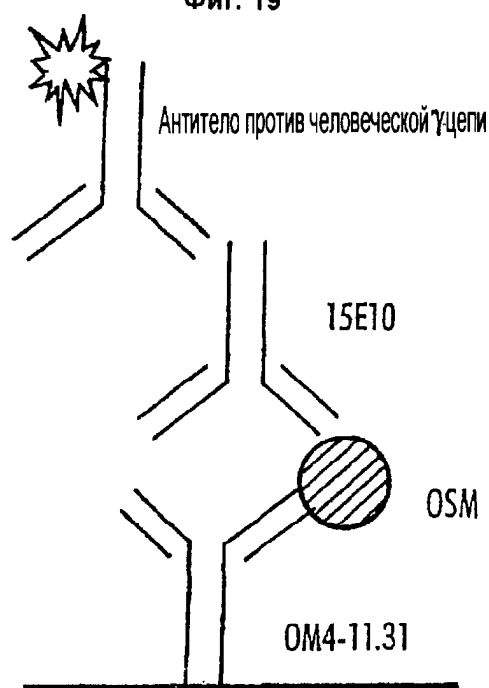
Фиг.17



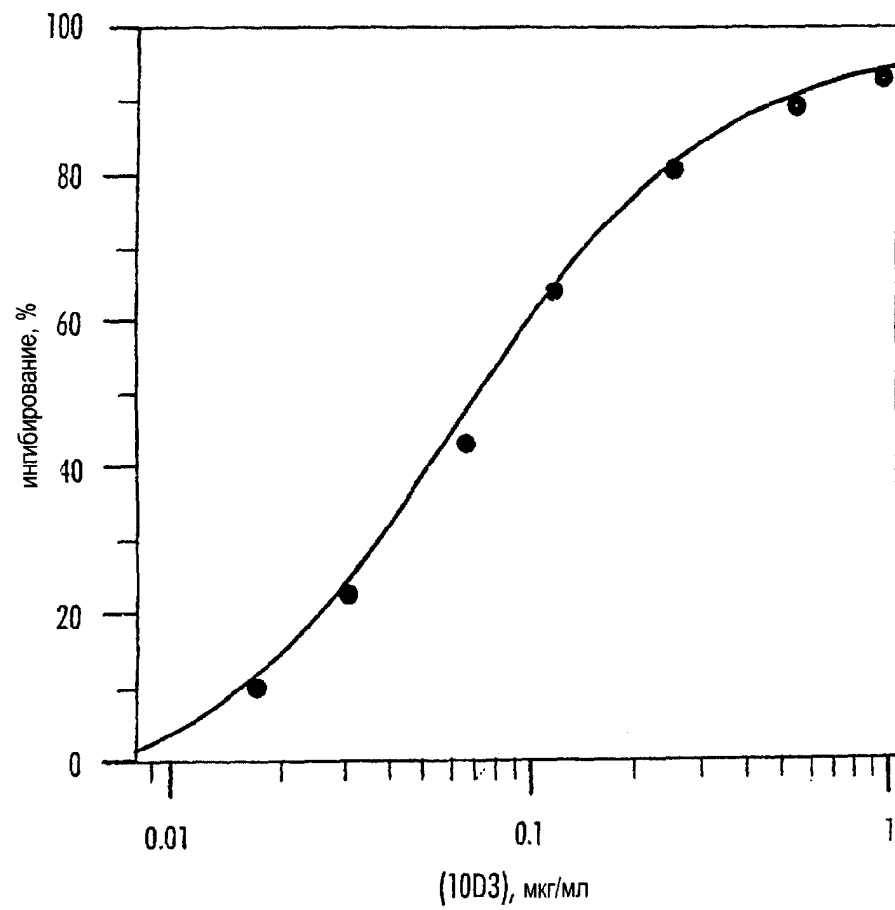
Фиг. 18



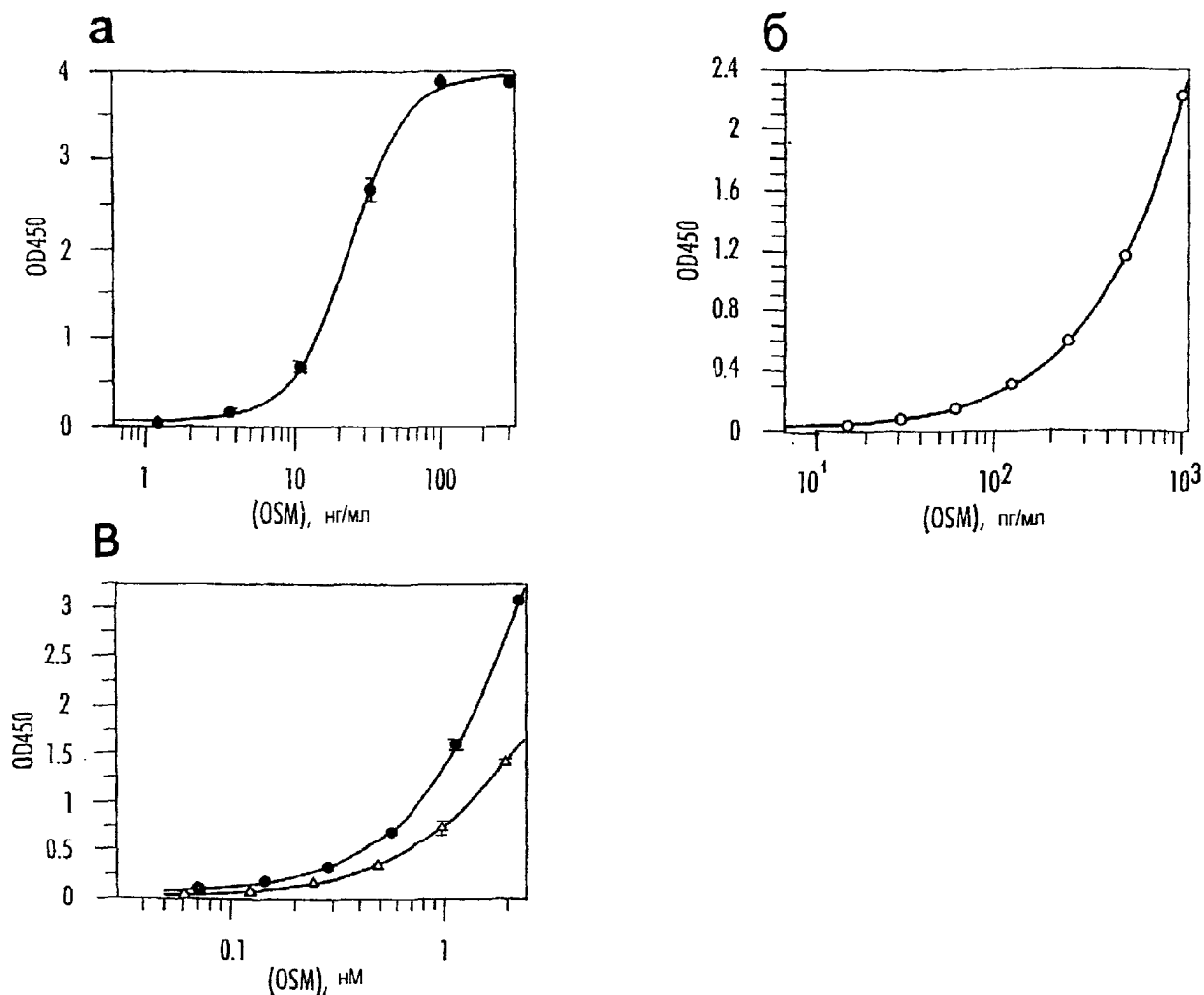
Фиг. 19



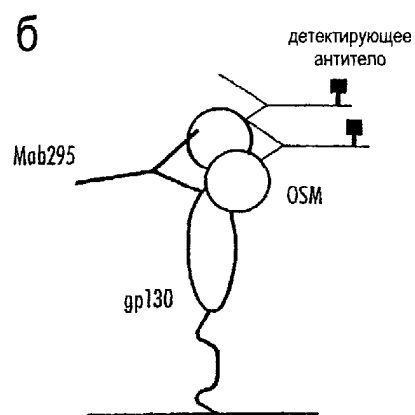
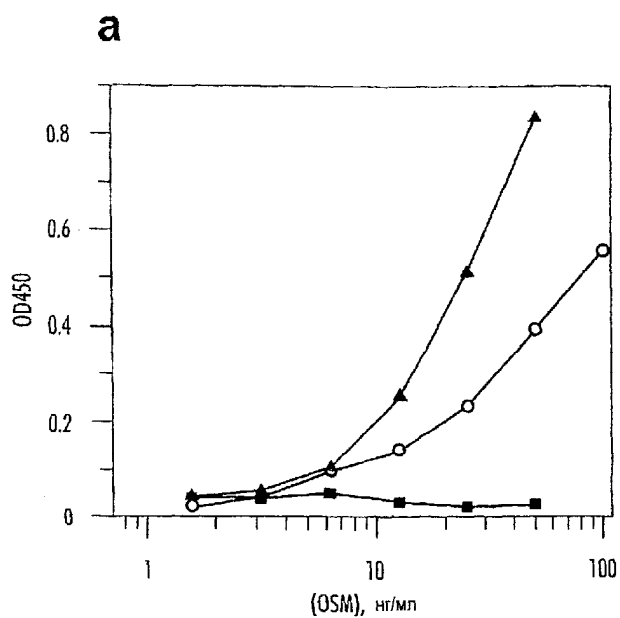
Фиг. 20



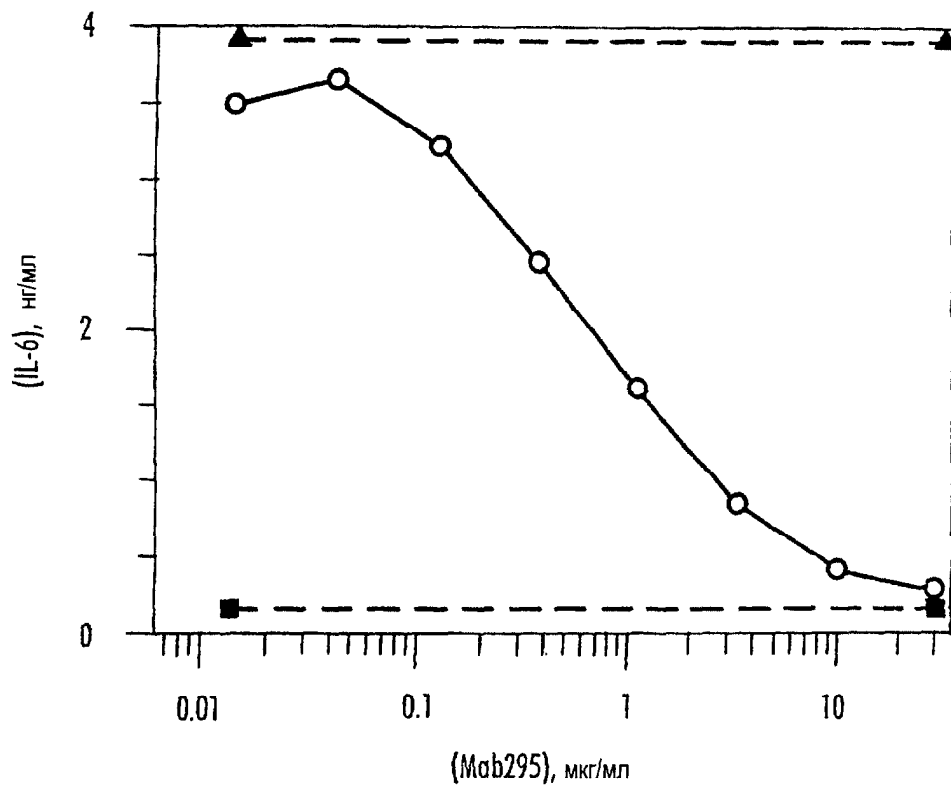
Фиг. 21



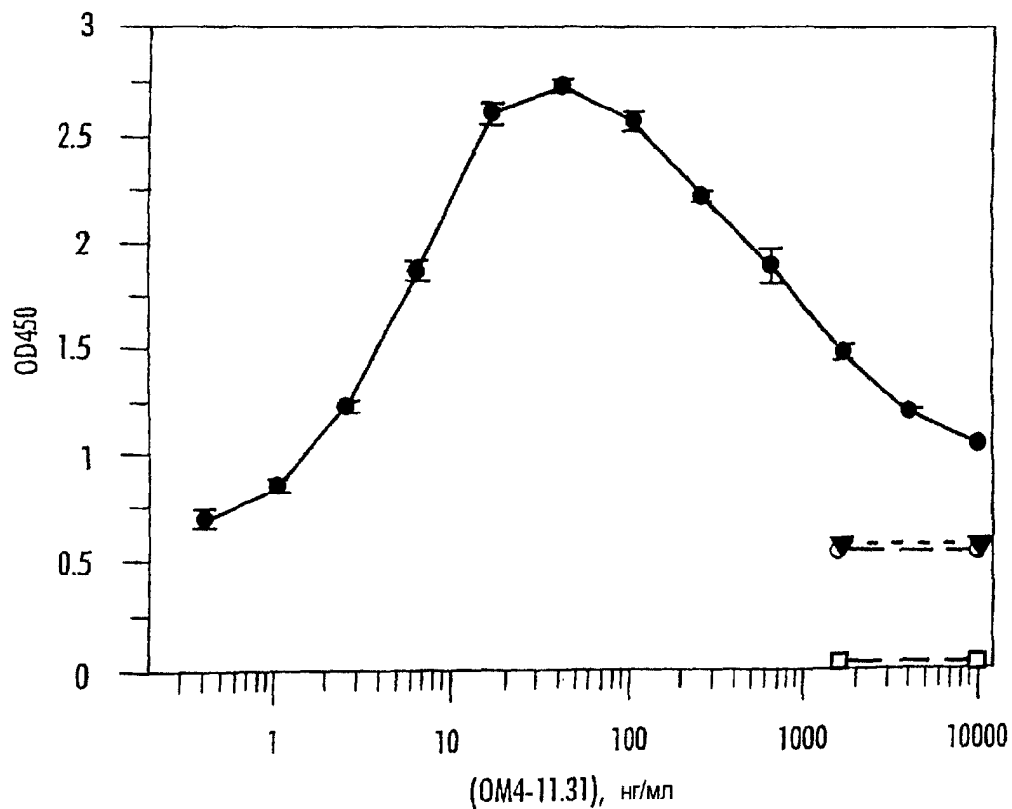
Фиг. 22



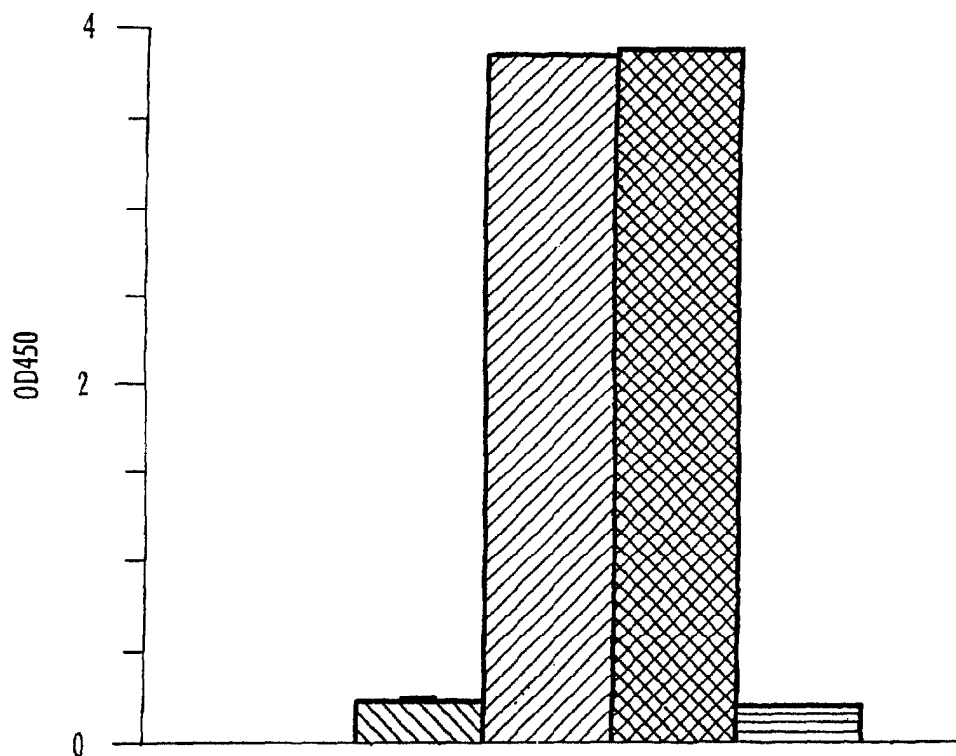
Фиг. 23



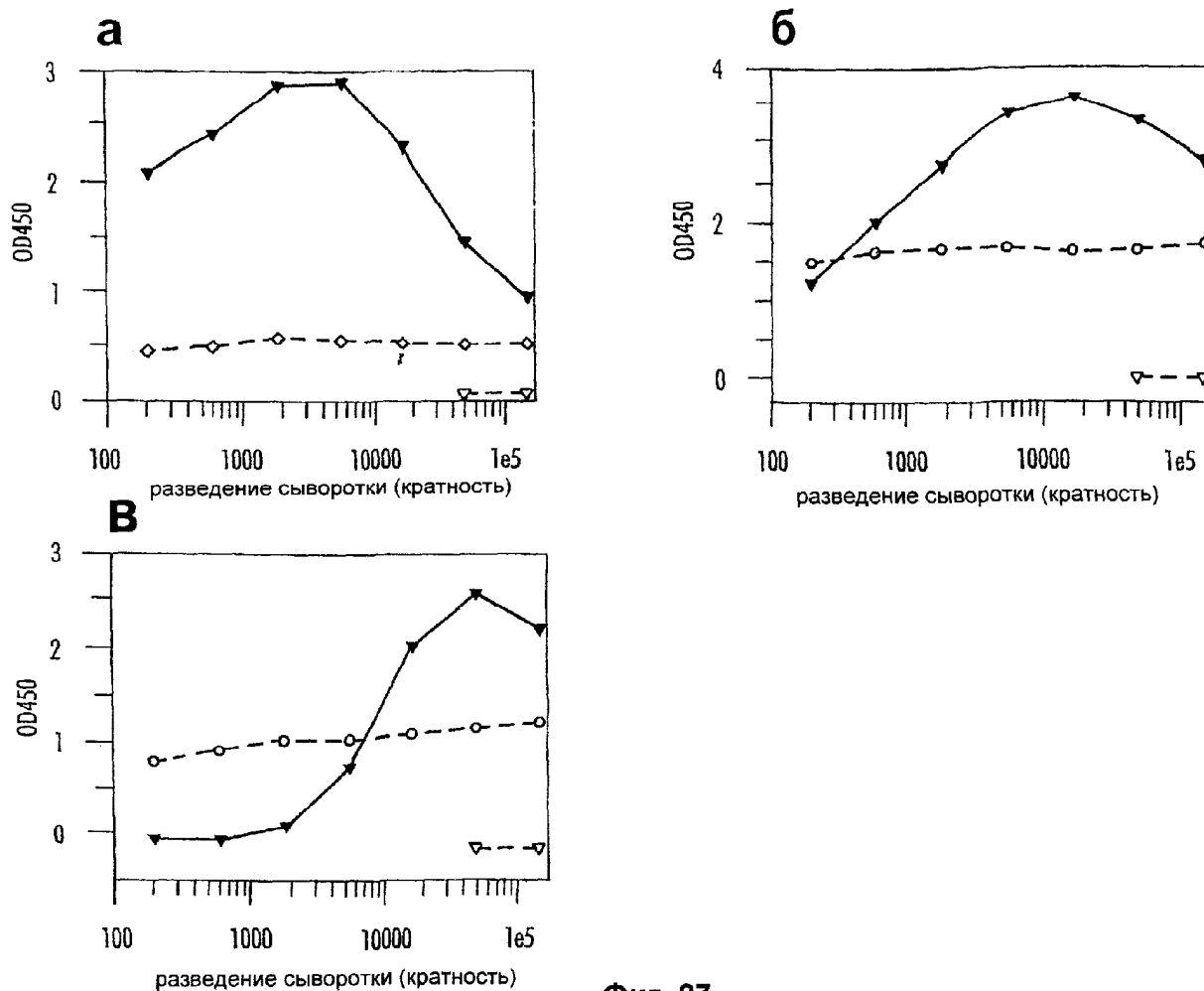
Фиг. 24



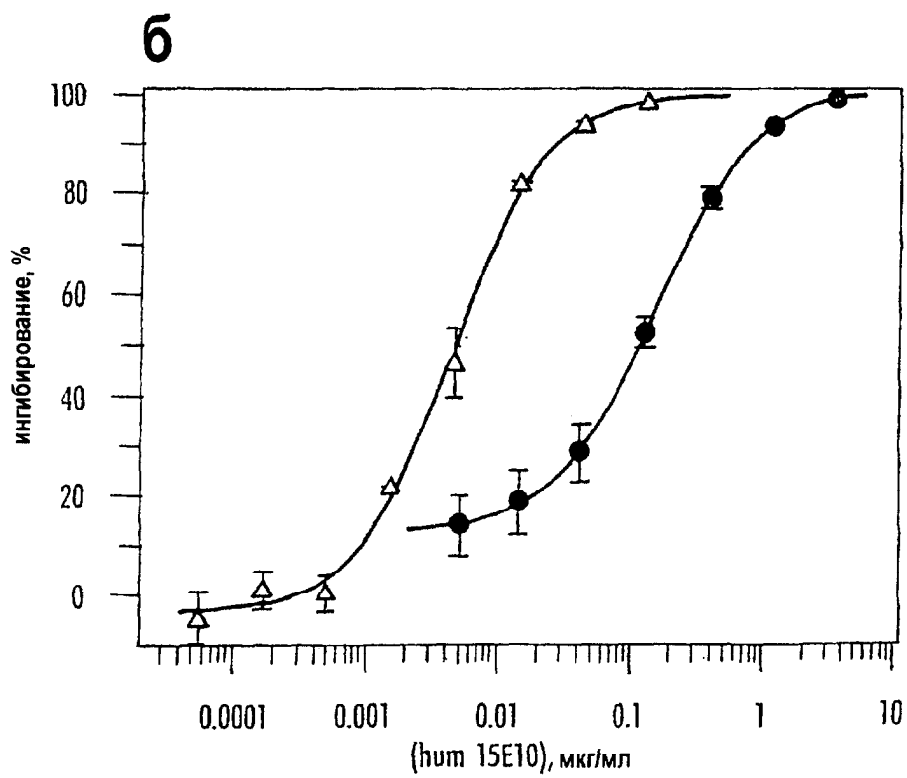
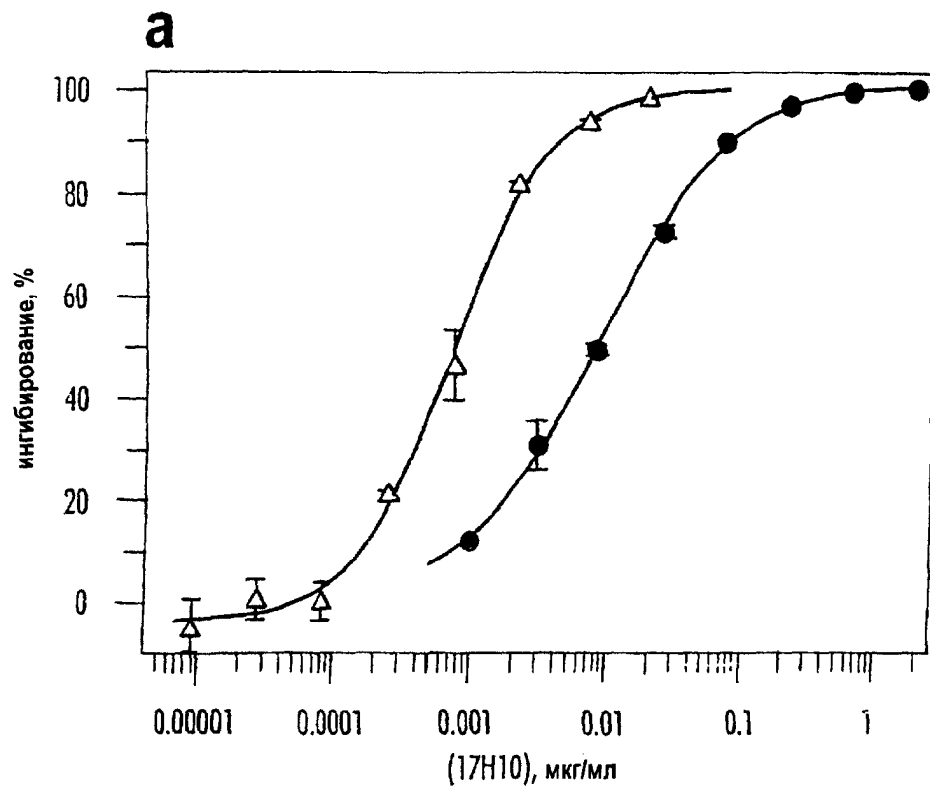
Фиг. 25



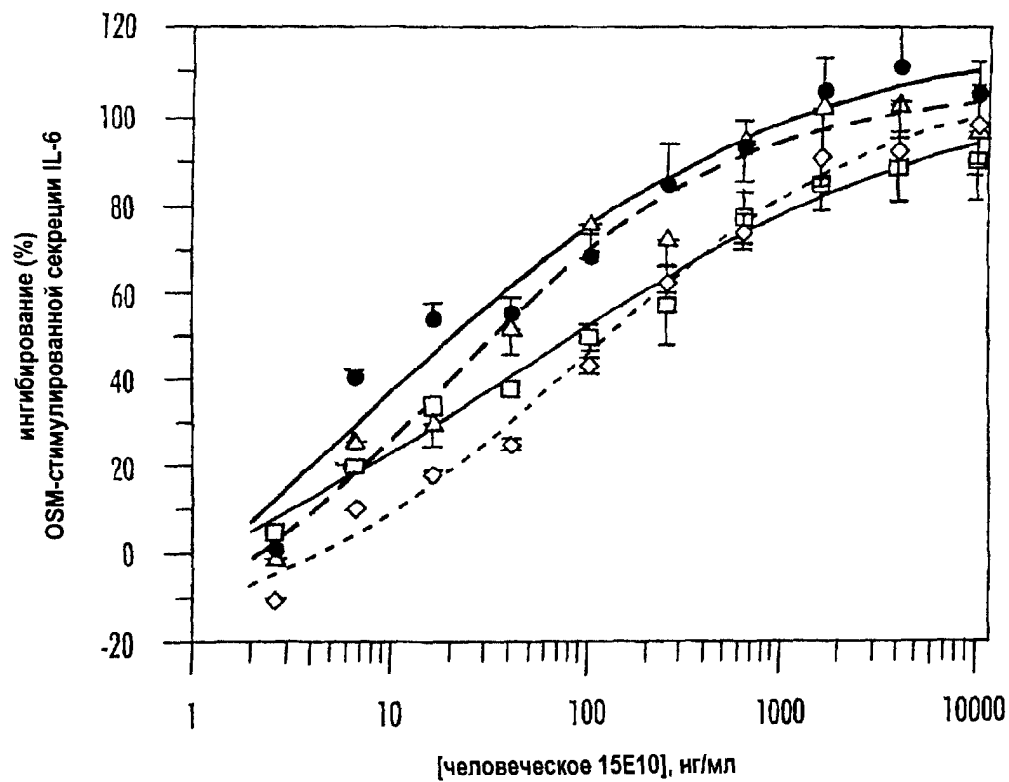
Фиг. 26



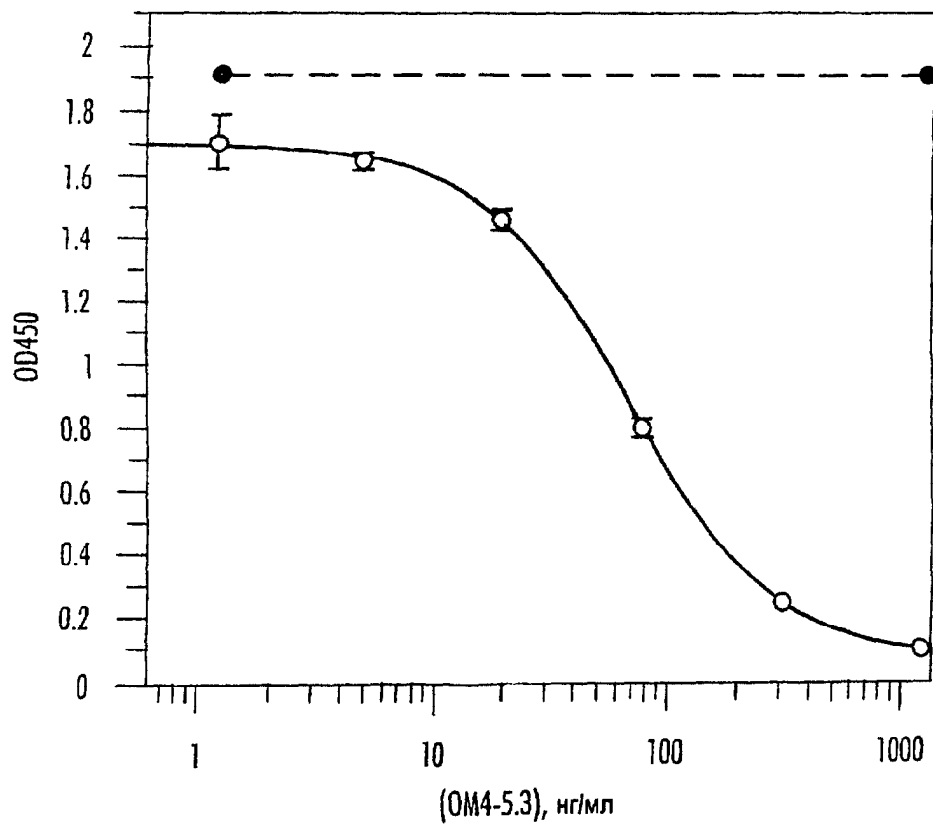
Фиг. 27



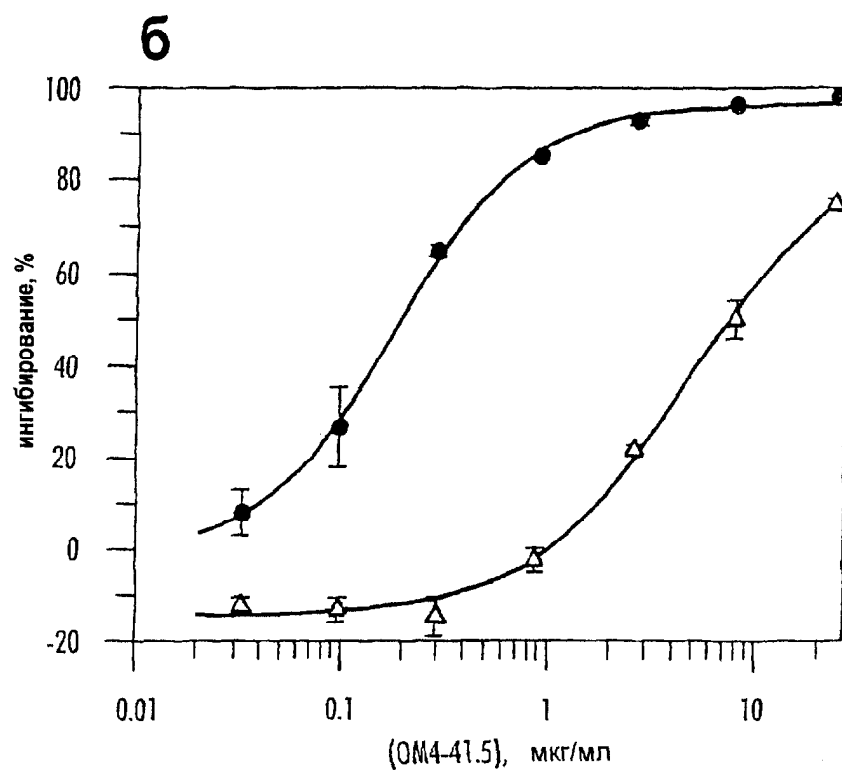
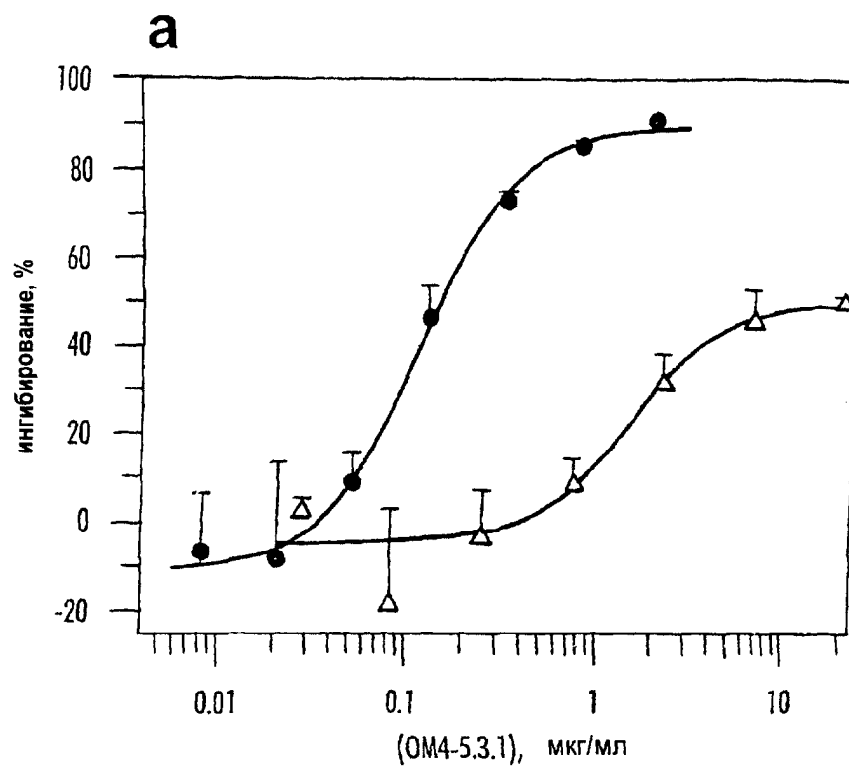
Фиг. 28



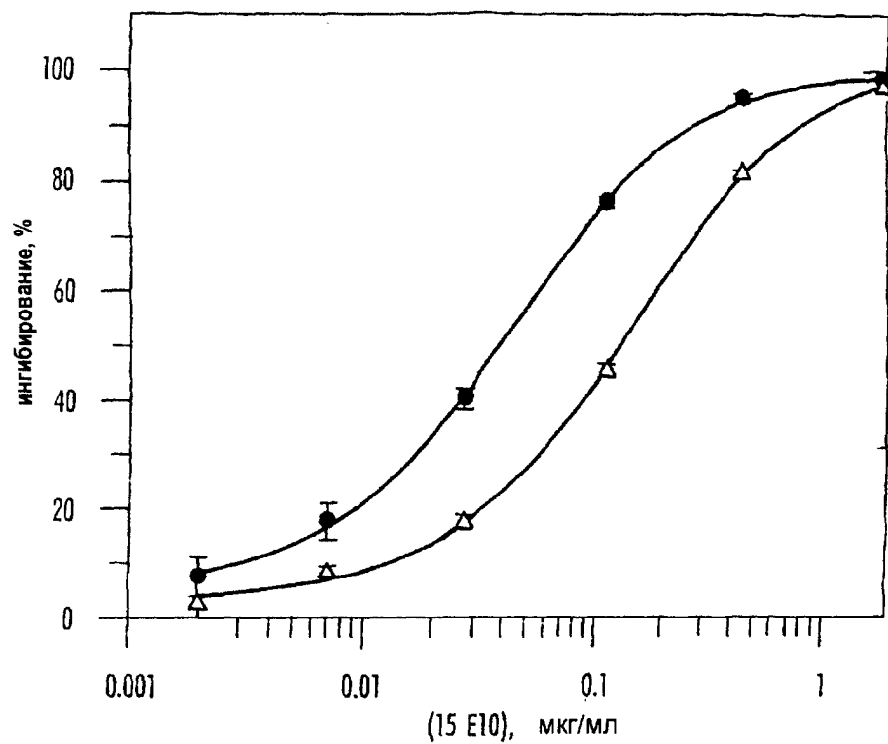
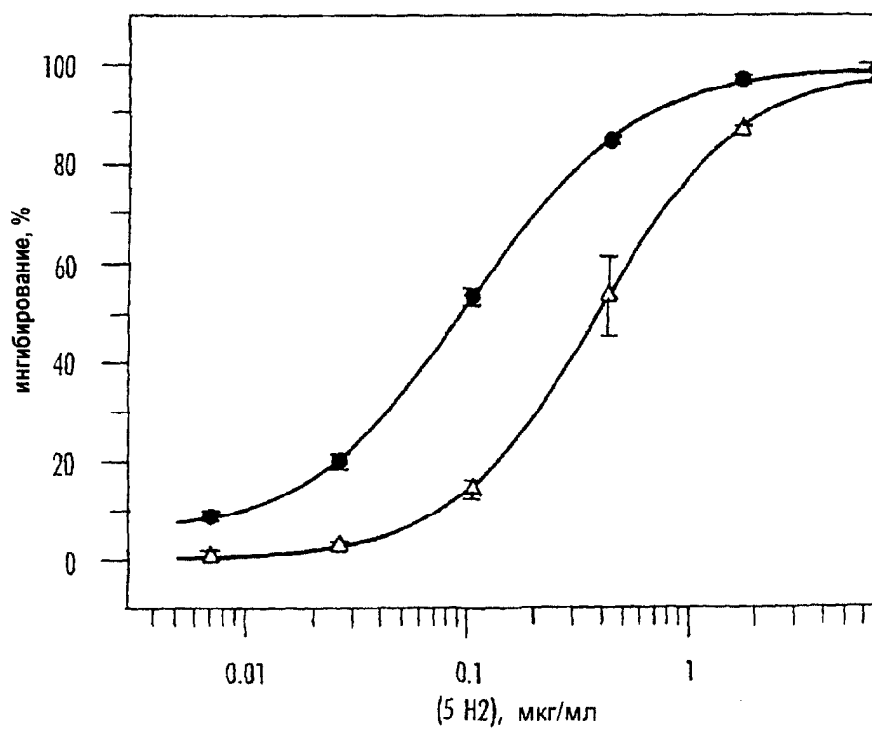
Фиг. 29

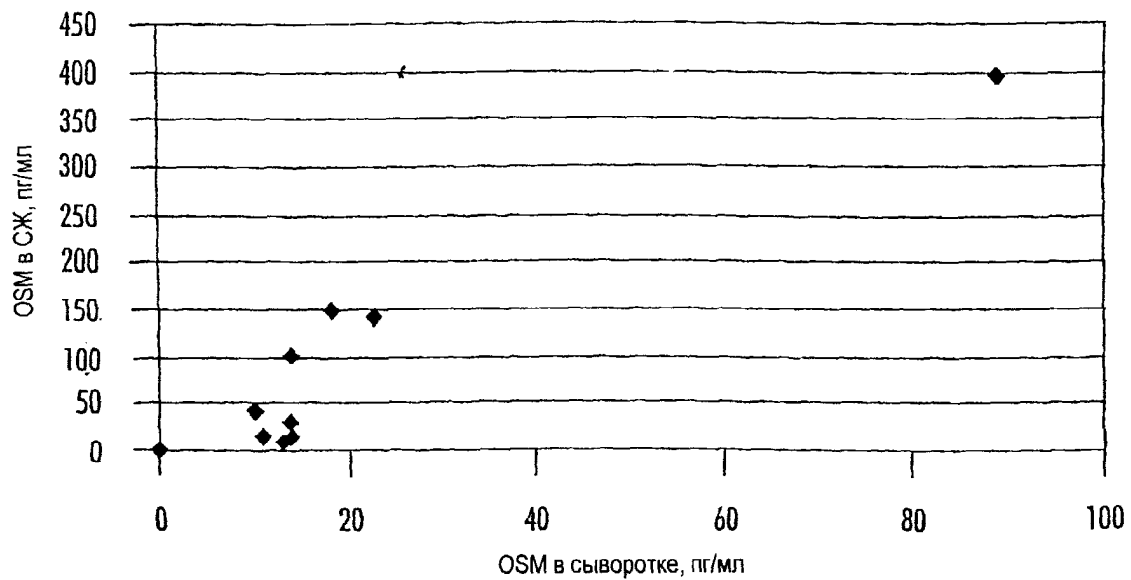


Фиг. 30

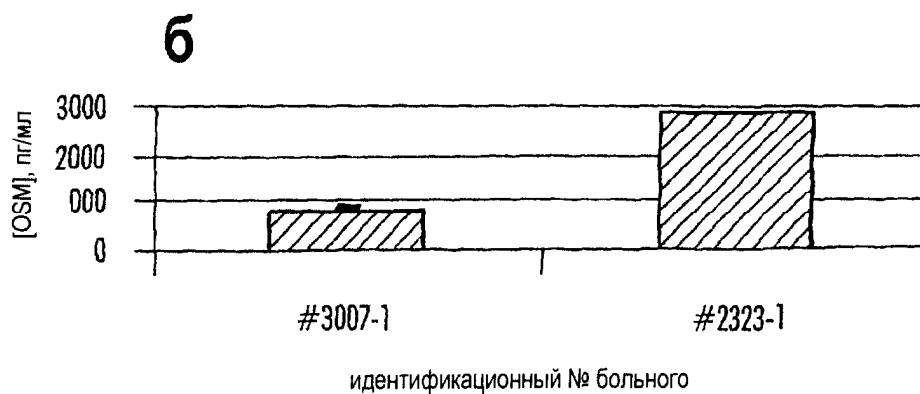
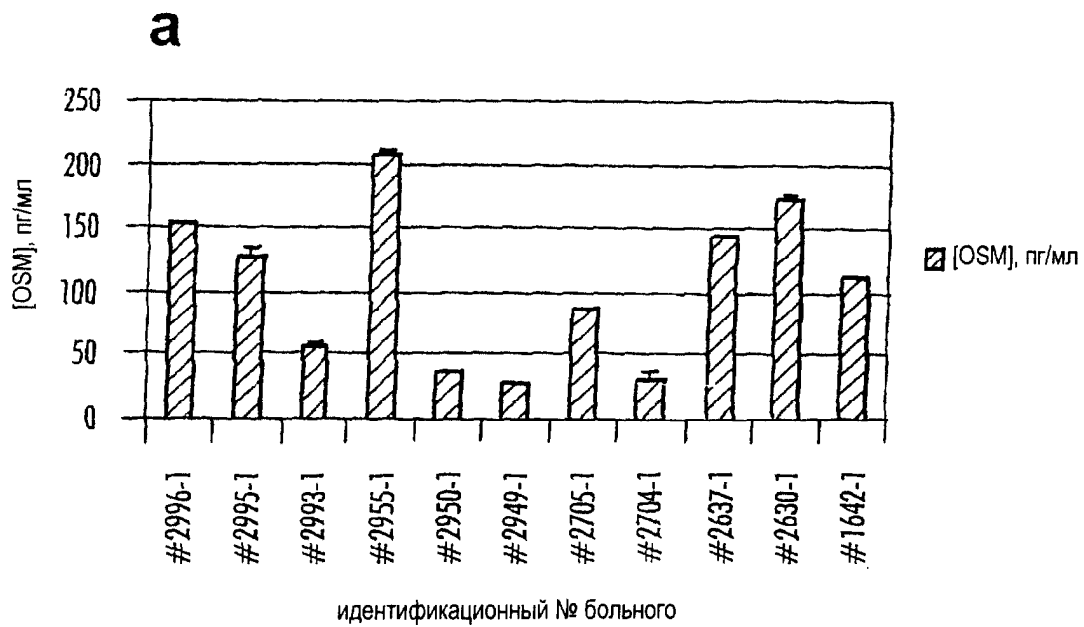


Фиг. 31

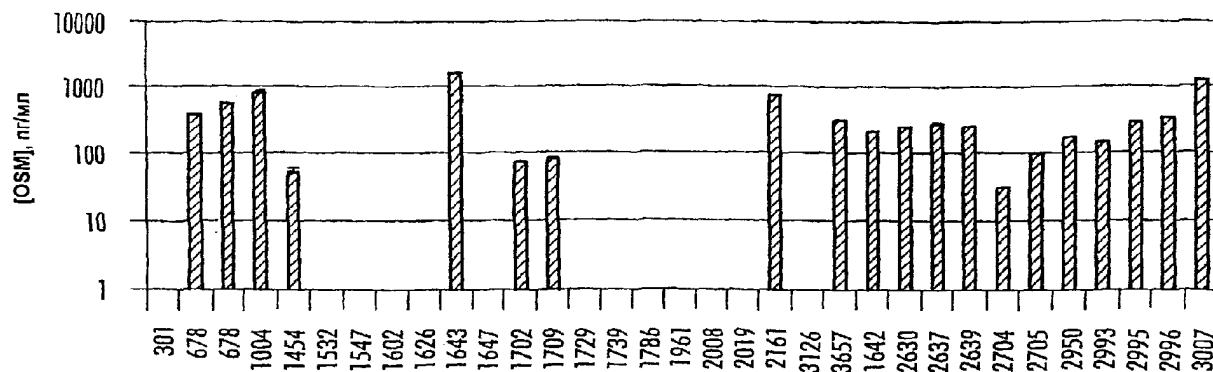
а**б****Фиг. 32**



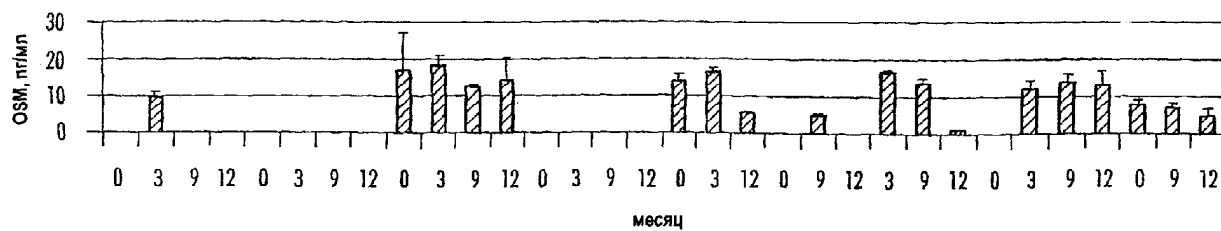
Фиг. 33



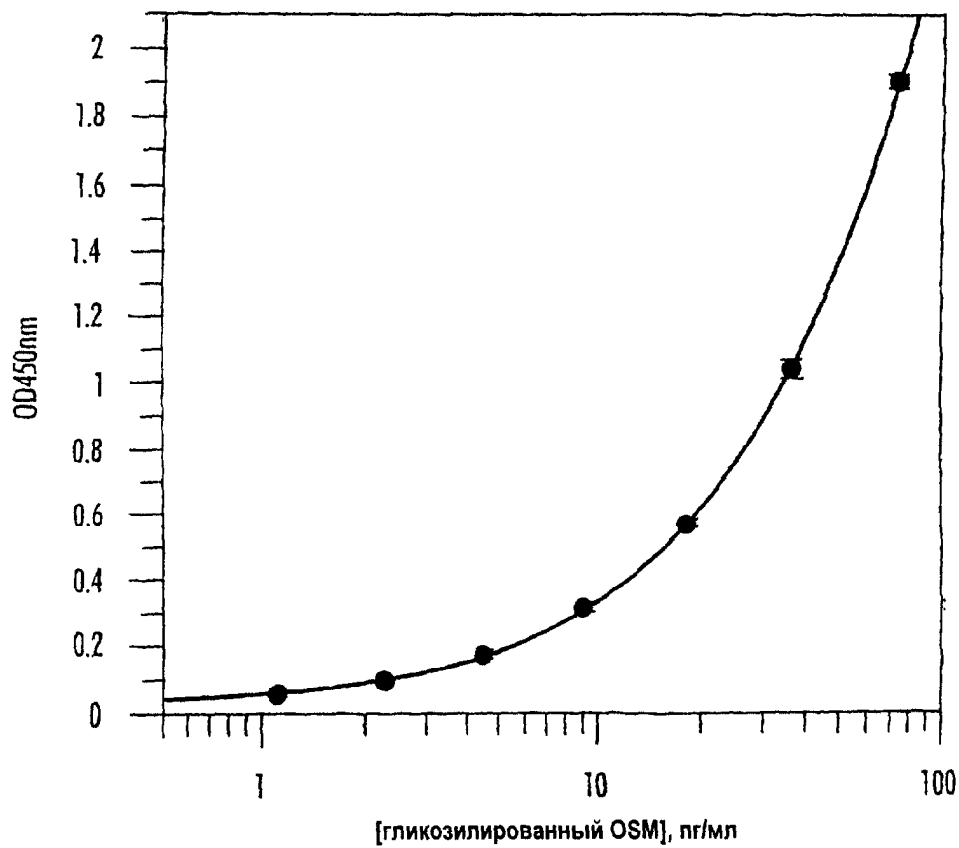
Фиг. 34



Фиг. 35



Фиг. 36



Фиг. 37