



**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 Групп Лимитед (GB)

R U 2 4 2 9 2 4 5 C 2
2 4 2 9 2 4 5 C 2

(54) ИММУНОГЛОБУЛИНЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и представляет собой антитела, которые специфически связывают сайт II онкостатина M человека (hOSM) и ингибируют взаимодействие между hOSM и gp130. Также представлены

полинуклеотид, 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 трансдуцерном рецепторе цитокинов gp130 в онкогематологии.

R U 2 4 2 9 2 4 5 C 2

R U 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),
REhPSO Nikolas Timoti (GB),
UEhST Majkl Robert (GB)

(73) Proprietor(s):

Glakso Grup Limited (GB)

R U 2 4 2 9 2 4 5 C 2

(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

2 4 5
2 4 9 2 4 5
2 4 2 9 2 4 5
R U

Текст описания приведен в факсимильном виде.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к иммуноглобулинам, которые 5 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 10 также относится к способам лечения заболеваний или расстройств указанными иммуноглобулинами, к фармацевтическим композициям, содержащим указанные иммуноглобулины, и к способам изготовления. Другие аспекты 15 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), 20 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 25 имеют общий рецептор gp130 для трансмембранный передачи сигналов (см. Taga and Kishimoto T (1997) Annu. Rev. Immunol. 15: 797-819). OSM был первоначально обнаружен по его способности ингибировать рост меланомной 30 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 35 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), 40 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 45 (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 гематопоэза (см. Tanaka M et al (2003) 5 102: 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.

10 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), 15 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 20 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- 25 168). 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).

30 Как и другие цитокины семейства IL-6, OSM связывается с гликопротеином gp130 для трансмембранный передачи сигналов. Ключевым 35 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 40 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 45 (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 50 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 (AK) и C-концевой пропептид из 33 AK, оба из которых отщепляются с образованием зрелого OSM. Белок-предшественник OSM не имеет биологической активности, но она значительно повышается при отщеплении C-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 20Å × 27Å × 56Å. Имеются четыре альфа-спиральные области (спираль A 10-37AK, спираль B 67-90AK, спираль C 105-131AK и спираль D 159-185AK, нумерация AK начинается после удаления сигнальной последовательности). Спирали A и C содержат "перегибы". Эти спирали соединены двумя выступающими петлями (петля AB: 38-66AK; петля CD: 130-158AK) и расположены в виде двух антипараллельных пар (A-D и B-C) (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. Sporen 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

MGVLLTQRTLLSLVLALLFPMASMAAIGSCSKEYRVLLG~~Q~~LQKQTDLMQD
 15 TSRLLDPYIRI~~Q~~GLDVPKLREHCRERPGAFPSEETLRGLGRRGF~~Q~~TINAT
 LGCVLHRLADLEQRLPKAQDLERSGLNTIEDLEKLQ~~M~~ARPNTIL~~G~~LRNNIYCM
 AQLLDNSDTAEPTKAGRGA~~S~~QPPTPTPASDAFQRKLEGCRFLHGYHRFMHS
 VGRVFSKWGE~~S~~PNRSRRHSPHQALRKGVRRTRPSRKGKRLMTRGQLPR.

(SEQ ID NO: 13).

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

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

25 ATGGGGGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTC~~T~~GGTC~~C~~TGCACTC
 CTGTTCCAAGCATGGCGAGCATGGCGGCTATAGGCAGCTGCTCGAAAGAG
 TACCGCGTGCTC~~T~~GGCCAGCTCCAGAACAGACAGATCTCATGCAGGAC
 ACCAGCAGACTCCTGGACCCCTATATA~~C~~GTATCCAAGGC~~T~~GGATGTT~~C~~
 30 AACACTGAGAGAGCACTGCAGGGAGCGCCCCGGGC~~T~~CCCAGTGAGGAG
 ACCCTGAGGGGGCTGGCAGGC~~G~~GGGCTTCC~~C~~TCAGACCC~~T~~CAATGCCACA
 CTGGGCTGCGT~~C~~TC~~G~~ACAGACTGGCCGACTTAGAGCAGCGC~~T~~CCCCAAG
 GCCCAGGATTGGAGAGGTCTGGCTGAACATCGAGGACTTGGAGAAGCTG
 35 CAGATGGCGAGGCCGAA~~C~~ATCCTGGGCTCAGGAACAAACATCTACTGCATG
 GCCCAGCTGCTGGACA~~A~~CTCAGACACGGCTGAGCCCACGAAGGCTGGCCGG
 GGGGC~~T~~CTCAGCCGCCACCC~~C~~CC~~T~~GCCTCGGATGCTTT~~C~~AGCGC
 AAGCTGGAGGGCTGCAGGTT~~C~~TC~~G~~ATGGCTACC~~A~~TCGCTTCATGCACTCA
 40 GTGGGGCGGGTCTTCAGCAAGTGGGGGAGAGCCC~~G~~AACGGAGCCGGAGA
 CACAGCCCCCACCAGGCC~~T~~GAGGAAGGGG~~T~~CGCAGGACCAGACCC~~T~~CC
 AGGAAAGGCAAGAGACTCATGACCAGGGACAGCTGCC~~C~~GGTAG
 (SEQ ID NO:14)

45 Ревматоидный артрит (РА) включает синдром из отдельных, но взаимосвязанных патогенных процессов. Ими являются: локальное и системное воспаление, пролиферация синовиальных клеток, ангиогенез и отложение 50 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). Инициирующие 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 развивающемся 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 мононуклеарных 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 эktopические 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 заживание 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 (GMCSF) 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 подвывижу 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 (МТХ), сульфасалазин, золото и лефлуномид. Недавно значительным достижением стало внедрение биологических лекарственных средств, таких как Enbrel™, Remicade™ 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 25 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, 30 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 секretирует OSM спонтанно *ex vivo* (см. Okamoto H et al (1997) Arthritis and 45 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 50 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 транссудацию 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 мышного 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 адено-вирусной доставки mOSM агрессивное заболевание наблюдали у нокаут-мышей, не имеющих ФНО, IL-1, IL-6 и индуцибелной

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 мышного OSM при использовании 5 адено-вирусно 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 10 экспериментальной модели коллаген-индуцированного артрита антитела против OSM, терапевтически введенные мышам, предотвращали полностью дальнейшую прогрессию заболевания. Подобные результаты наблюдали, когда 15 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 20 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 25 мононуклеарными и полиморфоядерными нейтрофилами и высвобождение протеогликана (см. Bell MC et al (1999) *Arthritis Rheum* 42: 2543-2551). Трансгенная сверхэкспрессия mOSM в лимфатических узлах мыши приводит к 30 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 35 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 40 лечении воспалительных заболеваний и расстройств. В этом описании в мышиной модели артрита использованы антитела против мышного OSM.

Все ссылки на патенты и литературу, раскрытые в настоящем описании, 45 прямо и полностью включены посредством ссылки.

Краткое изложение сущности изобретения

Авторы настоящего изобретения постулируют, что модулирование (в 50 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:

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

50

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

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

15 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

30 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.

35 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.

40 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.

5 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.

10 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.

15 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.

20 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.

25 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.

30 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.

35 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.

40 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.

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

10 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.

15

20 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.

25 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.

30

35 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.

40

45 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.

50

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.

10 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.

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

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

30 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)).

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

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

которое специфически связывает hOSM и модулирует (то есть, ингибитирует 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 (cOSM) (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 cOSM (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 cOSM (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 ингибиования gp130 в примерах, где различные гуманизированные антитела (B2L2, B3L2, B4L2) сопоставлены с химерным 15E10 по связыванию с СНО-продуцированным hOSM.

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

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

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

Фиг. 9 иллюстрирует ELISA-анализ ингибиования 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 ингибиования 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 КВ вместо ELISA ингибиования gp130, за исключением того, что в анализе OSM нейтрофилов на клетках КВ по Фиг. 15 использован один образец OSM нейтрофилов человека. Таким образом, Фиг. 11 иллюстрирует КВ-анализ СНО-продуцируемого hOSM, Фиг. 12 иллюстрирует КВ-анализ СНО-продуцированного cOSM, Фиг. 13 иллюстрирует КВ-анализ СНО-продуцированного hOSM в 25%-ной человеческой сыворотке группы АВ, Фиг. 14 иллюстрирует КВ-анализ СНО-продуцированного cOSM в 25%-ной человеческой сыворотке группы АВ, Фиг. 15 иллюстрирует КВ-анализ OSM нейтрофилов, Фиг. 16 иллюстрирует КВ-анализ OSM, выделенного из клеток СЖ пациентов с РА.

Фиг. 17 иллюстрирует ELISA-анализ ингибиования gp130 родительскими мышиными 15E10, химерными 15E10, конструктом B3L2, представляющим собой гуманизированное антитело, и Fc-литическим мутантом B3L2 против СНО-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 мышного 15E10, химерных 15E10, гуманизированного конструкта B3L2 и Fc-литического мутанта B3L2 против СНО-продуцируемого hOSM.

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

Фиг. 21 иллюстрирует ингибирование 15E10 (гуманизированный конструкт B3L2) мышным конкурирующим антителом 10D3 из примеров. Процент ингибирования 15E10 конкурирующим 10D3 при эквимолярности (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 + Mab295: 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 gp130-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 ингибиование связывания комплекса OSM с антителом OM4-11.17, специфичным к сайту III, с gp130, 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 gp130-OSM ELISA. Анализ сывороток после первичной, вторичной и третичной бустер-иммунизации человеческим OSM: а, б и с, соответственно. OSM+доиммунная сыворотка: незакрашенные кружки. OSM+антисыворотки от иммунизированной мыши: закрашенные перевернутые треугольники. OSM+антисыворотка от иммунизированной мыши, но без gp130 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 (а) или hum 15E10 в отдельности (б): 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 ингибицию 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 ингибиции 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 ингибиции 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 гликопroteины, 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 вариабельный домен (V_H), за которым следует ряд константных областей. Каждая легкая цепь имеет вариабельный домен (V_L) и константную область на ее другом конце; константная область легкой цепи выровнена с первой константной областью тяжелой цепи, и вариабельный домен легкой цепи выровнен с вариабельным 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. Вариабельный домен антитела придает антителу специфичность связывания с определенными областями, проявляющими особенную вариабельность, называемыми участками, определяющими комплементарность (complementarity determining regions (CDRs)). Более стабильные участки вариабельной области называют каркасными участками (framework regions, FR). Вариабельные 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 С1q 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 вариабельную область, имеющую CDRs с SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6 или вариабельную область с SEQ ID NO: 40, 41, 42, 43, 44 и 45.

В еще одном воплощении предложено интактное мышье 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 мышье 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 мышной-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 мышных 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 Trimera™ (см. Eren R et al., (1998) Immunology 93:154-161), где человеческие лимфоциты трансплантируют в облученных мышах, систему Selected Lymphocyte Antibody System (SLAM, см. Babcock 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 деконвюляцией, предельным разведением и селекцией, и Xenomouse II™ (Abgenix Inc). Альтернативный подход доступен от Morphotek Inc при использовании технологии Morphodoma™.

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

5 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 вариабельный домен, не являющийся человеческим, (например грызуна, такого как мышь), конденсированный с человеческой константной областью. Поскольку антигенсвязывающий сайт антитела локализован в вариабельных 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 Н- 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 СНО 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 мышиными), 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. Большего снижения иммуногенности можно достичь вставкой только CDRs антител ("донорных" антител), не являющихся человеческими, (например мышевых), 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 антигена связывающих 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, So, 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 идентифицировать такие структурно важные остатки, можно использовать компьютерное моделирование антитела, см. WO99/48523.

Альтернативно, гуманизацию можно осуществить способом "маскировки". Статистический анализ уникальных вариабельных областей тяжелых и легких цепей человеческих и мышиных иммуноглобулинов выявил то, что точные картины экспонированных остатков являются разными в человеческих и 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 являющегося человеческим, путем замены экспонированных остатков в его каркасных участках, которые отличаются от обычно обнаруживаемых в человеческих антителах. Поскольку антигенный белок может коррелировать с доступностью поверхности, замена поверхностных остатков может быть достаточной, чтобы сделать мышью вариабельную область "невидимой" для иммунной системы человека (см. также Mark G.E. *et al* (1994) в *Handbook of Experimental Pharmacology* vol. 113: *The pharmacology of monoclonal antibodies*, Springer-Verlag, pp105-134). Этую процедуру гуманизации называют "маскировкой", так как изменяют только поверхность антитела, несущие остатки остаются ненарушенными. Дополнительный альтернативный подход изложен в WO04/006955.

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

В еще одном воплощении предложено химерное терапевтическое антитело, содержащее вариабельный участок, не являющийся человеческим, (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 человеческую константную область, относящуюся к изотипу IgG, например IgG1.

В еще одном воплощении предложено химерное терапевтическое антитело, содержащее вариабельный 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.

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.

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.

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.

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).

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: 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
10 29	L
30	T
71	K
15 94	K,

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

Положение	Остаток
20 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
35 29	L
30	T
71	K
40 94	K,

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

Положение	Остаток
45 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

50

67	A
69	L
71	V
5 73	K,

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

10	Положение	Остаток
36	F	
38	K	
15 46	R	
47	W	
71	Y.	

20 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 25 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
35 Остатки, которые влияют на ориентацию цепи	gly, pro
Ароматическая	trp, tyr, phe

40 1.3 Биспецифичные антитела

Биспецифичное антитело представляет собой антитело, обладающее специфичностями связывания для по меньшей мере двух разных эпитопов. 45 Способы получения таких антител известны в данной области. Традиционно рекомбинантное получение биспецифичных антител основано на коэкспрессии двух пар H-цепей и L-цепей иммуноглобулина, где две H-цепи имеют разные специфичности связывания, см. Millstein *et al*, Nature 305 537-539 (1983), 50

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

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

10 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 15 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 20 антитело состоит из H-цепи с первой специфичностью связывания в одной ветви и пары H-L-цепи, обеспечивающей вторую специфичность связывания, в другой ветви, см. WO94/04690. См. также Suresh *et al* Methods in Enzymology 25 121, 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 30 модулирует (то есть, ингибирует или блокирует) взаимодействие между сайтом II hOSM и gp130. Такие антитела могут дополнительно содержать человеческую 35 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 40 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.

45 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 50 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 производят в эукариотических клетках. Одним из недостатков ScFv является одновалентность продукта, которая делает невозможным повышение avidности 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 5 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 10 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, 15 3055-3061). Также можно получать тандемы ScFv-Sc-Fv ($(\text{ScFV})_2$) путем 20 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, 25 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 30 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 35 доступны, например, при использовании слияния ScFv-фрагмента с СН3-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 40 биспецифичных одноцепочечных диател (см. Alt *et al*, (1999) *FEBS Lett* 454, 90-94). Меньшие четырехвалентные биспецифичные молекулы можно также 45 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 50 вариабельных 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 зипперы (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, ингибитирует 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 (Fc_γR) 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 липидическое в иных случаях антитело нелипидическим, подробно описаны в EP 0629240B1 и EP 0307434B2, или можно включить в антитело эпигоп связывания с «рецептором-спасателем» (salvage receptor) для увеличения периода полужизни в сыворотке, см. US 5739277. В настоящее время распознано пять человеческих Fc_γ-рецепторов: Fc_γR (I), Fc_γRIIa, Fc_γRIIb, Fc_γRIIIa и неонатальные FcRn. В Shields et

al (2001) J.Biol.Chem 276, 6591-6604 показано, что в связывание всех Fc γ R вовлечена общая совокупность IgG1 остатков, в то время как Fc γ RII и Fc γ RIII используют отдельные сайты вне этой общей совокупности. Одна группа IgG1 остатков снижала связывание со всеми Fc γ R, 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 Fc γ RI использует для связывания только общую совокупность IgG1 остатков, Fc γ RII и Fc γ RIII взаимодействуют с отдельными остатками в дополнение к этой общей совокупности. Изменение некоторых остатков снижало связывание только с Fc γ RII (например Arg-292) или Fc γ RIII (например Glu-293). Некоторые варианты показали улучшенное связывание с Fc γ RII или Fc γ RIII, но не влияли на связывание с другим рецептором (например Ser-267Ala улучшал связывание с Fc γ RII, но связывание с Fc γ RIII было незатронутым). Другие варианты проявляли улучшенное связывание с Fc γ RII или Fc γ RIII при снижении связывания с другим рецептором (например Ser-298Ala улучшал связывание с Fc γ RIII и снижал связывание с Fc γ RII). Для Fc γ RIIIa, 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 сиалирование иммуноадгезина ФНО α -IgG было увеличено процессом повторного галактозилирования и/или сиалирования с использованием бета-1,4-галактозилтрансферазы и/или альфа-2,3-сиалилтрансферазы. Увеличение концевого сиалирования, как считается, увеличивает время полужизни иммуноглобулинов. Антитела, как и большинство гликопротеинов, в типичных случаях производятся в природе в виде смеси гликоформ. Эта смесь является особенно очевидной, когда антитела производятся 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 10 также Fab'-фрагментами, см. Koumentis I.L. *et al* (2000) Int.J.Pharmaceut. 198:83-95.

Доставка терапевтических белков в мозг затруднена присутствием 15 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 20 ГЭБ имеет некоторые специфические рецепторы, которые транспортируют соединения из циркулирующей крови в мозг. Исследования показали, что 25 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 30 посредством опосредованного рецепторами трансцитоза. Рецепторы для этих молекул, таким образом, дают для антител по этому изобретению и/или 35 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 40 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 45 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 50 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 эквимолярных 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. 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;
- (в) отбор указанного антитела, если указанное антитело имеет аффинность связывания более чем 1 мкМ, в типичных случаях более чем 100 нМ;
- (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;
- 5 (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 10 способом, в изготовлении лекарства для лечения заболеваний или расстройств, подробно описанных ниже.

Также предложено применение антитела (например интактного, 15 человеческого, гуманизированного, химерного), которое специфически связывает нативный гликозилированный hOSM (в частности, связывает элитоп сайта II нативного гликозилированного hOSM) и модулирует взаимодействие 20 между указанным нативным гликозилированным hOSM и gp130, в изготовлении лекарства для лечения заболевания или расстройства, подробно описанного 25 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 30 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 35 специфически связывает гликозилированный hOSM.

В некоторых воплощениях способа используют hOSM, 40 гликозилированный клеткой-хозяином млекопитающего, такой как СНО или NS0. В других воплощениях способа используют hOSM, гликозилированный человеческой клеткой, например рекомбинантно трансформированной или 45 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 50 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- 15 606, 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 типичных случаях антитела по этому изобретению производят с 20 использованием технологии культивирования рекомбинантных клеток, хорошо известной специалистам в данной области техники. Полинуклеотид, кодирующий антитело, выделяют и встраивают в реплицируемый вектор, такой как плазмида, для дополнительного клонирования (амплификации) или 25 экспрессии. Одной из полезных экспрессионных систем является глутаматсинтетазная система (например, поставляемая Lonza Biologics), особенно если клеткой-хозяином является CHO или NS0 (см. ниже). Полинуклеотид, кодирующий антитело, легко выделять и секвенировать, 30 используя общепринятые способы (например, с олигонуклеотидными зондами). Векторы, которые могут быть использованы, включают плазмиду, вирус, фаг, 35 транспозоны, мини-хромосомы, причем плазмиды представляют собой типичное воплощение. Обычно такие векторы дополнительно включают сигнальную последовательность, точку инициации репликации, один или более чем один маркерный ген, энхансерный элемент, промотор и 40 последовательности терминации транскрипции, функциональным образом связанные с полинуклеотидом легкой и/или тяжелой цепи, чтобы способствовать экспрессии. Полинуклеотид, кодирующий легкие и тяжелые 45 цепи, может быть встроен в отдельные векторы и введен (например электропорацией) в ту же самую клетку-хозяина, или, если желательно, обе 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 50 вектора, кодирующего легкие и/или тяжелые цепи терапевтического антитела

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
5 ниже.

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

В еще одном воплощении этого изобретения предложен полинуклеотид, кодирующий мышний V_L -домен, имеющий последовательность, указанную как
15 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.
20

В еще одном воплощении предложен полинуклеотид, кодирующий гуманизированную V_L -цепь, имеющую последовательность, указанную как SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 55.
25

В еще одном воплощении предложен полинуклеотид, кодирующий гуманизированную тяжелую цепь, имеющую последовательность, указанную как SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 56.
30

В еще одном воплощении предложен полинуклеотид, кодирующий гуманизированную легкую цепь, имеющую последовательность, указанную как SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 57.
35

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.
40

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
45 50

фосфатазы, пеницилликазы 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, плазмида 2μ для большинства дрожжей, и точки инициации репликации различных вирусов, таких как SV40, вируса полиомы, аденоовириуса, 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 СНО представляют собой особенно полезную клеточную линию для DHFR-селекции. Способы амплификации и селекции клеток-хозяев при использовании DHFR-системы

5 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, 10 48(8):870-80, 1998 Aug. Дополнительным примером является глутаматсинтетазная 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

15 Подходящие промоторы для экспрессии антител по этому изобретению функциональным образом связаны с ДНК/полинуклеотидом, кодирующим антитело. Промоторы для прокариотических хозяев включают промотор *rhoA*, 20 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 25 енолазы, глицеральдгид-3-фосфатдегидрогеназы, гексокиназы, пируватдекарбоксилазы, фосфофруктокиназы, глюкозо-6-фосфатизомеразы, 30 3-фосфоглицератмутазы и глюкокиназы. Индуцибелльные дрожжевые промоторы включают промоторы алкогольдегидрогеназы-2, изоцитохрома С, кислой фосфатазы, металлотионеина и ферментов, ответственных за метаболизм азота или утилизацию мальтозы/галактозы.

35 Промоторы для экспрессии в системах клеток млекопитающих включают промоторы вирусов, таких как вирус полиомы, птичьей оспы и аденоовириусы (например аденоовириус 2), вирус бычьей папилломы, вирус птичьей саркомы, цитомегаловирус (в частности, промотор непосредственно раннего гена), 40 ретровирус, вирус гепатита В, актина, промотор вируса саркомы Райса (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

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

50

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 мышного 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*, *Kluyveromyces* (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 (BHK) (ATCC CRL.1632), BHK 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 супензионной культуры, мышиные 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), Hep 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 флачонах или системах полых волокон, но предпочтительным для крупномасштабного производства является использование реакционных аппаратов с мешалкой, особенно для супензионных культур. В типичных случаях реакционные аппараты с мешалкой адаптированы для аэрации с использованием, например, разбрзгивателей, 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 раскрытие 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, секрецируемые 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 центрифugирования с последующей стадией

осветления супернатанта с использованием, например, микрофильтрации, ультрафильтрации 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, гельфильтрационная хроматография, и осаждения сульфатом аммония. В типичных случаях используют стадии удаления вирусов (например, нанофильтрация 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 этилендиаминетрауксусная 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, раздельно 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 антиangiогенные 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 antagonista сайта II, способного модулировать (то есть, ингибировать или блокировать) взаимодействие сайта II hOSM с gp130, и предоставление antagonista 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 antagonista сайта II, способного модулировать (то есть, ингибировать или блокировать) взаимодействие сайта II hOSM с gp130, и предоставление antagonista 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, ингибиовать 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 ингибиовать связывание OSM с gp130 в ELISA-анализе по примерам.

Антитело к сайту II можно распознавать по его способности ингибиовать 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 развивающейся 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 (OA) является хроническим дегенеративным заболеванием неизвестного происхождения, характеризующимся постепенной потерей суставного хряща и функции сустава. В настоящее время его классифицируют на две группы. Первичный OA может быть локальным или генерализованным, причем последний более чем обычно обнаруживается у постклиматических женщин, с развитием узелков Гебердена. Вторичный OA 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. OA 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 OA 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 COX-2, например целеоксиб, рофеоксиб, 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,

50

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, кортикоиды, 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, Дильтитокс), Zenapax™ (Даклизумаб), Базиликсимаб, антитела против CD4, Эфализумаб, Alefacept™, Сиплизумаб, IDEC-114 и BMS 188667 (CTLA4Ig). 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 секretируется кратковременными органными культурами патологически измененной псориатической кожи (см. Bonifati C *et al*, там же). Более того, конститтивная 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 фиброзный 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 єю 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.

Противомалярийные средства (например гидроксихлорохин, хлорохин и хинарин) 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

50

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 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 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 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 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 существенным компонентом воспаления дыхательных путей, включая ХОЗЛ и тяжелую астму. В дополнение, OSM также экспрессируют (мышиные) тканевые эозинофилы, и они могут быть существенным источником OSM при воспалении (см. Tamura, там же).

Сверхэкспрессия OSM в дыхательных путях мыши при использовании аденоовирусного 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 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 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

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 5 увеличению содержания гистамина (см. Gyotoku E *et al* (2001) Arch.Dermatol.Res 293:508-514). Непосредственное вливание OSM в изолированные легкие крысы 10 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 15 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 20 (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 25 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 30 церебральных микрососудов, что может усиливать инфильтрацию лейкоцитов в ткань головного мозга (Ruprecht K *et al*, там же). В дополнение к усилинию воспаления в мозге, OSM может непосредственно вносить вклад в потерю 35 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 M. Поскольку многие больные ВИЧ-инфекцией страдают атрофией мозга, 40 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 45 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 нейрофибрillaryных сплетениях. OSM, про который известно, что он секретируется как 50

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) (Wijelah E.S. *et al* (1997) *J.Cell Sci* 110:871-879) Интересно, что человеческие эндотелиальные клетки имеют примерно в 10-20 раз большую 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 сосудистых 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 прокоагулантной 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.I.D.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
5	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
10	Тяжелая цепь (гуманизированная, Fc мутирован)	SEQ ID NO: 61	NA
	Тяжелая цепь (гуманизированная, Fc мутирован, PN)	SEQ ID NO: 62	NA

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

20 **Примеры**

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

25 **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 30 клеток мышиной миеломы с В-лимфоцитами из мышей, иммунизированных целевым антигеном. Клетки гибридомы иммортализуют партнером слияния, представляющим собой миелому, в то время как способность продуцировать 35 антитела обеспечивается В-лимфоцитом.

Четырех мышей SJL иммунизировали внутрибрюшинной инъекцией гликозилированного человеческого OSM (hOSM), продуцированного в клетках CHO, супенсированных в адьюванте RIBI (Sigma). Мышей повторно иммунизировали через 2 недели введением только hOSM, затем еще через 2 недели введением hOSM, нейтрализованного моноклональным антителом 40 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 45 селезенки и проводили слияние В-лимфоцитов с клетками мышиной миеломы,

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.

Исходная селекция по антителу против OSM была основана на специфичности и эффективности в нейтрализации человеческого гликозилированного OSM, оцениваемой по ингибиции gp130 в ELISA и в анализе на клетках KB (см. ниже), причем последний позволил оценить специфичность в отношении OSM. После идентификации антител с достаточной эффективностью и соответствующей специфичностью применяли дополнительные критерии селекции:

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

Проводили скрининг 1920 гибридом на ингибицию 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 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 ингибиции gp130 в ELISA, но у него была 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 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

транскрипции с использованием праймеров, специфичных к мышиной лидерной последовательности и к константным областям антитела в соответствии с предопределенным изотипом (IgG2a/к). Затем клонировали кДНК 5 вариабельных тяжелых и легких доменов в вектор pCR2.1 для секвенирования.

2.1 Экстракция РНК

Суммарную РНК экстрагировали из осадка 10^6 клеток гибридомы клона 10 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 15 вариабельных тяжелых и легких доменов с использованием праймеров, специфичных к мышним лидерным последовательностям и константным 20 областям мышных IgG2a/к. Используемая смесь праймеров описана в Jones ST and Bendig MM Biotechnology 9:88-89 (1991).

Пулы прямых праймеров для лидерной последовательности мышных V_H и V_L получали в концентрации 50 мкМ. Растворы обратных праймеров для 25 константных областей мышных $\gamma 2a$ и к также получали в концентрации 50 мкМ.

2.3 Обратнотранскриптазная ПЦР (ОТ-ПЦР)

Обратную транскрипцию с РНК, кодирующей вариабельные тяжелые и 30 легкие участки, осуществляли в двух параллельных опытах с использованием системы Access RT-PCR от Promega в соответствии с инструкциями 35 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 40 наносили на препаративный 1%-ный агарозный гель, содержащий 0,01% бромид этидия, пропускали в буфере ТАЕ при 100 В в течение 1 часа и полосы 45 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 50 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 насыщали 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 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 конструктов. Это химерное антитело экспрессировали в клетках CHO, очищали и тестировали на аффинность к сайту II OSM в ингибиции 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 RId и RIn для млекопитающих. Сайты Hind III и Spe I были разработаны для встраивания в рамку V_H-домена и создания возможности клонирования в модифицированный вектор RId, содержащий человеческую С-область γ1 дикого типа. Сайты Hind III и BsiW I были разработаны для встраивания в рамку V_L-домена и создания возможности клонирования в модифицированный вектор RIn, содержащий С-область человеческой к.

4.1 ПЦР-амплификация

Прямой праймер для V_H:

15 5'-GAT GAA GCT TGC CAC CAT GGC TGT CCT AGG GCT ACT C-3'
(SEQ ID NO: 22)

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

Обратный праймер для V_H:

25 5'-GAT GGA CTA GTG TCC CTG TGC CCC AGA C-3' (SEQ ID NO: 23)

Рестрикционный сайт Spe I подчеркнут.

25 Прямой праймер для V_L:

30 5'-GAT GAA GCT TGC CAC CAT GGA TTT TCA GGT GCA GAT T-3'
(SEQ ID NO: 24)

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

Обратный праймер для V_L:

35 5'-GAT GCG TAC GTT TGA TTT CCA ACT TTG TCC C-3' (SEQ ID NO:
25)

Рестрикционный сайт BsiW I подчеркнут.

40	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
45		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 RId hCγ1wt 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 RId hCγ1wt (при 0,25 мг/мл).

Инкубировали 2 часа при 37°C.

Продукт ПЦР с V_L и экспрессионный вектор RIn hCκ 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 RIn hCk (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% бромида этидия, пропускали в буфере ТАЕ при 100 В в течение 1 часа и полосы векторов RId и RIn, 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 RId hCγ1wt.

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

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

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

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

V_L: вектор: RIn hCk, 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 аликовты по 50 мкл.

Добавляли и осторожно перемешивали на конечником 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.

5 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.

15 Плазмида RId и RIn, содержащие V_H - и V_L -домены, соответственно, экстрагировали и очищали с использованием набора QIAprep Spin Miniprep от Qiagen в соответствии с инструкциями изготовителя.

20 V_H -область секвенировали с использованием прямых праймеров в векторе RId и сигнальной последовательности и обратного праймера в человеческой $C\gamma 1$ -области.

25 V_L -область секвенировали с использованием прямых праймеров в векторе RIn и сигнальной последовательности и обратного праймера в человеческой $C\kappa$ -области.

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

4.3 Экспрессия химерного антитела в клетках CHO

Плазмидами RId и RIn, содержащими V_H - и V_L -домены 15E10, соответственно, временно котрансфицировали клетки CHO и экспрессировали.

35 Продуцируемое химерное антитело очищали из супернатанта клеточной культуры аффинной хроматографией на сефарозе с рекомбинантным протеином A и его аффинность к OSM оценивали по ингибираванию gp130 в 40 ELISA и в анализе на клетках KB (см. ниже).

4.3.1 Очистка плазмид

Клетки DH5 α , содержащие плазмида RId-15E10 V_H и RIn-15E10 V_L , 45 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 СНО культивировали до конфлюэнтности 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 уравновешивали 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 забуференный 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 уравновешивали 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 1M Trizma-HCl, pH 8,0, и фракции с достаточными количествами чистого антитела объединяли в пул и хранили в виде 100-мкл аликов 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 *Cynomolgus* (hOSM и cOSM). Протоколы для ингибирования gp130 в ELISA и анализа на клетках KB приведены ниже.

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

	gp130 в ELISA	анализ на клетках KB
15E10, мышьюное	0,059	0,195
15E10, химерное	0,036	0,110
10D3, мышьюное	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 мышным антителом. У обоих химерных антител профили кривых и величины IC₅₀ такие же, как у родительских мышных 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:

MGVPLRRTLLSLILALLFPSMASMAAMGSCSKERYMLLGQLQKQTDLMQDTSR
 LLDPYIRIQGLDIPKLREHCRESPGAFPSEETLRLGLRRGFLQTLNATLGCVLH
 RLADLEQHLPKAQDLERSGLNIEDLEKLQMAPNVLGLRNNVYCMACQLLNSDM
 TEPTKAGRGTPOPPPTPTSDVFORKLEGCSFLRGYHRFMHHSVGRIFSKWGESP
 NRSRRHSPHQALRKGVRRTRPSRKGNRLMPRGQLPR

SEQ ID NO: 64:

ATGGGGGTACCGCTCACACGGAGGACGCTGCTCAGTCTGATCCTTGCACTCCTG
 TTTCCAAGCATGGCAAGCATGGCGGCTATGGCAGCTGCTCGAAAGAGTACCGC
 ATGCTCCTGGCCAGCTCCAGAAGCAGACAGATCTCATGCAGGACACCAGCAGG
 CTCCTGGACCCCTATATACTGATCCAAGGCTGGATATTCTAAACTGAGAGAG
 CACTGCAGAGAGAGGCCCTGGGGCTTCCCCAGCGAGGAGACCCCTGAGGGGGCTG
 GGCAGGGGGCTTCTACAGACGCTCAATCCCACACTGGGCTGCGTCCTGCAC
 AGACTGGCCGACTTAGAGCAGCATCTCCCCAAGGCCAGGACTTGGAGAGGTCT
 GGGCTGAACATAGAGGACTTAGAGAAGCTGCAGATGGCGAGGCCGAATGTCTC
 GGGCTCAGGAACAAACGTCTACTGCATGGCCAGCTGCTGGACAACTCAGACATG
 ACTGAGCCCACGAAGGCCGGGGACCCCTCAGCCGCCACCCCCACCCCT
 ACCTCAGATGTTTCAGCGCAAGCTGGAGGGCTGCAGTTCTCGCTGGCTAC
 CATCGCTTCATGCACTCAGTGGGGCCATCTCAGCAAGTGGGGGAGAGCCCG
 AACCGGAGCCGGAGACACAGCCCCCACCAGGCCCTGGGAAGGGGGTGCAGCAGG
 ACGAGACCCCTCCAGGAAAGGCAATAGACTCATGCCAGGGACAGCTGCCCGG
 TAG

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

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

5.1.1 Поиск в базе данных мышиных последовательностей

15 мышиных последовательностей, имеющих наивысшую гомологию с аминокислотной последовательностью V_H из 15E10, и 10 мышиных 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 мышиными 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 мышиными 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:

5 QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYS
GSTNYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSPSSGSYYYYY
YGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ.I.D.NO:26)

10 CDRs подчеркнуты;

И

Группа В, в которой для гуманизации было выбрано следующее:

15 QVQLVESGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYD
GSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLGGPLYWYF
DLWGRGTLVTVSS (SEQ.I.D.NO:27)

15 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
30	G	G	A
67	L	V	F
71	K	V	R
35	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 (A1, A2, A3 и A4) и 4 на основании человеческих каркасных участков группы В (B1, B2, B3 и B4).

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

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

5

CDRs подчеркнуты.

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

10

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

15

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

Гуманизированный V_H-конструкт А1:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGVHWIRQPPGKGLEWIGVIWRG
20 GSTDYNAAFMSRVТИSVDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKSPNSNFYWF
VWGQGTTs (SEQ.I.D.NO:29)

Гуманизированный V_H-конструкт А2:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGVHWIRQPPGKGLEWIGVIWRG
25 GSTDYNAAFMSRVТИSKDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKSPNSNFYWF
VWGQGTTs (SEQ.I.D.NO:30)

Гуманизированный V_H-конструкт А3:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGVHWIRQPPGKGLEWIGVIWRG
30 GSTDYNAAFMSRVТИSKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKSPNSNFYWF
VWGQGTTs (SEQ.I.D.NO:31)

Гуманизированный V_H-конструкт А4:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGVHWIRQPPGKGLEWIGVIWRG
35 GSTDYNAAFMSRLТИSKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKSPNSNFYWF
VWGQGTTs (SEQ.I.D.NO:32)

Гуманизированный V_H-конструкт В1:

QVQLVESGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWAVIWRG
40 GSTDYNAAFMSRFTИSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSPNSNFYWF
VWGRGTLV (SEQ.I.D.NO:33)

Гуманизированный V_H-конструкт В2:

QVQLVESGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWAVIWRG
45 GSTDYNAAFMSRFTИSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWF
VWGRGTLV (SEQ.I.D.NO:34)

Гуманизированный V_H-конструкт В3:

50

5 QVQLVESGGVVQPGRSRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWAVIWRG
 GSTDYNAAFMSRFTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWF
 VWGRGTLV (SEQ.I.D.NO:35)

Гуманизированный V_H-конструкт B4:

10 QVQLVESGGVVQPGRSRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWAVIWRG
 GSTDYNAAFMSRLTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWF
 VWGRGTLV (SEQ.I.D.NO:36)

15 **Гуманизированный V_L-конструкт L1:**

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

20 **Гуманизированный V_L-конструкт L2:**

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

5.2 Гуманизация 15E10

25 Гуманизированные V_H- и V_L-конструкты получали de novo путем сборки перекрывающихся олигонуклеотидов, включающих рестрикционные сайты для клонирования в экспрессионные векторы для млекопитающего RId и RIn, а также человеческую сигнальную последовательность. Рестрикционные сайты Hind III и Spe I вводили для встраивания в рамку V_H-домена, содержащего 30 человеческую сигнальную последовательность для клонирования в RId, содержащем константную область человеческой γ1 дикого типа. Рестрикционные сайты Hind III и BsiW I вводили для встраивания в рамку V_L- 35 домена, содержащего человеческую сигнальную последовательность для клонирования в RIn, содержащем константную область человеческой каппа.

40 Человеческая сигнальная последовательность: MGWSCIIILFLVATATGVHS (SEQ ID NO: 39).

45 Сконструировали восемь гуманизированных V_H-конструктов и два гуманизированных V_L-конструкта. Это должно приводить к 16 разным комбинациям цепей. Поскольку сборка олигонуклеотидов вариабельных 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 50 комбинации с двумя гуманизированными V_L-конструктами.

Для сборки были сконструированы 10 олигонуклеотидов длиной 60 оснований с перекрыванием 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
5	реакционная смесь для сборки путем ПЦР	1 мкл
	ДНК-полимераза ProofStart	0,5 мкл
	суммарный объем	50 мкл

	праймер 1	праймер 2
10	15E10-A1/A4	15E10-A4-U1
	15E10-B1	15E10-B1-U1
	15E10-B4	15E10-B1-U1
	15E10-L1/L2	15E10-L1-U1
15	Цикл продуктивной ПЦР: 1- 94°C в течение 2 мин	

20 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

25 стадии от 2 до 4 повторяли 25 раз.

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

5.2.2 Рестрикционные фрагменты

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

5.2.3 Очистка в геле

35 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 RId hCγ1wt, расщепленный по Hind III-Spe I.

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

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

5.2.5 Трансформация

Как в 4.2.5.

5.2.6 Секвенирование

Колонии из каждого реакционного планшета культивировали в течение 5 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.

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

6. Экспрессия гуманизированных антител в клетках СНО

15 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 RId hCγ1wt и RIn hCκ. Восемь плазмид с комбинациями 20 тяжелой цепи и легкой цепи (A1L1, A1L2, A4L2, B1L2, B4L1 и B4L2) временно котрансфицировали в клетки СНО и экспрессировали в малом масштабе с 25 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 30 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 35 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 40 плазмиды измеряли по поглощению при 260 нм после 100-кратного разведения маточного раствора.

6.2 Трансфекция

45 В 9 лунок 6-луночных планшетов Corning Costar 3506 высевали по 10⁶ клеток СНО 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 Вијou:

- 5 1 мл Optimem 1 с Glutamax-1,
- 10 5 мкг плазмида, несущей гуманизированный V_H,
- 15 5 мкг плазмида, несущей гуманизированный V_L,
- 20 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 ингибиованию 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 ингибиовании 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: ингибиование меньше, чем 50%

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

Супомолгус в ингибиовании 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

50

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 СНО

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 СНО и экспрессировали. Полученные 3 гуманизированных антитела очищали из супернатанта клеточной культуры путем аффинной хроматографии на Сефарозе с рекомбинантным белком А 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 *Cynomolgus*. Анализы осуществляли с человеческими OSM из ряда источников, в том числе клеток СНО, клеток СНО 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

5 QVQLVESGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWWAVIWRG
 GSTDYNAAFMSRLTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWF
 VWGRGTLTVSS
 (SEQ.I.D.NO: 21)

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

10 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.

15 **6.7 Сравнение гуманизированного антитела B3L2 с химерными и родительскими мышиными антителами**

20 Гуманизированное антитело B3L2 сравнивали с химерными 15E10 и родительскими мышиными антителами в ингибиовании gp130 в ELISA и в анализе на клетках KB (см. ниже) с использованием OSM человека и обезьяна Cynomolgus в качестве целевого антигена. Гуманизированное антитело B3L2, несущее 2 точечных мутации в константной тяжелой цепи (Ala заменяет Leu в 25 положении 235 и Gly в положении 237), было сконструировано, экспрессировано в клетках CHO и очищено. Мутации снижают способность антитела выполнять эффекторные функции, особенно рекрутование факторов комплемента. На Фиг. 17-19 гуманизированное антитело-кандидат B3L2 с интактной тяжелой цепью обозначено как B3L2 wt (дикого типа), тогда 30 как мутированное антитело B3L2 обозначено как B3L2 mut.

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

40

	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

45 Величины IC50 приведены в мкг/мл.

50 Эти результаты подтверждают, что гуманизированное антитело B3L2 имеет эффективность, эквивалентную родительскому мышенному 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 10Д3

Суммарную РНК экстрагировали из клона 10D3 клеток гибридомы и кДНК тяжелых и легких вариабельных доменов получали обратной транскрипцией с использованием праймеров, специфичных для мышиной лидерной последовательности и константных областей антитела в соответствии с предопределенным изотипом (IgG1/κ). кДНК вариабельных 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 вариабельных тяжелых и легких доменов с использованием праймеров, специфичных для мышиных лидерных последовательностей и константных областей мышиных IgG γ 2a/к. 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 $\gamma 2a$ и κ также получали при 50 мкМ.

7.2.3 Обратнотранскриптазная ПЦР (ОТ-ПЦР)

Обратную транскрипцию РНК, кодирующую вариабельные 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% бромида этидия, и пропускали в буфере ТАЕ 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 планшетам, содержащим 100 мкг/мл ампициллина, и насыпали 8 мкл раствора 500 mM 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 конструктов. 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 RId и RIn для млекопитающего. Сайты Hind III и Spe I были разработаны для встраивания в рамку V_H-домена и возможности клонирования в модифицированном векторе RId, 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 RIn, 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
5		dНТФ (2 мМ)	10 мкл
		праймер 1 (5 мкМ)	4 мкл
		праймер 2 (5 мкМ)	4 мкл
10		полимераза AmpliTaq	2 мкл
		очищенная плазмида	4 мкл
		суммарный объем	100 мкл

Праймер 1: прямой праймер V_H или V_L

15 Праймер 2: обратный праймер V_H или V_L

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

20 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

25 стадии от 2 до 4: повторяли 30 раз

7.4.2 Клонирование в экспрессионных векторах для млекопитающего

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

7.4.2.1 Рестрикционные фрагменты

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

10×буфер (NEBuffer 2) 5 мкл

40 100×BSA (NEB) 0,5 мкл

ДНК 5 мкл

Hind III (Promega) 2 мкл

Spe I (NEB) 2 мкл

45 вода 35,5 мкл

суммарный объем 50 мкл

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

50 Инкубировали 2 ч при 37°C.

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

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

ДНК: очищенный продукт ПЦР V_L или вектор Rln hCk (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 ТАЕ 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 hCk.

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	
45	V _L :	вектор:	Rln hCk, 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 :

5 Оттаивали на льду флаконы по 200 мкл DH5 α .

Приготавливали в пробирках для трансформации аликовты по 50 мкл.

10 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.

15 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.

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

30 V_H-область секвенировали с использованием прямых праймеров в векторе RId и сигнальной последовательности и обратного праймера в человеческой Сγ1-области.

35 V_L-область секвенировали с использованием прямых праймеров в векторе RIn и сигнальной последовательности и обратного праймера в человеческой Сκ-области.

Идентифицировали клоны с соответствующими последовательностями 40 V_H и V_L и получали плазмиды для экспрессии в клетках СНО.

7.4.3 Экспрессия химерного антитела в клетках СНО

Плазмидами RId и RIn, содержащими V_H- и V_L-домены 10D3, соответственно, временно котрансфицировали клетки СНО и экспрессировали.

45 Продуцируемое химерное антитело очищали из супернатанта клеточной культуры аффинной хроматографией на Сефарозе с рекомбинантным белком А

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

7.4.3.1 Очистка плазмида

Клетки DH5 α , содержащие плазмиды RId-10D3V_H и RIn-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 ресуспендирували 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 СНО культивировали до конфлюэнтности 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 4×175-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 RId-10D3V_H

20 мкг очищенной плазмиды RIn-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 уравновешивали 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 дополнительные 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 уравновешивали 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, pH 8,0, и фракции с достаточными количествами чистого антитела объединяли в пул и хранили в аликоватах по 100 мкл при -20°C.

7.4.4 Анализ химерного антитела

Химерное антитело 10D3 анализировали на ингибиование gp130 в ELISA и в анализе на клетках КВ (см. ниже) на их эффективность в нейтрализации как OSM человека, так и OSM обезьян Супомолгус.

Протоколы для ингибиования gp130 в ELISA и для анализа на клетках КВ приведены ниже.

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

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

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

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

10 Мышиные вариабельные области клонировали и секвенировали, затем вставляли в человеческие константные области $\gamma 1/k$ с получением химерного антитела. Химерное антитело 10D3 показало эффективность против OSM 15 человека и обезьян Супомолгус, эквивалентную таковой родительского мышиного антитела, в ингибиции gp130 в ELISA и в анализе на клетках KB (см. ниже).

20 Мышиное антитело гуманизировали, используя стратегию "наилучшего соответствия". Для вариабельного тяжелого домена выбирали последовательность с 65%-ной идентичностью и вставляли мышиные CDRs в 25 человеческие каркасные участки. Сконструировали ряд конструктов с различными обратными мутациями в каркасных участках для восстановления аффинности. Этими конструктами являются:

- | | | |
|----|-----------|--|
| 25 | Конструкт | Обратные мутации |
| | A | T28I |
| | B | T28I, R71V, T73K |
| 30 | C | T28I, V67A, M69L, R71V, T73K |
| | D | T28I, M48I, G44K, V67A, M69L, R71V, T73K |

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

- | | | |
|----|-----------|------------------------------|
| 40 | Конструкт | Обратные мутации |
| | LA | отсутствуют (прямая вставка) |
| | LB | L46R, L47W |
| 45 | LC | Y36F, Q38K |
| | LD | Y36F, Q38K, L46R, L47W |
| | LE | Y36F, Q38K, L46R, L47W, F71Y |

50

Только конструкты 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 ингибиции gp130 в ELISA.

Только гуманизированные антитела ALE и DLE показали ингибицию в gp130 ELISA, но ингибиение 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
⁵ Клетки TOP10F': Invitrogen 44-0300
 L-агар + ампициллин (100 мкг/мл): приготавливали самостоятельно
 X-Gal, 50 мг/мл в ДМФ: Promega V394A
¹⁰ ДНК-полимераза AmpliTaq: Applied Biosystems
 10× буфер для ПЦР: Applied Biosystems
 Гель для электрофореза, 1,2%-ный агарозный: Invitrogen G501801
¹⁵ Среда LB + ампициллин (100 мкг/мл): приготавливали самостоятельно
 Набор QIAprep Spin Miniprep: Qiagen 27106
 Набор MinElute для очистки продуктов ПЦР: Qiagen 28004
²⁰ Буфер NEBuffer2, конц.10×: New England Biolabs B7002S
 Очищенный бычий сывороточный альбумин (BSA), конц. 100×: New England
 Biolabs B9001S
²⁵ 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
³⁰ Химически компетентные клетки MAX Efficiency DH5α: Invitrogen 18258-012
 Среда SOC: приготавливали самостоятельно
 Набор QIAfilter Plasmid Maxi: Qiagen 12263
³⁵ 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
⁴⁰ 1-мл колонка FF с рекомбинантным белком А на сефарозе: Amersham
 Biosciences 17-5079-01
 Забуференный фосфатами физраствор Dulbecco's PBS: Sigma D8537
⁴⁵ 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

⁵⁰

Пример 8. Ингибирование gp130 в ELISA

5 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 ингибиции связывания OSM с
 gp130 рецептором антителами, индуцированными против сайта II OSM.

10 **8.1 Материалы**

1. Планшет Nunc Immunoplate 1 F96 Maxisorp (Life Technologies, 4-39454A)
- 15 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)
- 20 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)
- 25 7. Стрептавидин-пероксидаза хрена (HPR) (Amersham RPN4401)
8. 3,3'5,5'-тетраметиленбензидин (TMB) (Sigma)
9. Серная кислота
- 30 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%).
- 35 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.

5 (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)

10 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.

15 7. Промывают как на стадии 1.

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

20 9. Промывают как на стадии 1.

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

25 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 ингибиования связывания gp130-OSM

30 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.

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

40 3) Проводят анализ, как описано выше.

9. КВ-анализ

Введение

45 Клетки КВ (человеческая эпителиальная клеточная линия) экспрессируют мРНК 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

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

9.1 Методика

Клетки КБ 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 КВ"). Клетки выращивали в монослое и пересевали 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 (1нг/мл) + антитело/сыворотка.

Инкубируют в течение 1 ч при КТ.

4. Осторожно удаляют среду из планшета с клетками КВ 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 КВ должно быть постоянным, и стандартны OSM следует приготавливать в этой смеси.

- Стимуляция клеток КВ 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 A 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 G. 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 H₂SO₄ 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. % ингибиования вычисляли как:

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

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

Пример 10.1: 10D3 в качестве конкурирующего антитела

В качестве конкурента 15E10 использовали антитело E9 из мышного 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)	% ингибиования
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

% ингибиования 15E10 конкурентом, представляющим собой 10D3, при эквимолярности (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-gp130 изложен в Примере 8. Типичная стандартная кривая (при 1 мкг/мл, gp130) 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 gp130 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-gp130. 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 gp130 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 gp130, поскольку сайт II доступен. При более высоких концентрациях молекулы антитела связывают две молекулы OSM, каждая из которых доступна для связывания с gp130, что делает возможным связывание 2 молекул OSM с каждой молекулой gp130, причем одна связывается непосредственно с gp130, 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 gp130-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 КВ-анализе, но не должно нейтрализовывать связывание OSM-gp130 в анализе ELISA. Антитело к сайту II будет нейтрализовать OSM как в ELISA-анализе, так и в КВ-анализе.

gp130-OSM ELISA-анализ использовали в качестве первичного скрининга гибридом для детектирования антител, генерированных по Примеру 1, которые ингибирировали взаимодействие gp130-OSM. В дополнение, гибридомы были подвергнуты скринингу для детектирования активности связывания OSM. Супернатанты гибридом, показывающие высокий уровень связывания OSM, но которые не ингибирировали связывание OSM-gp130 в анализе ELISA по примеру 8, были протестированы в анализе на клетках КВ 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 gp130-OSM ELISA они значительно усиливали сигнал от OSM, как показано на Фиг. 25.

Антитело к сайту II, 1B5 (1мкг/мл), полностью ингибирирует связывание OSM-gp130. 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 gp130, пока не достигнет пиковой величины. Изотипический контроль IgG для OM4-11.3.1 не влиял на связывание OSM-gp130. 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-gp130 ELISA-анализе

Когда антитела против OSM, специфичные к сайту II и сайту III, смешаны вместе, антитела к сайту II имеют преобладающий эффект в gp130-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 КВ-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 Kd, до в 10 раз меньших, чем Kd, 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 КВ. 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 КВ. 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.

Фибробlastы 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 СНО). Однако, когда измерили способность субклона этого антитела (OM4-5.3.1) ингибировать связывание гликозилированного OSM (hOSM, гликозилирован клетками СНО) 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

40

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 50

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 M
22. Таблетки PBS (SIGMA P4417, 100 таблеток)
23. Tween 20 (Sigma P7949)
24. Приспособления для заклеивания планшетов

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление планшетов

5 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

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

Блокирующий буфер

15 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

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

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

Разделяют на аликовты и замораживают.

30 В день анализа оттавивают 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

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

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

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

МЕТОДИКА

45 1. Промывают планшет 4x 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.

50

3. Промывают как на стадии 1.
4. Добавляют по 50 мкл/лунку стандарта или образца. Накрывают и встряхивают 2 часа при комнатной температуре.

5 (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-HPR 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 1M H₂SO₄.
12. Считывают немедленно при 450 нм после встряхивания планшета.

30

35

40

45

50

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> ΠΡΤ

10

<213> Mus sp.

15

<400> 2
Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met Ser
1 5 10 15

20

<210> 3

<211> 12

<212> ΠΡΤ

25

<213> Mus sp.

30

<400> 3

Ser Pro Asn Ser Asn Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

35

<210> 4

<211> 10

<212> ΠΡΤ

40

<213> Mus sp.

45

<400> 4
Ser Gly Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
1 5 10

50

<210> 5
<211> 7
<212> ΠΡΤ
<213> Mus sp.

RU 2429 245 C2

<400> 5

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

5

<210> 6

<211> 9

<212> ΠΡΤ

10

<213> Mus sp.

<400> 6

15

Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> 7

20

<211> 120

<212> ΠΡΤ

<213> Mus sp.

25

<400> 7

30

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

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

40

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

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

5

<213> Mus sp.

<400> 8

10

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

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				

20

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

25

Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	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			

30

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

<210> 9

35

<211> 120

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

40

<220>

<223> VH домен (гуманизированный, В3)

45

<400> 9

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

50

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

RU 2429 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
50			
Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr			
85	90	95	

RU 2429 245 C2

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

<210> 11

5

<211> 450

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

10

<220>

<223> Тяжелая цепь (гуманизированная)

15

<400> 11

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

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 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

35

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

40

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

45

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

50

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 2429 245 C2

180

185

190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

5

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

30

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

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

40

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

45

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

50

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
450

<210> 12

5

<211> 213

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

10

<220>

15

<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	

20

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

25

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

30

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		

35

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

40

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

45

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

50

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

RU 2429 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> ΠΡΤ

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

RU 2429 245 C2

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

30 <400> 14
 atgggggtac tgctcacaca gaggacgctg ctcagtctgg tccttgcact cctgtttcca 60
 agcatggcga gcatggcgcc tataaggcagc tgctcgaaag agtaccgcgt gtccttggc
 cagctccaga agcagacaga tctcatgcag gacaccagca gactcctgga cccctatata 120
 35 cgtatccaag gcctggatgt tcctaaactg agagagcact gcagggagcg cccgggggcc
 ttccccagtg aggagaccct gagggggctg ggcaggcgg gcttcctgca gaccctcaat
 gccacactgg gctgcgtcct gcacagactg gccgacttag agcagcgcct ccccaaggcc 180
 40 caggatttgg agaggtctgg gctgaacatc gaggacttgg agaagctgca gatggcgagg
 ccgaacatcc tcgggctca gaaacacatc tactgcatgg cccagctgct ggacaactca
 gacacggctg agcccacgaa ggctggccgg ggggcctctc agccgcccac ccccacccct 240
 45 gcctcgatg cttttcagcg caagctggag ggctgcaggt tcctgcattt ctaccatcgc
 ttcatgcact cagtggggcg ggtcttcagc aagtgggggg agagccccgaa ccggagccgg
 agacacagcc cccaccaggc cctgaggaag ggggtgcgca ggaccagacc ctccaggaaa 300
 50 ggcaagagac tcatgaccag gggacagctg ccccggtag 360
 420
 480
 540
 600
 660
 720
 759

<210> 15

<211> 360

<212> ДНК

5

<213> Mus sp.

<400> 15

10

caggtgcaac tgaaggcagtc aggacctggc ctagtgcagc cctcacagag cctgtccata 60
 acctgcacag tctctggttt ctcattaact aattatggtg tacactgggt tcgccagtct 120
 ccagggaaagg 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 cgtctctca 360

20

<210> 16

<211> 318

<212> ДНК

25

<213> Mus sp.

<400> 16

30

caaattgttc tcacccagtc tccaaacaatc atgtctgcat ctccaggggga gaaggtcacc 60
 atgacctgca gtggcagctc aagtgttaatg tacatgtatt ggtaccagga gaagccagga 120
 tcctccccca gactcctgat tgaagacaca tccaaacctgg cttctggagt ccctgctcgc 180
 35 ttcagtgccca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacaa tcagccgaat ggaggctgaa 240
 gatgctgcca cttattactg tcaacagtgg agtagttatc cacccacgtt cggctcgaaa 300
 acaaagttgg aaatcaaa 318

40

<210> 17

<211> 360

<212> ДНК

45

<213> Искусственная последовательность

<220>

50

<223> VH домен (гуманизированный, РН, В3)

<400> 17
 caggtgcagc tggggggggc gtgggtccagc ctggggaggc cctgagactc 60

RU 2429 245 С2

	tcctgtgcag cgtctggatt ctcattaact aattatggtg tacactgggt ccgccaggct	120
	ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtg atatggagag gtggaagcac agactacaat	180
5	gcagcttca tgtcccgatt caccatctcc aaggacaatt ccaagaacac gctgttatctg	240
	caaataaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgaa aagtccgaat	300
	agtaactttt actggtattt cgatgtctgg ggccgtggca cactagtcac agtctcctca	360
10	<210> 18	
	<211> 318	
	<212> ДНК	
15	<213> Искусственная последовательность	
	 <220>	
20	<223> VL домен (гуманизированный, РН, L2)	
	<400> 18 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtcttgt ctccaggaaa aagagccacc	60
25	ctctcctgca gtggcagctc aagtgttaat tacatgtatt ggtaccaaca gaaacctggc	120
	caggctccca ggctcctcat cgaagacaca tccaacctgg cttctggcat cccagccagg	180
	ttcagtggca gtgggtctgg gacagactac actctcacca tcagcaacct agagcctgaa	240
30	gattttgcag tttattactg tcaacagtgg agtagttatc cacccacgtt tggccagggg	300
	accaagctgg agatcaaa	318
	 <210> 19	
35	<211> 1350	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
40	 <220>	
	<223> Тяжелая цепь (гуманизированная, РН)	
45	<400> 19 caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc	60
	tcctgtgcag cgtctggatt ctcattaact aattatggtg tacactgggt ccgccaggct	120
	ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtg atatggagag gtggaagcac agactacaat	180
50	gcagcttca tgtcccgatt caccatctcc aaggacaatt ccaagaacac gctgttatctg	240
	caaataaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgaa aagtccgaat	300

RU 2429 245 C2

	agtaactttt actggatttt ccatgtctgg ggccgtggca cactagtcac agtctcctca	360
	gcctccacca agggccccatc ggtttcccc ctggcacccct cctccaagag cacctctggg	420
5	ggcacagcg ccctgggctg cctggtaag gactacttcc ccgaaccgggt gacggtgtcg	480
	tggaaacttag cgcccctgac cagccgcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtccctca	540
	ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgcctcca gcagcttggg cacccagacc	600
10	tacatctgca acgtgaatca caagcccaagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc	660
	aaatcttgtg acaaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggg	720
	ccgtcagtct tcctttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct	780
15	gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	840
	tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgccggagga gcagtacaac	900
	agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag	960
20	gagtacaagt gcaaggcttc caacaaagcc ctcccagccc ccacgcgagaa aaccatctcc	1020
	aaagccaaag ggcagcccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccggatgag	1080
	ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtaaag gcttctatcc cagcgacatc	1140
25	gccgtggagt gggagagcaa tggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctccctg	1200
	ctggactccg acggctcctt cttctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg	1260
	cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg	1320
	cagaagagcc tctccctgtc tccggtaaa	1350
30		
	<210> 20	
	<211> 639	
35	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
40	<220>	
	<223> Легкая цепь (гуманизированная, РН)	
	<400> 20	
	gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgttttgt ctccagggga aagagccacc	60
45	ctctcctgca gtggcagctc aagtgttaagt tacatgtatt ggtaccaaca gaaacctggc	120
	caggctccca ggctcctcat cgaagacaca tccaacctgg cttctggcat cccagccagg	180
	ttcagtggca gtgggtctgg gacagactac actctcacca tcagcaacct agagcctgaa	240
50	gattttgcag tttattactg tcaacagtg agtagttatc caccacgtt tggccagggg	300
	accaagctgg agatcaaacg tacggtggt gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct	360

gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc	420
agagaggcca aagtacagtg gaaggtggac aacgcctcc aatcggttaa ctcccaggag	480
5 agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg	540
agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgct aagtcaaccca tcagggctg	600
agctcgcccc tcacaaagag cttcaacagg ggagagtg	639
10 <210> 21	
<211> 120	
<212> ПРТ	
15 <213> Искусственная последовательность	
<220>	
20 <223> VH домен (В4, гуманизированный)	
<400> 21	
25 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser 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	
10	<400> 22 gatgaagctt gccaccatgg ctgtcctagg gctactc	37
15	<210> 23	
	<211> 28	
20	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
25	<220>	
	<223> VH обратный праймер	
30	<400> 23 gatggactag tgtccctgtg ccccaagac	28
35	<210> 24	
	<211> 37	
40	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
45	<220>	
	<223> VL прямой праймер	
50	<400> 24 gatgaagctt gccaccatgg attttcaggt gcagatt	37
55	<210> 25	
	<211> 31	
60	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
65	<220>	
	<223> VL обратный праймер	
70	<400> 25	

gatgcgtacg tttgatttcc aactttgtcc c

31

<210> 26

5 <211> 124

<212> PPT

<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	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> PPT

<213> Homo sapiens

45

<400> 27

50

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

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 конструкт A1

15 <400> 29

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

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

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

25

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

30

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

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

35

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

40

Gly	Thr	Thr	Ser
			115

<210> 30

<211> 116

45

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

50

<220>

<223> Гуманизированный VH конструкт A2

RU 2429 245 C2

<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 Ieu 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

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

25

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

30

<210> 31

<211> 116

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

35

<220>

<223> Гуманизированный VH конструкт А3

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 Ieu Thr Asn Tyr
20 25 30

50

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
----	----	----

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 конструкт 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
---	----	----	----

45

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn 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
---	----	----	----

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 конструкт В1

15 <400> 33

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		

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

<211> 116

45

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

50

<220>

<223> Гуманизированный VH конструкт В2

RU 2429 245 C2

<400> 34

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser 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

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

25

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

30

Gly Thr Leu Val
115

<210> 35

35

<211> 116

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

40

<220>

<223> Гуманизированный VH конструкт В3

45

<400> 35

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

50

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

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

<212> ПРТ

20

<213> Искусственная последовательность

25

<220>

<223> Гуманизированный VH конструкт B4

<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 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

<210> 37

5 <211> 106

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

10

<220>

<223> Гуманизированный VL конструкт L1

15 <400> 37

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	Tyr
					35			40			45				

25

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

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	

40 <210> 38

<211> 106

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

45

<220>

<223> Гуманизированный VL конструкт 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 2429 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	
10	Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro Glu			
	65	70	75	80
15	Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr			
	85	90	95	
	Phe Gly Gin Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
	100	105		
20	<210> 39			
	<211> 19			
	<212> ΠΡΤ			
25	<213> Homo sapiens			
	<400> 39			
30	Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly			
	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> ΠΡΤ			

<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> NPT

<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> NPT

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> NPT

<213> Mus sp.

45

<400> 44

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
 1 5

<210> 45

RU 2429 245 C2

<211> 9

<212> NPT

<213> Mus sp.

5

<400> 45

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
10 1 5

<210> 46

15 <211> 121
<212> NPT

<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

30

Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys 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

35

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

40

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

Ala Arg Gly Ile 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> NPT

<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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Val Met
 10 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

29 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

1220>

<223> УН Домен (гуманизированный В3)

40

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

45 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asp Tyr
 ⁶⁰ ⁶⁵ ⁷⁰

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

Glu Asp Ile Asp Pro Asp Asp Glu Glu Thr Ile Asp Asp Gln Lys Phe

50

55

60

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

5

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 Gly Ser His Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

15

<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 цель (гуманизированная)

10

<400> 50

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

15

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ile	Phe	Thr	Asp	Tyr
															30
20															

20

Asn	Met	Asp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Lys	Leu	Glu	Trp	Ile
															45
35															

Gly	Asp	Ile	Asn	Pro	Asn	Asn	Gly	Gly	Thr	Ile	Asp	Asn	Gln	Lys	Phe
															60
50															

25

Lys	Asp	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr
															80
65															

30

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

Ala	Arg	Gly	Ile	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Ser	His	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly
															110
100															

35

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

40

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

Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val
															160
145															

45

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

50

Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val
															190
180															

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His

195

200

205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

5

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	

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				

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		

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

Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	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					

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

gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgag ctggtaagg ctggggcttc agtgaagata 60

20 tcctgcaagg cctctggata catattcaact gactacaaca tggactgggt gaagcagagc 120

catggaaaga aacttgatg gattggagat attaattccta ataattggtgg tactatcgac 180

aaccagaagt tcaaggacaa ggccacattt actgttagaca agtcctccag cacagcctac 240

25 atggagctcc gcagcctgac atctgaggac actgcagtct attactgtgc aagaggatt 300

tattactacg gtatgtacta ctttgactat tggggccaag gcaccactct cacagtctcc 360

tca 363

30

<210> 53

<211> 318

<212> ДНК

35 <213> Mus sp.

<400> 53

40 caaatgttc tcacccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60

atgacctgca gtgccaccc aagtgttgt gtcgtgcact ggttccagaa gaagtcaggt 120

acctccccca aaagatggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt ccctactcgc 180

45 ttcaatgtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacaa tcagtagcat ggaggctgaa 240

gataactgcca cttattactg ccagcgtgg agtagtaacc cactcacgtt cggttctggg 300

accaagctgg agctgaaa 318

50

<210> 54

<211> 363

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

5

<220>

<223> VH домен (гуманизированный, PN, В3)

<400> 54

10	gagggtccagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt tcctgcaagg catctggata catattcacc gactacaaca tggactgggt gcgacaggcc	60
	cctggacaaa aacttgagtg gattggagat attaatccta ataatggtgg tactatcgac	120
15	aaccagaagt tcaaggacag agccacacctg accgttagaca agtccacgag cacagtctac atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaggatt	180
	tattactacg gtagtcacta ctttgactat tggggccagg gaacactagt cacagtctcc	240
20	tca	300
		360
		363

<210> 55

<211> 318

25

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

30

<220>

<223> VL домен (гуманизированный, PN, L2)

<400> 55

35	gaaatttgt tgacgcagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgttgaga cagagtcacc atcacttgca gtgccacctc aagtgttaagt gtcatgcact gggtccagaa gaaaccagg	60
	aaagccccta agagatggat ctatgacaca tccaaactgg ctctgggtt cccatcaagg	120
40	ttcagtgcca gtggatctgg gacagattac actctcacca tcagcagtct gcaacctgaa gatttgcaa cttattactg ccagcagtgg agtagtaacc cactcacgtt cggcggagg	180
	acccaaagtgg atatcaaa	240
		300
		318

45

<210> 56

<211> 1353

<212> ДНК

50

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тяжелая цепь (гуманизированная, РН)

5	<400> 56 gagggtccagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt	60
	tcctgcaagg catctggata catattcacc gactacaaca tggactgggt gcgacaggcc	120
	cctggacaaa aacttgagtg gattggagat attaatccta ataatggtgg tactatcgac	180
10	aaccagaagt tcaaggacag agccacaccc accgttagaca agtccacgag cacagtctac	240
	atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagggatt	300
	tattactacg gtagtcacta ctttgactat tggggccagg gaacactagt cacagtctcc	360
15	tcagcctcca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct	420
	gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg	480
	tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggtgt cctacagtcc	540
20	tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgcctt ccagcagctt gggcacccag	600
	acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag	660
	cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg	720
25	ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc	780
	cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac	840
	tggtaacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagacaa agccgcggga ggagcagttac	900
30	aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc	960
	aaggagtaca agtgcacaggctt ctccaaacaaa gcccctccag ccccccattcga gaaaaccatc	1020
	tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccccc atcccgggat	1080
35	gagctgacca agaaccaggat cagcctgacc tgccctggtca aaggcttcta tcccagcgcac	1140
	atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc	1200
	gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg	1260
40	tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcattt aggtcttgca caaccactac	1320
	acgcagaaga gccttccct gtctccgggt aaa	1353

<210> 57

45 <211> 639

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

50

<220>

<223> Легкая цепь (гуманизированная, РН)

<400>	57	
gaaattgtgt tgacgcagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgttggaga cagagtcacc		60
5 atcaacttgca gtgccacctc aagtgttaagt gtcatgcact ggttccagaa gaaaccagg		120
aaagccccta agagatggat ctatgacaca tccaaactgg cttctgggtt cccatcaagg		180
ttcagtggca gtggatctgg gacagattac actctcacca tcagcagtct gcaacctgaa		240
10 gatttgcaa ttattactg ccagcagtgg agtagtaacc cactcacgtt cggcggaggg		300
accaaagtgg atatcaaacg tacggggct gcaccatctg tttcatctt cccgccccatct		360
gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc		420
15 agagaggcca aagtacagtg gaaggtggac aacgcctcc aatcggtaa ctcccaggag		480
agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg		540
agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgct aagtcacccca tcagggcctg		600
20 agctcgccccg 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 agcttgggcc 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

35

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	Phe	Met	
					50					55					60

40

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

45

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

50

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

RU 2429 245 C2

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		5	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					10	180	185	190		Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys					15	195	200	205		Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp						210	215	220		Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Ala Gly Ala					20	225	230	235	240	Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile					25	245	250	255		Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu						260	265	270		Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His					30	275	280	285		Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg					35	290	295	300		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					40	325	330	335		Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr					45	340	345	350		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					50	370	375	380	
140																																																																																																																																																						
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser																																																																																																																																																						
5	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																																																																																																																																																						
10	180	185	190																																																																																																																																																			
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys																																																																																																																																																						
15	195	200	205																																																																																																																																																			
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp																																																																																																																																																						
	210	215	220																																																																																																																																																			
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Ala Gly Ala																																																																																																																																																						
20	225	230	235	240																																																																																																																																																		
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile																																																																																																																																																						
25	245	250	255																																																																																																																																																			
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu																																																																																																																																																						
	260	265	270																																																																																																																																																			
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His																																																																																																																																																						
30	275	280	285																																																																																																																																																			
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg																																																																																																																																																						
35	290	295	300																																																																																																																																																			
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																																																																																																																																																						
40	325	330	335																																																																																																																																																			
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr																																																																																																																																																						
45	340	345	350																																																																																																																																																			
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																																																																																																																																																						
50	370	375	380																																																																																																																																																			

RU 2429 245 C2

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 Ileu 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 caggtgcagc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggc cctgagactc 60

tcctgtcag cgtctggatt ctcattaact aattatggtg tacactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtg atatggagag gtgaaagcac agactacaat 180

35 gcagcttca tgtcccgatt caccatctcc aaggacaatt ccaagaacac gctgtatctg 240

caaataaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgaa aagtccgaat 300

agtaactttt actggatttt cgatgtctgg ggccgtggca cactagtcac agtctcctca 360

40 gcctccacca agggcccatc ggtttcccc ctggcacccct cctccaagag cacctctggg 420

ggcacagcgg ccctgggcgtg cctggtcaag gactacttcc cccaaccgggt gacgggtgtcg 480

tggaactcag ggcgcctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540

45 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgcctcca gcagcttggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaatca caagcccac aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660

aaatcttgtg acaaaaactca cacatgcccc cctgtccccag cacctgaact cgcggggca 720

50 ccgtcagtct tcctttccc cccaaaaccc aaggacacccc tcatgatctc ccggacccct 780

gaggtcacat gcgtgggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900

RU 2429 245 C2

	agcacgtacc	gtgtggtcag	cgtcctcacc	gtcctgcacc	aggactggct	aatggcaag	960										
	gagtacaagt	gcaaggcttc	caacaaagcc	ctccccagccc	ccatcgagaa	aaccatctcc	1020										
5	aaagccaaag	ggcagccccg	agaaccacag	gtgtacaccc	tgccccatc	ccgggatgag	1080										
	ctgaccaaga	accaggtcag	cctgacctgc	ctggtaaaag	gcttctatcc	cagcgacatc	1140										
	gccgtggagt	gggagagcaa	tggcagccg	gagaacaact	acaagaccac	gcctcccg	1200										
10	ctggactccg	acggctcctt	tttcctctac	agcaagctca	ccgtggacaa	gagcagg	1260										
	cagcagggga	acgtttctc	atgctccgtg	atgcattgagg	ctctgcacaa	ccactacacg	1320										
	cagaagagcc	tctccctgtc	tccggtaaa				1350										
15	<210>	63															
	<211>	252															
	<212>	NP															
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 2429 245 C2

Gly Leu Arg Asn Asn Val Tyr Cys Met Ala Gln Leu Leu Asp Asn Ser
 145 150 155 160

Asp Met Thr Glu Pro Thr Lys Ala Gly Arg Gly Thr Pro Gln Pro Pro
 5 165 170 175

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

Phe Ser Lys Trp Gly Glu Ser Pro Asn Arg Ser Arg Arg His Ser Pro
 15 210 215 220

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 ctcagtctga tccttgcact cctgtttcca 60

35 agcatggcaa gcatggcggc tatgggcagc tgctcgaaag agtaccgcat gtccttggc 120

cagctccaga agcagacaga tctcatgcag gacaccagca ggctcctgga cccctatata 180

cgtatccaag gcctggatat tcctaaactg agagagact gcagagagag ccctggggcc 240

40 ttccccagcg aggagaccct gagggggctg ggcaggcgg gcttcctaca gacgctcaat 300

gccacactgg gctgcgtcct gcacagactg gccgacttag agcagcatct ccccaaggcc 360

caggacttgg agaggtctgg gctgaacata gaggacttag agaagctgca gatggcgagg 420

45 ccgaatgtcc tcgggctca gaaacacgtc tactgcatgg cccagctgct ggacaactca 480

gacatgactg agcccacgaa ggccggccgg gggacccctc agccgcccac ccccacccct 540

acctcagatg ttttcagcg caagctggag ggctgcagtt tcctgcgtgg ctaccatcgc 600

50 ttcatgcaact cagtggggcg gatcttcagc aagtgggggg agagccgaa 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

SGSSSVSYMY

20

SEQ.I.D.NO:5

DTSNLAS

25

SEQ.I.D.NO:6

QQWSSSYPPPT

SEQ.I.D.NO:7

30

QVQLKQSGPGLVQPSQSLAITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIRGG
STDYNAAFMSRLSITKDNRSQLQADDTAIYYCAKSPNSNFYWFYFDVW
GTGTTVTVSS

35

SEQ.I.D.NO:8

QIVLTQSPTIMSASPGEKVMTCSGSSSVSYMYWYQEKGPGSSPRLLIEDTSNLAS
GVPARFSGSGSGTYSLTISRMEAEDAATYYCQQWSSYPPTEFGSGTKLEIK

40

45

50

SEQ.I.D.NO:9

5 QVQLVESGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRGG
 STDYNAAFMSRFTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKS PNSNFYWF'DVW
 GRGTLTVSS

SEQ.I.D.NO:10

10 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSGSSSVSYM WYQQKPGQAPRLLIEDTSNLAS
 GIPARFSGSGSGTDYTLTISNLEPEDFAVYYCQQWSSYPPFGQGTKLEIK

15

SEQ.I.D.NO:11

20 QVQLVESGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRGG
 STDYNAAFMSRFTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKS PNSNFYWF'DVW
 GRGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTWSWNSGA
 LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
 KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
 LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
 25 SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
 QKSLSLSPGK

25

30

SEQ.I.D.NO:12

35

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSGSSSVSYM WYQQKPGQAPRLLIEDTSNLAS
 GIPARFSGSGSGTDYTLTISNLEPEDFAVYYCQQWSSYPPFGQGTKLEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
 DSKDSTYSLSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ.I.D.NO:15

40

45

50

5 CAGGTGCAACTGAAGCAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGAGCCTGT
 CCATAACCTGCACAGTCTCTGGTTCTATTAACTAATTATGGTGTACACTGGGT
 TCGCCAGTCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGAGTGTATGGAGAGGTGGA
 AGCACAGACTACAATGCAGCTTCATGTCCAGACTGAGCATCACCAAGGACA
 CCAGGAGCCAAGTTCTTAAAATGAACAGTCTACAAGCTGATGACACTGCCAT
 ATACTACTGTGCCAAAAGTCCGAATAGTAACCTTACTGGTATTCGATGTCTGG
 GGCACAGGGACCACGGTACCGTCTCCTCA

10

SEQ.I.D.NO:16

15 CAAATTGTTCTACCCAGTCTCCAACAATCATGTCTGCATCTCCAGGGAGAAGG
 TCACCATGACCTGCAGTGGCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGTATTGGTACCA
 GAAGCCAGGATCCTCCCCAGACTCCTGATTGAAGACACATCCAACCTGGCTTCT
 GGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCACAA
 TCAGCCGAATGGAGGCTGAAGATGTCGCCACTTATTACTGTCAACAGTGGAGTAG
 TTATCCACCCACGTTGGCTCGGGACAAAGTTGGAAATCAA

20

SEQ.I.D.NO:17

25 CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCCTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGA
 GACTCTCCTGTGCAGCGCTGGATTCTCATTTAACTAATTATGGTGTACACTGGGT
 CCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGTGGCAGTGATATGGAGAGGTGGA
 AGCACAGACTACAATGCAGCTTCATGTCCCATTCAACATCTCCAAGGACAATT
 CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGT
 30 GTATTACTGTGCAAAAGTCCGAATAGTAACCTTACTGGTATTCGATGTCTGG
 GGCGTGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCA

30

SEQ.I.D.NO:18

35

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCGTCTTGTCTCCAGGGAAAGAG
 CCACCCCTCCCTGCAGTGGCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGTATTGGTACCAACA
 GAAACCTGCCAGGCTCCAGGCTCTCATCGAAGACACATCCAACCTGGCTTCT
 40 GGCATCCCAGCCAGGTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTACACTCTCACCA
 TCAGCAACCTAGAGCCTGAAGATTTGCAGTTATTACTGTCAACAGTGGAGTAG
 TTATCCACCCACGTTGGCCAGGGACCAAGCTGGAGATCAA

45

50

SEQ.I.D.NO:19

5 CAGGTGCAGCTGGTGGGTCTGGGGAGGCGTGTCAGCCTGGGAGGTCCCTGA
 GACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCTCATTAACATAATTATGGTGTACACTGGGT
 CCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTGATATGGAGAGGTGGA
 AGCACAGACTACAATGCAGCTTCATGTCCCATTACCATCTCCAAGGACAATT
 CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGT
 GTATTACTGTGCGAAAAGTCCGAATAGTAACCTTTACTGGTATTCGATGTCTGG
 10 GGCGTGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCT
 TCCCCCTGGCACCCCTCCtCCAAGAGCACCTCTGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG
 CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGGAACCTCAGGCGCC
 CTGACCAGCGCGTGCACACCTCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACT
 15 CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTGGCACCCAGACCTACAT
 CTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCC
 AAATCTTGTGACAAAACtCACACATGCCAACCGTGCCTGACCTGAACCTCTGG
 GGGGACCGTCAGTCTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTC
 20 CCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAG
 GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
 CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACGGTCCTCACCGTCCT
 GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCCAACAAAGCC
 25 CTCCCAGCCCCAtCGAGAAAACCaTCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAAC
 CACAGGTGTACACCCCTGCCCTCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGaACCAGGTCA
 CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAG
 AGCAATGGGAGCCGGAGAACAAACTACAAGACCACGCCCTCCGTGCTGGACTCCG
 30 ACGGCTCCTTCTCCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA
 GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACG
 CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAA

35

SEQ.I.D.NO:20

40 GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCGTCTTGTCTCCAGGGAAAGAG
 CCACCCCTCTCCTGCAGTGGCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATGTATTGGTACCAACA

45

50

GAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCGAAGACACATCCAACCTGGTTCT
 GGCATCCCAGCCAGGTTAGTGGCAGTGGTCTGGGACAGACTACACTCTCACCA
 TCAGCAACCTAGAGCCTGAAGATTTCAGTAACTTATTACTGTCAACAGTGGAGTAG
 TTATCCACCCACGTTGCCAGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTACGGTGGCT
 GCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTGAATCTGGAAC TG
 CCTCTGTTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTG
 GAAGGTGGACAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAG
 GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAG
 ACTACGAGAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCTGAGCTC
 GCCCGTCACAAAGAGCTAACAGGGGAGAGTGT

5

10

20

25

30

35

40

45

50

SEQ.I.D.NO:21

QVQLVESGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRG
 GSTDYNAAFMSRLTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWF
 VWGRGTLVTVSS

SEQ.I.D.NO:40

DYNMD

SEQ.I.D.NO:41

DINPNNGGTIDNQKFKD

SEQ.I.D.NO:42

GIYYYYGSHYFDY

SEQ.I.D.NO:43

SATSSVSVMH

SEQ.I.D.NO:44

DT SKLAS

SEQ.I.D.NO:45

QQWSSNPLT

SEQ.I.D.NO:46

5 EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYIFTDYNMDWVKQSHGKKLEWIGDINPNN
 GGTIDNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDTAVYYCARGIYYYGSHYFDY
 WGQGTTLTVSS

SEQ.I.D.NO:47

10 QIVLTQSPAAMSASPGEKVMTCSATSSVSVMHWFQKKSGTSPKRWIYDTSKLAS
 GVPTRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDTATYYCQQWSSNPLTFGSGTKLELK

SEQ.I.D.NO:48

15 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTDYNMDWVRQAPGQKLEWIGDINPNN
 GGTIDNQKFKDRATLTVDKSTSTVYMELOSSLRSEDTAVYYCARGIYYYGSHYFDY
 WGQGTLVTVSS

20

SEQ.I.D.NO:49

25 EIVLTQSPSSLASAVGDRVITCSATSSVSVMHWFQKKPGKAPKRWIYDTSKLAS
 GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKVDIK

SEQ.I.D.NO:50

30 EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTDYNMDWVRQAPGQKLEWIGDINPNN
 GGTIDNQKFKDRATLTVDKSTSTVYMELOSSLRSEDTAVYYCARGIYYYGSHYFDY
 WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSNSG
 ALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
 PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPETCVVVDVSHEDP
 EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHY
 TQKSLSLSPGK

35

SEQ.I.D.NO:51

40 EIVLTQSPSSLASAVGDRVITCSATSSVSVMHWFQKKPGKAPKRWIYDTSKLAS
 GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKVDIKRTVA
 APSVFIGPPSDEQLKSGTASVVCNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
 DSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

45

50

SEQ.I.D.NO:52

5 GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAGCCTGGGCTTCAGTGA
 AGATATCCTGCAAGGCCTCTGGATAACATATTCACTGACTACAACATGGACTGGGT
 GAAGCAGAGCCATGGAAAGAAACTTGAGTGGATTGGAGATATTAACTCTAATAAT
 GGTGGTACTATCGACAACCAGAACGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACA
 AGTCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGAGCCTGACATCTGAGGACACTGC
 AGTCTATTACTGTGCAAGAGGGATTATTACTACGGTAGTCACTACTTGACTAT
 TGGGCCAAGGCACCTCACAGTCTCCTCA

SEQ.I.D.NO:53

10 CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCATCTCCAGGGAGAAGGTAC
 CATGACCTGCAGTGCACCTCAAGTGTAAAGTGTCACTGCAGTGGTCCAGAAGAAGTCAG
 GTACCTCCCCAAAAGATGGATTATGACACATCAAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTACT
 CGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGACCTCTTACTCTCTCACAACTCAGTAGCATGGAGGC
 15 TGAAGATACTGCCACTTATTACTGCCAGTGGAGTAGTAACCCACTCACGTTGGTT
 CTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

SEQ.I.D.NO:54

20 GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGCTCAGTGAAGGT
 TTCCTGCAAGGCATCTGGATAACATATTCAACGACTACAACATGGACTGGTGCGACAGG
 CCCCTGGACAAAAACTTGAGTGGATTGGAGATATTAAATCTAATAATGGTGGTACTATC
 GACAACCAGAACGTTCAAGGACAGAGCCACCTTGACCGTAGACAAGTCCACGAGCACAGT
 CTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAG
 GGATTTATTACTACGGTAGTCACTACTTGACTATTGGGCCAGGGAAACACTAGTCACA
 25 GTCTCCTCA

25

30

SEQ.I.D.NO:55

35 GAAATTGTTGACGCAGTCTCCATCCTCCCTGCTGCATCTGTTGGAGACAGAGTCAC
 CATCACTTGCAAGTGCACCTCAAGTGTAAAGTGTCACTGCAGTGGTCCAGAAGAAACCAG
 GGAAAGCCCCTAACAGAGATGGATCTATGACACATCAAACCTGGCTTCTGGGTCCCCTCA
 AGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGACAGATTACACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACC
 TGAAGATTTGCAACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCACTCACGTTGGCG
 GAGGGACCAAGTGGATATCAA

SEQ.I.D.NO:56

40 GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGCTCAGTGAAGGT
 TTCCTGCAAGGCATCTGGATAACATATTCAACGACTACAACATGGACTGGTGCGACAGG

45

50

CCCCTGGACAAAACCTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCTAATAATGGTGGTACTATC
 GACAACCAGAAGTCAGGACAGAGCACCTTGACCGTAGACAAGTCCACGAGCACAGT
 CTACATGGAGCTGAGCAGCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGATTACTGTGCGAGAG
 GGATTATTACTACGGTAGTCACTACTTGACTATTGGGGCCAGGAACACTAGTCACA
 5 GTCTCCTCAGGCCCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCCAAGAG
 CACCTCTGGGGCACAGCGCCCTGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGG
 TGACGGTGTGTTGGAACTCAGGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCTGTC
 CTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCTCCAGCAGCTT
 GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA
 AGAAAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCAACGTGCCAGCACCT
 10 GAACTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCAAAACCCAAGGACACCTCAT
 GATCTCCCGAACCTGAGGTACATCGTGGTGGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTG
 AGGTCAAGTTCACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG
 CGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACGCGTCTCACCGTCTGCACCA
 GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCC
 15 CCACTCGAGAAAACCACTCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACC
 CTGCCCTCCatTCCCAGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTACGCCCTGGTCAA
 AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGAGAGCAATGGGAGCCGAGAACAA
 ACTACAAGACCAACGCCCTCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTACAGCAAG
 CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA
 TGAGGCTCTGCACAAACACTACAGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAA

SEQ.I.D.NO:57

20 GAAATTGTGTTGACCGAGTCTCCATCCTCCCTGCTGCATCTGTTGGAGACAGAGTCAC
 CATCACTGCGAGTGCACCTCAAGTGTAAAGTGTCTGCACAGCTGGCTCTGGGTCCATCA
 GGAAAGCCCCCTAAGAGATGATCTATGACACATCAAACCTGGCTCTGGGTCCATCA
 AGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGACAGATTACACTCTCACCATCAGCAGTCTGCACCC
 TGAAGATTTGCAACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCACTCACGTTGGCG
 GAGGGACCAAAGTGGATATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGCTCTCATCTTCCC
 25 CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCCTGTTGTCGCTGCTGAATAACTT
 CTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTCCAATCGGGTAACCT
 CCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACC
 CTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCCA
 TCAGGGCCTGAGCTGCCGTACAAAGAGCTTCAACAGGGAGAGTGT

SEQ.I.D.NO:61

30 QVQLVESGGVVQPGRSRLSLCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAIWRG
 GSTDYNAAFMSRFTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWF
 35 VWGRGLTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
 KVEPKSCDKTHTCP PCPAPELAGAPSFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
 KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
 40 DIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMH
 EALHNHYTQKSLSLSPGK

45

50

SEQ.I.D.NO:62

5 CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCCTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTG
 AGACTCTCCTGTGCAGCGCTGGATTCTCATTAACATAATTATGGTGTACACTGG
 GTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTGATATGGAGAGGT
 GGAAGCACAGACTACAATGCAGCTTCATGTCCCATTACCATCTCCAAGGAC
 AATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGGCCAGGACACG
 GCTGTGTATTACTGTGCAAAAGTCGAATAGTAACCTTTACTGGTATTCGAT
 GTCTGGGGCGTGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCA
 TCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCAAAGAGCACCTCTGGGGCACAGCGGCC
 CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGGAAC
 TCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTCCGGCTGTCCTACAGTCCTCA
 GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTGGCACCC
 CAGACCTACATCTGCAACGTGAATACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG
 AAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACACACATGCCACCGTGCCAGCA
 CCTGAACTCGGGGGCACCGTCAGTCTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGAC
 ACCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGC
 CACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT
 AATGCCAAGACAAAGCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC
 AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
 AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCC
 AAAGGGCAGCCCCGAGAACCCACAGGTGTACACCCTGCCCATCCGGGATGAG
 CTGACCAAGAACCAAGGTTCAGCCTGACCTGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC
 GACATCGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACC
 ACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTACAGCAAGCTCACC
 GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
 GAGGCTCTGCACAACCAACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAA

30 Формула изобретения

1. Терапевтическое антитело, которое специфически связывает сайт II онкостатина M человека (hOSM) и ингибирует взаимодействие между сайтом II hOSM и gp130, содержащее следующие CDR:

- 35 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,
 40 CDRL3 с SEQ ID NO: 6.

2. Антитело по п.1, выбранное из группы, состоящей из интактного, химерного, гуманизированного, биспецифичного, гетероконьюгатного.

3. Антитело по п.2, являющееся гуманизированным.

45 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.

50 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.

15

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 нелитическим.

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.

40

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.

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.

50

19. Способ по п.18, где указанный пациент страдает ревматоидным артритом и/или остеоартритом.

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 псoriasisом, включающий стадию введения указанному пациенту терапевтически эффективного количества композиции по п.15.

⁵ 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.

¹⁰ 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,
¹⁵ чувствительного к ингибированию взаимодействия между hOSM и gp130, такого как ревматоидный артрит, остеоартрит, псoriasis, астма, ХОЗЛ.

²⁰ 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.

²⁵ 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 производящая клетка-хозяин, содержащая вектор по п.25.

³⁰ 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.

³⁵ 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 мышной миеломы (линия NSO).

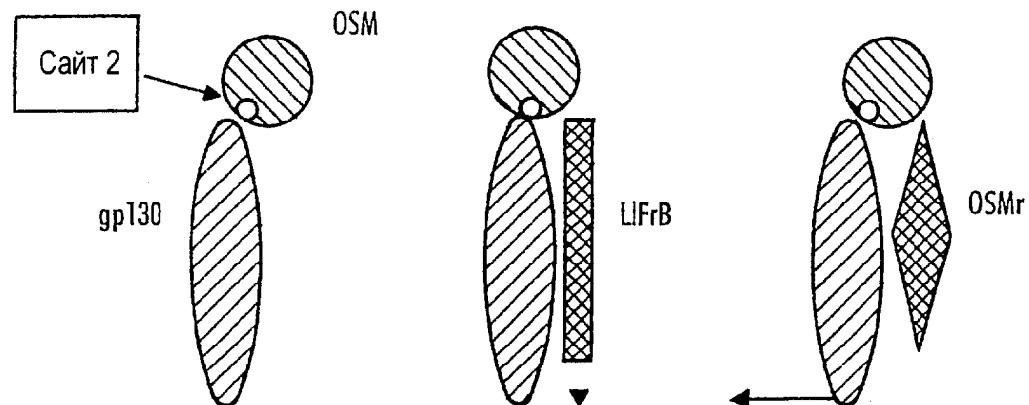
⁴⁰ 31. Способ получения терапевтического антитела, включающий стадию культивирования клетки-хозяина по любому из пп.27-30.

⁴⁵

⁵⁰

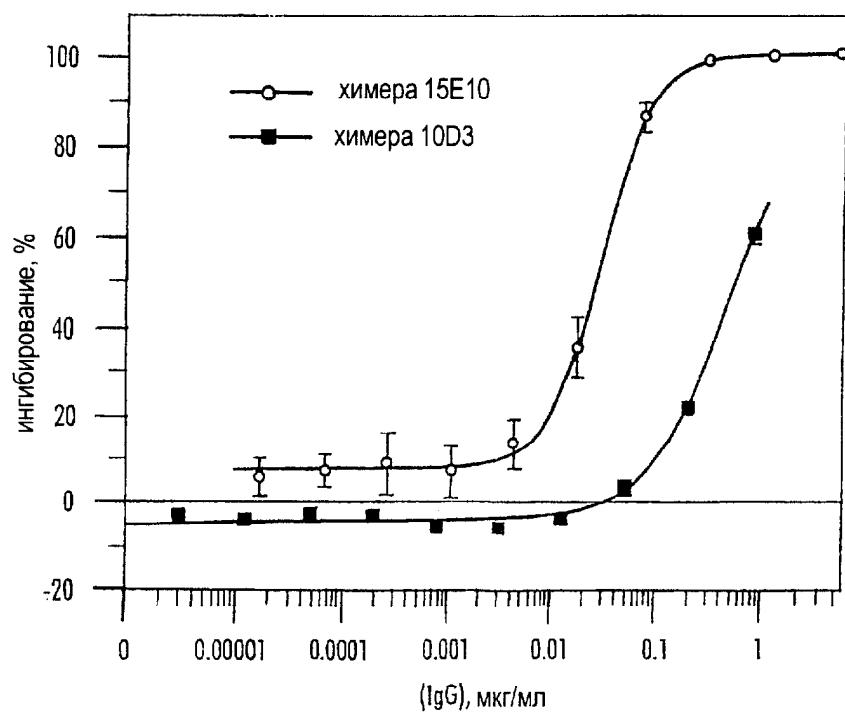
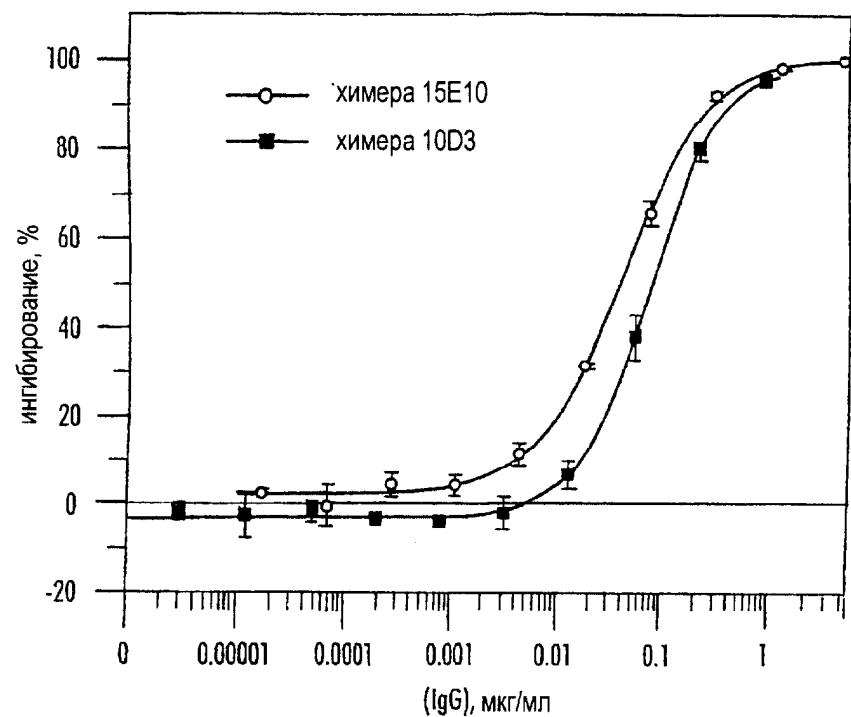
Тип I

Тип II

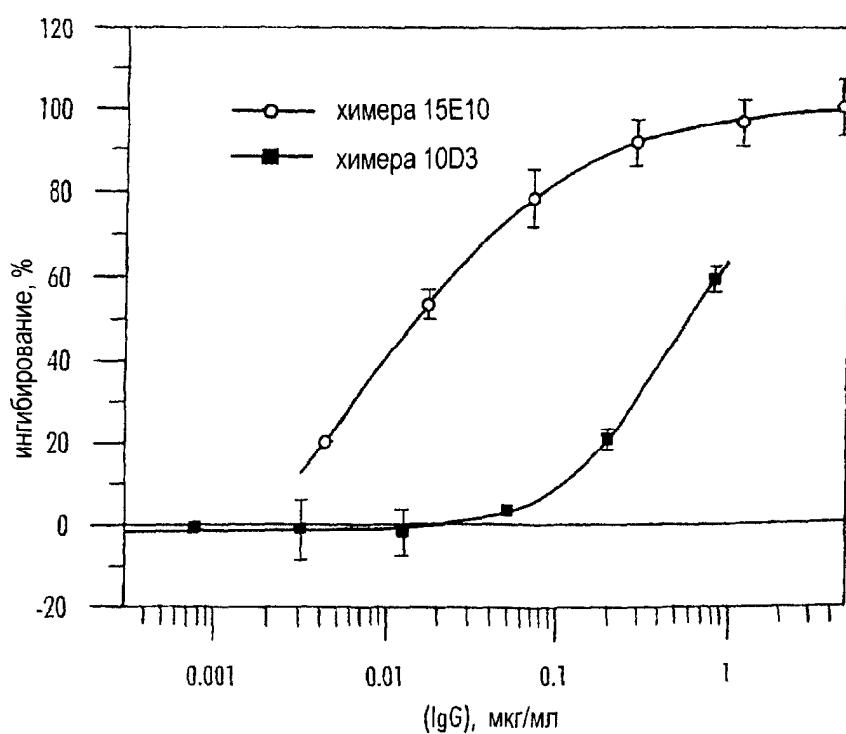
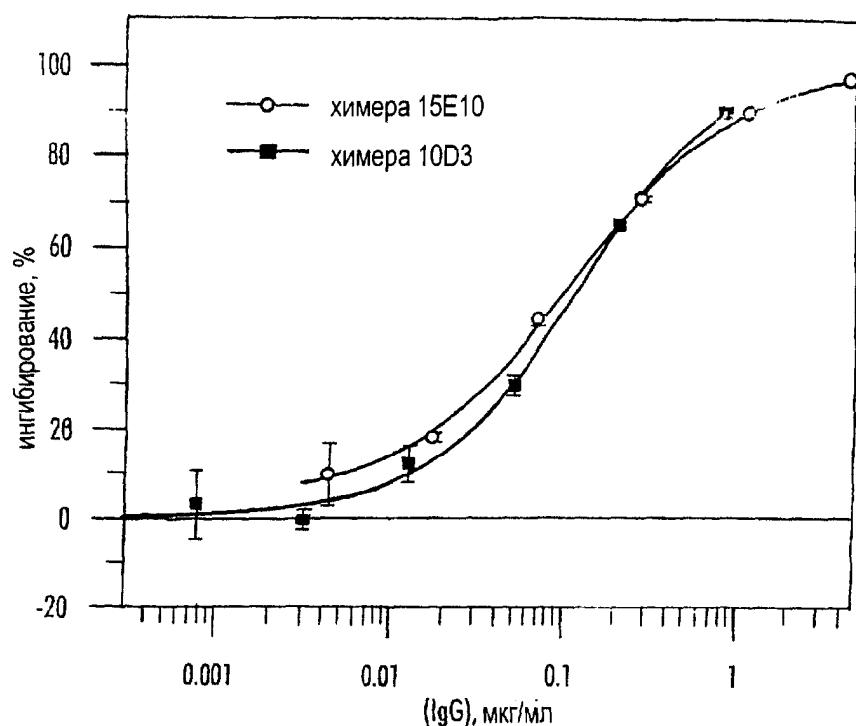


Stat-1/3, JAK, ras MAPK

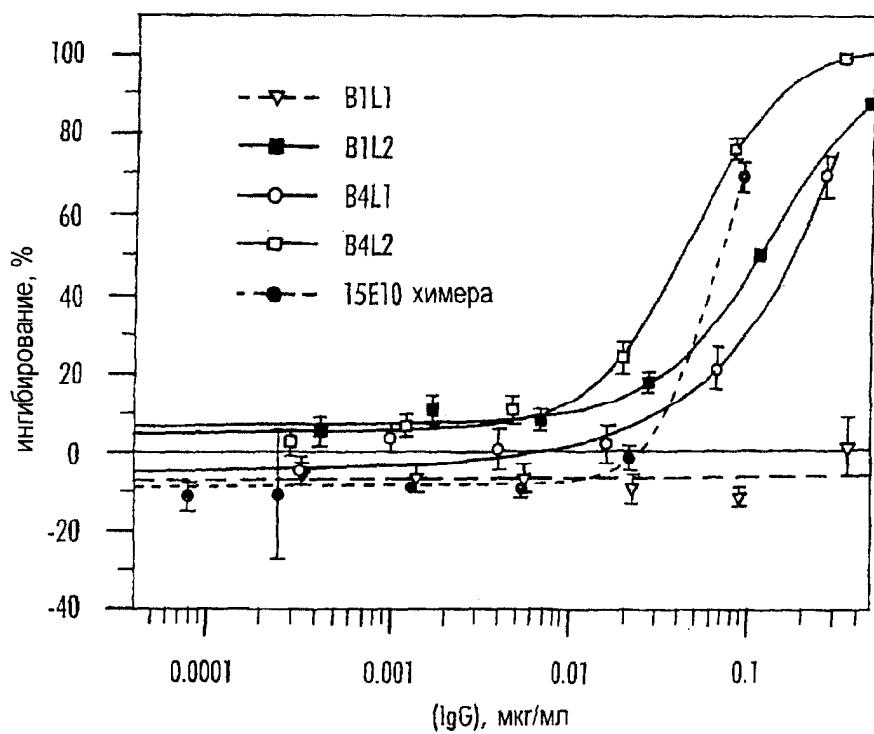
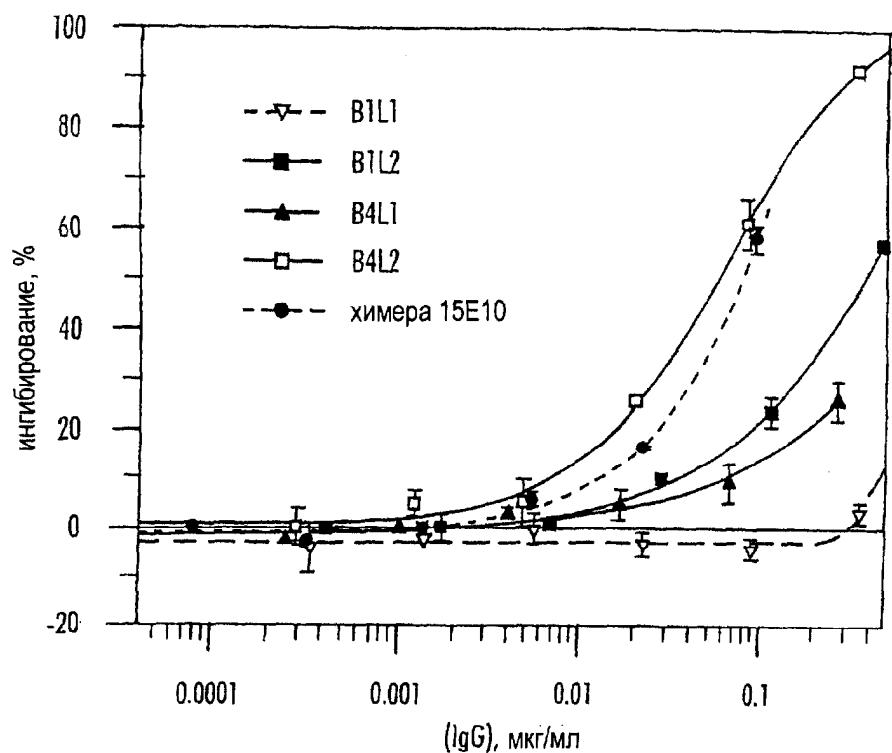
Фиг. 1



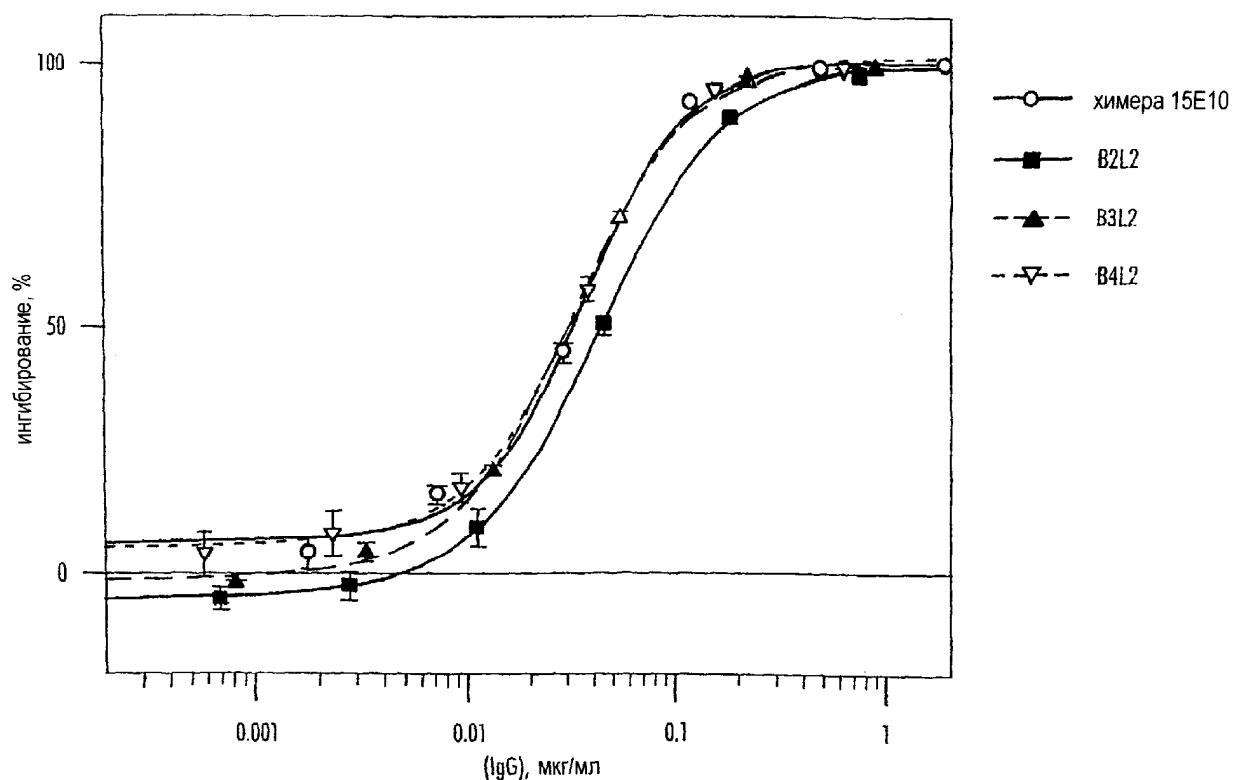
Фиг. 2



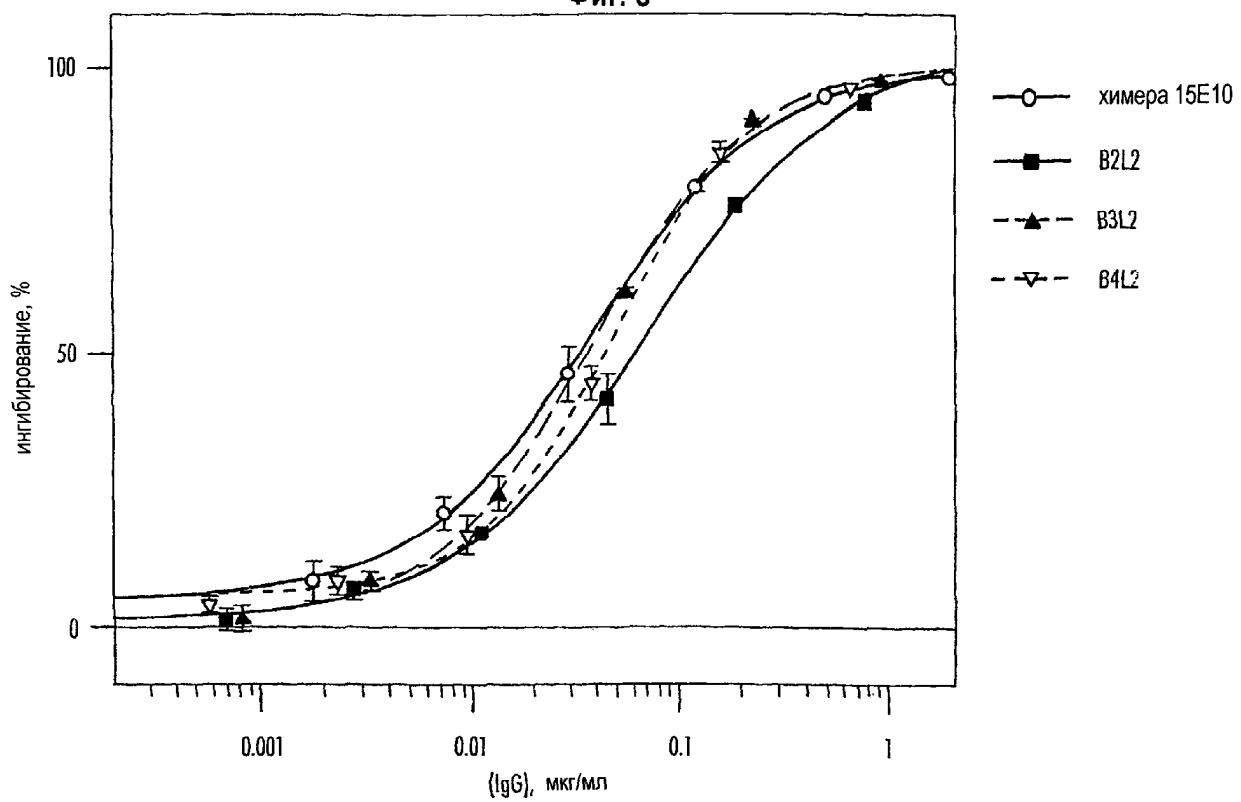
Фиг.3



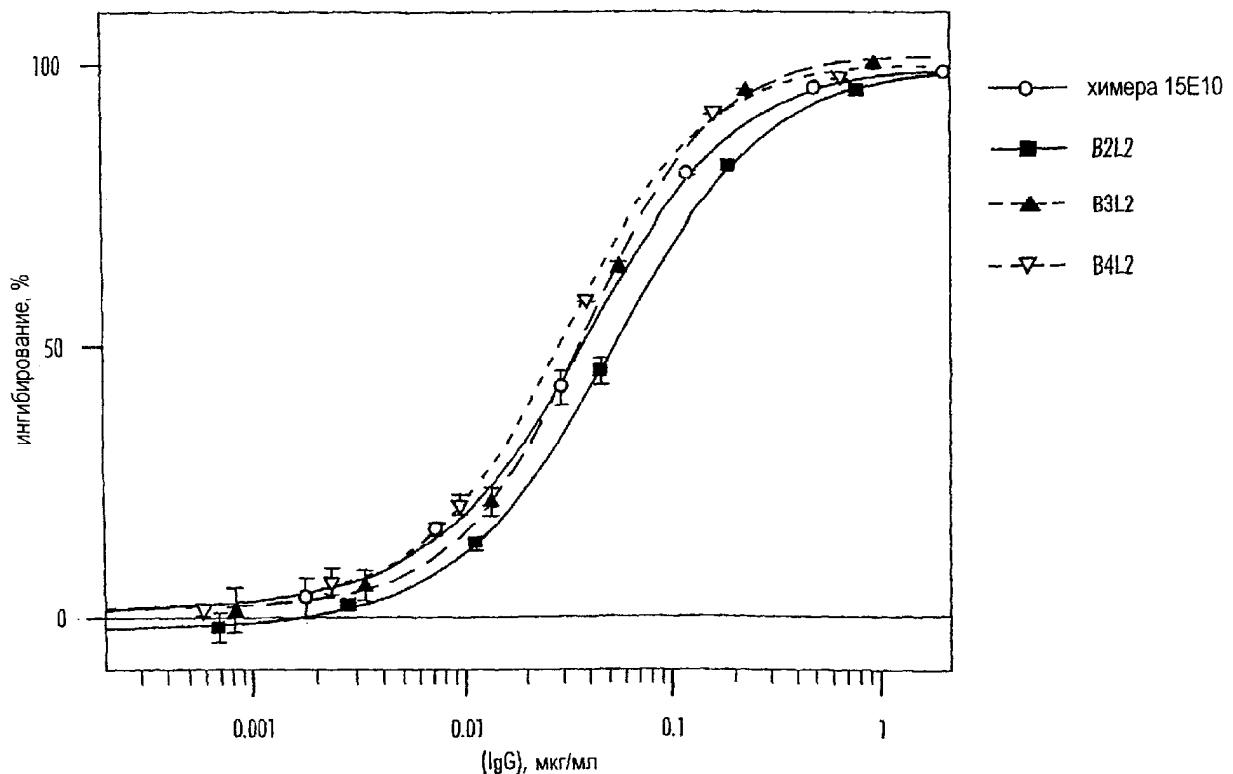
Фиг. 4



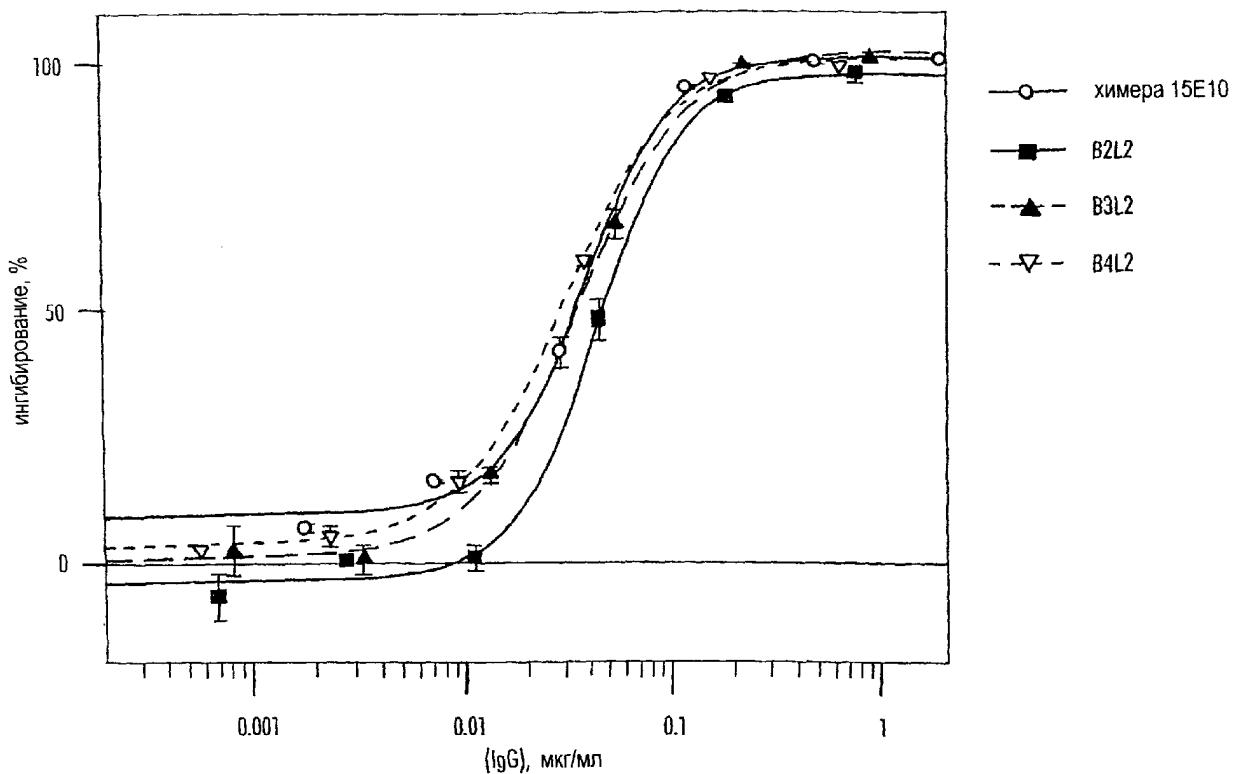
Фиг. 5



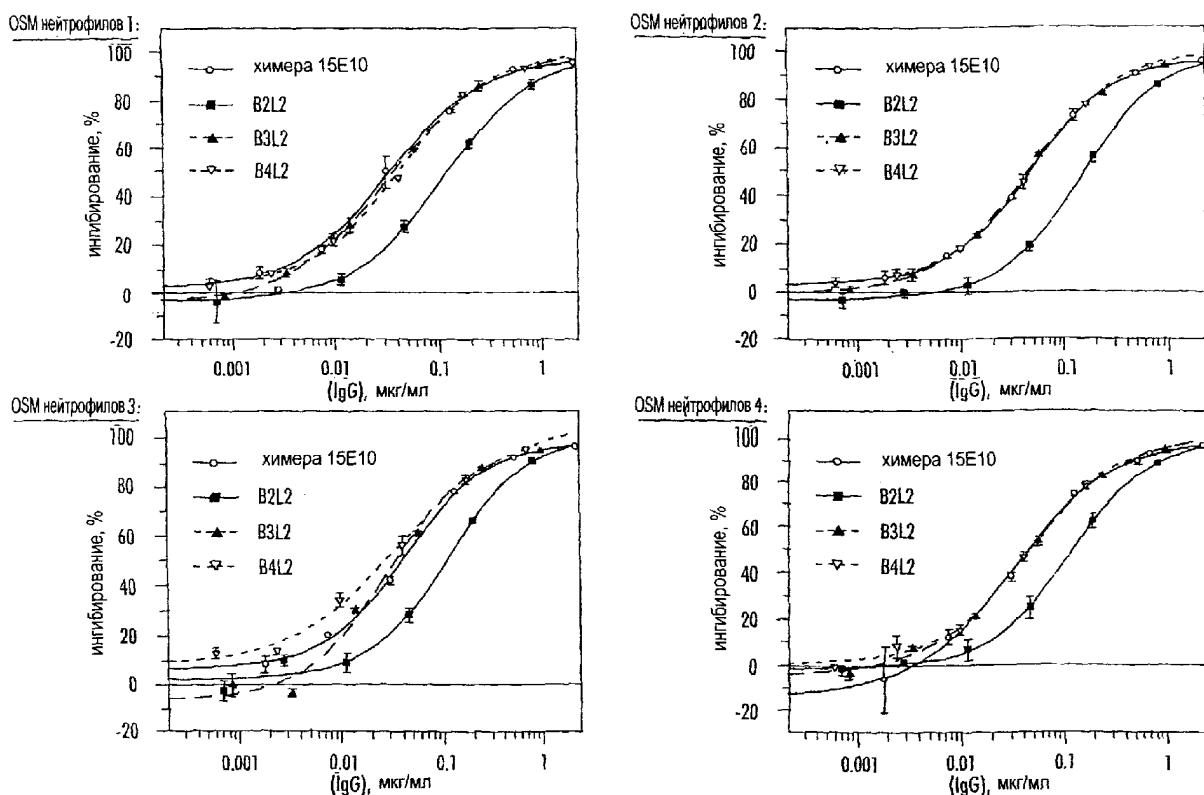
Фиг. 6



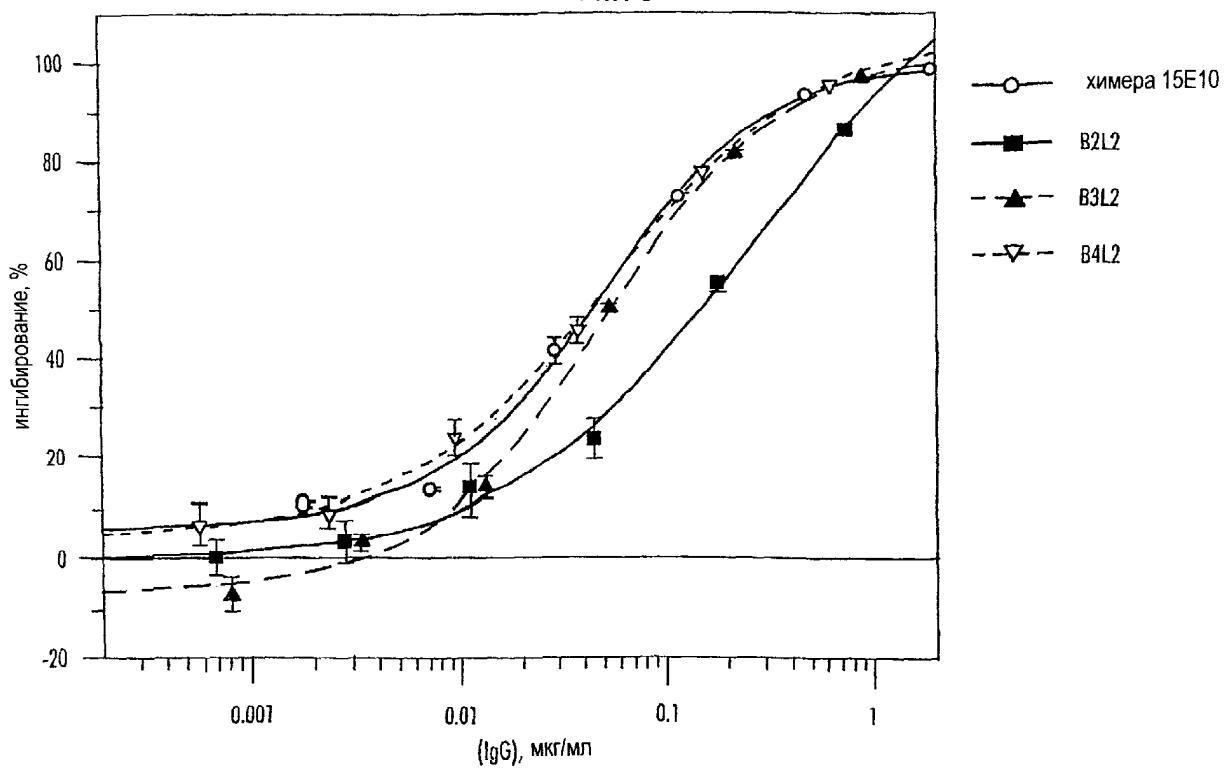
Фиг. 7



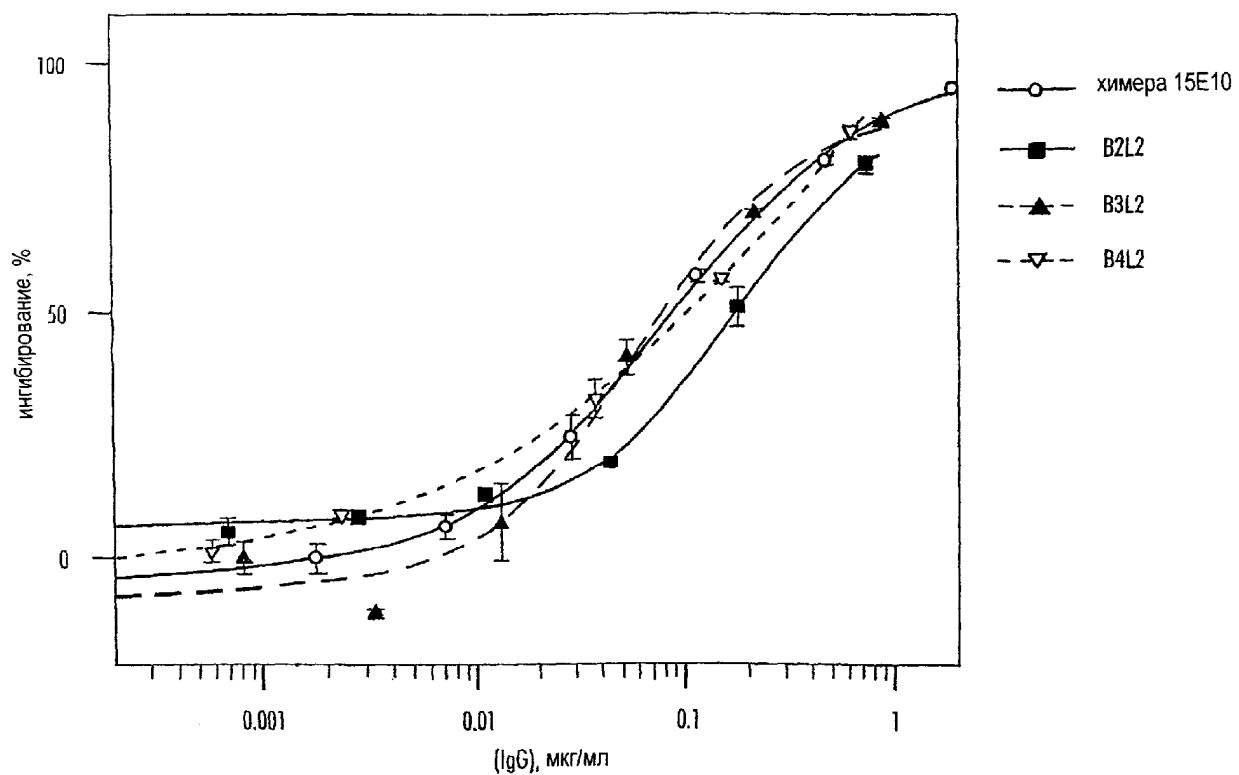
Фиг. 8



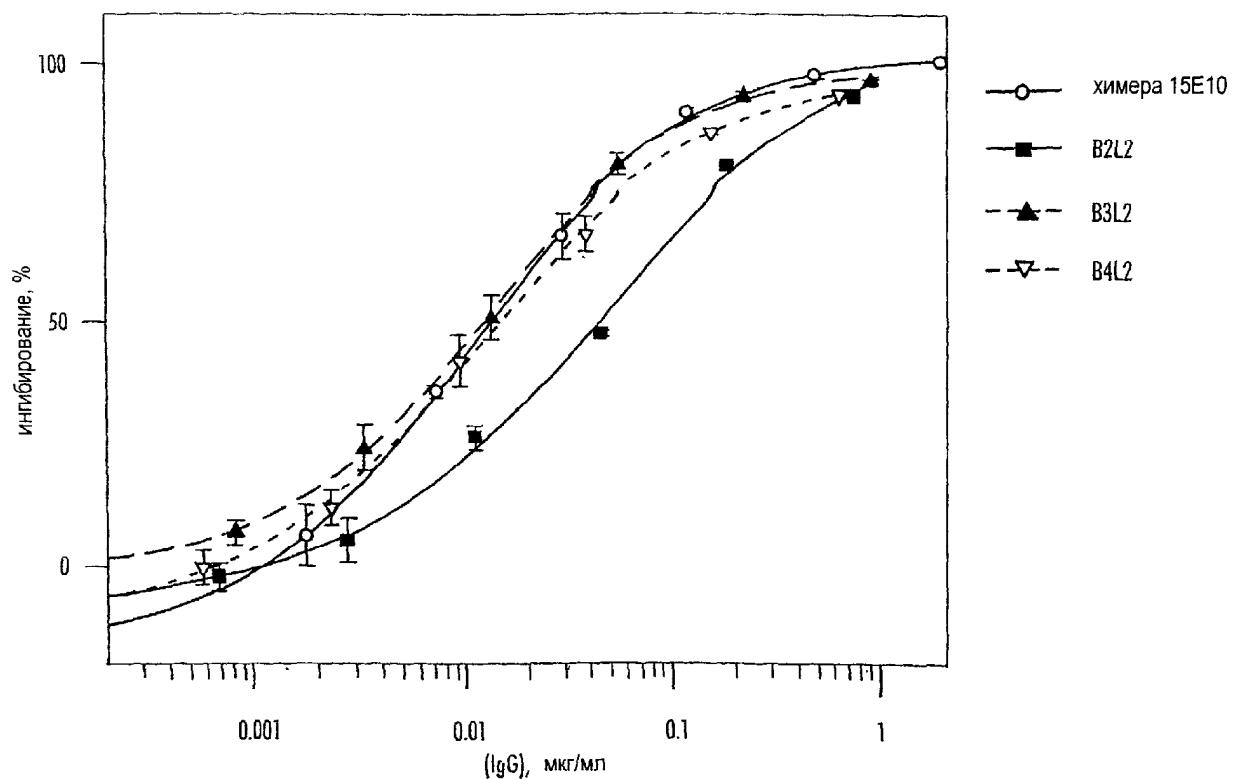
Фиг. 9



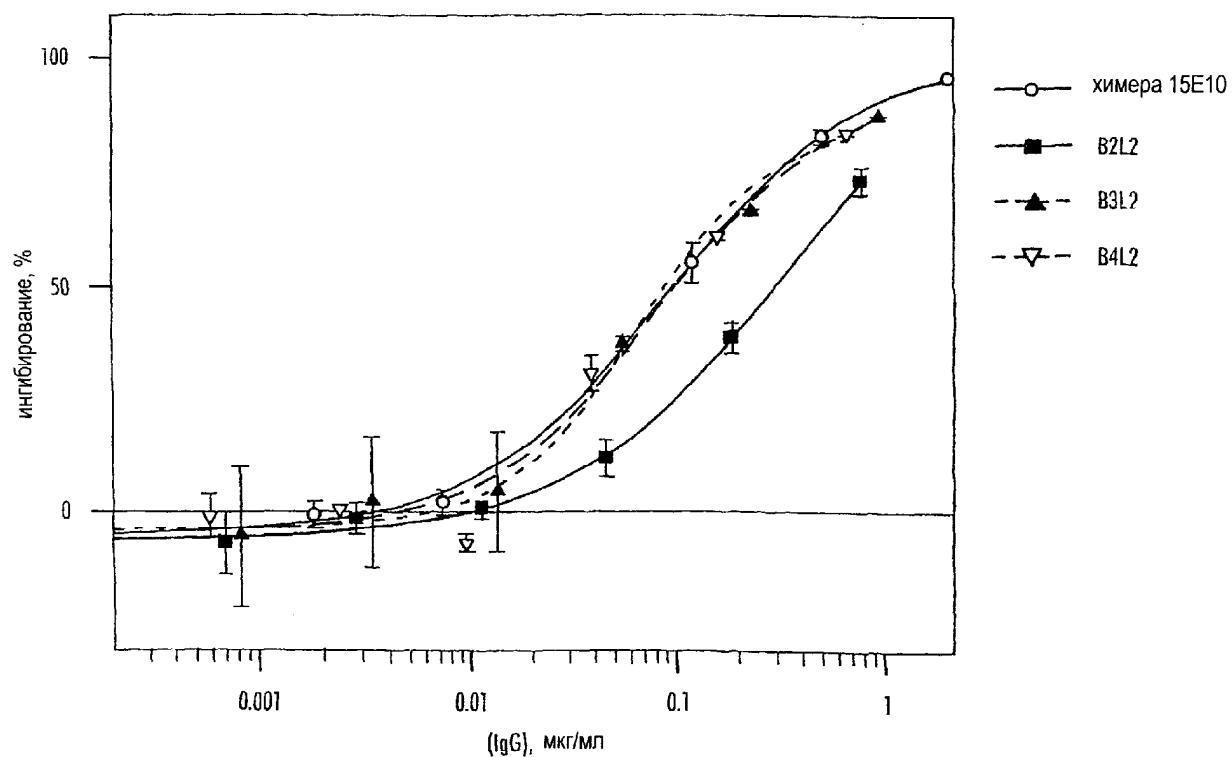
Фиг. 10



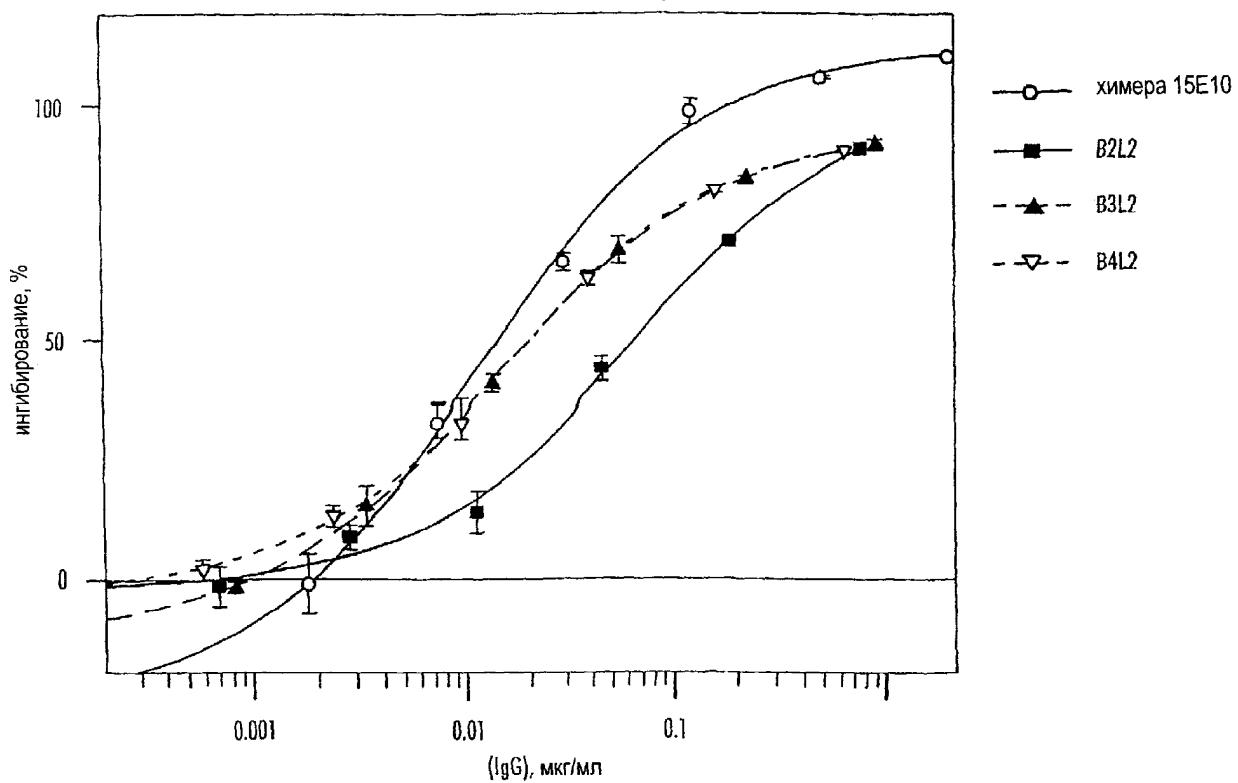
Фиг. 11



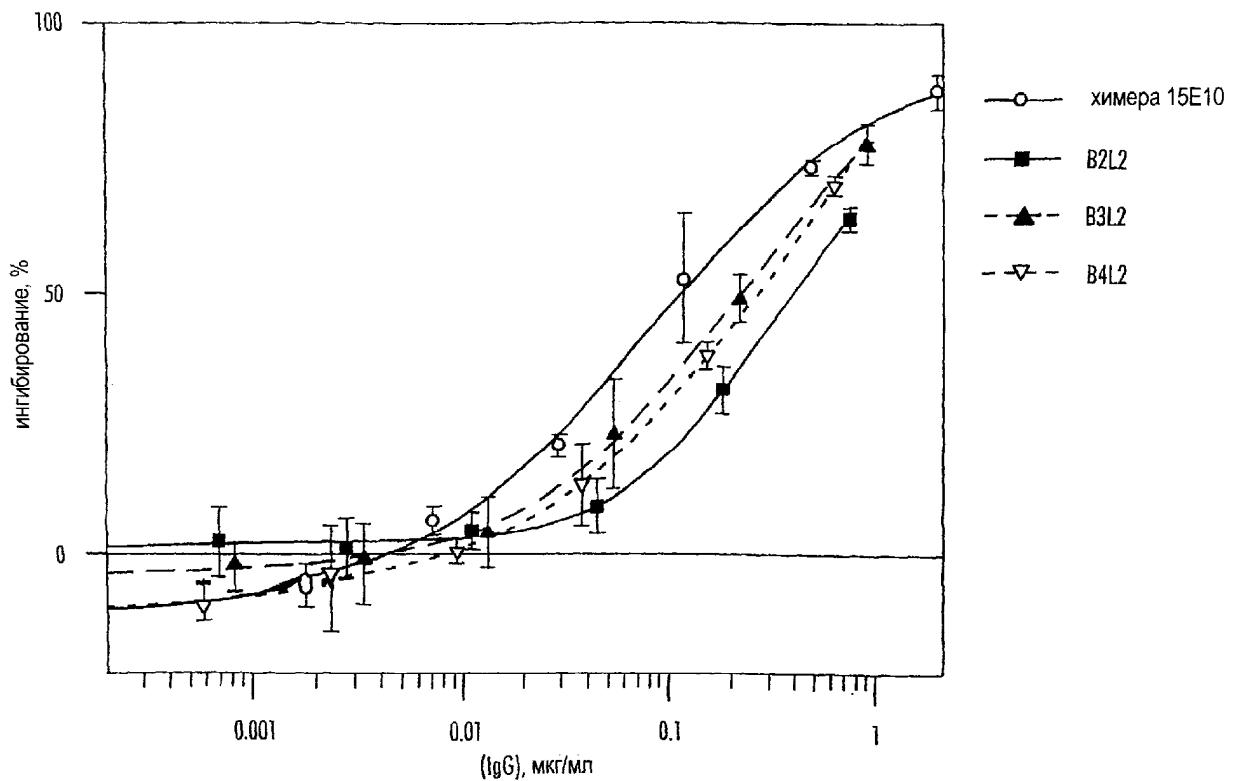
Фиг. 12



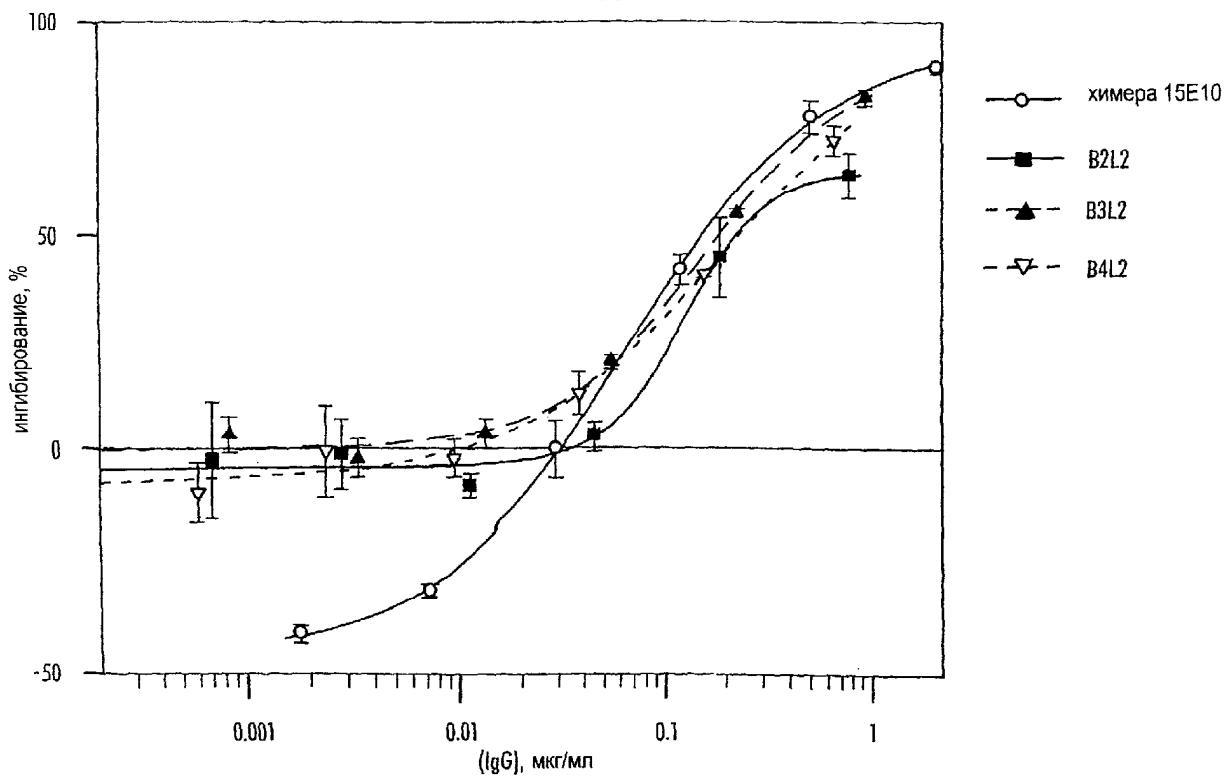
Фиг. 13



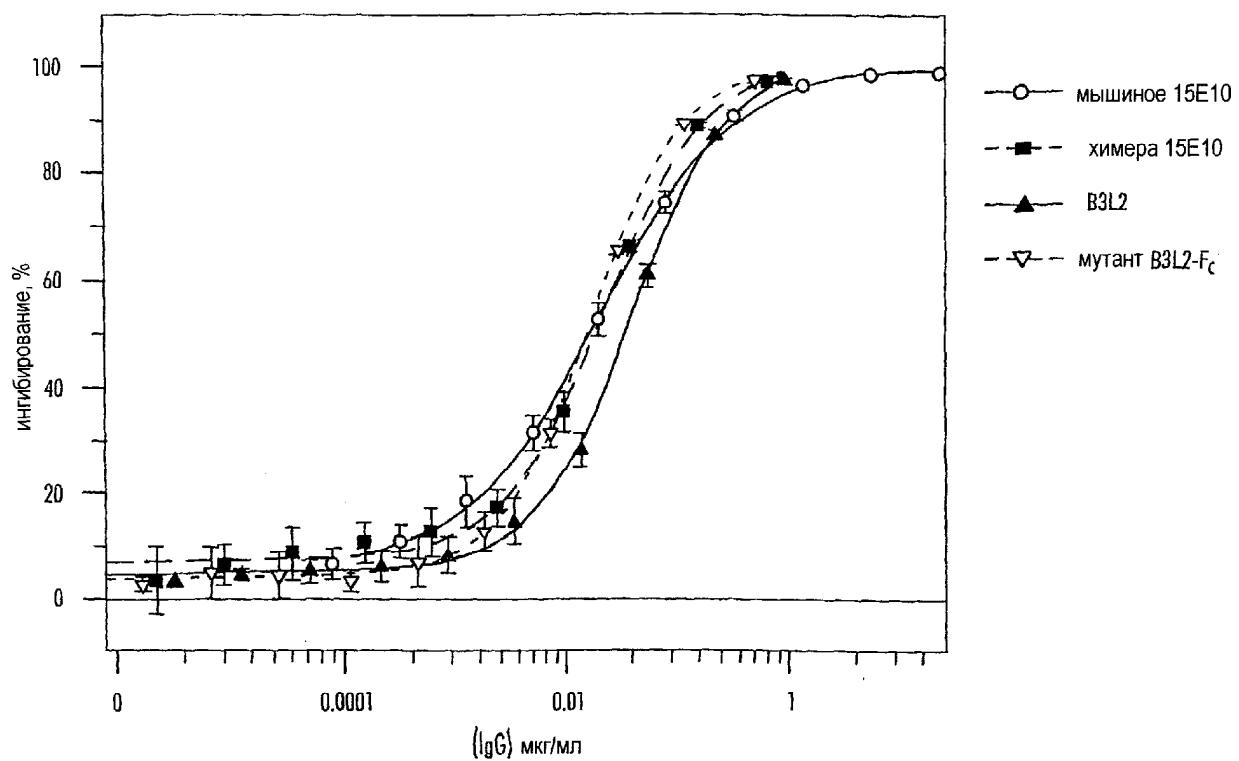
Фиг. 14



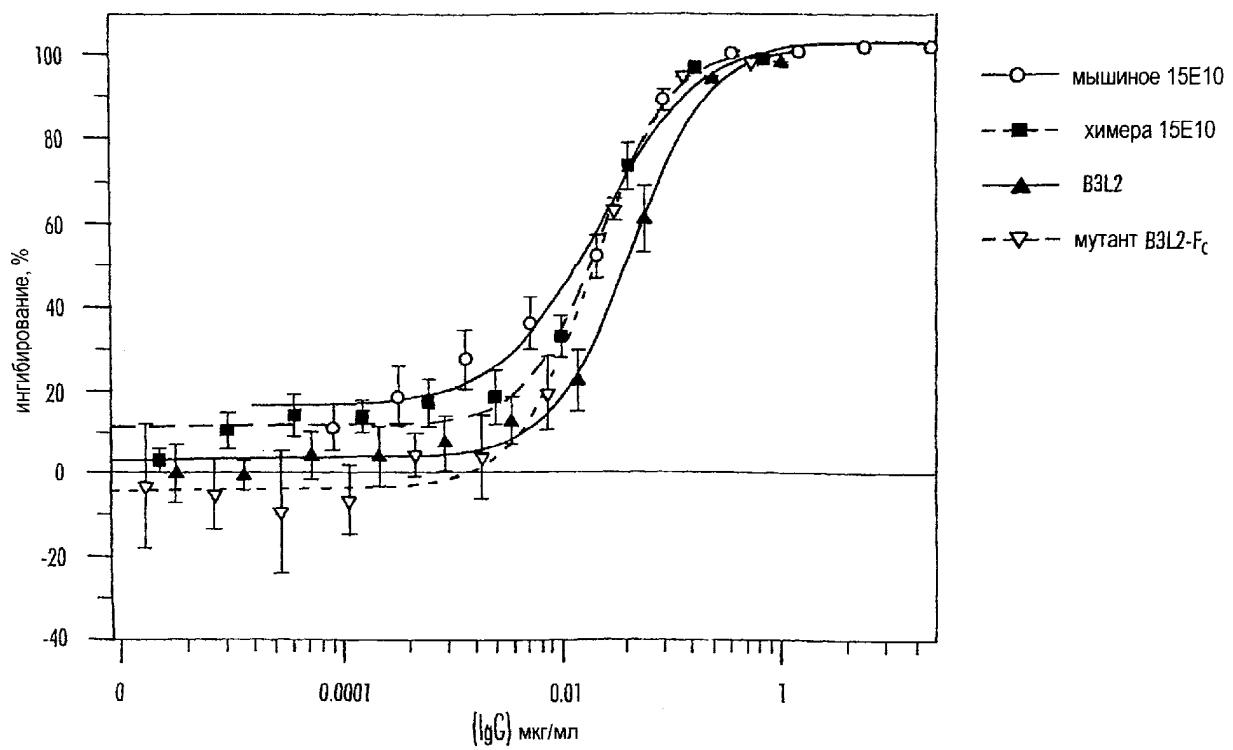
Фиг. 15



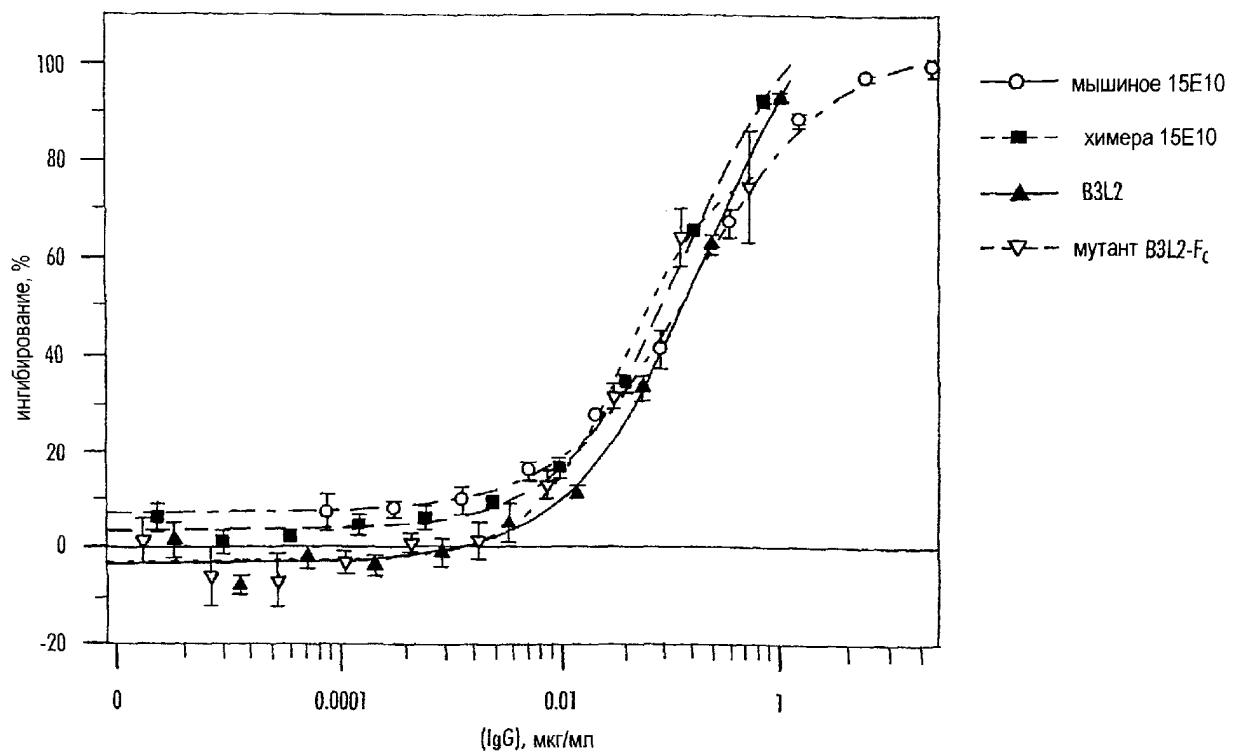
Фиг. 16



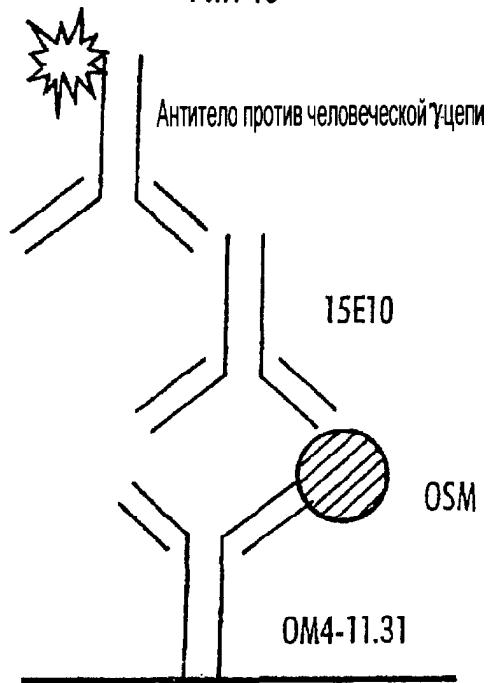
Фиг.17



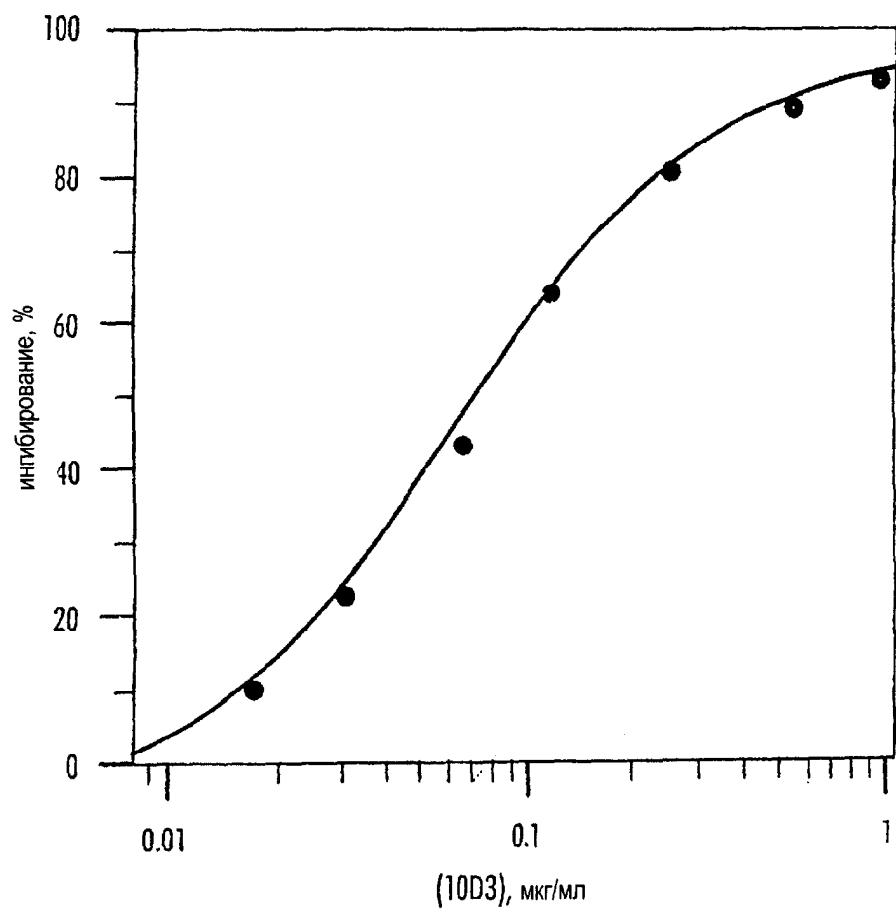
Фиг. 18



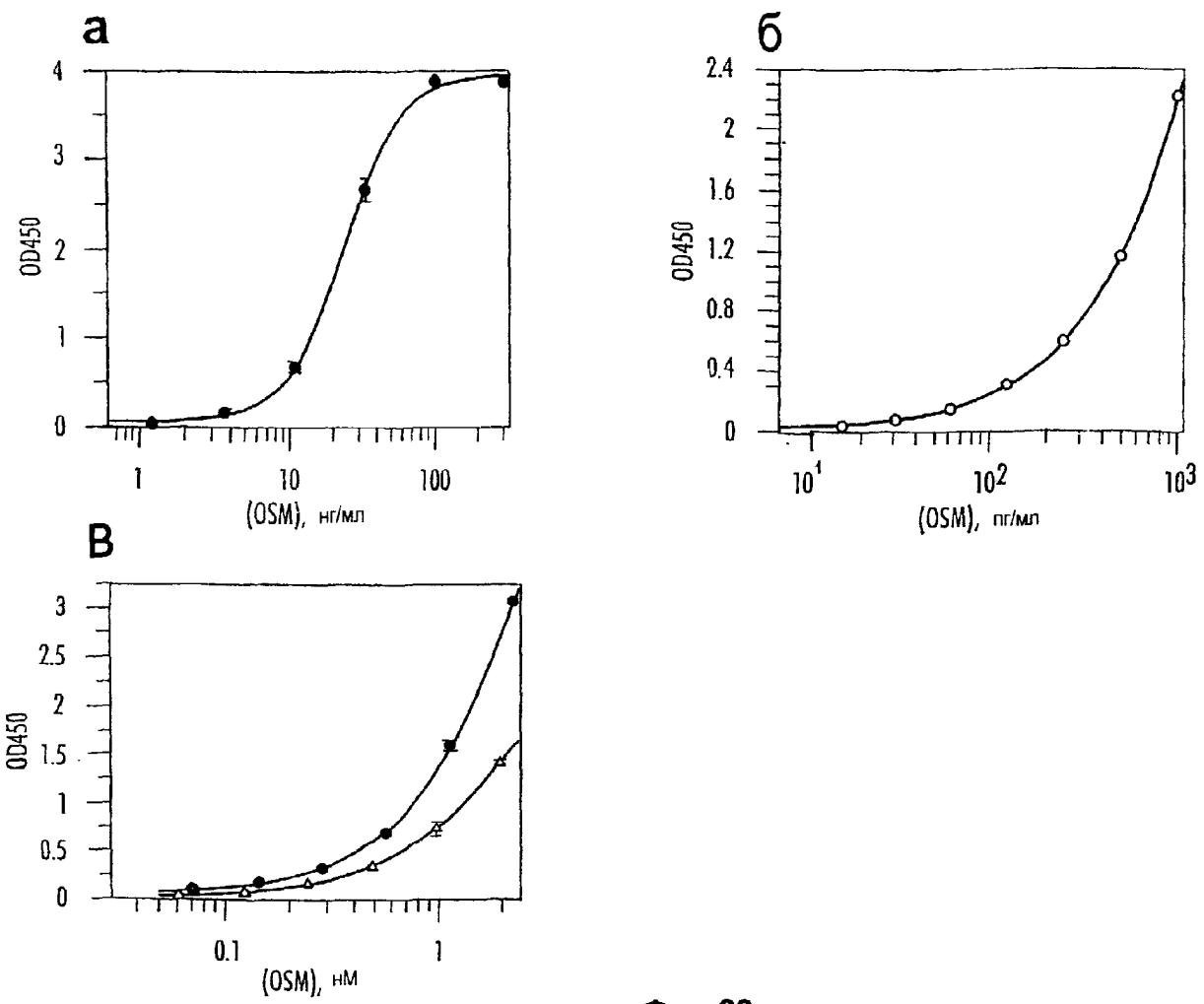
Фиг. 19



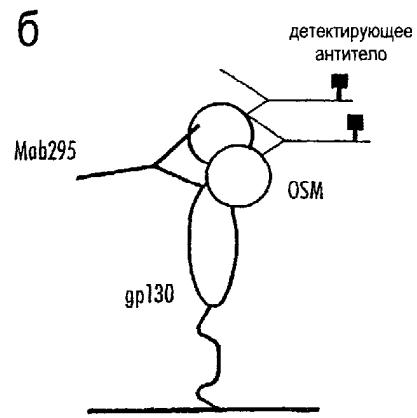
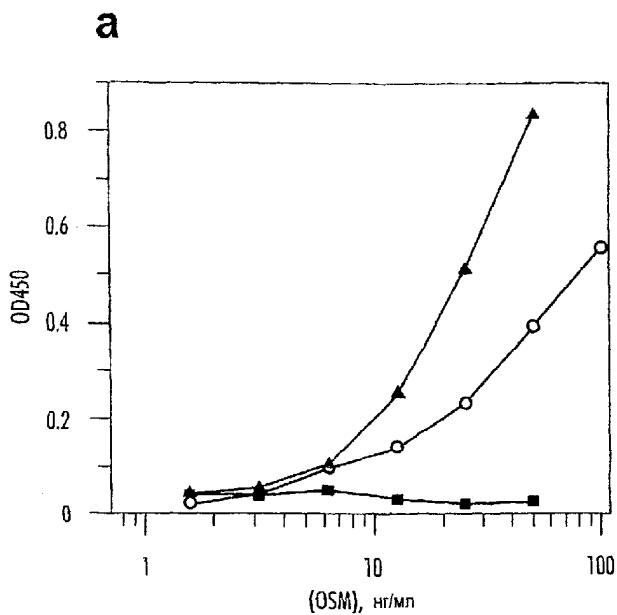
Фиг. 20



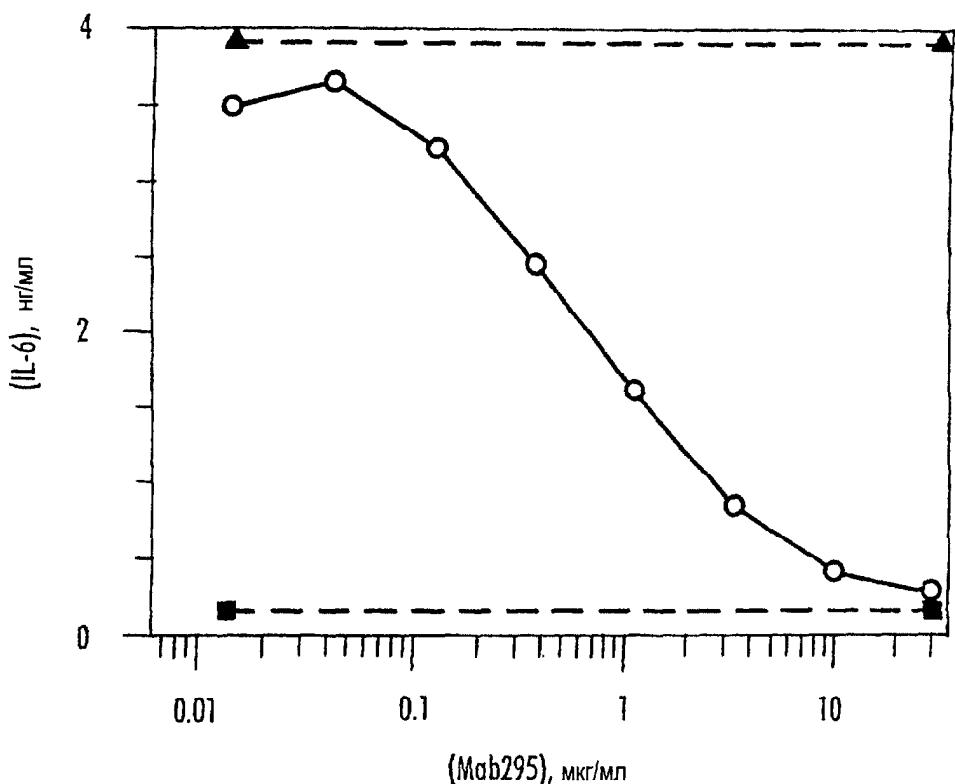
Фиг. 21



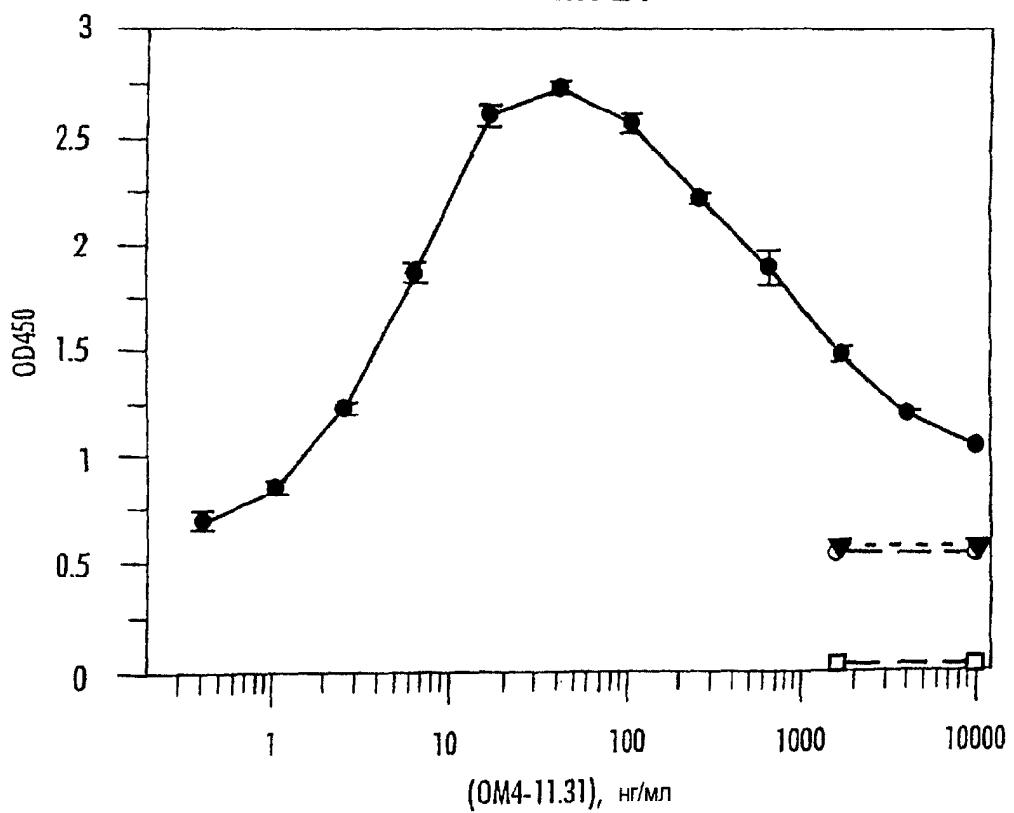
Фиг. 22



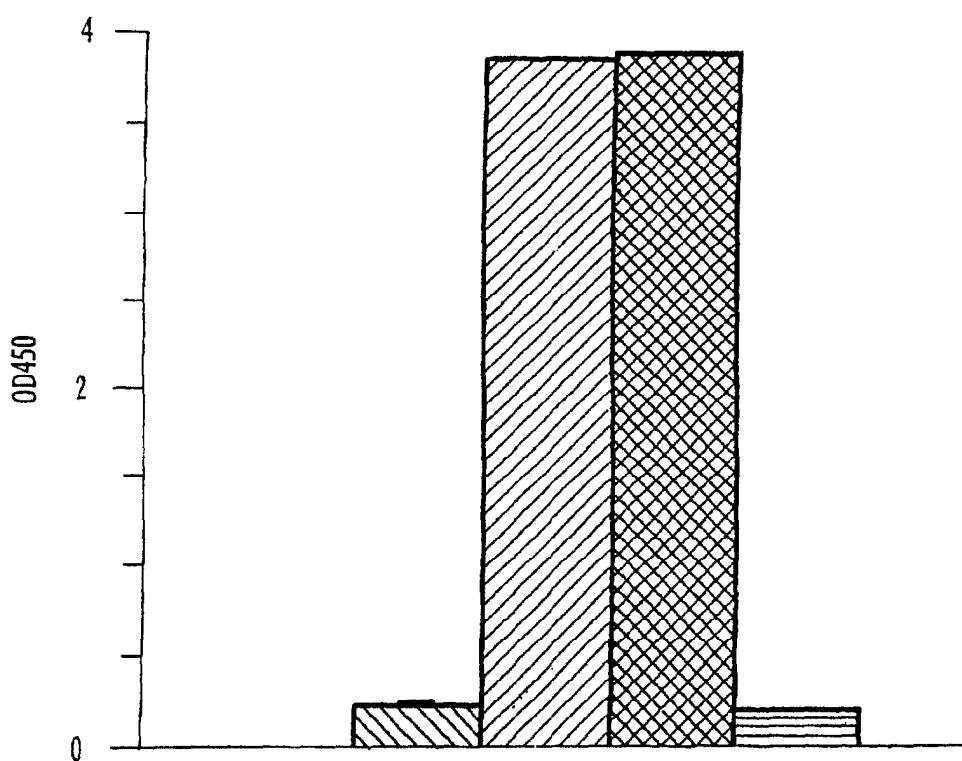
Фиг. 23



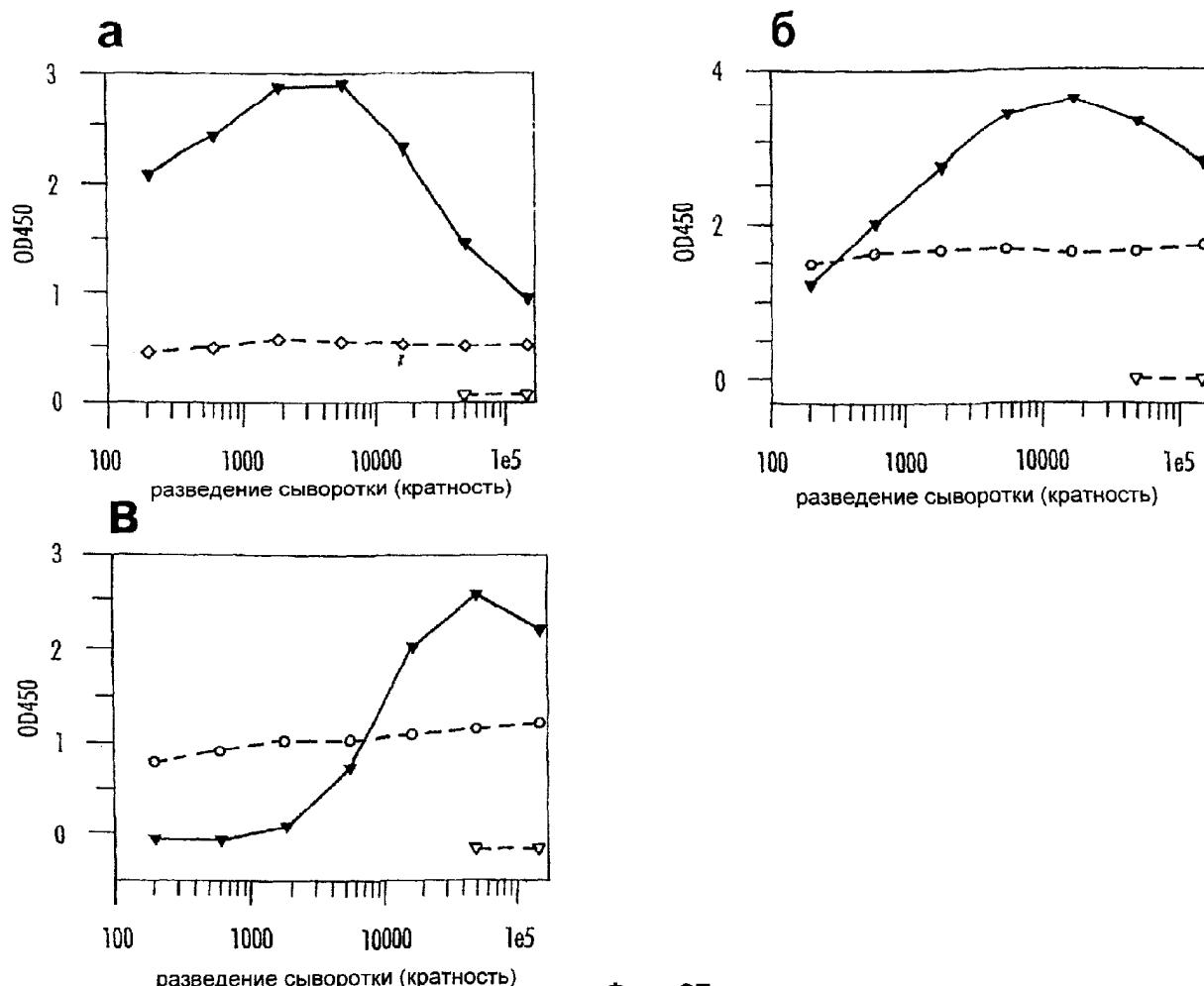
Фиг. 24



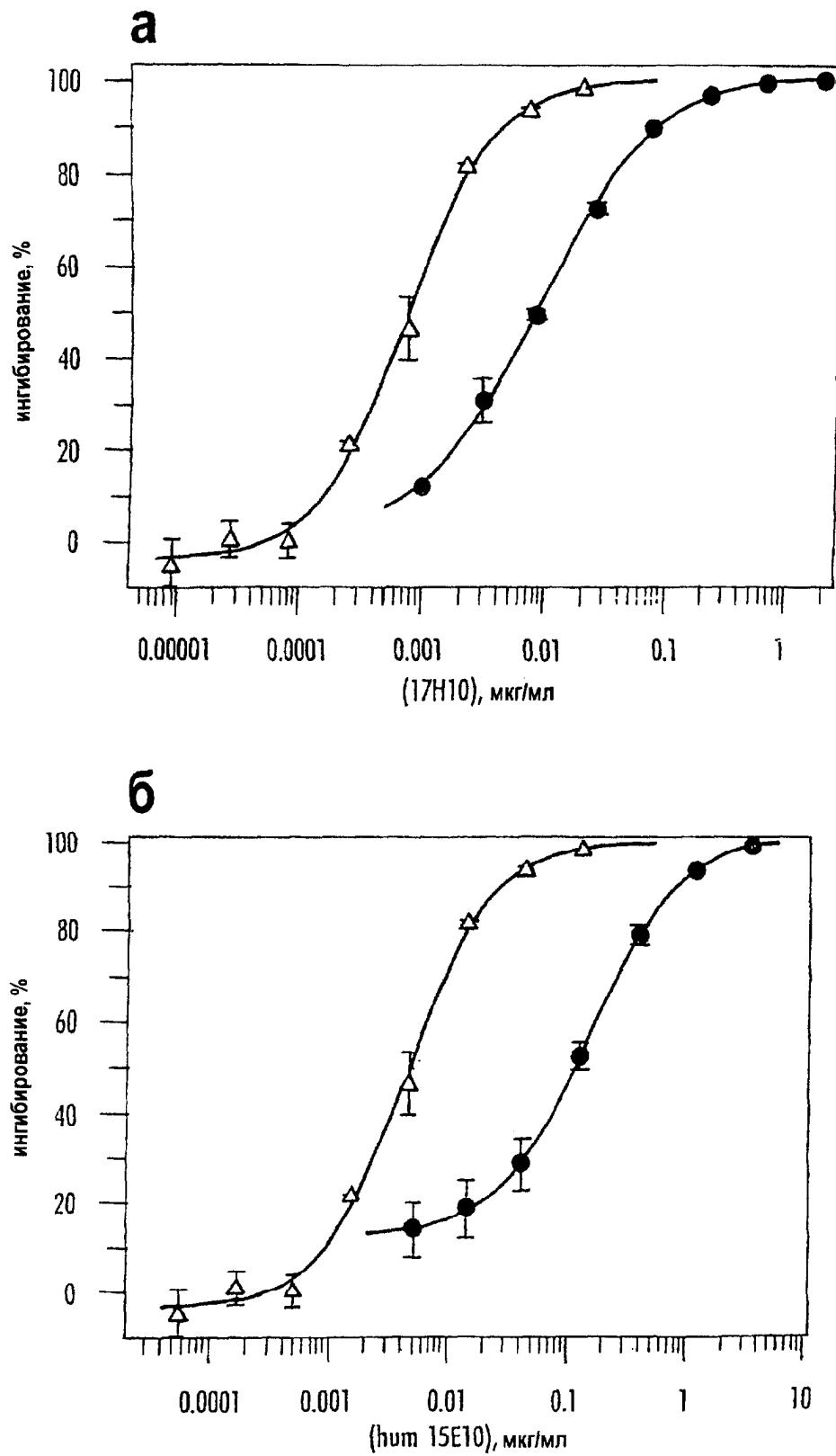
Фиг. 25



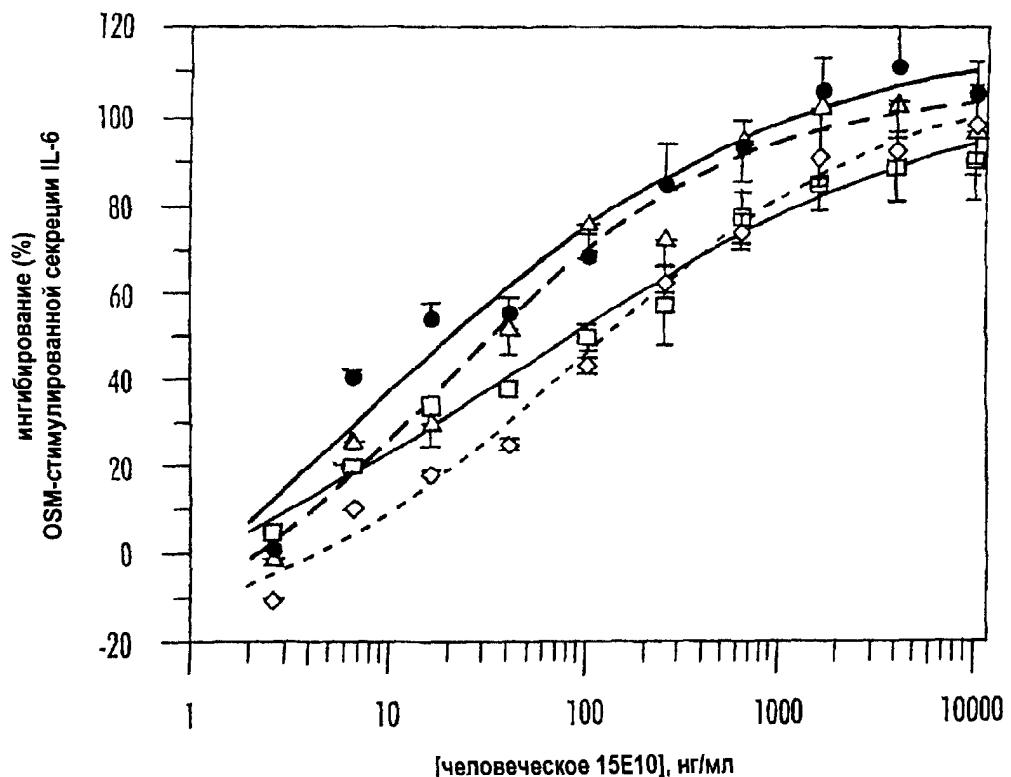
Фиг. 26



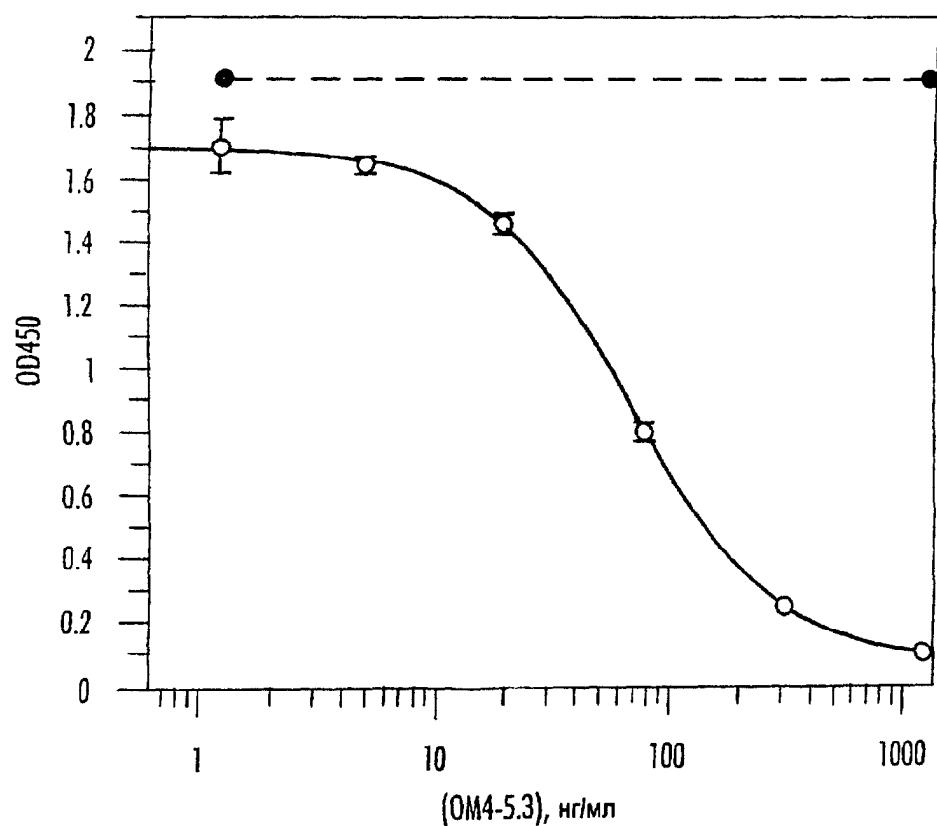
Фиг. 27



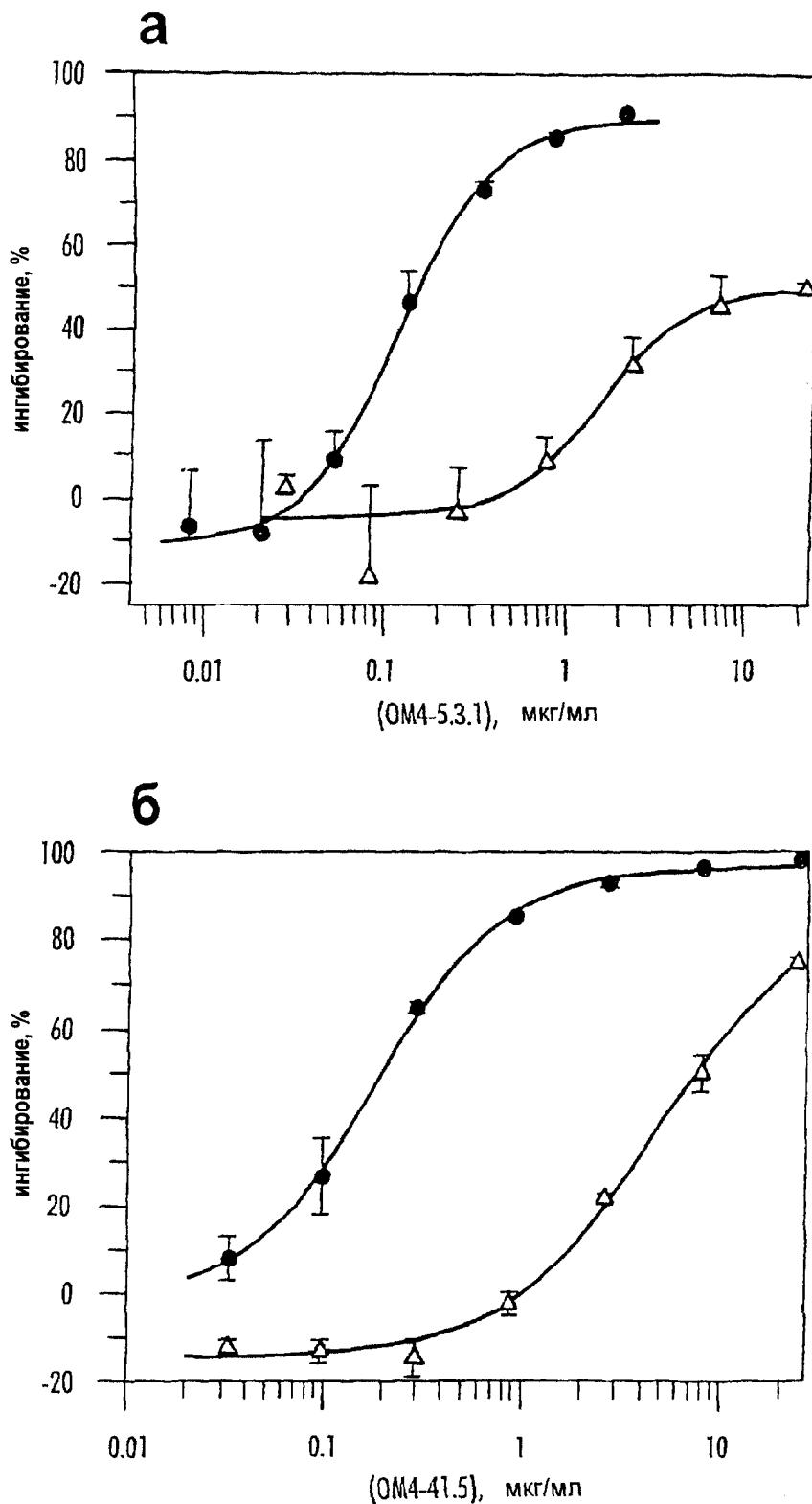
Фиг. 28



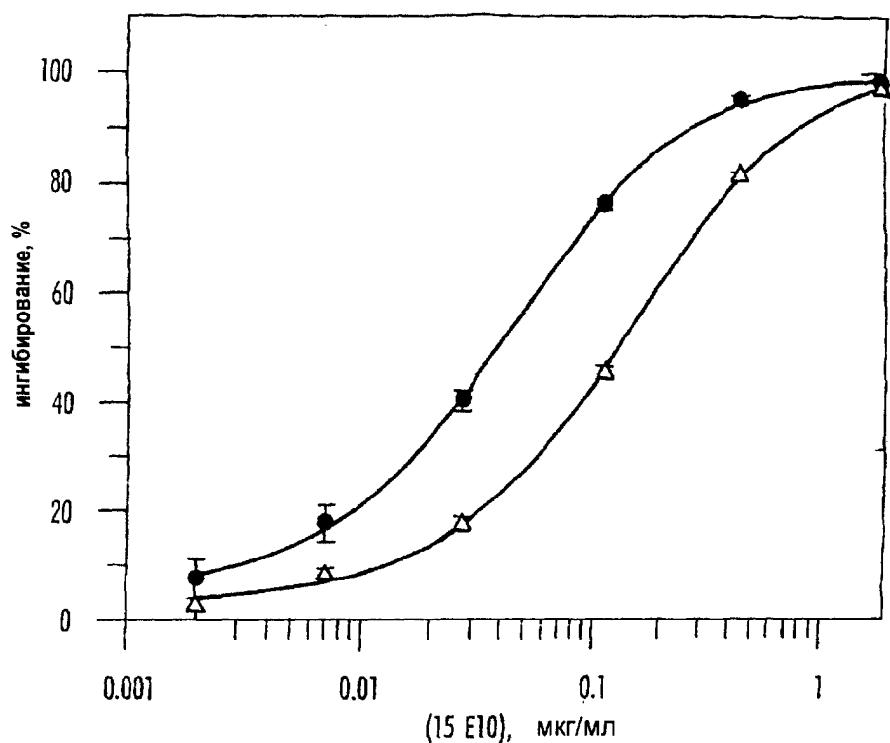
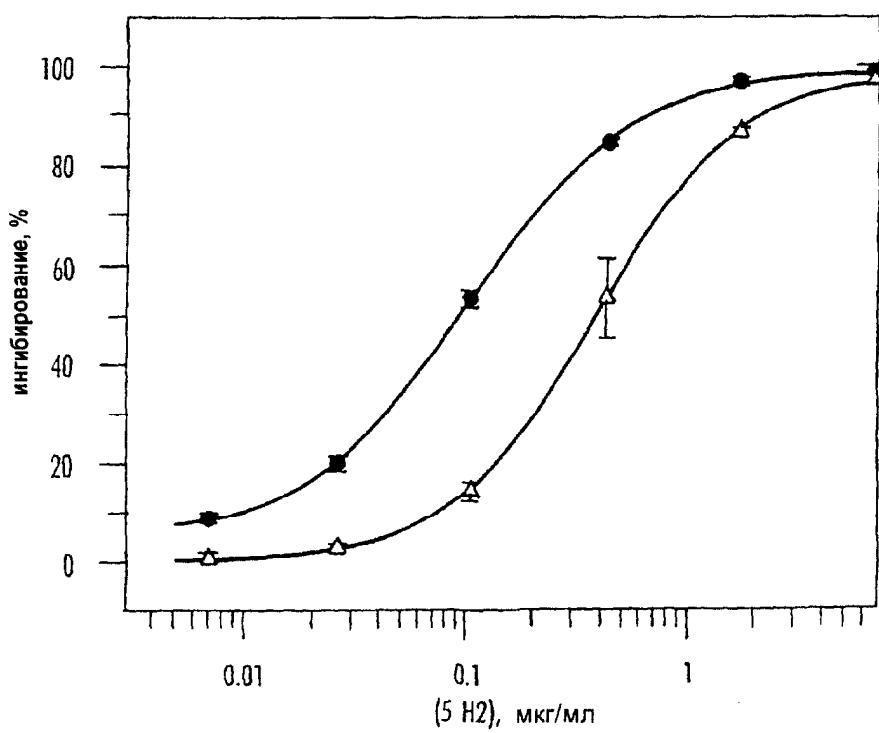
Фиг. 29



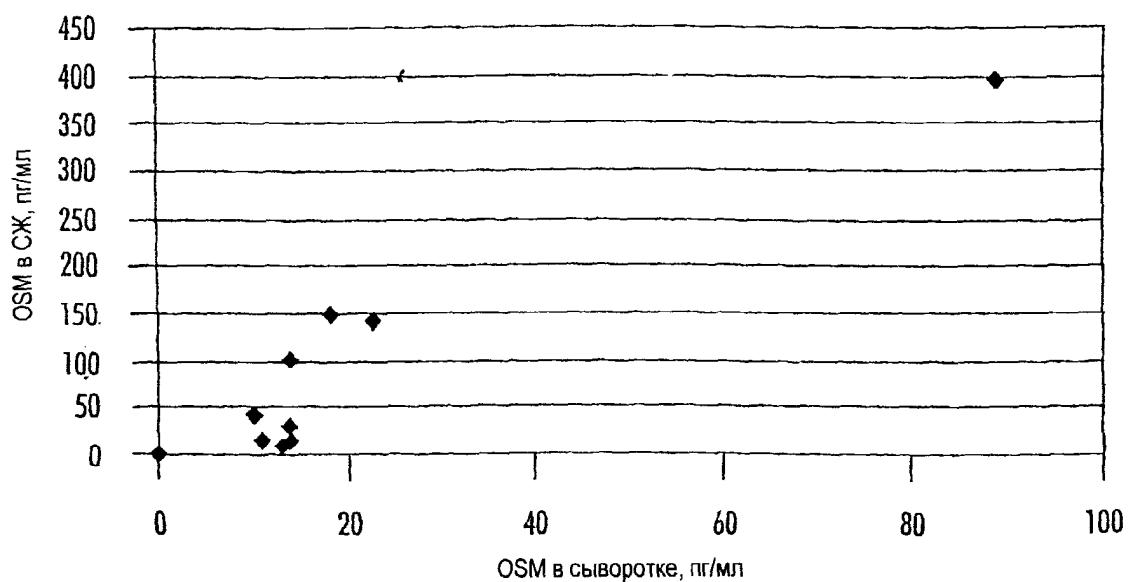
Фиг. 30



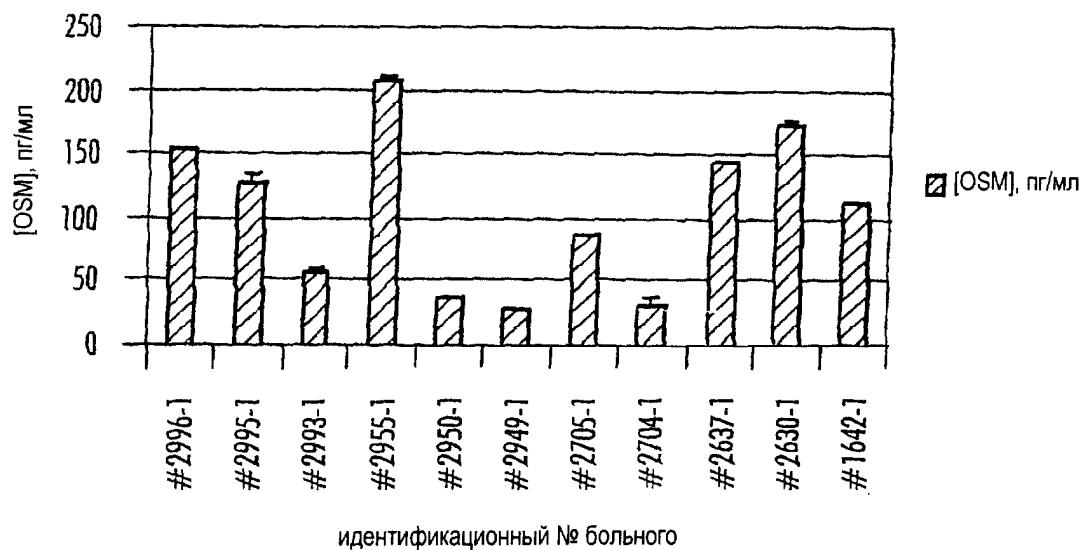
Фиг. 31

a**б**

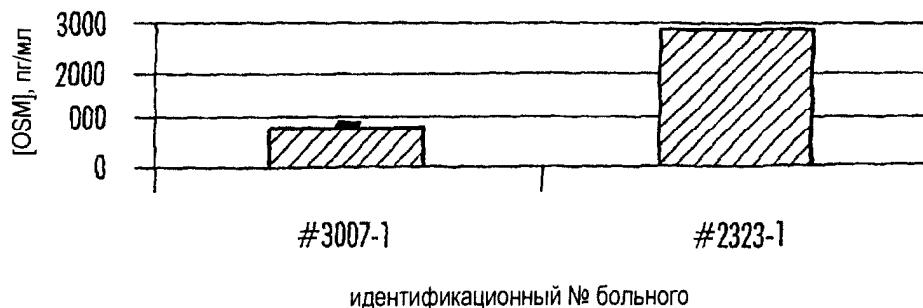
Фиг. 32



Фиг. 33

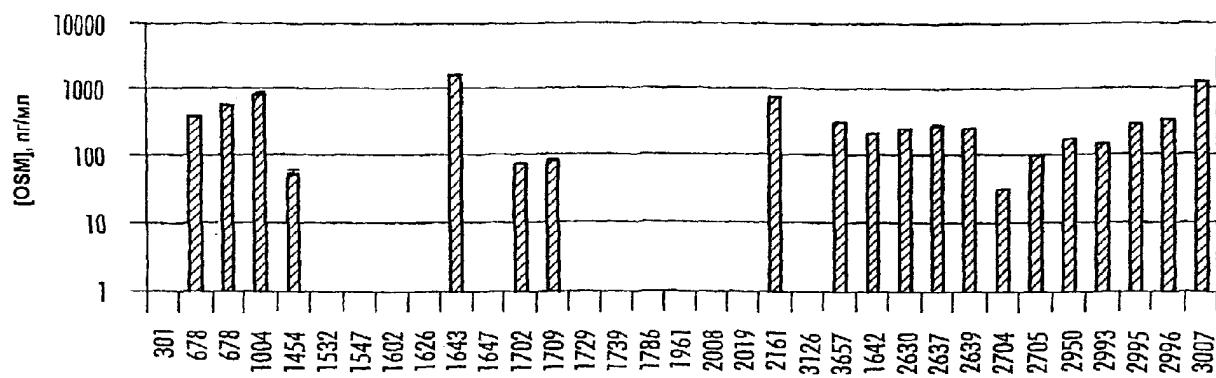
а

идентификационный № больного

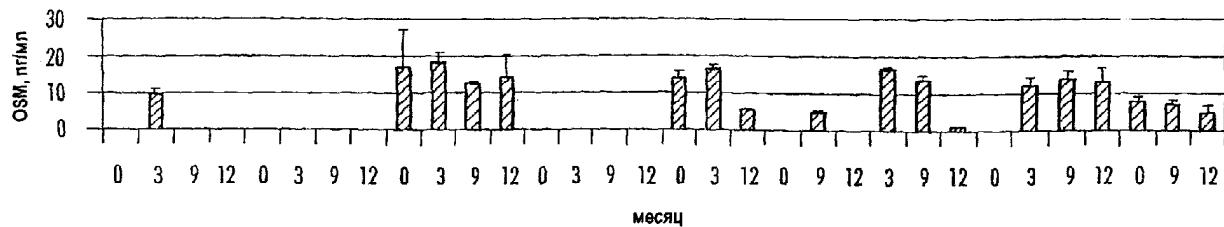
б

идентификационный № больного

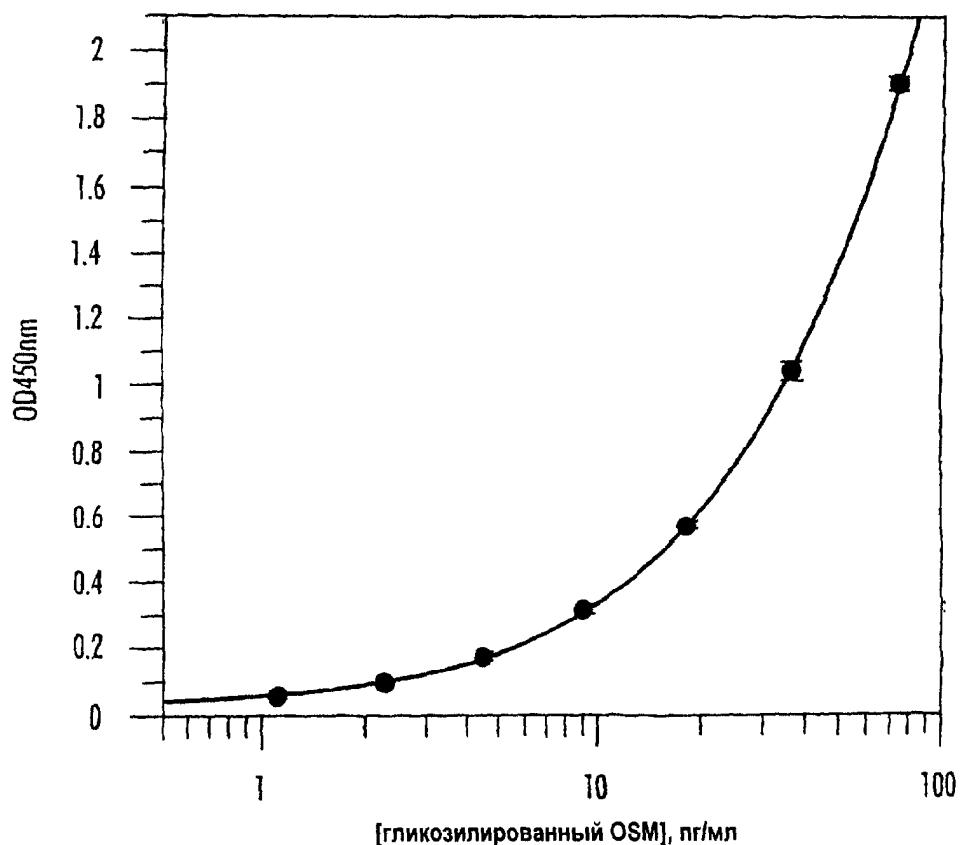
Фиг. 34



Фиг. 35



Фиг. 36



Фиг. 37