



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118267** (13) **C2**  
(51) МПК**C07K 16/38** (2006.01)**A61K 39/395** (2006.01)**A61P 7/02** (2006.01)МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(21) Номер заявки: <b>а 2016 02278</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>13.08.2014</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>26.12.2018</b></p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>61/865,451, 14305757.8</b></p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>13.08.2013, 22.05.2014</b></p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>US, EP</b></p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: <b>10.10.2016, Бюл.№ 19</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>26.12.2018, Бюл.№ 24</b></p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: <b>PCT/US2014/050896, 13.08.2014</b></p> | <p>(72) Винахідник(и):<br/><b>Прітскер Алла (US),<br/>Грель Патрік (FR),<br/>Рак Алексєй (FR),<br/>Матьє Магалі (FR),<br/>Морган Крістофер Райан (US),<br/>Борен Ніколя (FR),<br/>Пуар'є Брюно (FR),<br/>Даве Сиріль (FR),<br/>Дюффьє Франсіс (FR),<br/>Лі Хань (US),<br/>Комінос Доротеа (US),<br/>Жаніак Філіп (FR)</b></p> <p>(73) Власник(и):<br/><b>САНОФІ,</b><br/>54 rue La Boétie, F-75008 Paris, France (FR)</p> <p>(74) Представник:<br/><b>Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115</b></p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:<br/>WO 2011139973 A2, 10.11.2011<br/>US 2009136500 A1, 28.05.2009<br/>Antithrombotic activity of a monoclonal antibody inducing the substrate form of plasminogen activator inhibitor type 1 in rat models of venous and arterial thrombosis / C.N. Berry, C. Lunven, I. Lechaire et al. // British journal of pharmacology. – 1998. – Vol. 125 (1). – P. 29-34<br/>Wind T. Epitope mapping for four monoclonal antibodies against human plasminogen activator inhibitor type-1 implications for antibody-mediated PAI-1-neutralization and vitronectin-binding / Troels Wind, Mads A. Jensen, Peter A. Andreasen // European journal biochemistry. – 2001. – Vol. 268 (4). – P. 1095-1106<br/>Study of recombinant antibody fragments and PAI-1 complexes combining protein-protein docking and results from site-directed mutagenesis / Hector Novoa de Armas, Maarten Dewilde, Koen Verbeke et al. // Structure. – 2007. – Vol. 15 (9). – P. 1105-1116<br/>Elucidation of the epitope of a latency-inducing antibody: identification of a new molecular target for PAI-1 inhibition / Dominik Naessens, Ann Gils, Griet Compennolle et al. // Thrombosis and haemostasis. – 2003. - Vol. 90 (1). – P. 52-58</p> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

UA 118267 C2

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | <p>(56) Mapping of a conformational epitope on plasminogen activator inhibitor-1 by random mutagenesis / Natalia V/ Gorlatova, Hassan Elokda, Kristi Fan et al. // The journal of biological chemistry. – 2003. – Vol. 278 (18). – P. 16329–16335</p> <p>Accelerated conversion of human plasminogen activator inhibitor-1 to its latent form by antibody binding / Ingrid Verhamme, Jan-Olov Kvassman, Duane Day et al. // The journal of biological chemistry. – 1999. – Vol. 274 (25). – P. 17511-17517</p> <p>Elucidation of the paratope of scFv-8H9D4, a PAI-1 neutralizing antibody derivative / Koen Verbeke, Ann Gils, Jean-Marie Stassen et al. // Thrombosis and haemostasis. – 2003. - Vol. 89 (1). – P. 74-82</p> <p>Verbeke K. Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1: antibody fragments and their unique sequences as a tool for the development of profibrinolytic drugs / K. Verbeke, A. Gils, J. Declerck // Journal of thrombosis and haemostasis. – 2004. - Vol. 2 (2). – P. 298 – 305</p> <p>Verbeke K. Cloning and paratope analysis of an antibody fragment, a rational approach for the design of a PAI-1 inhibitor / K. Verbeke, A. Gils, J. Declerck // Journal of thrombosis and haemostasis. – 2004. - Vol. 2 (2). – P. 289 –297</p> <p>Debrock S. Neutralization of plasminogen activator inhibitor-1 inhibitory properties: identification of two different mechanisms / Sophie Debrock, Paul J. Declerck // Biochimica et Biophysica Acta. – 1997. – Vol. 1337 (2). – P. 257-266</p> |
|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

#### (54) АНТИТІЛО ДО ІНГІБІТОРА АКТИВАТОРА ПЛАЗМІНОГЕНУ 1 (PAI-1) ТА ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ

##### (57) Реферат:

Винахід стосується виділеного моноклонального антитіла, яке специфічно зв'язується з інгібітором активатора плазміногену 1 типу (PAI-1). Винахід також стосується гуманізованого антитіла, яке специфічно зв'язується з PAI-1, та застосування фармацевтично ефективної кількості антитіла до PAI-1 для виробництва лікарського засобу для лікування фіброзу.

## ПЕРЕХРЕСНЕ ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

Дана заявка заявляє пріоритет за попередньою заявкою на патент США № 61/865451, поданою 13 серпня 2013 р., та заявкою на європейський патент № 14305757.8, поданою 22 травня 2014 р., які включені в даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті.

## 5 ПЕРЕДУМОВИ ВІНАХОДУ

Інгібітор активатора плазміногену 1 типу (PAI-1) являє собою основний інгібітор тканинного активатора плазміногену (tPA) та урокіназного активатора плазміногену (uPA), ключових серинових протеаз, які відповідають за утворення плазміну. PAI-1 регулює фібриноліз шляхом інгібування активації плазміногену в судинному компартменті. Фібриноліз являє собою чітко скоординований процес руйнування фібринових згустків, що утворюються після активації системи згортання крові. Порушення регуляції балансу згортання/фібриноліз призводить до аномальних подій гемостазу, таких як кровотеча або тромботичні захворювання. PAI-1 також є ключовим регулятором активації плазміногену у навколоклітинному компартменті (внутрішньосудинному та тканинному), де зв'язаний з рецептором плазміноген активується, переважно, урокіназою, зв'язаною з рецептором урокінази (uPAR). Шляхом інгібування навколоклітинного протеолізу PAI-1 регулює численні клітинні функції, такі як руйнування позаклітинного матриксу (ECM), активація факторів росту та їх вивільнення з ECM, активація матриксних металопротеїназ (MMP) та апоптоз клітин. Нещодавно були ідентифіковані незалежні від протеаз ефекти PAI-1, зумовлені його взаємодією з кофакторами (такими як вітронектин, гепарин, глікозаміноглікан), комплексами uPAR-урокіназа, або клітинними рецепторами (LRP: білок, споріднений з рецептором ліпопротеїнів низької щільності), або інтегіринами, які впливають на функції клітин, такі як адгезія/дезадгезія, міграція, проліферація та внутрішньоклітинна біологічна активність. Завдяки цим клітинним механізмам та антифібринолітичним ефектам була встановлена патогенна роль PAI-1 у рості та метастазуванні пухлин, фіброзі, гострому інфаркті міокарда та порушеннях обміну речовин, таких як атеросклероз, ожиріння та цукровий діабет.

Ген SERPINE1 (PAI-1) людини локалізований у хромосомі 7, складається з восьми інтронів та дев'яти екзонів та має розмір 12169 основ (Klinger, K.W. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:8548, 1987). PAI-1 являє собою одноланцюговий глікопротеїн розміром приблизно 50 кДа (379 амінокислот) з суперсімейства SERPIN (інгібітори серинових протеаз), який синтезується в активній конформації, але спонтанно стає неактивним за відсутності вітронектину (Vn). Вітронектин, основний кофактор PAI-1, стабілізує активну конформацію з петлею реакційного центра (RCL), яка містить приблизно 20 амінокислот, що розташовані на поверхні. Механізм інгібування двох основних мішеней PAI-1 (tPA та uPA) являє собою суїцидне інгібування. Ділянка RCL PAI-1 містить пептидний зв'язок-"принаду" (R346-M347, який також називають P1-P'1), який містить сайт розщеплення для цієї серинової протеази. Спочатку утворюється комплекс Міхаеліса з tPA або uPA, потім каталітична тріада реагує з пептидним зв'язком-"принадою" з утворенням комплексу ацил-фермент, який після розщеплення пептидного зв'язку P1-P'1 спричиняє суттєві конформаційні зміни. Конформаційні зміни зумовлюють вставку розщепленої RCL у  $\beta$ -нитку, при цьому протеаза залишається ковалентно зв'язаною з PAI-1 у вигляді ацил-ферменту. У нефізіологічних умовах гідроліз даного комплексу ацил-фермент може вести до вивільнення розщепленого PAI-1 та вільної активної протеази (Blouse et al., Biochemistry, 48:1723, 2009).

PAI-1 циркулює у крові з надзвичайно мінливими рівнями (в діапазоні нМ) та у надлишку порівняно з концентраціями t-PA або uPA. PAI-1 проявляє структурну гнучкість та може перебувати в одній з трьох конформацій: (1) неактивній конформації, (2) активній конформації або (3) субстратній конформації (див. фігуру 1). PAI-1 переважно перебуває у вигляді нековалентного комплексу з вітронектином ( $K_d \sim 1$  нМ), який зменшує перехід до неактивного стану в 1,5-3 рази. Спорідненість неактивного, розщепленого або PAI-1, що перебуває у складі комплексу, до вітронектину значно знижена. Вітронектин, зв'язаний з матриксом, також локалізований разом з PAI-1 у навколоклітинному просторі. Ендотеліальні клітини, моноцити, макрофаги та гладеньком'язові клітини судин синтезують цей PAI-1, який потім може зберігатися у великій кількості в неактивній формі у тромбоцитах (в  $\alpha$ -гранулі). PAI-1 є швидкодіючим та специфічним інгібітором (при цьому константа швидкості реакції другого порядку становить  $10^6$ - $10^7$   $M^{-1}s^{-1}$ ) tPA та uPA у розчині, але неактивним щодо протеаз, зв'язаних або з фібрином, або з їхніми клітинними рецепторами. Інші протеази, такі як тромбін, плазмін, активований білок C, також можуть інгібуватися PAI-1, але менш ефективно.

Декілька варіантів 3D-структури PAI-1 людини були виявлені після опису першої з них у 1992 р. (Mottonen et al., Nature 355:270, 1992) у неактивній конформації. Ці 3D-структури включають мутантні форми PAI-1 у субстратній (Aertgeerts et al., Proteins 23:118, 1995), стабілізованій

активній конформації (Sharp et al., Structure 7:111, 1999), як PAI, що утворює комплекс з соматомедин В-подібним доменом вітронектину (Zhou et al., Nat. Struct. Biol. 10:541, 2003), або з інгібуючим пентапептидом з RCL-петлі (Xue et al., Structure 6:627, 1998). Нещодавно структуру PAI-1 миші у неактивній конформації з'ясували Dewilde et al. (J Struct. Biol. 171:95, 2010), та вони виявили відмінності порівняно з PAI-1 людини в положенні RCL, "ділянки воріт" та положенні  $\alpha$ -спіралі А. Взаємозв'язки структура/функція у PAI-1 досліджували із застосування більш ніж 600 мутантних білків (огляд De Taeye et al., Thromb. Haemost. 92:898, 2004) для визначення локалізації доменів, що беруть участь у різних видах активності даного багатофункціонального Serpin.

Оскільки PAI-1 може синтезуватися клітинами практично будь-якого типу, в тому числі гепатоцитами, адипоцитами, мезангіальними клітинами, фібробластами, міофібробластами та епітеліальними клітинами, його експресія значною мірою варіює при фізіологічних (наприклад, добова зміна рівня PAI-1 у плазмі крові) та патологічних станах (наприклад, ожиріння, метаболічний синдром, інсулінорезистентність, інфекція, запальні захворювання, рак). PAI-1 розглядають як білок гострої фази. Транскрипційна регуляція експресії мРНК PAI-1 індукується декількома цитокінами та факторами росту (наприклад, TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , EGF, FGF, інсуліном, ангіотензином II та IV), гормонами (наприклад, альдостероном, глюкокортикоїдами, РМА, високим рівнем глюкози) та стрес-факторами (наприклад, гіпоксією, активними формами кисню, ліпополісахаридами).

Крім того, поліморфізм промотора (положення -675) гена PAI-1 впливає на рівень експресії. Аallel 4G підвищує рівень PAI-1, а варіант 4G/4G (що зустрічається приблизно у 25 % популяції) спричиняє підвищення рівня PAI-1 в плазмі крові приблизно на 25 % порівняно з 5G/5G (поширеність 25 %, а поширеність 4G/5G складає 50 %). Був встановлений зв'язок поліморфізму 4G/4G з інфарктом міокарда (Dawson et al., Arterioscler Thromb. 11:183, 1991), певним типом легеневого фіброзу (ідіопатичною інтерстиціальною пневмонією) (Kim et al., Mol Med. 9:52, 2003), а генотип 4G/4G у групи донорів є незалежним фактором ризику відторгнення трансплантата нирки внаслідок інтерстиціального фіброзу та атрофії каналців (Rerolle et al., Nephrol. Dial. Transplant 23:3325, 2008).

PAI-1 розглядали як патогенну причину деяких тромботичних захворювань, таких як артеріальний та венозний тромбоз, гострий інфаркт міокарда та атеросклероз. Широко відомим є його залучення в порушення обміну речовин, такі як синдром інсулінорезистентності та ожиріння. PAI-1 також відомий як профібротичний фактор для деяких органів, і, як було показано, він є надекспресованим у фіброзних тканинах (тобто у печінці, легені, нирці, серці, спайках черевної порожнини, шкірі: під час рубцювання або склеродермії) (огляд Ghosh and Vaughan, J. Cell Physiol. 227:493, 2012). Миші з нокаутом (KO) PAI-1 є захищеними від фіброзу у різних моделях, як, наприклад, фіброз печінки (перев'язування жовчного протоку або вплив ксенобіотиків), нирки (модель односторонньої обструкції сечоводу (UUO)), легенів (вдихання блеомицину) (Bauman et al., J. Clin. Invest. 120:1950, 2010; Hattori et al., Am. J. Pathol. 164:1091, 2004; Chuang-Tsai et al., Am. J. Pathol. 163:445, 2003), тоді як у серці ця делеція захищає від індукованого фіброзу (Takeshita et al., Am. J. Pathol. 164:449, 2004), але призводить до залежного від віку кардіоселективного фіброзу (Moriwaki et al., Circ. Res. 95:637, 2004). Повідомлялося, що зниження рівня експресії PAI-1 за допомогою siRNA (Senoo et al., Thorax 65:334, 2010) або його інгібування хімічними сполуками (Izuhara et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 28:672, 2008; Huang et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 46:87, 2012) знижує інтенсивність фіброзу легенів, тоді як надекспресія PAI-1 дикого типу (Eitzman et al., J. Clin. Invest. 97:232, 1996) або мутантного PAI-1, що зберігає лише функцію зв'язування з вітронектином, а не інгібування tPA, загострює фіброз легенів (Courey et al., Blood 118:2313, 2011).

Фіброз печінки, спричинений перев'язуванням жовчного протоку (BDL), послаблюється антитілом, що нейтралізує PAI-1 (патент США № 7771720), тоді як зниження рівня експресії за допомогою siRNA послаблює фіброз печінки, спричинений BDL та ксенобіотиками (Hu et al., J. Hepatol. 51:102, 2009). Миші з KO PAI-1 були захищені від ураження печінки, індукованого холестазом, та фіброзу при BDL (Bergheim et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 316:592, 2006; Wang et al., FEBS Lett. 581:3098, 2007; Wang et al., Hepatology 42:1099, 2005), а також від фіброзу печінки, індукованого ангіотензином II (Beier et al., Arch. Biochem. Biophys. 510:19, 2011).

Миші з KO PAI-1 захищені від ниркового фіброзу в моделі UUO (Oda et al., Kidney Int. 60, 587, 2001), при діабетичній нефропатії (Nicholas et al., Kidney Int. 67:1297, 2005) та при нефропатії, індукованій ангіотензином II (Knier et al., J. Hypertens. 29:1602, 2011; для оглядів див. у Ma et al. Frontiers Biosci. 14:2028, 2009 та Eddy A.A. Thromb. Haemost. 101:656, 2009). На противагу, у мишей з надекспресією PAI-1 спостерігають більш тяжку ступінь фіброзу та підвищений рекрутинг макрофагів після UUO (Matsuo et al., Kidney Int. 67: 2221, 2005; Bergheim



et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 316:592, 2006). Було показано, що неінгібіторний мутантний PAI-1 (PAI-1 R) захищає мишей від розвитку фіброзу при експериментальному гломерулонефриті (thy1) у щурів шляхом зниження експресії сечового білка та відкладення гломерулярного матриксу (Huang et al., Kidney Int. 70:515, 2006). Пептиди, які блокують PAI-1, інгібують відкладення колагену 3, 4 та фібронектину в мишей з UUO (Gonzalez et al., Exp. Biol. Med. 234:1511, 2009).

Протягом останніх 20 років PAI-1, як мішень при численних патологіях, знаходився в центрі уваги інтенсивних досліджень, що стосувалися інгібування його активності або регуляції його експресії. Хімічні сполуки (Suzuki et al., Expert Opin. Investig. Drugs 20:255, 2011), моноклональні антитіла (Gils and Declercq, Thromb Haemost; 91:425, 2004), пептиди, мутантні форми (Cale and Lawrence, Curr. Drug Targets 8:971, 2007), siRNA або антисмислові РНК були розроблені для інгібування його різноманітних функцій або для регуляції його експресії. Проте, незважаючи на інтенсивні дослідження, проблема розробки терапевтично ефективного модулятора PAI-1 все ще чекає на вирішення. Відповідно, у даній галузі техніки існує потреба у нових засобах, що інгібують активність PAI-1, для застосування в лікуванні патологій людини, зумовлених PAI-1.

#### КОРОТКИЙ ОПИС РОЗКРИТТЯ

В одному аспекті в даному документі розкрито виділене моноклональне антитіло, що специфічно зв'язується з інгібітором активатора плазміногену людини 1 типу (PAI-1), де антитіло містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, при цьому зазначена варіабельна ділянка важкого ланцюга містить CDR1 (SEQ ID NO: 34), CDR2 (SEQ ID NO: 33) та CDR3 (SEQ ID NO: 32) з SEQ ID NO: 6, та варіабельну ділянку легкого ланцюга, при цьому зазначена варіабельна ділянка легкого ланцюга містить CDR1 (SEQ ID NO: 37), CDR2 (SEQ ID NO: 36) та CDR3 (SEQ ID NO: 35) з SEQ ID NO: 7. У додатковому аспекті важкий ланцюг містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 6, а легкий ланцюг містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 7. У додатковому аспекті варіабельна ділянка важкого ланцюга на 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 % або 90 % ідентична SEQ ID NO: 6, а варіабельна ділянка легкого ланцюга на 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 % або 90 % ідентична SEQ ID NO: 7. Всі приблизні значення % ідентичності означають мінімальний % ідентичності; більш високі % ідентичності, ніж зазначені значення, також охоплені даним розкриттям.

В іншому аспекті в даному документі розкрито виділене моноклональне антитіло, що специфічно зв'язується з PAI-1, яке містить: (а) каркасні ділянки важкого ланцюга, CDR1-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 34, CDR2-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 33, та CDR3-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 32; та (b) каркасні ділянки легкого ланцюга, CDR1-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 37, CDR2-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 36, та CDR3-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 35. У певних аспектах важкий ланцюг антитіла містить каркасні ділянки важкого ланцюга, які на 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 % або 90 % ідентичні каркасним ділянкам важкого ланцюга з SEQ ID NO: 6, а легкий ланцюг антитіла містить каркасні ділянки легкого ланцюга, які на 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 % або 90 % ідентичні каркасним ділянкам з SEQ ID NO: 7.

В одному аспекті в даному документі розкрито виділене моноклональне антитіло, що специфічно зв'язується з інгібітором активатора плазміногену людини 1 типу (PAI-1), де антитіло містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, при цьому зазначена варіабельна ділянка важкого ланцюга містить CDR1 (SEQ ID NO: 22), CDR2 (SEQ ID NO: 21) та CDR3 (SEQ ID NO: 20) з SEQ ID NO: 2, та варіабельну ділянку легкого ланцюга, при цьому зазначена варіабельна ділянка легкого ланцюга містить CDR1 (SEQ ID NO: 25), CDR2 (SEQ ID NO: 24) та CDR3 (SEQ ID NO: 23) з SEQ ID NO: 3. У додатковому аспекті важкий ланцюг містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 2, а легкий ланцюг містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 3. У додатковому аспекті варіабельна ділянка важкого ланцюга на 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 % або 90 % ідентична SEQ ID NO: 2, а варіабельна ділянка легкого ланцюга на 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 % або 90 % ідентична SEQ ID NO: 3.

В додатковому аспекті в даному документі розкрито виділене моноклональне антитіло, що специфічно зв'язується з PAI-1, яке містить: (а) каркасні ділянки важкого ланцюга, CDR1-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 22, CDR2-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 21, та CDR3-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 20; та (b) каркасні ділянки легкого ланцюга, CDR1-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 25, CDR2-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 24, та CDR3-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 23. У певних аспектах важкий ланцюг антитіла містить каркасні ділянки важкого ланцюга,









[illegible]

В одному аспекті в даному документі розкриті виділене моноклональне антитіло, що специфічно зв'язується з PAI-1, яке містить: (а) каркасну ділянку важкого ланцюга та варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 86, та (b) каркасну ділянку легкого ланцюга та варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 93. У певних аспектах виділений важкий ланцюг моноклонального антитіла містить каркасні ділянки важкого ланцюга, які на 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 % або 90 % ідентичні каркасним ділянкам важкого ланцюга з SEQ ID NO: 86, а легкий ланцюг виділеного моноклонального антитіла містить каркасні ділянки легкого ланцюга, які на 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 % або 90 % ідентичні каркасним ділянкам з SEQ ID NO: 93. У певних інших аспектах важкий ланцюг виділеного моноклонального антитіла містить каркасні ділянки важкого ланцюга, на 95 % ідентичні каркасним ділянкам важкого ланцюга з SEQ ID NO: 86, а легкий ланцюг виділеного моноклонального антитіла містить каркасні ділянки легкого ланцюга, на 95 % ідентичні каркасним ділянкам з SEQ ID NO: 93.

В іншому аспекті в даному документі розкриті гуманізоване моноклональне антитіло, що специфічно зв'язується з PAI-1 людини, де антитіло містить важкий ланцюг, що має варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 154, або його антигензв'язувальний фрагмент; та легкий ланцюг, що має варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 153, або його антигензв'язувальний фрагмент. В іншому аспекті в даному документі розкриті гуманізоване моноклональне антитіло, що специфічно зв'язується з PAI-1 людини, де антитіло містить важкий ланцюг, що має варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 155, або його антигензв'язувальний фрагмент, та легкий ланцюг, що має варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 153, або його антигензв'язувальний фрагмент. У додатковому аспекті гуманізована варіабельна ділянка важкого ланцюга на 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 % або 90 % ідентична будь-якій з розкритих раніше варіабельних ділянок важкого ланцюга людини, а гуманізована варіабельна ділянка легкого ланцюга на 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 % або 90 % ідентична будь-якій з розкритих раніше варіабельних ділянок легкого ланцюга людини.

В іншому аспекті в даному документі розкриті виділене моноклональне антитіло, що специфічно зв'язується з PAI-1, де антитіло зв'язує поліпептид, що містить SEQ ID NO: 158. В іншому варіанті здійснення виділене моноклональне антитіло зв'язує фрагмент поліпептиду, що містить SEQ ID NO: 158. В ще одному варіанті здійснення виділене моноклональне антитіло, що специфічно зв'язується з PAI-1, зв'язує поліпептид, що містить SEQ ID NO: 156 та/або SEQ ID NO: 158. В іншому варіанті здійснення виділене моноклональне антитіло, що специфічно зв'язується з PAI-1, зв'язує поліпептид, що містить SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 158 та/або SEQ ID NO: 157. В ще одному варіанті здійснення виділене моноклональне антитіло, що специфічно зв'язується з PAI-1, має спорідненість специфічного зв'язування з залишками 160, 262, 296-297, 300-307 та/або 310-316 з SEQ ID NO: 1. У певних варіантах здійснення виділене моноклональне антитіло, розкриті в даному документі, взаємодіє щонайменше з залишками 311, 312 та 313 (D-Q-E) з SEQ ID NO: 1. У певних варіантах здійснення PAI-1, що зв'язується антитілом, являє собою PAI-1 людини. В інших варіантах здійснення PAI-1, що зв'язується антитілом, являє собою активну форму PAI-1 людини.

В інших варіантах здійснення виділене моноклональне антитіло, що специфічно зв'язується з PAI-1, розкриті в даному документі, зв'язує поліпептид, що містить SEQ ID NO: 161. У ще деяких інших варіантах здійснення виділене моноклональне антитіло зв'язує поліпептид, що містить SEQ ID NO: 159 та/або SEQ ID NO: 161. У ще деяких інших варіантах здійснення виділене моноклональне антитіло зв'язує поліпептид, що містить SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160 та/або SEQ ID NO: 161. У ще одному варіанті здійснення виділене моноклональне антитіло, що специфічно зв'язується з PAI-1, має спорідненість специфічного зв'язування з залишками 44-64 та/або залишками 307-321 з PAI-1 макаки-крабоїда (SEQ ID NO: 162). У певних варіантах здійснення PAI-1, що зв'язується антитілом, являє собою PAI-1 макаки-крабоїда. В інших варіантах здійснення PAI-1, що зв'язується антитілом, являє собою неактивну форму PAI-1 макаки-крабоїда.

У додатковому аспекті в даному документі розкриті виділене моноклональне антитіло, що здійснює конкурентне інгібування зв'язування будь-якого з розкритих антитіл з PAI-1. У варіанті здійснення у даному документі розкриті виділене моноклональне антитіло, яке конкурує за зв'язування з будь-яким з виділених моноклональних антитіл, розкритих у даному документі, та/або здійснює конкурентне інгібування їх зв'язування. У певних варіантах здійснення виділене моноклональне антитіло конкурує за зв'язування або здійснює конкурентне інгібування зв'язування з PAI-1 людини. У певних варіантах здійснення виділене моноклональне антитіло конкурує за зв'язування або здійснює конкурентне інгібування зв'язування з поліпептидом, що містить SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 157 та/або SEQ ID NO: 158. В іншому варіанті здійснення виділене моноклональне антитіло конкурує за зв'язування або здійснює конкурентне інгібування зв'язування з поліпептидом, що містить SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160 та/або SEQ ID NO: 161. У варіанті здійснення виділене антитіло конкурує за зв'язування з поліпептидом, що містить SEQ ID NO: 156, 157 та/або 158, з виділеним моноклональним антитілом, що містить (а) каркасні ділянки важкого ланцюга, CDR1-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 34, CDR2-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 33, та CDR3-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 32; та (b) каркасні ділянки легкого ланцюга, CDR1-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 37, CDR2-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 145, та CDR3-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 35.

В іншому аспекті в даному документі розкриті нуклеотиди, які кодують будь-яке з виділених моноклональних антитіл, розкритих у даному документі.

В одному аспекті в даному документі розкритий спосіб лікування стану, який спричиняє підвищена експресія PAI-1 або підвищена чутливість до PAI-1, що включає введення пацієнту або іншому суб'єкту фармацевтично ефективної кількості антитіла до PAI-1 перорально, парентерально за допомогою розчину для ін'єкцій, шляхом інгаляції або місцево.

В одному аспекті в даному документі розкритий спосіб відновлення утворення плазміну, що включає введення пацієнту або іншому суб'єкту, який потребує цього, фармацевтично ефективної кількості антитіла до PAI-1 перорально, парентерально за допомогою розчину для ін'єкцій, шляхом інгаляції або місцево. Парентеральне введення, розкрите в даному документі, включає внутрішньовенну, шляхом краплинного внутрішньовенного вливання, внутрішньоартеріальну, внутрішньочеревинну, внутрішньом'язову, підшкірну, ректальну або вагінальну, внутрішньовенну, внутрішньоартеріальну, підшкірну та внутрішньом'язову форми парентерального введення. У деяких варіантах здійснення введення пацієнту або іншому суб'єкту включає декілька введень. В іншому аспекті спосіб відновлення утворення плазміну полегшує терапевтичне лікування стану, що включає підвищені рівні фіброзної тканини. У деяких аспектах стан характеризується фіброзом. У деяких аспектах стан являє собою фіброз, фіброз шкіри, системний склероз, фіброз легенів, ідіопатичний легеневий фіброз, інтерстиціальне захворювання легенів та хронічне захворювання легенів. В інших аспектах утворення плазміну полегшує терапевтичне лікування фіброзу печінки, фіброзу нирок, у тому числі хронічного захворювання нирок, тромбозу, венозного та артеріального тромбозу, тромбозу глибоких вен, периферичної ішемії кінцівок, тромбозу з синдромом дисемінованого внутрішньосудинного згортання крові, гострого ішемічного інсульту, що супроводжується та не супроводжується тромболізисом, або рестенозу в стенті.

В іншому аспекті в даному документі розкрите застосування фармацевтично ефективної кількості антитіла до PAI-1 для виробництва лікарського препарату для лікування стану, який спричиняє підвищена експресія PAI-1 або підвищена чутливість до PAI-1, що передбачає введення пацієнту або іншому суб'єкту перорально, парентерально за допомогою розчину для ін'єкцій, шляхом інгаляції або місцево.

В одному аспекті лікарський препарат призначений для лікування стану, що включає підвищені рівні фіброзної тканини. У деяких аспектах стан характеризується фіброзом. У деяких аспектах стан являє собою фіброз, фіброз шкіри, системний склероз, фіброз легенів, ідіопатичний легеневий фіброз, інтерстиціальне захворювання легенів та хронічне захворювання легенів. В інших аспектах лікарський препарат призначений для лікування стану, який включає фіброз печінки, фіброз нирок, у тому числі хронічне захворювання нирок, тромбоз, венозний та артеріальний тромбоз, тромбоз глибоких вен, периферичну ішемію кінцівок, тромбоз з дисемінованим внутрішньосудинним згортанням крові, гострий ішемічний інсульт, що супроводжується та не супроводжується тромболізисом, або рестеноз у стенті.

В іншому аспекті в даному документі розкрите виділене моноклональне антитіло, що специфічно зв'язується з PAI-1, де антитіло пригнічує фіброз легенів. У певних варіантах здійснення антитіло пригнічує фіброз у легені суб'єкта. У певних варіантах здійснення антитіло пригнічує фіброз у легені суб'єкта з ідіопатичним легенеvim фіброзом (IPF). У деяких варіантах здійснення виділене моноклональне антитіло, розкрите в даному документі, спричиняє підсилення розпаду фібрину у суб'єкта. У певних варіантах здійснення антитіло підсилює розпад фібрину у плазмі крові суб'єкта. У деяких інших варіантах здійснення виділене моноклональне антитіло, розкрите в даному документі, інгібує відкладення колагену у легені суб'єкта. У деяких варіантах здійснення суб'єкт має IPF. У деяких інших варіантах здійснення виділене моноклональне антитіло, розкрите в даному документі, підвищує рівні D-димеру в рідині бронхоальвеолярного лаважу (BALF) суб'єкта. У деяких варіантах здійснення суб'єкт має IPF. У деяких других варіантах здійснення виділене моноклональне антитіло, розкрите в даному документі, специфічно зв'язується з PAI-1, де антитіло інгібує збільшення маси легені у зв'язку з фіброзом у суб'єкта. В одному варіанті здійснення суб'єкт має IPF.

В іншому аспекті в даному документі розкрите застосування фармацевтично ефективної кількості антитіла до PAI-1 для виробництва лікарського препарату для лікування стану, який спричиняє підвищена експресія PAI-1 або підвищена чутливість до PAI-1, що передбачає введення пацієнту перорально, парентерально за допомогою розчину для ін'єкцій, шляхом інгаляції або місцево, де стан являє собою ідіопатичний легенеvim фіброз.

В іншому аспекті в даному документі розкритий спосіб відновлення утворення плазміну, що включає введення пацієнту або іншому суб'єкту, який потребує цього, фармацевтично ефективної кількості антитіла до PAI-1 перорально, парентерально за допомогою розчину для ін'єкцій, шляхом інгаляції або місцево, де утворення плазміну полегшує терапевтичне лікування ідіопатичного легеневого фіброзу.



В іншому аспекті в даному документі розкрито виділене моноклональне антитіло, що специфічно зв'язується з PAI-1, де антитіло відновлює фібринолітичну активність у суб'єкта. У певних варіантах здійснення антитіло відновлює фібринолітичну активність у суб'єкта з гострим ішемічним інсультом. Гострий ішемічний інсульт може супроводжуватися або не супроводжуватися тромболізисом. У деяких варіантах здійснення виділене моноклональне антитіло відновлює лізис згустків. У певних варіантах здійснення антитіло відновлює лізис згустків *in vitro*. У ще деяких інших варіантах здійснення антитіло відновлює лізис згустків *in vitro* за IC<sub>50</sub>, що становить приблизно 2 нМ.

В інших аспектах у даному документі розкрито виділене моноклональне антитіло, що специфічно зв'язується з PAI-1, де антитіло відновлює руйнування фібрину у суб'єкта. У деяких варіантах здійснення суб'єкт має гострий ішемічний інсульт.

В іншому аспекті в даному документі розкрито застосування фармацевтично ефективної кількості антитіла до PAI-1 для виробництва лікарського препарату для лікування стану, який спричиняє підвищена експресія PAI-1 або підвищена чутливість до PAI-1, що передбачає введення пацієнту перорально, парентерально за допомогою розчину для ін'єкцій, шляхом інгаляції або місцево, де стан являє собою гострий ішемічний інсульт, що супроводжується та не супроводжується тромболізисом.

В іншому аспекті в даному документі розкритий спосіб відновлення утворення плазміну, що включає введення пацієнту або іншому суб'єкту, який потребує цього, фармацевтично ефективної кількості антитіла до PAI-1 перорально, парентерально за допомогою розчину для ін'єкцій, шляхом інгаляції або місцево, де утворення плазміну полегшує терапевтичне лікування гострого ішемічного інсульту, що супроводжується та не супроводжується тромболізисом.

В іншому аспекті в даному документі розкрито виділене моноклональне антитіло, що специфічно зв'язується з PAI-1, де антитіло інгібує утворення спайок у суб'єкта. У деяких варіантах здійснення утворення спайок відбувається після хірургічної операції або пошкодження у суб'єкта. У деяких варіантах здійснення утворення спайок у суб'єкта відбувається у черевній порожнині. В інших варіантах здійснення утворення спайок відбувається в ділянці плеча, таза, серця, хребта, кисті руки та інших ділянок тіла суб'єкта.

В іншому аспекті в даному документі розкрито застосування фармацевтично ефективної кількості антитіла до PAI-1 для виробництва лікарського препарату для лікування або попередження стану, який спричиняє підвищена експресія PAI-1 або підвищена чутливість до PAI-1, що передбачає введення пацієнту перорально, парентерально за допомогою розчину для ін'єкцій, шляхом інгаляції або місцево, де стан являє собою утворення спайок в черевній порожнині.

В іншому аспекті в даному документі розкритий спосіб відновлення утворення плазміну, що передбачає введення пацієнту або іншому суб'єкту, який потребує цього, фармацевтично ефективної кількості антитіла до PAI-1 перорально, парентерально за допомогою розчину для ін'єкцій, шляхом інгаляції або місцево, де утворення плазміну полегшує терапевтичне лікування або попередження утворення спайок. У деяких варіантах здійснення утворення спайок у суб'єкта відбувається у черевній порожнині.

В іншому аспекті в даному документі розкрито виділене моноклональне антитіло, яке зв'язується з комплексом PAI-1/вітронектин. В іншому аспекті в даному документі розкрито виділене моноклональне антитіло, яке нейтралізує активність PAI-1, спричиняючи утворення субстратної конформації PAI-1. У варіанті здійснення антитіло відновлює або є здатним відновлювати утворення плазміну. В іншому варіанті здійснення виділене моноклональне антитіло спричиняє або є здатним спричинити розпад фібронектину. У ще одному варіанті здійснення виділене моноклональне антитіло спричиняє або є здатним спричинити активацію матриксних металопротеїназ (MMP).

В іншому аспекті виділене моноклональне антитіло, розкрито в даному документі, являє собою фрагмент антитіла. У деяких варіантах здійснення антитіло являє собою антитіло на основі однокланцюгового Fv. В інших варіантах здійснення важкий ланцюг та легкий ланцюг з'єднані гнучким лінкером з утворенням однокланцюгового антитіла. В інших варіантах здійснення антитіло являє собою антитіло на основі Fab, Fab' або (Fab')<sub>2</sub>.

В іншому аспекті в даному документі розкрито виділене моноклональне антитіло, що специфічно зв'язується з PAI-1, де антитіло являє собою кристалізоване антитіло. У варіанті здійснення у даному документі розкритий виділений кристал, що містить Fab'-фрагмент моноклонального антитіла A44, де Fab'-фрагмент складається з послідовності легкого ланцюга SEQ ID NO:7 та послідовності важкого ланцюга SEQ ID NO:6. В іншому варіанті здійснення в даному документі розкритий виділений кристал, що містить Fab'-фрагмент, що містить послідовність легкого ланцюга SEQ ID NO:93 та послідовність важкого ланцюга SEQ ID NO:86. У

варіанті здійснення виділений кристал має наступні розміри асиметричної елементарної комірки:  $a=105 \text{ \AA}$ ,  $b=152 \text{ \AA}$  та  $c=298 \text{ \AA}$ . У варіанті здійснення виділений кристал належить до просторової групи P212121. В іншому варіанті здійснення виділений кристал характеризується роздільною здатністю рентгенівської дифракції, що становить  $3,3 \text{ \AA}$ . У варіанті здійснення виділений кристал зберігає біологічну активність кристалізованого антитіла. У деяких варіантах здійснення виділений кристал має триваліший період напіввиведення *in vivo*, ніж розчинний аналог кристалізованого антитіла.

В одному аспекті в даному документі розкрита фармацевтична композиція, що містить: (а) кристалізоване антитіло, що специфічно зв'язується з PAI-1, та (b) щонайменше один фармацевтичний наповнювач, в який занурений або в якому інкапсульований кристал.

В іншому аспекті в даному документі розкрита фармацевтична композиція, що містить фармацевтично прийнятний носій та терапевтично ефективну кількість будь-якого з антитіл, розкритих у даному документі.

В одному аспекті в даному документі розкритий спосіб одержання антитіла до PAI-1, що включає імунізацію ссавця комплексом, що складається з PAI-1 або його фрагмента та вітронектину.

В іншому аспекті в даному документі розкритий спосіб скринінгу антитіла до PAI-1 в ELISA щодо його здатності блокувати функції PAI-1 як інгібітора активності tPA, що включає стадії: (а) зв'язування PAI-1 на планшеті для ELISA; (b) інкубацію планшета для ELISA з антитілом до PAI-1; (c) інкубацію планшета для ELISA з tPA; (d) інкубацію планшета для ELISA з міченим антитілом до tPA та (e) вимірювання  $OD_{405}$  за випромінюванням міченого антитіла до tPA; де позитивна зареєстрована величина означає, що антитіло до PAI-1 зв'язується з PAI-1, але не блокує утворення ковалентного зв'язку між PAI-1 та tPA, а негативна зареєстрована величина означає, що антитіло до PAI-1 блокує взаємодію PAI-1 з tPA.

В іншому аспекті в даному документі розкритий спосіб скринінгу гібридом. У певних варіантах здійснення спосіб скринінгу включає спосіб зворотного скринінгу із застосуванням іммобілізованих антитіл до антитіл миші до PAI-1. В інших варіантах здійснення спосіб скринінгу включає аналіз з прямий скринінгом із застосуванням вільного PAI-1 як ліганда або на іммобілізованому вітронектині. У певних варіантах здійснення спосіб застосовують для визначення спорідненості антитіла з комплексом PAI-1/вітронектин. У деяких варіантах здійснення спосіб включає іммобілізацію вітронектину на поверхні; приведення PAI-1 у контакт з вітронектином, іммобілізованим на поверхні, з утворенням, таким чином, комплексу; приведення поверхні, що містить комплекс, у контакт з антитілом; відділення антитіла, зв'язаного з комплексом, від незв'язаного антитіла; виявлення антитіла, зв'язаного з комплексом, та аналіз рівнів антитіла, зв'язаного з комплексом, для визначення спорідненості антитіла до комплексу.

#### КОРОТКИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

На фігурі 1 показане схематичне зображення механізмів взаємодії між PAI-1 та серин-протеазним тканинним активатором плазміногену (tPA) та урокіназним активатором плазміногену (uPA). PAI-1 проявляє структурну гнучкість та може перебувати в неактивній конформації або активній конформації, якщо він пов'язаний з вітронектином (Vn). Ділянка RCL PAI-1 містить пептидний зв'язок-"принаду" (який також називають P1-P1'), який являє собою сайт розщеплення для серинової протеази. Спочатку утворюється комплекс Міхаеліса з tPA або uPA, потім каталітична тріада реагує з пептидним зв'язком-"принадою" з утворенням комплексу ацил-фермент, який після розщеплення пептидного зв'язку P1-P1' спричиняє суттєві конформаційні зміни. Ацил-фермент являє собою нестійкий комплекс, утворений ковалентним зв'язком між сериновим залишком (чорний трикутник) з каталітичної тріади серинової протеази (tPA) та амінокислотою з субстрату (чорний кружок), що піддається подальшому гідролізу. Конформаційні зміни зумовлюють вставку розщепленої RCL у  $\beta$ -нитку, при цьому протеаза залишається ковалентно зв'язаною з PAI-1 як ацил-фермент. У нефізіологічних умовах гідроліз даного комплексу ацил-фермент може призводити до вивільнення розщепленого PAI-1 та вільної активної протеази.

На фігурі 2 показана типова калібрувальна крива для титрування антитіла в аналізі зв'язування ELISA, який описано в прикладі 2. Антитіла 31C9, 33B8 та 33H1 являли собою позитивні контролю, а IgG1 було негативним контролем.

На фігурі 3 показана ілюстративна крива для функціонального ELISA для відбору антитіл, що блокують взаємодію PAI-1 з tPA, як описано у прикладі 4. Антитіло 33H1 являє собою позитивний контроль, IgG1 являє собою негативний контроль, а A44 ідентифікували як позитивний клон антитіла.

На фігурі 4 показана нейтралізація активності PAI-1 людини щодо блокування tPA за допомогою A44 та комерційно доступних антитіл (33B8 та 33H1) у хромогенному аналізі, описаному у прикладі 4.

На фігурі 5 показана нейтралізація активності PAI-1 людини щодо блокування tPA шляхом відбору антитіл, одержаних з різних продуктів злиття (див. приклад 4).

На фігурі 6 показані PAI-1 людини та його ортологи, які блокують активність tPA людини у хромогенному аналізі з аналогічною ефективністю.

На фігурі 7 показана нейтралізація активності PAI-1 яванської макаки (макаки-крабоїда) та миші щодо блокування tPA людини за допомогою антитіл A44 та 33B8 (комерційно доступні) у хромогенному аналізі, описаному у прикладі 4.

На фігурі 8 показаний аналіз SDS-PAGE механізму дії антитіл 33H8 (перетворює PAI-1 з активної на неактивну конформацію), 33H1 (перетворює PAI-1 з активної на субстратну конформацію) та A44 з блокування взаємодії PAI-1 з tPA. Доріжка 1: стандарти молекулярної маси; доріжка 2: лише PAI-1; доріжка 3: лише tPA; доріжка 4: PAI-1 в присутності tPA; доріжка 5: 33B8+PAI-1+tPA; доріжка 6: 33H1+PAI-1+tPA; доріжка 7: A44+PAI-1+tPA; доріжка 8: mAb являє собою антитіло ізотипічного контролю.

На фігурі 9 показаний аналіз SDS-Page механізму дії антитіл 33H8 (перетворює PAI-1 з активної на неактивну конформацію), 33H1 (перетворює PAI-1 з активної на субстратну конформацію) та антитіл, що вироблені продуктами злиття C26, E16 та E21, з блокування взаємодії PAI-1 з tPA. Доріжка 1: стандарти молекулярної маси; доріжка 2: лише PAI-1; доріжка 3: лише tPA; доріжка 4: PAI-1 в присутності tPA; доріжка 5: 33B8+PAI-1+tPA; доріжка 6: 33H1+PAI-1+tPA; доріжка 7: C26+PAI-1+tPA; доріжка 8: E16+PAI-1+tPA; доріжка 9: E21+PAI-1+tPA; доріжка 10: mAb являє собою антитіло ізотипічного контролю.

На фігурі 10 показаний аналіз SDS-PAGE механізму дії антитіл 33H8 (перетворює PAI-1 з активної на неактивну конформацію), 33H1 (перетворює PAI-1 з активної на субстратну конформацію) та антитіл, що вироблені продуктами злиття A39, B109 та C45, з блокування взаємодії PAI-1 з tPA. Доріжка 1: стандарти молекулярної маси; доріжка 2: лише PAI-1; доріжка 3: лише tPA; доріжка 4: PAI-1 в присутності tPA; доріжка 5: 33B8+PAI-1+tPA; доріжка 6: 33H1+PAI-1+tPA; доріжка 7: A39+PAI-1+tPA; доріжка 8: B109+PAI-1+tPA; доріжка 9: C45+PAI-1+tPA; доріжка 10: mAb являє собою антитіло ізотипічного контролю.

На фігурі 11 показано вирівнювання легких ланцюгів наступних антитіл миші: A105 (SEQ ID NO: 3), A39 (SEQ ID NO: 5), A44 (SEQ ID NO: 7), A71 (SEQ ID NO: 9), A75 (SEQ ID NO: 81), B109 (SEQ ID NO: 11), B28 (SEQ ID NO: 13), C45 (SEQ ID NO: 15), E16 (SEQ ID NO: 17) та E21 (SEQ ID NO: 19). CDR виділені жирним шрифтом.

На фігурі 12 показано вирівнювання важких ланцюгів наступних антитіл миші: A105 (SEQ ID NO: 2), A39 (SEQ ID NO: 4), A44 (SEQ ID NO: 6), A71 (SEQ ID NO: 8), A75 (SEQ ID NO: 80), B109 (SEQ ID NO: 10), B28 (SEQ ID NO: 12), C45 (SEQ ID NO: 14), E16 (SEQ ID NO: 16) та E21 (SEQ ID NO: 18). CDR, як визначено за допомогою IMGT, виділені жирним шрифтом.

На фігурі 13 показане вирівнювання легкого ланцюга A44 миші (SEQ ID NO: 7) з vk1 (SEQ ID NO: 101) та  $\nu$ -лямбда-3 (SEQ ID NO: 102).

На фігурі 14 показане вирівнювання важкого ланцюга A44 миші (SEQ ID NO: 6) з vh2 (SEQ ID NO: 103) та vh4 (SEQ ID NO: 104).

На фігурі 15 показана гуманізація VL клону A44 з вирівнюванням усіх конструкцій. Усі піддані вирівнюванню послідовності (SEQ ID NO: 91-98) додатково описані нижче в таблиці 25. В чорних рамках представлені CDR-домени. Виділені залишки відрізняються в послідовності від залишку, що розташований безпосередньо вище у вирівнюванні. Нумерація залишків відповідає тій, що описана за допомогою IMGT.

На фігурі 16 показана гуманізація VH клону A44 з вирівнюванням усіх конструкцій. Усі піддані вирівнюванню послідовності (SEQ ID NO: 82-90) додатково описані нижче в таблиці 25. В чорних рамках представлені CDR-домени. Виділені залишки відрізняються в послідовності від залишку, що розташований безпосередньо вище у вирівнюванні. Нумерація залишків відповідає тій, що описана за допомогою IMGT.

На фігурі 17 показане відсоткове значення інгібування активності PAI-1, нанесене на графік залежно від концентрації mAb, а також IC<sub>50</sub> та I<sub>max</sub>, визначені за допомогою програмного забезпечення швидкої дії Biostat.

На фігурі 18 показане очищення однорідного рекомбінантного Fab A44 з міткою 6-His.

На фігурі 19 показаний SPR-аналіз за допомогою Biacore 2000 із застосуванням одноразового кінетичного аналізу зв'язування глікозилізованого PAI-1 людини з іммобілізованим антитілом APG. Сенсограма кінетичного аналізу з одним циклом показана сірим кольором. Апроксимована модель показана чорним кольором.

На фігурі 20 показана нейтралізація PAI-1 у плазмі крові людини за допомогою антитіл APG, APGv2 та APGv4, як визначено шляхом виявлення утворення комплексу UK-PAI-1 за допомогою ELISA. Відсоткове значення інгібування активності PAI-1 наносили на графік залежно від концентрації антитіл APG, APGv2 або APGv4.

5 На фігурі 21 показане відновлення лізису згустків плазми крові людини за допомогою A44V11 (1, 3 або 10 нМ) в присутності 1 нМ tPA та 3 нМ PAI-1, яке виявляють за допомогою турбідиметричного кінетичного вимірювання шляхом зчитування поглинання при 340 нм залежно від часу (хв.).

10 На фігурі 22 показана відсутність відновлення лізису згустків плазми крові людини за допомогою IgG1 людини у ролі негативного контролю (1, 3 або 10 нМ) в присутності 1 нМ tPA та 3 нМ PAI-1, яку виявляють за допомогою поглинання при 340 нм залежно від часу (хв.).

На фігурі 23 показане відновлення лізису згустків плазми крові людини за допомогою A44V11 або IgG1 людини у ролі негативного ізотипічного контролю з різними концентраціями.

15 На фігурі 24 показане відновлення лізису згустків плазми крові людини за допомогою APG, APGv2 або APGv4 при 3 нМ в присутності 1 нМ tPA та 3 нМ PAI-1, яке виявляють за допомогою поглинання при 340 нм залежно від часу (хв.).

На фігурі 25 показане відновлення лізису згустків плазми крові людини за допомогою варіантів 2 та 4 APG з різними концентраціями.

20 На фігурі 26 показаний імуноблотинг антитіл до PAI-1 в надосадових рідинах з культури міофібробластів людини LL29 через 48 год. після обробки mAb A44V11 або ізотипічним контролем IgG при 50 нМ та 5 нг/мл TGFβ.

На фігурі 27 показана загальна активність MMP у первинних фібробластах легенів людини після обробки клітин протягом 48 год. за допомогою PBS (контроль), плазміногену (Pg), A44v11 та плазміногену (A+Pg) або IgG людини як негативного контролю та плазміногену (негатив+Pg).

25 На фігурі 28 показаний рівень активного PAI-1 людини в рідині бронхоальвеолярного лаважу (BALF) (A) та в лізаті легені (B) у мишей, оброблених блеомицином, у день 7 та день 9 після обробки в день 4 за допомогою A44 або IgG1 з розрахунку 10 мг/кг або PBS шляхом і.р. введення. Рівень активного PAI-1 визначали за допомогою ELISA (№ HPAIKT, Molecular Innovation). Відсоткове значення інгібування розраховували шляхом ділення різниці між A44-блеоміцин та IgG-блеоміцин на різницю між IgG-блеоміцин та необробленою (PBS) групою мишей.

30 На фігурі 29 показаний рівень D-димеру мишей в BALF від мишей, оброблених блеомицином, у день 7 та день 9 після обробки у день 4 за допомогою A44 або IgG1 з розрахунку 10 мг/кг або PBS шляхом і.р. введення, який визначали за допомогою ELISA (Asserachrom D-Di, Diagnostica Stago). Вказана кратність збільшення рівня D-димеру, індукованого A44, порівняно з IgG.

35 На фігурі 30 показана маса правої легені у трансгеніх гуманізованих мишей через 21 день після обробки або фізіологічним розчином, або блеомицином, а потім PBS (середовище), IgG1 або A44 з розрахунку 10 мг/кг шляхом і.р. введення від дня 4 до дня 20 кожні 3 дні.

40 На фігурі 31 показаний вміст гідроксипроліну в легені у трансгеніх гуманізованих мишей через 21 день після обробки або фізіологічним розчином, або блеомицином, а потім PBS (середовище), IgG1 або A44 з розрахунку 10 мг/кг шляхом і.р. введення від дня 4 до дня 20 кожні 3 дні.

45 На фігурі 32 показаний рівень активного PAI-1 в плазмі крові мавп, оброблених mAb A44V11 (A) (n=5) або IgG1 у ролі ізотипічного контролю (B) (n=4) (5 мг/кг і.р.) за 24 години до стимуляції за допомогою LPS (100 мкг/кг і.в). Зразки крові збирали в зазначений момент часу та за допомогою ELISA (№ HPAIKT від Molecular Innovation) визначали рівні активного PAI-1 в плазмі крові.

50 На фігурі 33 показаний рівень активного PAI-1 в біоптатах печінки мавп, оброблених mAb A44V11 (A) (n=5) або IgG1 у ролі ізотипічного контролю (B) (n=4) (5 мг/кг і.р.) за 24 години до стимуляції за допомогою LPS (100 мкг/кг і.в). Біоптати печінки збирали у підданих анестезії мавп у зазначений момент часу та за допомогою ELISA (№ HPAIKT від Molecular Innovation) визначали рівні активного PAI-1 у лізатах.

55 На фігурі 34 показаний рівень D-димеру в плазмі крові мавп, оброблених mAb A44V11 (A) (n=5) або IgG1 у ролі ізотипічного контролю (B) (n=4) (5 мг/кг і.р.) за 24 години до стимуляції за допомогою LPS (100 мкг/кг і.в). Зразки крові збирали в зазначений момент часу та за допомогою ELISA визначали рівні D-димеру в плазмі крові.

60 На фігурі 35 показаний рівень комплексів плазмін-α2-антиплазмін (PAP) в плазмі крові мавп, оброблених mAb A44V11 (A) (n=5) або IgG1 у ролі ізотипічного контролю (B) (n=4) (5 мг/кг і.р.) за 24 години до стимуляції за допомогою LPS (100 мкг/кг і.в). Зразки крові збирали в зазначений

момент часу та за допомогою ELISA (№ Asserachrom PAP від Diagnostica Stago) визначали рівні PAP у плазмі крові.

На фігурі 36 показаний рівень активного PAI-1 у внутрішньочеревній рідині (IPF) та лізатах рогів матки. Рівні активного PAI-1 у внутрішньочеревній рідині (A) та лізатах рогів матки (B). У моменти часу 6 годин та день 7 рівні активного PAI-1 як у внутрішньочеревній рідині (IPF), так і в лізатах рогів матки (UH) у тварин, оброблених антитілом A44V11, були більш низькими порівняно з тваринами, обробленими антитілом ізотипічного контролю, при цьому в момент часу 72 години різниці не спостерігали. (\*  $p < 0,001$ , розраховано за Т-критерієм Стюдента).

На фігурі 37 показаний ще один приклад очищення однорідного рекомбінантного Fab A44 з міткою 6-His.

На фігурі 38 показане очищення однорідного рекомбінантного Fab A44 з міткою 6-His, у комплексі з білком PAI-1 wt людини.

На фігурі 39 (a) показана кристалізація комплексу у випадку комплексу Fab A44/PAI-1, а на фігурі 39 (b) показані найкращі оптимізовані кристали.

На фігурі 40 показані окремі паличкоподібні кристали комплексу Fab A44/PAI-1.

На фігурі 41 показане розпізнавання Fab A44 активної форми PAI-1 людини та неактивної форми PAI-1 макаки-крабоїда.

На фігурі 42 показаний епітоп PAI-1, що розпізнається Fab A44, в (A) активному PAI-1 людини та (B) неактивному PAI-1 макаки-крабоїда.

На фігурі 43 показана частина важкого ланцюга, що утворює паратоп, комплексу Fab A44/PAI-1.

На фігурі 44 показана частина легкого ланцюга, що утворює паратоп, комплексу Fab A44/PAI-1.

На фігурі 45 показане вирівнювання послідовностей припустимих епітопів PAI-1 макаки-крабоїда, людини, щура та миші для зв'язування A44. Послідовності відібрані з SEQ ID NO:1 (PAI-1 людини), SEQ ID NO:162 (PAI-1 макаки-крабоїда), SEQ ID NO:163 (PAI-1 миші) та SEQ ID NO:164 (PAI-1 щура).

На фігурі 46 показане порівняння структури PAI-1 миші зі структурою комплексу PAI-1 людини/A44V11.

На фігурі 47 показана структура комплексу PAI-1 людини/A44V11 та модель зв'язування вібронектину з PAI-1.

На фігурі 48 показане охоплення за рахунок одержаних під дією пепсину пептидів PAI-1 макаки-крабоїда (SEQ ID NO:162); 95,3 % охоплення послідовностей одержали за рахунок 150 одержаних під дією пепсину пептидів, що перекриваються.

На фігурі 49 показані ілюстративні діаграми поглинання дейтерію для пептидів PAI-1 макаки-крабоїда у незв'язаному (лінії з кружками), зв'язаному з APGv2 (лінії з хрестиками) та зв'язаному з A44v11 (лінії з ромбами) станах. Діапазони/положення залишків взяті з SEQ ID NO:162. (A) Для більшості одержаних під дією пепсину пептидів не була показана різниця між PAI-1 макаки-крабоїда окремо та зв'язаним з будь-яким mAb. (B) Пептиди, що охоплюють залишки 44-64, демонстрували аналогічну захищеність від обміну в обох станах зв'язку з mAb. (C) Пептиди, які мали у своєму складі залишки 295-322, включають меншу кількість дейтерію в обох станах зв'язку з mAb, хоча величина захищеності є більшою для A44v11.

На фігурі 50 показане порівняння PAI-1 макаки-крабоїда окремо та зв'язаного з A44v11 за методом воднево-дейтерієвого обміну (HDX). (A) Діаграма-"метелик" для середнього значення відносного часткового обміну, при цьому незв'язаний стан показаний угорі, а зв'язаний стан показаний унизу. Лінії відповідають даним, одержаним для моментів часу 10 с, 1 хв., 5 хв. та 240 хв. На (B) наведена діаграма з даними про різницю (у дальтонах) з вищенаведеної діаграми (A) для PAI-1 макаки-крабоїда окремо або зв'язаного з A44v11.

На фігурі 51 показане порівняння PAI-1 макаки-крабоїда окремо та зв'язаного з APGv2 за методом HDX. На (A) наведена діаграма-"метелик" для середнього значення відносного часткового обміну, при цьому незв'язаний стан показаний угорі, а зв'язаний стан показаний унизу. Лінії відповідають даним, одержаним для моментів часу 10 с, 1 хв., 5 хв. та 240 хв. На (B) наведена діаграма з даними про різницю з вищенаведеної панелі (A) для PAI-1 макаки-крабоїда окремо або зв'язаного з APGv2.

На фігурі 52 показане порівняння PAI-1 макаки-крабоїда, зв'язаного з A44v11 та зв'язаного з APGv2, за методом HDX. На (A) наведена діаграма-"метелик" для середнього значення відносного часткового обміну, при цьому стан зв'язку з APGv2 показаний угорі, а стан зв'язку з A44v11 показаний унизу. Лінії відповідають даним, одержаним для моментів часу 10 с, 1 хв., 5 хв. та 240 хв. На (B) наведена діаграма з даними про різницю з вищенаведеної панелі (A) для PAI-1 макаки-крабоїда, зв'язаного з APGv2 або зв'язаного з A44v11.

На фігурі 53 показаний епітоп PAI-1 макаки-крабоїда:A44v11, визначений за допомогою HDX-MS. Залишки PAI-1 макаки-крабоїда (SEQ ID NO: 162), які демонструють захищеність від обміну в стані зв'язку з антитілом A44v11, показані жирним шрифтом. Залишки епітопу PAI-1 макаки-крабоїда:A44v11, визначені з досліджень кристалізації, показані в рамках.

## 5 ДОКЛАДНИЙ ОПИС

У даному винаході наведені антитіла та їхні фрагменти, які специфічно зв'язуються з PAI-1 людини та модулюють біологічні функції PAI-1. Такі антитіла особливо придатні для лікування захворювань або порушень, асоційованих з PAI-1 (наприклад, фіброзу). У даному винаході також наведені фармацевтичні композиції, а також нуклеїнові кислоти, які кодує антитіла до PAI-1, рекомбінантні вектори експресії та клітини-хазяї для одержання таких антитіл або їхніх фрагментів. Способи застосування антитіл, як розкрито в даному документі, для виявлення PAI-1 або для модулювання активності PAI-1 або *in vitro*, або *in vivo* також охоплені даним винаходом.

### 15 I. Визначення

Аби можна було легше зрозуміти даний винахід, спочатку наведені визначення деяких термінів.

Застосовний у даному документі термін "PAI-1 людини" стосується пептиду, що містить амінокислотну послідовність, наведену нижче:

VNHPPSYVAHLASDFGVRVFQQVAQASKDRNVFSPYGVASVLAMLQLTTGGETQQQIQAAAMG  
20 FKIDDKGMAPALRHLYKELMGPNWKDEISTTDAIFVQRDLKLVQGFMPHFFRLFRSTVKQVDFSEVER  
ARFIINDWVKTHTKGMISNLLGKGAVDQLTRLVLVNALYFNGQWKTPFPDSSTHRRFLHKSDGSTVSV  
PMAAQTNKFNYTEFTTPDGHYYDILELPYHGDLSMFIAAPYEKEVPLSALTNILSAQLISHWKGNMT  
RLPRLVLVPKFSLETEVDLRKPLENLGMTDMFRQFQADFTSLSDQEPLHVAQALQKVKIEVNESGTVA  
SSSTAVIVSARMAPEEIIIMDRPFLFVVRHNPTGTVLFMGQVMEP (SEQ ID NO. 1), або її фрагмент,  
25 або складається з них.

Застосовний у даному документі термін "антитіло" стосується молекул імуноглобулінів, що містять чотири поліпептидні ланцюги, два важких (H) ланцюги та два легких (L) ланцюги, з'єднані між собою дисульфідними зв'язками, а також їх мультимерів (наприклад, IgM). Кожний важкий ланцюг містить варіабельну ділянку важкого ланцюга (скорочено V<sub>H</sub> або VH) та константну ділянку важкого ланцюга (C<sub>H</sub> або CH). Константна ділянка важкого ланцюга містить три домени: C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> та C<sub>H3</sub>. Кожний легкий ланцюг містить варіабельну ділянку легкого ланцюга (скорочено V<sub>L</sub> або VL) та константну ділянку легкого ланцюга (C<sub>L</sub> або CL). Константна ділянка легкого ланцюга містить один домен (C<sub>L1</sub>). Ділянки V<sub>H</sub> та V<sub>L</sub> можна додатково поділяти на ділянки гіперваріабельності, які мають назву "ділянки, що визначають комплементарність" (CDR), які чергуються з більш консервативними ділянками, які мають назву "каркасні ділянки" (FR). Кожна V<sub>H</sub> та V<sub>L</sub> складається з трьох CDR та чотирьох FR, розташованих від аміно-кінця до карбокси-кінця у наступному порядку: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Застосовний у даному документі термін "антигензв'язувальний фрагмент" антитіла включає будь-який природний, одержуваний ферментативним шляхом, синтетичний або одержуваний методами генної інженерії поліпептид або глікопротеїн, що специфічно зв'язується з антигеном з утворенням комплексу. Антигензв'язувальні фрагменти антитіла можна одержувати, наприклад, з цілих молекул антитіл за допомогою будь-яких придатних стандартних методик, таких як протеолітичне розщеплення або рекомбінантні методики генної інженерії, які передбачають маніпуляцію з ДНК, що кодує варіабельні та необов'язково константні домени антитіл, та її експресію. Необмежувальні приклади антигензв'язувальних частин включають: (i) Fab-фрагменти; (ii) F(ab')<sub>2</sub>-фрагменти; (iii) Fd-фрагменти; (iv) Fv-фрагменти; (v) одноланцюгові молекули Fv (scFv); (vi) dAb-фрагменти та (vii) мінімальні розпізнавальні одиниці, що складаються з амінокислотних залишків, які імітують гіперваріабельну ділянку антитіла (наприклад, виділену ділянку, що визначає комплементарність (CDR)). Інші сконструйовані молекули, такі як діатіла, триатіла, тетратіла та мініантитіла, також охоплені виразом "антигензв'язувальний фрагмент".

Застосовний у даному документі термін "CDR" або "ділянка, що визначає комплементарність" позначає несуміжні антигензв'язувальні сайти, що знаходяться у варіабельній ділянці як важкого, так і легкого поліпептидного ланцюга. Ці конкретні ділянки були описані в Kabat et al., J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977), та в Kabat et al., Sequences of protein of immunological interest. (1991), та в Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), та в MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), де визначення включають перекриття або підмножини амінокислотних залишків при порівнянні між собою. Визначення за Kabat базується на варіабельності послідовностей. Унікальна нумерація за IMGT для усіх V-ділянок IG та TR усіх видів зумовлена високою консервативністю структури варіабельної ділянки (Lefranc, Mr et al.,

Dev Comp. Immunol. 27:55-77, 2003). Нумерація за IMGT, встановлена після вирівнювання більш ніж 5000 послідовностей, враховує та об'єднує визначення каркасних ділянок та CDR. Визначення за Chothia базується на місцезорозташуванні ділянок структурних петель. Контактне визначення (MacCallum et al.) базується на аналізі кристалічних структур комплексів та взаємодії антитіла та антигену. Амінокислотні залишки, які охоплені CDR, як визначено в будь-якому з вищенаведених літературних джерел, наведені для порівняння. В одному варіанті здійснення, розкритому в даному документі, термін "CDR" позначає CDR, як визначено згідно з визначенням за Kabat. В іншому варіанті здійснення, розкритому в даному документі, CDR являє собою CDR, як визначено за IMGT.

Застосовний у даному документі термін "амінокислотні залишки каркасної ділянки (FR)" стосується тих амінокислот, що знаходяться у каркасній ділянці ланцюга Ig. Термін "каркасна ділянка" або "FR-ділянка", застосовний у даному документі, включає амінокислотні залишки, які є частиною варіабельної ділянки, але не є частиною CDR (наприклад, за контактним визначенням CDR). Таким чином, каркасна ділянка у варіабельній ділянці має довжину приблизно 100-120 амінокислот, але містить лише ті амінокислоти, які знаходяться за межами CDR.

Даний винахід також охоплює "консервативні амінокислотні заміни" в амінокислотних послідовностях CDR антитіл, розкритих в даному документі, тобто модифікації амінокислотних послідовностей, які не ведуть до припинення зв'язування антитіла з антигеном, тобто з PAI-1. Консервативна заміна являє собою таку заміну нативного амінокислотного залишку на ненативний залишок, що вплив на полярність або заряд амінокислотного залишку в даному положенні є незначним або відсутнім. Наприклад, консервативна заміна відбувається внаслідок заміщення неполярного залишку в поліпептиді будь-яким іншим неполярним залишком. Крім того, будь-який нативний залишок у поліпептиді також можна замінити на аланін, як було раніше описано для "аланін-сканувального мутагенезу" (Cunningham et al., Science 244:1081-85 (1989)). Консервативні амінокислотні заміни включають заміну амінокислоти з одного класу на амінокислоту з того самого класу, де клас визначається загальними фізико-хімічними властивостями бічних ланцюгів амінокислот та високими частотами замін у гомологічних білках, які знаходять у природі, як визначено, наприклад, за допомогою стандартної матриці частоти обміну Дайхофф або матриці BLOSUM. Амінокислоти були розподілені у шість загальних класів за бічними ланцюгами, вони включають: клас I (Cys); клас II (Ser, Thr, Pro, Ala, Gly); клас III (Asn, Asp, Gln, Glu); клас IV (His, Arg, Lys); клас V (Ile, Leu, Val, Met) та клас VI (Phe, Tyr, Trp). Наприклад, заміна Asp на інший залишок класу III, такий як Asn, Gln або Glu, являє собою консервативну заміну. Таким чином, передбачений несуттєвий амінокислотний залишок в антитілі до PAI-1 замінюють іншим амінокислотним залишком з того самого класу. Способи ідентифікації консервативних амінокислотних замін, які не ліквідують зв'язування з антигеном, добре відомі з рівня техніки (див., наприклад, Brummell et al., Biochem. 32:1180, 1993; Kobayashi et al. Protein Eng. 12:879, 1999 та Burks et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:412, 1997). Загальні правила для консервативних амінокислотних замін наведені в таблиці 1 нижче.

Таблиця 1

## Консервативні амінокислотні заміни

| Початкові залишки | Ілюстративні заміни                | Вибрані заміни |
|-------------------|------------------------------------|----------------|
| Ala               | Val, Leu, Ile                      | Val            |
| Arg               | Lys, Gln, Asn                      | Lys            |
| Asn               | Gln, His, Lys, Arg                 | Gln            |
| Asp               | Glu                                | Glu            |
| Cys               | Ser                                | Ser            |
| Gln               | Asn                                | Asn            |
| Glu               | Asp                                | Asp            |
| Gly               | Pro, Ala                           | Ala            |
| His               | Asn, Gln, Lys, Arg                 | Arg            |
| Ile               | Leu, Val, Met, Ala, Phe, норлейцин | Leu            |
| Leu               | Норлейцин, Ile, Val, Met, Ala, Phe | Ile            |
| Lys               | Arg, Gln, Asn                      | Arg            |

| Початкові залишки | Ілюстративні заміни                | Вибрані заміни |
|-------------------|------------------------------------|----------------|
| Met               | Leu, Phe, Ile                      | Leu            |
| Phe               | Leu, Val, Ile, Ala, Tyr            | Leu            |
| Pro               | Ala                                | Ala            |
| Ser               | Thr                                | Thr            |
| Thr               | Ser                                | Ser            |
| Trp               | Tyr, Phe                           | Tyr            |
| Tyr               | Trp, Phe, Thr, Ser                 | Phe            |
| Val               | Ile, Met, Leu, Phe, Ala, норлейцин | Leu            |

Консервативні амінокислотні заміни також охоплюють амінокислотні залишки, що не зустрічаються у природі, які звичайно включають шляхом хімічного синтезу пептидів, а не шляхом синтезу в біологічних системах. Вони включають пептидоміметики, а також інші обернені або інвертовані форми амінокислотних фрагментів.

Припускають, що консервативні модифікації амінокислотної послідовності (та відповідні модифікації кодуєчих нуклеотидів) зумовлюють одержання антитіл до PAI-1, що мають функціональні та хімічні характеристики, аналогічні таким у антитіл до PAI-1, що зустрічаються в природі. На відміну від цього, суттєві модифікації функціональних або хімічних характеристик антитіл до PAI-1 можна виконувати шляхом добору заміни, які значно відрізняються за своїм впливом на підтримання (а) структури молекулярного кістяка в ділянці заміни, наприклад, у формі складчастої або спіральної конформації, (b) заряду або гідрофобності молекули в цільовому сайті або (c) об'єму бічного ланцюга. Залишки, що зустрічаються в природі, можна поділяти на групи, базуючись на загальних властивостях бічного ланцюга:

- 1) гідрофобні: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- 2) нейтральні гідрофільні: Cys, Ser, Thr;
- 3) кислі: Asp, Glu;
- 4) основні: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- 5) залишки, що впливають на орієнтацію ланцюга: Gly, Pro; та
- 6) ароматичні: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативні заміни можуть включати обмін представника одного з цих класів на представника іншого класу. Такі залишки, які піддають заміні, можна вводити в ділянки антитіла людини до PAI-1, які є гомологічними антитілу до PAI-1, що не належить людині, або в негомологічні ділянки молекули.

У певних аспектах варіабельні ділянки важкого або легкого ланцюга можуть бути на 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 % або 90 % ідентичні будь-якій з послідовностей варіабельних ділянок, розкритих в даному документі.

Застосовний у даному документі термін "специфічно зв'язується з" стосується здатності антитіла або його антигензв'язувального фрагмента зв'язуватися з антигеном за  $K_d$  нижче  $1 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-7}$  M,  $1 \times 10^{-8}$  M,  $1 \times 10^{-9}$  M,  $1 \times 10^{-10}$  M,  $1 \times 10^{-11}$  M,  $1 \times 10^{-12}$  M або менше. Даний термін також охоплює посилення на здатність антитіла або його антигензв'язувального фрагмента зв'язуватися з антигеном зі спорідненістю, яка щонайменше в два рази перевищує його спорідненість з неспецифічним антигеном.

В даному розкритті також наведені антитіла, що здійснюють конкурентне інгібування зв'язування антитіла з епітопом, розкритим в даному документі, як визначено за допомогою будь-якого способу визначення конкурентного зв'язування, відомого з рівня техніки, наприклад, імунологічних аналізів, описаних у даному документі. У певних варіантах здійснення антитіло здійснює конкурентне інгібування зв'язування з епітопом щонайменше на 95 %, щонайменше на 90 %, щонайменше на 85 %, щонайменше на 80 %, щонайменше на 75 %, щонайменше на 70 %, щонайменше на 60 % або щонайменше на 50 %.

Застосовний у даному документі термін "антиген" стосується сайту зв'язування або епітопу, що розпізнається антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом.

Мають на увазі, що застосовний у даному документі термін "вектор" стосується молекули нуклеїнової кислоти, яка здана переносити іншу нуклеїнову кислоту, з якою її зв'язали. Одним типом вектора є "плазмід", якою називають кільцеву двониткову петлю ДНК, у яку можна лігувати додаткові сегменти ДНК. Іншим типом вектора є вірусний вектор, де в вірусний геном можна лігувати додаткові сегменти ДНК. Деякі вектори здатні до автономної реплікації в клітині-



хазяїні, до якої їх вводять (наприклад, бактеріальні вектори, які мають бактеріальну точку початку реплікації, та епісомні вектори для ссавців). Інші вектори (наприклад, неепісомні вектори для ссавців) можуть інтегруватися в геном клітини-хазяїна після введення в клітину-хазяїна та реплікуються, таким чином, разом з геномом хазяїна. Крім того, певні вектори здатні керувати експресією генів, з якими вони функційно пов'язані. Такі вектори називають у даному документі "рекомбінантні вектори експресії" (або просто "вектори експресії"). Як правило, вектори експресії, застосовувані в методиках рекомбінантних ДНК, часто перебувають у формі плазмід. Терміни "плазміда" та "вектор" можна використовувати взаємозамінно. Проте припускають, що даний винахід включає й інші такі форми векторів експресії, такі як вірусні вектори (наприклад, ретровіруси, дефектні за реплікацією, аденовіруси та аденоасоційовані віруси), які здійснюють еквівалентні функції.

Для цілей даного винаходу можна використовувати численні векторні системи експресії. Наприклад, в одному класі векторів застосовують елементи ДНК, що походять з вірусів тварин, таких як вірус папіломи великої рогатої худоби, вірус полііоми, аденовірус, вірус коров'ячої віспи, бакуловірус, ретровіруси (RSV, MMTV або MOMLV) або вірус SV40. В інших передбачається застосування поліцистронних систем з внутрішніми сайтами зв'язування рибосом. Крім того, клітини, у хромосомах яких інтегрована ДНК, можна піддавати добору шляхом введення одного або декількох маркерів, які дозволяють проводити добір трансфікованих клітин-хазяїв. Маркер може забезпечувати прототрофність для ауксотрофного хазяїна, стійкість до біоцидів (наприклад, антибіотиків) або стійкість до важких металів, таких як мідь. Селективний маркерний ген можна або безпосередньо зв'язувати з послідовностями ДНК, що піддаються експресії, або вводити до тієї самої клітини шляхом котрансформації. Для оптимального синтезу мРНК також можуть бути потрібні додаткові елементи. До цих елементів можуть належати сигнальні послідовності, сигнали сплайсингу, а також транскрипційні промотори, енхансери та сигнали термінації. В конкретних варіантах здійснення клонівані гени варіабельних ділянок вбудовують у вектор експресії разом з генами константних ділянок важкого та легкого ланцюга (наприклад, людини) шляхом синтезу, як обговорюється вище.

Взагалі, після того, як вектор або послідовність ДНК, що кодує антитіло або його фрагмент, були одержані, вектор експресії можна вводити до придатної клітини-хазяїна. Інакше кажучи, клітини-хазяї можна трансформувати. Введення плазмиди до клітини-хазяїна можна здійснювати за допомогою різних методик, добре відомих фахівцям у даній галузі. Вони передбачають, без обмеження, трансфекцію (в тому числі електрофорез та електропорацію), злиття протопластів, осадження фосфатом кальцію, злиття клітин з ДНК в оболонці, мікроін'єкцію та інфікування інтактним вірусом. Див. Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors" Chapter 24.2, pp. 470-472, Vectors, Rodriguez and Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, Mass. 1988). Варіант здійснення, розкритий в даному документі, являє собою введення плазмиди до хазяїна шляхом електропорації. Трансформовані клітини вирощують за умов, придатних для продукування легких ланцюгів та важких ланцюгів, та аналізують щодо синтезу важких або легких ланцюгів білка. Ілюстративні аналітичні методики включають твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA), радіоімунологічний аналіз (RIA) або аналіз за допомогою клітинного сортувальника з активацією флуоресценції (FACS), імуногістохімічний аналіз тощо.

Застосовний у даному документі термін "трансформація" слід застосовувати у широкому сенсі для позначення введення ДНК в реципієнтну клітину-хазяїна, яке змінює генотип та внаслідок цього спричиняє зміну в реципієнтній клітині.

"Клітинами-хазяями" називають клітини, які були трансформовані векторами, сконструйованими за допомогою методик рекомбінантних ДНК та які кодують щонайменше один гетерологічний ген. Під час описів способів виділення поліпептидів з рекомбінантних хазяїв терміни "клітина" та "культура клітин" застосовують взаємозамінно для позначення джерела антитіла, якщо явно не визначене інше. Інакше кажучи, виділення поліпептиду з "клітин" може означати виділення або з цілих клітин, осаджених за допомогою центрифугування, або з культури клітин, що містить як середовище, так і суспендовані клітини.

Слід розуміти, що даний термін припускає посилання не лише на конкретну вказану клітину, але й на нащадків такої клітини. Оскільки в наступних поколіннях можуть відбуватися певні модифікації або внаслідок мутації, або впливів довкілля, такі нащадки, насправді, можуть не бути ідентичні з батьківською клітиною, але їх все ще включають в об'єм терміна "клітина-хазяїн", застосовуваного в даному документі.

Застосовні в даному документі терміни "лікувати", "лікувальний" та "лікування" стосуються терапевтичних або запобіжних засобів, описаних у даному документі. У способах "лікування" застосовують введення суб'єкту антитіла або антигензв'язувального фрагмента, розкритих в даному документі, наприклад, суб'єкту, який має захворювання або порушення, асоційоване з

PAI-1 (наприклад, фіброзне захворювання), або схильному до наявності захворювання або порушення, з метою запобігання, вилікування, затримки, зниження тяжкості або поліпшення одного або декількох симптомів захворювання або порушення або рецидивного захворювання або порушення, або з метою подовження терміну життя суб'єкта за межі очікуваного за відсутності такого лікування.

Застосовний у даному документі термін "захворювання або порушення, асоційоване з PAI-1" включає хворобливі стани з симптомами, асоційованими з хворобливим станом, або без них, під час яких виявляють змінні рівні або активність PAI-1. Ілюстративні захворювання або порушення, асоційовані з PAI-1, включають різні типи фіброзу.

Застосовний у даному документі термін "ефективна кількість" стосується такої кількості антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, що зв'язують PAI-1, яка є достатньою для здійснення лікування, передбачення перебігу або діагностики захворювання або порушення, асоційованого з PAI-1, яке описане в даному документі, при введенні суб'єкту. Терапевтично ефективна кількість буде варіювати залежно від суб'єкта та хворобливого стану, що піддають лікуванню, маси та віку суб'єкта, тяжкості хворобливого стану, способу введення тощо, що може легко визначити звичайний фахівець у даній галузі. Дози для введення можуть варіювати, наприклад, від приблизно 1 нг до приблизно 10000 мг, від приблизно 1 мкг до приблизно 5000 мг, від приблизно 1 мг до приблизно 1000 мг, від приблизно 10 мг до приблизно 100 мг антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, розкритих в даному документі. Режим дозування можна регулювати для одержання оптимального терапевтичного ефекту. Ефективною кількістю також є така, за якої будь-які токсичні або несприятливі ефекти (тобто побічні ефекти) антитіла або його антигензв'язувального фрагмента мінімізовані або їх перевищують сприятливі ефекти.

Застосовний у даному документі термін "суб'єкт" або "ссавець" включає людину або будь-яку тварину, що не є людиною.

Застосовний у даному документі термін "епітоп" стосується антигенної детермінанти, яка взаємодіє зі специфічним антигензв'язувальним сайтом у варіабельній ділянці молекули антитіла, відомим як паратоп. Один антиген може мати більше, ніж один епітоп. Таким чином, різні антитіла можуть зв'язуватися з різними зонами антигену та можуть мати різні біологічні ефекти. Епітопи можуть бути конформаційними або лінійними. Конформаційний епітоп утворений амінокислотами з різних сегментів лінійного поліпептидного ланцюга, які розташовані поряд у просторі. Лінійний епітоп утворений суміжними амінокислотними залишками в поліпептидному ланцюзі.

Тут вказано, що застосовні в даному описі та формулі винаходу, що додається, форми однини також включають посилання на множину, якщо в контексті явно не вказане інше.

## II. Антитіла до PAI-1

В одному аспекті в даному винаході наведені антитіла або їхні антигензв'язувальні фрагменти, що специфічно зв'язуються з PAI-1 людини. Ілюстративні амінокислотні послідовності VH, VL та CDR та нуклеотидні послідовності антитіл, розкритих в даному документі, наведені в таблиці 2. CDR-ділянки, показані в таблиці 2, визначені за IMGT.

Таблиця 2

Амінокислотні послідовності VH, VL та CDR ілюстративних антитіл до PAI-1 або їхніх фрагментів

| АНТИТИЛО | ПОСЛІДОВНІСТЬ                                                                                                                             | SEQ ID NO |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| mA105 VH | QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGFTFSIYWIEWVKQR<br>PGLGLEWIGEILPGSGSTNYNEKFKGKATFTADTSSNTAF<br>MQLSSLTSEDSAVYYCARGGLYYDLDYWGQGTLTSSAK<br>TTPP    | 2         |
| mA105 VL | DVVMQTPTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWL<br>LQRPGQSPQRLISLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKLS<br>RVEGADLGVYYCWQDRHFRPTFGGGTKLEIKRAD              | 3         |
| mA39 VH  | QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFNIYWIQWVKQ<br>RPGHGLEWIGEILPGSNTNYNEKFKDKATFTADSSSNTAY<br>MQLSSLTSEDSAVYYCARLGIGLRGALDYWGQGTSTVTS<br>SAKTTPP | 4         |
| mA39 VL  | DIQMTHTSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYHQKQ<br>GKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLNIKSLQP<br>EDFGTFYCQHRYPGWTFGGGTKLEIKRAD                    | 5         |

| АНТИТИЛО    | ПОСЛІДОВНІСТЬ                                                                                                                                            | SEQ ID NO |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| mA44 VH     | EMQLQESGPSLVKPSQTLTLTCSVTGDSMTNGYWNWIRK<br>FPGNKLEYMGYITYSGSTYYNPSLKGRISITRNTSKNQYYL<br>QLSSVTTEDTATYYCARWHYGSPYYFDYWGGQTTLTVSS<br>AKTTPP                | 6         |
| mA44 VL     | DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWLQQKP<br>GKSPKTLIYRANRSVDGVPSPRFSGSGSGQDYSLTISSEY<br>EDMGIYYCLQYDEFPTFGGGTKLEIKRAD                                    | 7         |
| mA71 VH     | QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGFTFSTYWIEWIKQR<br>PGHGLDWIGEILPGSGNTNYNEKFKGKATFTADTSSNTVY<br>MQLSSLTSEDSAVYYCARGGLYYNLDWSGGQTTLTVSSA<br>KTTTP                 | 8         |
| mA71 VL     | DVVMQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLYWL<br>LQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISR<br>VEAEDLGYYCWDTHFPRTFGGGTKLEIKRAD                                 | 9         |
| mA75 VH     | QGQLQQSGAELMKPGASVKISCKASGFTFSTYWIWLKQ<br>RPGHGLEWIAEILPGSGLTNYNEIFRGKATFTADTSSNTAY<br>MQLSSLTSEDSAVYYCARGGLYYAMDYWGQGSTVTVSS<br>AKTTAP                  | 80        |
| mA75 VL     | DVVMQTPLTSLVTIGQPASICKSSQSLLDSEGKTYLNWLF<br>QRPQGSPKRLIYLVCKLDCGVPDRFTGSGSGTDFTLKISR<br>VEGEDLGYYCWDGSHFPQTFGGGTKLEIKRAD                                 | 81        |
| mB109 VH    | EVQLQQSGSVLARPGTSVKMSCKASGYSFTSYWMHWVK<br>QRPQGGLWGMGAIYPGNSGQGLDWIGAIYPGNSDTTYNQ<br>KFEDKAKLTAVASASTAYMEVSSLTNEDSAVYYCTRGLRR<br>WGAMDYWGQGSTVTVSSAKTTPP | 10        |
| mB109 VL    | DIVMTQSHKFMSTSAGDRVSIPCKASQDVSSAVAWYQQK<br>LGQSPKLLIYSASFRTYGVDPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQA<br>EDLAVYYCQQHYSSPYTFGGGTNLEIKRAD                                  | 11        |
| mB28 VH     | QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSISWIEWIKQR<br>PGGLEWIGKILPGSGGANYNEKFKGKATVTADTSSNTVYM<br>QLSSLTSEDSAVYYCARLSTGTRGAFDYWGQGTTLTVSS<br>AKTTPP                | 12        |
| mB28 VL     | DIQLTQSPASLSASVGATVTITCRASENVYSYLAWYQQKQ<br>GKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINYLP<br>EDFGSYCQHHYGTPTFGGGTKVEIKRAD                                      | 13        |
| mC45 VH     | QVQLQQSGVELVRPGTSVKVSKASGYAFTNYLIEWIKQR<br>PGQGLEWIGVIHPGSGVTNYNEKFKGKAILTADKSSSTAY<br>MQLSSLTSDDSAVYFCARDYYGSSHGLMDYWGQGSTVT<br>VSS                     | 14        |
| mC45 VL     | DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKP<br>GKSPKTLIYRANRLVDGVPSPRFSGSGSGQDYSLTISSEYE<br>DMGIYYCLQYDEFPTFGGGTKLEIK                                       | 15        |
| mE16 VH     | EVKLVESSGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNYGMSWVRQ<br>TPEKGLGWVASLRTGGNTYYSDSVKGRFTISRDNDRNLY<br>LQMSSLTSEDTAVYYCARGLRHWGYFDVWGAGTTTVSS                            | 16        |
| mE16 VL     | DIVMTQSHKFMSTSVDGRVNITCKASQDVSTAVGWYQQE<br>PGQSPKLLIYSASNRHTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQ<br>AEDLAVYYCQQHYSSPWTFGGGTLEIK                                       | 17        |
| mE21 VH     | EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYMHMWVKQ<br>RPEQGLEWIGWIDPENGDEYDPKFQAKATMTADTSSNT<br>AYLQLSSLTSEDTAVYYCMYGNYPYFDYWGGQTTLTVS<br>S                         | 18        |
| mE21 VL     | DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKP<br>DGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQE<br>DIATYFCQQGNTLPWTFGGGTLEIK                                       | 19        |
| mA105 HCDR3 | ARGGLYYDLDY                                                                                                                                              | 20        |
| mA105 HCDR2 | ILPGSGST                                                                                                                                                 | 21        |
| mA105 HCDR1 | GFTFSIYW                                                                                                                                                 | 22        |

| АНТИТИЛО               | ПОСЛІДОВНІСТЬ | SEQ ID NO |
|------------------------|---------------|-----------|
| mA105 LCD3             | WQDRHFPRT     | 23        |
| mA105<br>mA71<br>LCDR2 | LVS           | 24        |
| mA105<br>mA71<br>LCDR1 | QSLDSDGKTY    | 25        |
| mA39 HCDR3             | ARLGIGLRGALDY | 26        |
| mA39 HCDR2             | ILPGSNT       | 27        |
| mA39 HCDR1             | GYTFNIYW      | 28        |
| mA39 LCDR3             | QHRYGSPWT     | 29        |
| mA39 LCDR2             | NAK           | 30        |
| mA39 LCDR1             | ENIYSY        | 31        |
| mA44<br>HCDR3          | ARWHYGSPYYFDY | 32        |
| mA44<br>HCDR2          | ITYSGST       | 33        |
| mA44<br>HCDR1          | GDSMTNGY      | 34        |
| mA44<br>LCDR3          | LQYDEFPPT     | 35        |
| mA44<br>LCDR2          | RAN           | 36        |
| mA44<br>LCDR1          | QDINSY        | 37        |
| mA71 HCDR3             | ARGGLYYNLDS   | 38        |
| mA71 HCDR2             | ILPGSGNT      | 39        |
| mA71 HCDR1             | GFTFSTYW      | 40        |
| mA71 LCDR3             | WQDTHFPRT     | 41        |
| mA71 LCDR2             | LVS           | 42        |
| mA71 LCDR1             | QSLDSDGKTY    | 43        |
| mA75<br>HCDR3          | ARGGLYYAMDY   | 44        |
| mA75<br>HCDR2          | ILPGSGLT      | 45        |
| mA75<br>HCDR1          | GFTFSTYW      | 46        |
| mA75<br>LCDR3          | WQGSHFPQT     | 47        |
| mA75<br>LCDR2          | LVC           | 48        |
| mA75<br>LCDR1          | QSLDSEGKTY    | 49        |
| mB109 HCDR3            | TRGLRRWGAMDY  | 50        |
| mB109 HCDR2            | ILPGSGLT      | 51        |
| mB109 HCDR1            | GFTFSTYW      | 52        |
| mB109 LCDR3            | QQHYSSPYT     | 53        |
| mB109 LCDR2            | SAS           | 54        |

| АНТИТИЛО    | ПОСЛІДОВНІСТЬ  | SEQ ID NO |
|-------------|----------------|-----------|
| mB109 LCDR1 | QDVSSA         | 55        |
| mB28 HCDR3  | ARLSTGTRGAFDY  | 56        |
| mB28 HCDR2  | ILPGSGGA       | 57        |
| mB28 HCDR1  | GYTFSISW       | 58        |
| mB28 LCDR3  | QHHYGPPT       | 59        |
| mB28 LCDR2  | NAK            | 60        |
| mB28 LCDR1  | ENVYSY         | 61        |
| mC45 HCDR3  | ARDYYGSSHGLMDY | 62        |
| mC45 HCDR2  | IHPGSGVT       | 63        |
| mC45 HCDR1  | GYAFTNYL       | 64        |
| mC45 LCDR3  | LQYDEFPR       | 65        |
| mC45 LCDR2  | RAN            | 66        |
| mC45 LCDR1  | QDINSY         | 67        |
| mE16 HCDR3  | ARGLRHWGYFDV   | 68        |
| mE16 HCDR2  | LRTGGNT        | 69        |
| mE16 HCDR1  | GFTFSNYG       | 70        |
| mE16 LCDR3  | QQHYSSPWT      | 71        |
| mE16 LCDR2  | SAS            | 72        |
| mE16 LCDR1  | QDISNY         | 73        |
| mE21 HCDR3  | MYGNYPYYFDY    | 74        |
| mE21 HCDR2  | IDPENGDT       | 75        |
| mE21 HCDR1  | GFNIKDY        | 76        |
| mE21 LCDR3  | QQGNTLPWT      | 77        |
| mE21 LCDR2  | YTS            | 78        |
| mE21 LCDR1  | QDISNY         | 79        |

m = миші; VH = варіабельна ділянка важкого ланцюга; VL = варіабельна ділянка легкого ланцюга.

В іншому варіанті здійснення в даному винаході наведені антитіла до PAI-1, що зв'язуються з тим самим епітопом або здійснюють конкурентне інгібування антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, які містять амінокислотні послідовності VH- та VL-ділянок, наведені в SEQ ID NO: 6 та 7, відповідно. Такі антитіла можна ідентифікувати за допомогою стандартних аналізів конкурентного зв'язування, в тому числі, наприклад, конкурентних аналізів на основі поверхневого плазмонного резонансу (SPR).

### III. Модифіковані антитіла до PAI-1

У певних варіантах здійснення антитіла до PAI-1, розкриті в даному документі, можуть містити одну або декілька модифікацій. Модифіковані форми антитіл до PAI-1, розкритих в даному документі, можна одержувати за допомогою будь-яких методик, відомих з рівня техніки.

#### і) Зниження імуногенності

У певних варіантах здійснення антитіла до PAI-1 або їхні антигензв'язувальні фрагменти, розкриті в даному документі, модифікують для зниження їхньої імуногенності за допомогою

методик, вживаних у даній галузі техніки. Наприклад, антитіла або їхні фрагменти можна піддавати хімеризації, гуманізації або деімунізації.

В одному варіанті здійснення антитіло або його антигензв'язувальні фрагменти, розкриті в даному документі, можуть бути химерними. Химерне антитіло являє собою антитіло, в якому різні частини антитіла походять від різних видів тварин, як, наприклад, антитіла, що мають варіабельну ділянку, що походить від моноклонального антитіла миші, та константну ділянку імунoglobуліну людини. Способи одержання химерних антитіл або їхніх фрагментів відомі з рівня техніки. Див., наприклад, Morrison, *Science* 229:1202, 1985; Oi et al., *BioTechniques* 4:214, 1986; Gillies et al., *J. Immunol. Methods* 125:191, 1989; патенти США №№ 5807715; 4816567 та 4816397, включені в даний документ за допомогою посилання в усій своїй повноті. Методики, розроблені для одержання "химерних антитіл" (Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:851, 1984; Neuberger et al., *Nature* 312:604, 1984; Takeda et al., *Nature* 314:452, 1985), можна використовувати для синтезу вказаних молекул. Наприклад, послідовність гена, яка відповідає за специфічність зв'язування молекули антитіла миші з PAI-1, можна злити разом з послідовністю з молекули антитіла людини з відповідною біологічною активністю. Застосовуване в даному документі химерне антитіло являє собою молекулу, в якій різні частини походять від різних видів тварин, як, наприклад, антитіла, що мають варіабельну ділянку, що походить з моноклонального антитіла миші, та константну ділянку імунoglobуліну людини, наприклад, гуманізовані антитіла.

В іншому варіанті здійснення антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, розкриті в даному документі, є гуманізованими. Гуманізовані антитіла мають специфічність зв'язування та містять одну або декілька ділянок, що визначають комплементарність (CDR), з антитіла, що не належить людині, та каркасні ділянки з молекули антитіла людини. Залишки каркасної ділянки в каркасних ділянках людини часто замінюють відповідними залишками з антитіла-донора CDR для зміни або поліпшення зв'язування з антигеном. Ці заміни в каркасній ділянці ідентифікують за допомогою способів, добре відомих з рівня техніки, наприклад, шляхом моделювання взаємодії залишків CDR та каркасної ділянки для ідентифікації залишків каркасної ділянки, важливих для зв'язування з антигеном, та порівняння послідовностей для ідентифікації нетипових залишків каркасної ділянки в конкретних положеннях. Див., наприклад, Queen et al., патент США № 5585089; Riechmann et al., *Nature* 332:323, 1988, включені в даний документ шляхом посилання в усій своїй повноті. Антитіла можна гуманізувати за допомогою низки методик, відомих з рівня техніки, в тому числі, наприклад, трансплантації CDR (EP 239400; міжнародна публікація № WO 91/09967; патенти США №№ 5225539; 5530101 та 5585089), поліпшення або змінення поверхні (EP 592106; EP 519596; Padlan, *Molecular Immunology* 28:489, 1991; Studnicka et al., *Protein Engineering* 7:805, 1994; Roguska et al., *PNAS* 91:969, 1994) та перетасування ланцюгів (патент США № 5565332).

В конкретному варіанті здійснення застосовують спосіб гуманізації, що базується на впливі гнучкості молекули антитіла під час імунного розпізнавання та на нього (див. міжнародну публікацію № WO2009/032661, включену в даний документ шляхом посилання в усій своїй повноті). Гнучкість білка пов'язана з молекулярною рухливістю молекули білка. Гнучкість білка являє собою здатність цілісного білка, частини білка або окремого амінокислотного залишку набувати низки конформацій, що значно відрізняються одна від одної. Інформацію стосовно гнучкості білка можна одержати шляхом здійснення експериментів з рентгенівської кристалографії білків (див., наприклад, Kundu et al., *Biophys. J.* 83:723, 2002), експериментів з ядерного магнітного резонансу (див., наприклад, Freedberg et al., *J. Am. Chem. Soc.* 120:7916, 1998) або шляхом проведення молекулярно-динамічного (MD) моделювання. MD-моделювання білка здійснюється на комп'ютері та дозволяє визначати рухливість всіх атомів білка протягом певного періоду часу шляхом розрахунку фізичних взаємодій атомів один з одним. Результатом MD-моделювання є траєкторія досліджуваного білка протягом періоду часу моделювання. Траєкторія являє собою сукупність конформацій білка, які також називають моментальними знімками, добір яких проводять періодично протягом періоду моделювання, наприклад, через кожну 1 пікосекунду (пс). Саме шляхом аналізу сукупності моментальних знімків можна кількісно визначати гнучкість амінокислотних залишків білка. Таким чином, гнучким є залишок, що набуває низки різних конформацій у контексті поліпептиду, в якому цей залишок знаходиться. MD-способи відомі з рівня техніки, див., наприклад, Brooks et al. "Proteins: A Theoretical Perspective of Dynamics, Structure and Thermodynamics" (Wiley, New York, 1988). Деяка кількість програмного забезпечення дозволяє здійснювати MD-моделювання, як, наприклад, Amber (див. Case et al. *J. Comp. Chem.* 26:1668, 2005; Brooks et al. *J. Comp. Chem.* 4:187, 1983 та MacKerell et al. (1998) у "The Encyclopedia of Computational Chemistry" vol. 1:271-177, Schleyer et al., eds. Chichester: John Wiley & Sons) або Impact (див. Rizzo et al. *J. Am. Chem. Soc.*; 122:12898, 2000).

Більшість білкових комплексів мають відносно велику та пласку занурену поверхню, та було показано, що гнучкість партнерів для зв'язування є джерелом їхньої пластичності, що дозволяє їм пристосовуватися одне до одного за конформацією (Sundberg and Mariuzza, Structure 8, R137-R142, 2000). В зв'язку з цим було показано, що приклади "індукованої відповідності" відіграють домінуючу роль на поверхні міжбілкових контактів. Крім того, існує постійно зростаючий обсяг інформації, що вказує на те, що білки дійсно зв'язуються з лігандами різноманітних форм, розмірів та складу (Protein Science 11:184-187, 2002) та що конформаційна різноманітність, певно, є суттєвою складовою здатності до розпізнавання різних партнерів (James et al., Science 299:1362, 2003). Гнучкі залишки беруть участь у зв'язуванні партнерів міжбілкових взаємодій (Grunberg et al., Structure 14, 683, 2006).

Гнучкі залишки можуть набувати різних конформацій, що забезпечують наявність сукупності ділянок взаємодії, які, ймовірно, розпізнаються В-клітинами пам'яті та запускають імуногенну реакцію. Таким чином, антитіло можна гуманізувати шляхом модифікації деякої кількості залишків каркасної ділянки таким чином, аби сукупність конформацій та ділянок розпізнавання, представлених у модифікованому антитілі, щонайбільше нагадувала такі, що набуває антитіло людини. Цього можна досягти за допомогою модифікації обмеженої кількості залишків шляхом (1) побудови гомологічної моделі початкового mAb та здійснення MD-моделювання; (2) аналізу гнучких залишків та ідентифікації найбільш гнучких залишків молекули антитіла, що не належить людині, а також ідентифікації залишків або мотивів, які, ймовірно, є джерелом неоднорідності або реакції розпаду; (3) ідентифікації антитіла людини, в якому представлена низка ділянок розпізнавання, що найбільш подібна до такої початкового антитіла; (4) визначення гнучких залишків, які треба піддати мутації, при цьому залишки або мотиви, які, ймовірно, є джерелом неоднорідності та розпаду, також піддають мутації; та (5) перевірки наявності відомих епітопів для Т-клітин або В-клітин. Гнучкі залишки можна виявляти за допомогою MD-розрахунку, ідея якого викладена в даному документі, за допомогою моделі з неявним розчинником, в якій враховується взаємодія водного розчинника з атомами білка протягом періоду часу моделювання.

Після ідентифікації набору гнучких залишків у варіабельних ділянках легкого та важкого ланцюгів ідентифікують набір каркасних ділянок у варіабельних ділянках важкого та легкого ланцюгів антитіла людини, що мають близьку подібність до таких в антитіла, що становить інтерес. Це можна здійснювати, наприклад, за допомогою BLAST-пошуку набору гнучких залишків за базою даних послідовностей антитіл зародкового типу людини. Це також можна здійснювати шляхом порівняння динамічних властивостей початкового mAb з динамічними властивостями бібліотеки канонічних структур зародкового типу. Залишки CDR та сусідні залишки виключають з пошуку для забезпечення збереження високої спорідненості з антигеном. Гнучкі залишки потім замінюють.

Якщо декілька залишків у антитілі людини демонструють подібні рівні гомології, то добір також виконують з урахуванням природи залишків, які, ймовірно, впливають на поведінку гуманізованого антитіла в розчині. Наприклад, полярні залишки часто розташовані в поверхневих гнучких петлях над гідрофобними залишками. Залишки, які являють собою потенційне джерело нестабільності та неоднорідності, також піддають мутації, навіть, якщо вони знаходяться в CDR. Вони включатимуть поверхневі метіонінові залишки, оскільки кисневі радикали можуть спричиняти утворення сульфоксидів, кислотонестійкі зв'язки, що піддаються протеолітичному розщепленню, як, наприклад, у дипептиді Asp-Pro (Drug Dev. Res. 61:137, 2004), сайти дезамідування, які знаходяться у поверхневому аспарагіновому залишку, за яким розташована невелика амінокислота, така як Gly, Ser, Ala, His, Asn або Cys (J. Chromatog. 837:35, 2006), та сайти N-глікозилювання, такі як сайт Asn-X-Ser/Thr. Як правило, поверхневі метіонінові залишки будуть заміщені Leu, поверхневі аспарагінові залишки будуть замінені глутаміном або аспартатом, або буде змінений наступний залишок. У сайті глікозилювання (Asn-X-Ser/Thr) буде змінений залишок Asn або Ser/Thr.

Одержану складену послідовність антитіла перевіряють на наявність відомих епітопів для В-клітин або лінійних епітопів для Т-клітин. Пошук виконують, наприклад, із застосуванням загальнодоступної бази даних з імунних епітопів (IEDB) (PLOS Biol. (2005) 3(3)e91). Якщо у складеній послідовності знаходять відомий епітоп, то пошук та заміщення виконують з іншим набором послідовностей людини. Таким чином, на відміну від способу зміни поверхні з патенту США № 5639641, даний спосіб вирішує проблему як опосередкованих В-клітинами, так і опосередкованих Т-клітинами імуногенних реакцій. Даний спосіб також уникає проблеми втрати активності, що іноді спостерігається при трансплантації CDR (патент США № 5530101). Крім того, в способі конструювання та добору також враховуються проблеми стабільності та

розчинності, внаслідок чого одержують антитіло, оптимізоване з точки зору низької імуногенності, високої спорідненості з антигеном та поліпшених біофізичних властивостей.

У деяких варіантах здійснення для зниження імуногенності антитіла або його антигензв'язувального фрагмента можна застосовувати деімунізацію. Застосовний у даному документі термін "деімунізація" включає змінення антитіла або його антигензв'язувального фрагмента з модифікацією епітопів для Т-клітин (див., наприклад, міжнародні публікації №№ WO9852976A1, WO0034317A2). Наприклад, можна аналізувати послідовності VH та VL від початкового антитіла, та для кожної V-ділянки можна створювати "карту" епітопів для Т-клітин людини, на якій вказане місцезонаштування епітопів відносно ділянок, що визначають комплементарність (CDR), та інших ключових залишків у послідовності. Окремі епітопи для Т-клітин з карти епітопів для Т-клітин аналізують з метою ідентифікації альтернативних амінокислотних замін з низьким ризиком зміни активності кінцевого антитіла. Конструюють низку альтернативних послідовностей VH та VL, що містять комбінації амінокислотних замін, та ці послідовності потім вбудовують у низку PAI-1-специфічних антитіл або їхніх фрагментів для застосування в способах діагностики та лікування, розкритих в даному документі, ці антитіла потім тестують щодо їх функції. Як правило, одержують та тестують від 12 до 24 варіантів антитіл. Повні гени важкого та легкого ланцюгів, що містять модифіковані V- та C-ділянки людини, потім клонують у вектори експресії та одержані плазмідні вводять у лінії клітин для одержання цілісного антитіла. Потім антитіла порівнюють у придатних біохімічних та біологічних аналізах та ідентифікують оптимальний варіант.

#### ii) Ефекторні функції та модифікації Fc

Антитіла до PAI-1, розкриті в даному документі, можуть містити константну ділянку антитіла (наприклад, константну ділянку IgG, константну ділянку IgG людини, константну ділянку IgG1 або IgG4 людини), що опосередковує одну або декілька ефекторних функцій. Наприклад, зв'язування компонента C1 системи комплемента з константною ділянкою антитіла може активувати систему комплемента. Активація системи комплемента важлива для опсонізації та лізису клітинних патогенів. Активація системи комплемента також стимулює запальну відповідь та також може брати участь в аутоімунній гіперчутливості. Крім того, антитіла зв'язуються з рецепторами на поверхні різноманітних клітин за допомогою Fc-ділянки, при цьому сайт зв'язування з Fc-рецептором у Fc-ділянці антитіла зв'язується з Fc-рецептором (FcR) на поверхні клітини. Існує декілька Fc-рецепторів, які є специфічними для різних класів антитіл, в тому числі для IgG (гамма-рецептори), IgE (епсилон-рецептори), IgA (альфа-рецептори) та IgM (мю-рецептори). Зв'язування антитіла з Fc-рецепторами на поверхні клітин запускає декілька важливих та різноманітних біологічних реакцій, у тому числі поглинання та руйнування частинок, вкритих антитілами, виведення імунних комплексів, лізис клітин-мішеней, вкритих антитілами, клітинами-кілерами (так звана антитілозалежна клітиноопосередкована цитотоксичність або ADCC), вивільнення медіаторів запалення, перенесення через плаценту та регуляцію продукування імуноглобулінів. У певних варіантах здійснення антитіла або їхні фрагменти, розкриті в даному документі, зв'язуються з Fc-гамма-рецептором. В альтернативних варіантах здійснення антитіла до PAI-1, розкриті в даному документі, можуть містити константну ділянку, що позбавлена однієї або декількох ефекторних функцій (наприклад, активності ADCC) або нездатна до зв'язування з Fc-рецептором.

Певні варіанти здійснення, розкриті в даному документі, включають антитіла до PAI-1, в яких щонайменше одна амінокислота в одному або декількох доменах константної ділянки була видалена або іншим чином змінена для забезпечення потрібних біохімічних характеристик, таких як послаблені або підсилені ефекторні функції, здатність до нековалентної димеризації, підвищена здатність до локалізації в конкретній ділянці організму (наприклад, у місці локалізації пухлини або у конкретному органі), зменшений період напіввиведення з сироватки крові або збільшений період напіввиведення з сироватки крові порівняно з цілісним, незмінним антитілом, що має приблизно таку саму імуногенність. Наприклад, визначені антитіла або їхні фрагменти для застосування в способах діагностики та лікування, описаних в даному документі, являють собою антитіла з видаленими доменами, які містять поліпептидний ланцюг, подібний до важкого ланцюга імуноглобуліну, але в якому немає щонайменше частини одного або декількох доменів важкого ланцюга. Наприклад, у визначених антитілах один цілий домен константної ділянки модифікованого антитіла буде видалений, наприклад, CH2-домен цілком або його частина будуть видалені.

У певних інших варіантах здійснення антитіла до PAI-1 містять константні ділянки, що походять від різних ізотипів антитіл (наприклад, константні ділянки з двох або більше з IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4 людини). В інших варіантах здійснення антитіла до PAI-1 містять химерну шарнірну ділянку (тобто шарнірну ділянку, що містить частини шарнірної ділянки, що походять з



шарнірних доменів різних ізотипів антитіл, наприклад, верхній шарнірний домен з молекули IgG4 та середній шарнірний домен IgG1). В одному варіанті здійснення антитіло до PAI-1 містить Fc-ділянку або її частину з молекули IgG4 людини та мутацію Ser228Pro (нумерація за Kabat) у коров'ї шарнірній ділянці молекули.

У визначених антитілах до PAI-1 Fc-частину можна піддавати мутації для підвищення або зниження ефекторної функції за допомогою методик, відомих з рівня техніки. Наприклад, видалення або інактивація (за допомогою точкових мутацій або інших засобів) домену константної ділянки можуть послаблювати зв'язування циркулюючого модифікованого антитіла з Fc-рецептором, збільшуючи, таким чином, локалізацію в пухлині. В інших випадках можливо, що модифікації константної ділянки згідно з даним винаходом послаблюють зв'язування комплемента та, таким чином, зменшують період напіввиведення з сироватки крові та неспецифічне зв'язування кон'югованого цитотоксину. Ще деякі модифікації константної ділянки можна застосовувати для модифікації дисульфідних зв'язків або олігосахаридних фрагментів, що забезпечує підвищення локалізації внаслідок збільшення специфічності до антигену або гнучкості. Зумовлені цим фізіологічний профіль, біодоступність та інші біохімічні ефекти модифікацій, такі як локалізація в пухлині, біорозподілення та період напіввиведення з сироватки крові, можна легко вимірювати та визначати кількісно за допомогою добре відомих імунологічних методик без здійснення зайвих експериментів.

У певних варіантах здійснення Fc-домен, який застосовується в антитілі, розкритому в даному документі, являє собою варіант Fc. Застосовний у даному документі термін "варіант Fc" стосується Fc-домену, що має щонайменше одну амінокислотну заміну порівняно з Fc-доменом дикого типу, з якого походить вказаний Fc-домен. Наприклад, у випадках, коли Fc-домен походить від антитіла IgG1 людини, варіант Fc зазначеного Fc-домена IgG1 людини містить щонайменше одну амінокислотну заміну порівняно з зазначеним Fc-доменом.

Амінокислотна(амінокислотні) заміна(заміни) у варіанті Fc можуть перебувати в будь-якому положенні (тобто в будь-якому амінокислотному положенні згідно з системою нумерації EU) у Fc-домені. В одному варіанті здійснення варіант Fc містить заміну в амінокислотному положенні, що розташоване у шарнірному домені або його частині. В іншому варіанті здійснення варіант Fc містить заміну в амінокислотному положенні, що розташоване у CH2-домені або його частині. В іншому варіанті здійснення варіант Fc містить заміну в амінокислотному положенні, що розташоване у CH3-домені або його частині. В іншому варіанті здійснення варіант Fc містить заміну в амінокислотному положенні, що розташоване у CH4-домені або його частині.

В антитілах, розкритих в даному документі, можна застосовувати будь-який вживаний у даній галузі варіант Fc, про який відомо, що він спричиняє поліпшення (наприклад, послаблення або підсилення) ефекторної функції або зв'язування з FcR. Зазначені варіанти Fc можуть містити, наприклад, будь-яку з амінокислотних заміन, розкритих в міжнародних публікаціях згідно з PCT WO88/07089A1, WO96/14339A1, WO98/05787A1, WO98/23289A1, WO99/51642A1, WO99/58572A1, WO00/09560A2, WO00/32767A1, WO00/42072A2, WO02/44215A2, WO02/060919A2, WO03/074569A2, WO04/016750A2, WO04/029207A2, WO04/035752A2, WO04/063351A2, WO04/074455A2, WO04/099249A2, WO05/040217A2, WO05/070963A1, WO05/077981A2, WO05/092925A2, WO05/123780A2, WO06/019447A1, WO06/047350A2 та WO06/085967A2 або патентах США №№ 5648260; 5739277; 5834250; 5869046; 6096871; 6121022; 6194551; 6242195; 6277375; 6528624; 6538124; 6737056; 6821505; 6998253 та 7083784, кожний з яких включений в даний документ шляхом посилання. В одному ілюстративному варіанті здійснення антитіло, розкрите в даному документі, може містити варіант Fc, що містить амінокислотну заміну в положенні 268 згідно з EU (наприклад, H268D або H268E). В іншому ілюстративному варіанті здійснення антитіло, розкрите в даному документі, може містити амінокислотну заміну в положенні 239 згідно з EU (наприклад, S239D або S239E) або в положенні 332 згідно з EU (наприклад, I332D або I332Q).

У певних варіантах здійснення антитіло, розкрите в даному документі, може містити варіант Fc, що містить амінокислотну заміну, яка змінює незалежні від антигену ефекторні функції антитіла, зокрема, період напіввиведення антитіла з крові. Такі антитіла проявляють підвищене або знижене зв'язування з FcRn порівняно з антитілами, які не мають цих замін, і, таким чином, мають збільшений або зменшений період напіввиведення з сироватки крові, відповідно. Варіанти Fc з поліпшеною спорідненістю з FcRn, як припускають, мають більш тривалі періоди напіввиведення з сироватки крові, та такі молекули мають корисні шляхи застосування в способах лікування ссавців, де потрібний довгий період напіввиведення введеного антитіла, наприклад, для лікування хронічних захворювань або порушень. Навпаки, очікують, що варіанти Fc зі зниженою спорідненістю зв'язування з FcRn матимуть більш короткі періоди напіввиведення, та такі молекули також застосовують, наприклад, для введення ссавцю, де

скорочений час циркуляції може мати перевагу, наприклад, для діагностичної візуалізації *in vivo* або в ситуаціях, де початкове антитіло має токсичні побічні ефекти, якщо воно присутнє у кровотоці протягом тривалих періодів часу. Варіанти Fc зі зниженою спорідненістю зв'язування з FcRn також з меншою імовірністю проходять крізь плаценту і, таким чином, також застосовуються в лікуванні захворювань або порушень у вагітних жінок. Крім того, інші шляхи застосування, в яких може бути потрібною знижена спорідненість зв'язування з FcRn, включають такі шляхи застосування, в яких потрібною є локалізація у головному мозку, нирці або печінці. В одному ілюстративному варіанті здійснення змінених антитіл, розкриті в даному документі, характеризуються зниженим перенесенням через епітелій ниркових клубочків з судинної системи. В іншому варіанті здійснення змінених антитіл, розкриті в даному документі, характеризуються зниженим перенесенням через гематоенцефалічний бар'єр (BBB) з головного мозку до внутрішньосудинного простору. В одному варіанті здійснення антитіло зі зміненим зв'язуванням з FcRn містить Fc-домен, що має одну або декілька амінокислотних заміну у "FcRn-зв'язувальній петлі" Fc-домену. FcRn-зв'язувальна петля містить амінокислотні залишки 280-299 (згідно з нумерацією за Kabat). Ілюстративні амінокислотні заміни, що змінюють активність зв'язування з FcRn, розкриті в міжнародній публікації згідно з PCT № WO05/047327, що включена в даний документ шляхом посилання. У певних ілюстративних варіантах здійснення антитіла або їхні фрагменти, розкриті в даному документі, містять Fc-домен, що має одну або декілька наступних заміну: V284E, H285E, N286D, K290E та S304D (нумерація за Kabat).

В інших варіантах здійснення антитіла для застосування в способах діагностики та лікування, описаних в даному документі, мають константну ділянку, наприклад, константну ділянку важкого ланцюга IgG1 або IgG4, яка є зміненою для зниження або усунення глікозилювання. Наприклад, антитіло, розкрите в даному документі, також може містити варіант Fc, що містить амінокислотну заміну, яка змінює глікозилювання антитіла. Наприклад, зазначений варіант Fc може характеризуватися зниженим глікозилюванням (наприклад, N- або O-зчепленим глікозилюванням). В ілюстративних варіантах здійснення варіант Fc має знижене глікозилювання у N-зчепленому глікані, що звичайно розташовується в амінокислотному положенні 297 (нумерація згідно з EU). В іншому варіанті здійснення антитіло має амінокислотну заміну біля мотиву глікозилювання, наприклад, N-зчепленого мотиву глікозилювання, що містить амінокислотну послідовність NXT або NXS, або в ньому. В конкретному варіанті здійснення антитіло містить варіант Fc з амінокислотною заміною в амінокислотному положенні 228 або 299 (нумерація згідно з EU). В більш конкретних варіантах здійснення антитіло містить константну ділянку IgG1 або IgG4, що містить мутації S228P та T299A (нумерація згідно з EU).

Ілюстративні амінокислотні заміни, що забезпечують знижене або змінене глікозилювання, розкриті в міжнародній публікації згідно з PCT № WO05/018572, включений в даний документ шляхом посилання. У певних варіантах здійснення антитіла або їхні фрагменти, розкриті в даному документі, модифікують для усунення глікозилювання. Такі антитіла або їхні фрагменти можна називати "аглікозильовані" антитіла або їхні фрагменти (наприклад, "аглікозильовані" антитіла). Не бажаючи обмежуватися конкретною теорією, вважають, що "аглікозильовані" антитіла або їхні фрагменти можуть мати поліпшений профіль безпеки та стабільності *in vivo*. Ілюстративні аглікозильовані антитіла або їхні фрагменти містять аглікозильовану Fc-ділянку антитіла IgG4, що не має ефекторної функції Fc, з усуненням, таким чином, потенційної токсичності, опосередкованої Fc, для нормальних життєво важливим органів, у яких експресується PAI-1. В ще деяких варіантах здійснення антитіла або їхні фрагменти, розкриті в даному документі, містять змінений глікан. Наприклад, антитіло може мати знижену кількість залишків фукози в N-глікані в положенні Asn297 Fc-ділянки, тобто є афукозильованим. В іншому варіанті здійснення антитіло може мати змінену кількість залишків сіалової кислоти в N-глікані в положенні Asn297 Fc-ділянки.

### iii) Ковалентне приєднання

Антитіла до PAI-1, розкриті в даному документі, можна модифікувати, наприклад, шляхом ковалентного приєднання молекули до антитіла таким чином, щоб ковалентне приєднання не запобігало специфічному зв'язуванню антитіла з його когнатним епітопом. Наприклад, але не з метою обмеження, антитіла або їхні фрагменти, розкриті в даному документі, можна модифікувати шляхом глікозилювання, ацетилювання, пегілювання, фосфорилювання, амідування, дериватизації за допомогою відомих захисних/блокувальних груп, протеолітичного розщеплення, утворення зв'язку з клітинним лігандом або іншим білком тощо. Будь-які з численних хімічних модифікацій можна здійснювати за допомогою відомих методик, в тому числі, без обмеження, специфічного хімічного розщеплення, ацетилювання, формілювання тощо. Крім того, похідна може містити одну або декілька неklasичних амінокислот.

Антитіла або їхні фрагменти, розкриті в даному документі, можна додатково піддавати рекомбінантному злиттю з гетерологічним поліпептидом на N- або C-кінці або хімічній кон'югації (в тому числі ковалентним та нековалентним типам кон'югації) з поліпептидами або іншими сполуками. Наприклад, антитіла до PAI-1 можна піддавати рекомбінантному злиттю або кон'югації з молекулами, застосовуваними як мітки в аналізах з виявлення, та ефекторними молекулами, такими як гетерологічні поліпептиди, лікарські засоби, радіонукліди або токсини. Див., наприклад, міжнародні публікації згідно з PCT №№ WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; патент США № 5314995 та EP 396387.

Антитіла до PAI-1 можна зливати з гетерологічними поліпептидами для збільшення періоду напіввиведення *in vivo* або для застосування в імунологічних аналізах за допомогою способів, відомих з рівня техніки. Наприклад, в одному варіанті здійснення PEG можна кон'югувати з антитілами до PAI-1, розкритими в даному документі, для збільшення періоду їх напіввиведення *in vivo*. (Leong, S. R., et al., *Cytokine* 16:106, 2001; *Adv. in Drug Deliv. Rev.* 54:531, 2002; або Weir et al., *Biochem. Soc. Transactions* 30:512, 2002).

Крім того, антитіла до PAI-1, розкриті в даному документі, можна зливати з маркерними послідовностями, такими як пептид, для полегшення їх очищення або виявлення. У певних варіантах здійснення маркерна амінокислотна послідовність являє собою гексагістидиновий пептид, такий як мітка, наявна у векторі pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Чатсворт, Каліфорнія, 91311), серед інших, багато з яких є комерційно доступними. Гексагістидин, описаний, наприклад, в Gentz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:821-824, 1989, забезпечує зручне очищення білка злиття. Інші пептидні мітки, застосовні для очищення, включають, без обмеження, мітку "HA", що відповідає епітопу, що походить від білка гемаглютиніну вірусу грипу (Wilson et al., *Cell* 37:767, 1984), та мітку "flag".

Антитіла до PAI-1, розкриті в даному документі, можна застосовувати в некон'югованій формі або можна кон'югувати щонайменше з однією з різноманітних молекул, наприклад, для поліпшення терапевтичних властивостей молекули, для полегшення виявлення мішеней або для візуалізації або терапії в пацієнта. Антитіла до PAI-1, розкриті в даному документі, можна мітити або кон'югувати як до очищення, так і після очищення, якщо очищення здійснюють. Зокрема, антитіла до PAI-1, розкриті в даному документі, можна кон'югувати з терапевтичними засобами, проліками, пептидами, білками, ферментами, вірусами, ліпідами, модифікаторами біологічних реакцій, фармацевтичними засобами або PEG.

Даний винахід додатково охоплює антитіла до PAI-1, кон'юговані з діагностичним або терапевтичним засобом. Антитіла до PAI-1 можна застосовувати з метою діагностики, наприклад, для слідкування за розвитком або прогресуванням порушення з боку імунних клітин (наприклад, CLL), як частину процедури клінічного випробування, наприклад, для визначення ефективності даного режиму лікування або профілактики. Виявлення можна полегшувати шляхом об'єднання антитіла до PAI-1 з детектованою речовиною. Приклади детектованих речовин включають різні ферменти, простетичні групи, флуоресцентні матеріали, люмінесцентні матеріали, біоломінесцентні матеріали, радіоактивні матеріали, позитронно-активні метали у разі застосування різних видів позитронно-емісійної томографії та іони нерадіоактивних парамагнітних металів. Див., наприклад, патент США № 4741900 щодо іонів металів, які можна кон'югувати з антитілами для застосування як діагностичних засобів згідно з даним винаходом. Необмежувальні приклади придатних ферментів включають пероксидазу хрому, лужну фосфатазу, бета-галактозидазу або ацетилхолінестеразу; необмежувальні приклади придатних комплексів з простетичними групами включають стрептавідин/біотин та авідин/біотин; необмежувальні приклади придатних флуоресцентних матеріалів включають умбеліферон, флуоресцеїн, ізотіоціанат флуоресцеїну, родамін, дихлортриазиніламінофлуоресцеїн, дансилхлорид або фікоеритрин; необмежувальний приклад люмінесцентного матеріалу включає люмінол; необмежувальні приклади біоломінесцентних матеріалів включають люциферазу, люциферин та екворин; та необмежувальні приклади придатного радіоактивного матеріалу включають <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>111</sup>In або <sup>99</sup>Tc.

Антитіла до PAI-1 для застосування в способах діагностики та лікування, розкритих в даному документі, можна кон'югувати з цитотоксинами (такими як радіоактивні ізотопи, цитотоксичні лікарські засоби або токсини), терапевтичними засобами, цитостатичними засобами, біологічними токсинами, проліками, пептидами, білками, ферментами, вірусами, ліпідами, модифікаторами біологічних реакцій, фармацевтичними засобами, імуноактивними лігандами (наприклад, лімфокінами або іншими антитілами, де одержана молекула зв'язується як з неопластичною клітиною, так і з ефекторною клітиною, такою як Т-клітина) або PEG.

В іншому варіанті здійснення антитіло до PAI-1 для застосування в способах діагностики та лікування, розкритих в даному документі, можна кон'югувати з молекулою, що послаблює ріст

пухлинних клітин. В інших варіантах здійснення розкриті композиції можуть містити антитіла або їхні фрагменти, об'єднані з лікарськими засобами або проліками. Ще декілька інших варіантів здійснення, розкритих в даному документі, передбачають застосування антитіл або їхніх фрагментів, кон'югованих зі специфічними біотоксинами або їх цитотоксичними фрагментами, як, наприклад, рицин, гелонін, екзотоксин *Pseudomonas* або дифтерійний токсин. Вибір кон'югованого або некон'югованого антитіла для застосування залежатиме від типу та стадії раку, застосування допоміжного лікування (наприклад, хіміотерапії або зовнішнього опромінення) та стану пацієнта. Слід враховувати, що фахівець у даній галузі може легко здійснити такий вибір, враховуючи ідеї, викладені в даному документі.

Слід враховувати, що протипухлинні антитіла, мічені ізотопами, з успіхом застосовувались в попередніх дослідженнях для руйнування пухлинних клітин у тваринних моделях та в деяких випадках у людей. Ілюстративні радіоактивні ізотопи включають  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$  та  $^{188}\text{Re}$ . Радіонукліди діють шляхом продукування іонізуючого випромінювання, яке спричиняє множинні розриви ниток в ядерній ДНК, що призводить до загибелі клітин. Ізотопи, які застосовують для одержання терапевтичних кон'югатів, звичайно продукують високоенергетичні альфа- або бета-частинки, які мають коротку довжину пробігу. Такі радіонукліди вбивають клітини, з яким вони перебувають у безпосередній близькості, наприклад, неопластичні клітини, до яких прикріплюється або в які проникає кон'югат. Ефект, що він спричиняє на нелокалізовані клітини, є незначним або відсутнім. Радіонукліди є практично неімунотоксичними.

#### IV. Експресія антитіл до PAI-1 або їхніх антигензв'язувальних фрагментів

Після маніпуляції з виділеним генетичним матеріалом для одержання антитіл до PAI-1, розкритих в даному документі, як викладено вище, гени звичайно вбудовують у вектор експресії для введення в клітини-хазяї, які можна застосовувати для одержання потрібної кількості заявлених антитіл або їхніх фрагментів.

В інших варіантах здійснення антитіла до PAI-1 або їхні фрагменти, розкриті в даному документі, можна експресувати із застосуванням поліцистронних конструкцій. У таких системах експресії декілька продуктів генів, що становлять інтерес, такі як важкий та легкий ланцюги антитіл, можна одержувати з однієї поліцистронної конструкції. В цих системах переважно застосовується сайт внутрішньої посадки рибосоми (IRES) для одержання відносно високих рівнів поліпептидів, розкритих в даному документі, в еукаріотичних клітинах-хазяях. Сумісні послідовності IRES розкриті в патенті США № 6193980, включеному в даний документ шляхом посилання. Фахівцям у даній галузі буде зрозумілим, що такі системи експресії можна застосовувати для ефективного одержання повного спектру поліпептидів, розкритих в даній заявці.

В одному варіанті здійснення лінія клітин-хазяїв, яку застосовують для експресії антитіл, походить від ссавців; фахівці в даній галузі можуть визначати конкретні лінії клітин-хазяїв, які щонайкраще придатні для експресії в них потрібного продукту гена. Ілюстративні лінії клітин-хазяїв включають, без обмеження, DG44 та DUXB11 (лінії клітин яєчника китайського хом'ячка, DHFR-негативні), HELA (клітини карциноми шийки матки людини), CV1 (лінію клітин нирки мавпи), COS (похідну CV1 з T-антигеном SV40), R1610 (фібробласти китайського хом'ячка), BALBC/3T3 (фібробласти миші), HAK (лінію клітин нирки хом'яка), SP2/O (клітини мієломи миші), BFA-1c1BPT (бичачі ендотеліальні клітини), RAJI (лімфоцити людини), 293 (клітини нирки людини). В одному варіанті здійснення лінія клітин забезпечує змінене глікозилювання, наприклад, афукозилювання, антитіла, що експресується в ній (наприклад, лінії клітин PER.C6.RTM. (Crucell) або CHO з нокаутом FUT8 (клітини Potelligent.RTM.) (Biowa, Принстон, Нью-Джерсі)). В одному варіанті здійснення можна застосовувати клітини NS0. Клітини CHO можна застосовувати в певних конкретних варіантах здійснення. Лінії клітин-хазяїв звичайно доступні від комерційних служб, Американської колекції типових культур або з опублікованих літературних джерел.

Одержання *in vitro* забезпечує можливість проводити розширення масштабів з одержанням великих кількостей потрібних поліпептидів. Методики культивування клітин ссавців в умовах культури тканин відомі з рівня техніки та включають культивування в однорідній суспензії, наприклад, в аероліфтному реакторі або в реакторі з безперервним перемішуванням, або культивування іммобілізованих або захоплених клітин, наприклад, в порожнистих волокнах, мікрокапсулах, на мікрогранулах агарози або в керамічних картриджах. За необхідності або за бажанням розчини поліпептидів можна очищати за допомогою традиційних хроматографічних способів, наприклад, гель-фільтрації, іонообмінної хроматографії, хроматографії на DEAE-целюлозі або (імуно-)афінної хроматографії.

Гени, що кодують антитіла до PAI-1 або їхні фрагменти, розкриті в даному документі, також можна експресувати в клітинах, що не належать до клітин ссавців, таких як бактеріальні, або дріжджові, або рослинні клітини. У цьому відношенні слід враховувати, що також можна трансформувати різні одноклітинні мікроорганізми, що не належать до клітин ссавців, такі як бактерії, тобто які можна вирощувати в культурах або культивувати. Бактерії, які піддаються трансформації, включають представників *Enterobacteriaceae*, таких як штами *Escherichia coli* або *Salmonella*; *Bacillaceae*, таких як *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* та *Haemophilus influenzae*. Додатково слід враховувати, що при експресії в бактеріях поліпептиди можуть ставати частиною тілець-включень. Поліпептиди слід виділяти, очищати та потім збирати в функціональні молекули.

Крім прокаріотів також можна застосовувати еукаріотичні мікроорганізми. *Saccharomyces cerevisiae*, або звичайні пекарські дріжджі, являють собою найбільш широко застосовувані еукаріотичні мікроорганізми, хоча ряд інших штамів є загальнодоступним. Для експресії у *Saccharomyces* звичайно застосовують, наприклад, плазмиду YRp7 (Stinchcomb et al., *Nature*, 282:39 (1979); Kingsman et al., *Gene*, 7:141 (1979); Tschemper et al., *Gene*, 10:157 (1980)). Ця плазміда вже містить ген TRP1, який являє собою маркер добору для мутантного штаму дріжджів, в якого відсутня здатність до росту на триптофані, наприклад, ATCC № 44076 або PER4-1 (Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)). Наявність пошкодження *trp1* як характеристика геному дріжджової клітини-хазяїна в цьому випадку забезпечує ефективні умови для виявлення трансформації внаслідок росту за відсутності триптофана.

#### V. Фармацевтичні складки та способи введення антитіл до PAI-1

В іншому аспекті в даному винаході наведені фармацевтичні композиції, що містять антитіло до PAI-1 або його фрагмент.

Способи одержання та введення суб'єкту антитіл або їхніх фрагментів, розкритих в даному документі, добре відомі фахівцям у даній галузі, або вони можуть легко їх визначити. Шлях введення антитіл або їхніх фрагментів, розкритих в даному документі, може бути пероральним, парентеральним, шляхом інгаляції або місцевим. Застосовний у даному документі термін "парентеральний" включає внутрішньовенне, внутрішньоартеріальне, внутрішньочеревинне, внутрішньом'язове, підшкірне, ректальне або вагінальне введення. У певних варіантах здійснення можна застосовувати внутрішньовенну, внутрішньоартеріальну, підшкірну та внутрішньом'язову форми парентерального введення. Хоча всі ці форми введення явно розглядаються як такі, що входять до об'єму, розкритому в даному документі, форма для введення може являти собою розчин для ін'єкції, зокрема, для внутрішньовенної або внутрішньоартеріальної ін'єкції або краплинного внутрішньовенного вливання. Придатна фармацевтична композиція для ін'єкції звичайно може містити буфер (наприклад, ацетатний, фосфатний або цитратний буфер), поверхнево-активну речовину (наприклад, полісорбат), неіонізований стабілізатор (наприклад, людський альбумін) тощо. Проте в інших способах, що сумісні з ідеями, викладеними в даному документі, поліпептиди можна доставляти безпосередньо в місце локалізації популяції небажаних клітин, підсилюючи, таким чином, вплив терапевтичного засобу на уражену тканину.

Препарати для парентерального введення включають стерильні водні або неводні розчини, суспензії та емульсії. Прикладами неводних розчинників є пропіленгліколь, поліетиленгліколь, рослинні олії, такі як оливкова олія, та ін'єкційні органічні естери, такі як етилолеат. Водні носії включають воду, спиртові/водні розчини, емульсії або суспензії, в тому числі фізіологічний розчин та буферні середовища. У винаході, що розглядається, фармацевтично прийнятні носії включають, без обмеження, 0,01-0,1 М (наприклад, 0,05 М) фосфатний буфер або 0,8 % фізіологічний розчин. Інші звичайні середовища для парентерального введення включають розчини фосфату натрію, розчин Рінгера з декстрозою, декстрозу та хлорид натрію, розчин Рінгера з лактатом або нелеткі олії. Середовища для внутрішньовенного введення включають засоби для поповнення рідини та поживних речовин, засоби для поповнення електролітів, як, наприклад, на основі розчину Рінгера з декстрозою, тощо. Також можуть бути присутні консерванти та інші добавки, такі як, наприклад, протимікробні засоби, антиоксиданти, хелатоутворювачі та інертні гази тощо. Більш конкретно, фармацевтичні композиції, придатні для ін'єкційного застосування, включають стерильні водні розчини (якщо вони є водорозчинними) або дисперсії та стерильні порошки для приготування стерильних ін'єкційних розчинів або дисперсій для негайного прийому. В таких випадках композиція має бути стерильною та рідкою до такого ступеня, аби зберігалася можливість її легкого введення через шприц. Вона має бути стабільною за умов виробництва та зберігання, та у варіанті здійснення її об'єкти будуть від забруднювальної дії мікроорганізмів, таких як бактерії та гриби. Носій може являти собою розчинник або дисперсійне середовище, що містить, наприклад, воду, етанол,

поліол (наприклад, гліцерин, пропіленгліколь та рідкий поліетиленгліколь тощо) та їх придатні суміші. Належну плинність можна підтримувати, наприклад, шляхом застосування покриття, такого як лецитин, шляхом підтримання необхідного розміру частинки у випадку дисперсії та шляхом застосування поверхнево-активних речовин. Запобігання дії мікроорганізмів може

5 досягатися за допомогою різних антибактеріальних та протигрибкових засобів, наприклад, парабенів, хлорбутанолу, фенолу, аскорбінової кислоти, тимеросалу тощо. У певних варіантах здійснення в композицію включені ізотонічні засоби, наприклад, цукри, багатоатомні спирти, такі як маніт, сорбіт, або хлорид натрію. Подовженого всмоктування ін'єкційних композицій можна

10 досягати шляхом включення в композицію засобів, які уповільнюють всмоктування, наприклад, моностеарату алюмінію та желатини.

У будь-якому випадку стерильні ін'єкційні розчини можна одержувати шляхом включення активної сполуки (наприклад, антитіла окремо або в комбінації з іншими активними засобами) в необхідній кількості у відповідному розчиннику разом з одним інгредієнтом або комбінацією

15 таких, наведених у даному документі, за необхідності, з наступною стерилізацією фільтруванням. Як правило, дисперсії одержують шляхом включення активної сполуки в стерильне середовище, яке містить основне дисперсійне середовище та інші необхідні інгредієнти з наведених вище. У випадку стерильних порошків для одержання стерильних ін'єкційних розчинів способи одержання можуть являти собою вакуумне сушіння та сублімаційне

20 сушіння, внаслідок яких одержують порошкову форму активного інгредієнта з будь-яким додатковим потрібним інгредієнтом з їх розчину, який попередньо піддали стерилізації фільтруванням. Препарати для ін'єкцій обробляють, ними наповнюють контейнери, такі як ампули, пакети, колби, шприци або флакони, які при цьому герметично закривають в асептичних умовах згідно зі способами, відомими з рівня техніки. Крім того, препарати можна пакувати та реалізувати у формі набору, такого як описаний в заявках, що одночасно перебувають на розгляді, заявці на патент США з реєстраційним № 09/259337 та заявці на

25 патент США з реєстраційним № 09/259338, кожна з яких включена в даний документ шляхом посилання. Такі вироби у варіанті здійснення матимуть етикетки або листки-вкладиші, на яких вказано, що відповідні композиції застосовувані для лікування суб'єкта, який страждає від аутоімунних або неопластичних порушень або схильний до них.

Ефективні дози стабілізованих антитіл або їхніх фрагментів, розкритих в даному документі, для лікування вищевказаних станів варіюють залежно від багатьох різних факторів, в тому числі від способу введення, цільової зони, фізіологічного стану пацієнта, є пацієнт людиною або твариною, інших ліків, що вводяться, та того, чи є лікування профілактичним або

30 терапевтичним. Звичайно пацієнтом є людина, але також можна лікувати ссавців, що не є людиною, в тому числі трансгенних ссавців. Лікувальні дози можна визначати за допомогою стандартних способів, відомих фахівцям у даній галузі, для оптимізації безпеки та ефективності.

Для пасивної імунізації антитілом, розкритим в даному документі, доза може варіювати в діапазоні, наприклад, від приблизно 0,0001 до 100 мг/кг, та більш звичайно становить від 0,01 до 5 мг/кг (наприклад, 0,02 мг/кг, 0,25 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,75 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг та т.п.) маси тіла

40 реципієнта. Наприклад, дози можуть становити 1 мг/кг маси тіла або 10 мг/кг маси тіла, або перебувати в діапазоні 1-10 мг/кг, або в конкретних варіантах здійснення становити щонайменше 1 мг/кг. Припускають, що проміжні дози у вищевказаних діапазонах також входять до об'єму, розкритого в даному документі.

Суб'єктам можна вводити такі дози щодня, через день, щотижня або згідно з будь-якою іншою схемою, визначеною шляхом емпіричного аналізу. Ілюстративний режим лікування передбачає введення декількох доз протягом тривалого періоду часу, наприклад, щонайменше

45 шести місяців. Додаткові ілюстративні режими лікування передбачають введення раз на два тижні, або раз на місяць, або раз у 3-6 місяців. Ілюстративні схеми дозування включають введення 1-10 мг/кг або 15 мг/кг у послідовні дні, 30 мг/кг через день або 60 мг/кг щотижня. У деяких способах два або більше моноклональних антитіл з різними специфічностями зв'язування вводять одночасно, та в цьому випадку доза кожного антитіла, що вводиться, може перебувати в межах вказаних діапазонів.

Антитіла або їхні фрагменти, розкриті в даному документі, можна вводити декілька разів. Інтервали між окремими введеннями доз можуть становити наприклад, день, тиждень, місяць

55 або рік. Інтервали також можуть бути нерегулярними, згідно з показниками вимірювання рівнів поліпептиду або цільової молекули в крові пацієнта. У деяких способах дозу регулюють для досягнення визначеної концентрації антитіла або токсину в плазмі крові, наприклад, 1-1000 мкг/мл або 25-300 мкг/мл. Альтернативно, антитіла або їхні фрагменти можна вводити як склад з уповільненим вивільненням, в цьому випадку потрібне менш часте введення. Доза та частота варіюють залежно від періоду напіввиведення антитіла у пацієнта. Як правило, гуманізовані

60

антитіла демонструють найтриваліший період напіввиведення, наступні за ними - химерні антитіла та антитіла, що належать людині. В одному варіанті здійснення антитіла або їхні фрагменти, розкриті в даному документі, можна вводити в некон'югованій формі. В іншому варіанті здійснення антитіла, розкриті в даному документі, можна вводити декілька разів у кон'югованій формі. В ще одному варіанті здійснення антитіла або їхні фрагменти, розкриті в даному документі, можна вводити в некон'югованій формі, а потім у кон'югованій формі або навпаки.

Доза та частота введення можуть варіювати залежно від того, чи є лікування профілактичним або терапевтичним. У разі профілактичних застосувань композиції, що містять антитіла за даним винаходом або їх суміш, вводять пацієнту, який ще не має хворобливого стану, для поліпшення несприйнятливості пацієнта. Визначено, що така кількість являє собою "профілактичну ефективну дозу". За даного шляху застосування точні кількості знову ж таки залежать від стану здоров'я та загального стану імунітету пацієнта, але звичайно варіюють в діапазоні від 0,1 до 25 мг на дозу, зокрема, від 0,5 до 2,5 мг на дозу. Відносно низьку дозу вводять відносно рідко протягом тривалого періоду часу. Деякі пацієнти продовжують одержувати лікування протягом решти їхнього життя.

У разі терапевтичних застосувань іноді необхідно вводити відносно високу дозу (наприклад, від приблизно 1 до 400 мг/кг антитіла на дозу, при цьому дози від 5 до 25 мг частіше застосовують для радіоімунокон'югатів, а більш високі дози - для молекул, кон'югованих з цитотоксичними лікарськими засобами) з відносно короткими інтервалами до зменшення або припинення прогресування захворювання та, в конкретних варіантах здійснення, доти, поки у пацієнта не реєструватимуть часткове або повне зменшення інтенсивності симптомів захворювання. Після цього пацієнту можна здійснювати введення у профілактичному режимі.

В одному варіанті здійснення суб'єкта можна обробляти молекулою нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, розкритий в даному документі (наприклад, у формі вектора). Дози нуклеїнових кислот, що кодують поліпептиди, варіюють від приблизно 10 нг до 1 г, від 100 нг до 100 мг, від 1 мкг до 10 мг або від 30 до 300 мкг ДНК на пацієнта. Дози для інфекційних вірусних векторів варіюють від 10 до 100 або більше віріонів на дозу.

Терапевтичні засоби можна вводити за допомогою парентерального, місцевого, внутрішньовенного, перорального, підшкірного, внутрішньоартеріального, внутрішньочерепного, внутрішньочеревинного, інтраназального або внутрішньом'язового способів для профілактичного або терапевтичного лікування. Для введення антитіла, розкритого в даному документі, можна застосовувати внутрішньом'язову ін'єкцію або внутрішньовенну інфузію. У деяких способах терапевтичні антитіла або їхні фрагменти ін'єкують безпосередньо усередину черепної коробки. У деяких способах антитіла або їхні фрагменти вводять як композицію або пристрій із уповільненим вивільненням, такий як пристрій Medipad™.

Засоби, розкриті в даному документі, можна необов'язково вводити у комбінації з іншими засобами, які є ефективними в лікуванні порушення або стану, яке потребує лікування (наприклад, профілактичного або терапевтичного). Додатковими засобами є вживані у даній галузі техніки, та їх вводять звичайним способом при конкретному порушенні.

Ефективні одноразові лікувальні дози (тобто терапевтично ефективні кількості) антитіл, мічених 90Y, що розкриті в даному документі, варіюють в діапазоні від приблизно 5 до приблизно 75 мКі та у варіанті здійснення від приблизно 10 до приблизно 40 мКі. Ефективні одноразові лікувальні дози, що не руйнують кістковий мозок, антитіл, мічених 131I, що розкриті в даному документі, варіюють у діапазоні від приблизно 5 до приблизно 70 мКі та у одному варіанті здійснення від приблизно 5 до приблизно 40 мКі. Ефективні одноразові лікувальні руйнівні дози (тобто можуть потребувати аутологічної трансплантації кісткового мозку) антитіл, мічених 131I, що розкриті в даному документі, варіюють у діапазоні від приблизно 30 до приблизно 600 мКі та у одному варіанті здійснення від приблизно 50 до менше ніж приблизно 500 мКі. Щодо химерного модифікованого антитіла через більш довгий період напіввиведення з крові порівняно з антитілами миші, ефективні одноразові лікувальні дози, що не руйнують кістковий мозок, химерних антитіл, мічених йодом-131, варіюють у діапазоні від приблизно 5 до приблизно 40 мКі та у варіанті здійснення становлять менше ніж приблизно 30 мКі. Критерії візуалізації, наприклад, для мітки 111In звичайно становлять менше ніж приблизно 5 мКі.

Хоча більша частина клінічного досвіду була здобута з 131I та 90Y, у даній галузі техніки відомі інші радіоактивні мітки, та їх застосовують для аналогічних цілей. Ще декілька інших радіоактивних ізотопів застосовують для візуалізації. Наприклад, додаткові радіоактивні ізотопи, що сумісні з об'ємом даного винаходу, включають, без обмеження, 123I, 125I, 32P, 57Co, 64Cu, 67Cu, 77Br, 81Rb, 81Kr, 87Sr, 113In, 127Cs, 129Cs, 132I, 197Hg, 203Pb, 206Bi, 177Lu, 186Re, 212Pb, 212Bi, 47Sc, 105Rh, 109Pd, 153Sm, 188Re, 199Au, 225Ac, 211At, 213Bi. У зв'язку з цим,

всі альфа-, гамма- та бета-випромінювачі сумісні з даним винаходом. Додатково, з урахуванням даного розкриття припускають, що фахівець у даній галузі зможе легко визначити, які радіонукліди сумісні з вибраним курсом лікування без здійснення зайвих експериментів. У зв'язку з цим, додаткові радіонукліди, які вже були застосовані в клінічній діагностиці, включають  $^{125}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{43}\text{K}$ ,  $^{52}\text{Fe}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ , а також  $^{111}\text{In}$ . Антитіла також мітили різними радіонуклідами для потенційного застосування у спрямованій імунотерапії (Peirersz et al. Immunol. Cell Biol. 65: 111, 1987). Ці радіонукліди включають  $^{188}\text{Re}$  та  $^{186}\text{Re}$ , а також, меншою мірою,  $^{199}\text{Au}$  та  $^{67}\text{Cu}$ . В патенті США № 5460785 наведені додаткові дані, які стосуються таких радіоактивних ізотопів, та він включений в даний документ шляхом посилання.

Як обговорювалося раніше, антитіла або їхні фрагменти, розкриті в даному документі, можна вводити в фармацевтично ефективній кількості для лікування порушень у ссавців *in vivo*. У цьому відношенні слід враховувати, що розкриті антитіла або їхні фрагменти будуть складати таким чином, щоб полегшувати введення та сприяти стабільності активного засобу. У певних варіантах здійснення фармацевтичної композиції згідно з даним винаходом містять фармацевтично прийнятний нетоксичний стерильний носій, такий як фізіологічний розчин, нетоксичні буфери, консерванти тощо. Для цілей даного винаходу будуть вважати, що фармацевтично ефективна кількість антитіла, розкритого в даному документі, кон'югованого або некон'югованого з терапевтичним засобом, означає кількість, достатню для досягнення ефективного зв'язування з мішенню та для досягнення сприятливого ефекту, наприклад, для зменшення інтенсивності симптомів захворювання або порушення або для виявлення речовини або клітини. У випадку пухлинних клітин поліпептид, у певних варіантах здійснення, буде здатним до взаємодії з вибраними імунореактивними антигенами на поверхні неопластичних або імунореактивних клітин, та передбачається збільшення частоти загибелі цих клітин. Як відомо, фармацевтичні композиції, розкриті в даному документі, можна вводити в одній або декількох дозах для забезпечення фармацевтично ефективної кількості поліпептиду.

Виходячи з об'єму даного розкриття, антитіла, розкриті в даному документі, можна вводити людині або іншій тварині згідно з вищезазначеними способами лікування в кількості, достатній, аби спричинити терапевтичний або профілактичний ефект. Поліпептиди, розкриті в даному документі, можна вводити такій людині або іншій тварині в традиційній лікарській формі, яку одержують шляхом об'єднання антитіла, розкритого в даному документі, з традиційним фармацевтично прийнятним носієм або розріджувачем згідно з відомими методиками. Фахівцю в даній галузі буде зрозуміло, що форма та тип фармацевтично прийнятного носія або розріджувача визначаються кількістю активного інгредієнта, з яким його потрібно об'єднати, шляхом введення та іншими добре відомими факторами. Фахівцям у даній галузі додатково слід розуміти, що суміш, що містить один або декілька видів поліпептидів згідно з даним винаходом, може виявитися особливо ефективною.

#### VI. Способи лікування захворювань або порушень, асоційованих з PAI-1

Антитіла до PAI-1 або їхні фрагменти, розкриті в даному документі, застосовувані для забезпечення антагонізму щодо активності PAI-1. Відповідно, в іншому аспекті в даному винаході наведені способи лікування захворювань або порушень, асоційованих з PAI-1, шляхом введення суб'єкту, який потребує цього, фармацевтичної композиції, що містить одне або декілька антитіл до PAI-1 або їхні антигензв'язувальні фрагменти, розкриті в даному документі.

Асоційовані з PAI-1 захворювання або порушення, що піддаються лікуванню, включають, без обмеження, патофізіологічні стани, такі як фіброз нирок, печінки або легенів, або запобігання утворенню спайок в черевній порожнині.

Поява спайок всередині черевної порожнини є головною причиною хвороб людини. Ускладнення спайок можуть бути серйозними, такими як кишкова непрохідність, небезпечна для життя, але хронічний тазовий біль та безпліддя в жінок також є поширеними наслідками спайок у черевній порожнині. Більшість спайок спричиняє хірургічна операція, хоча в деяких випадках також було показано, що їх утворення зумовлене запаленням, ендометріозом, хімічним перитонітом, променевою терапією, реакцією на сторонні предмети та постійним амбулаторним перитонеальним діалізом. Пошкодження очеревини спричиняє місцеву запальну відповідь, яка призводить до відкладення фібрину. Можна припустити, що посттравматична недостатність фібринолітичної активності очеревини, зумовлена зниженням рівня тканинного активатора плазміногену (tPA) та підвищенням рівнів інгібіторів активаторів плазміногену PAI-1 та PAI-2, забезпечує можливість відкладеному фібрину упорядитися в постійні спайки.

Доступний у нинішній час та ефективний варіант лікування, такий як застосування Seprafilm®, має такі обмеження, що його застосовують лише під час відкритого доступу



(лапаротомії) та його не можна застосовувати в лапароскопії. Триває пошук можливого методу лікування.

В певних ілюстративних варіантах здійснення антитіла, розкриті в даному документі, можна випускати для лікування ниркового фіброзу та асоційованого гострого пошкодження нирок, а також хронічних захворювань нирок, що є основними причинами кінцевої стадії ниркової недостатності.

Фахівець у даній галузі буде здатен шляхом проведення стандартних експериментів визначати, якою має бути ефективна нетоксична кількість антитіла (або додаткового терапевтичного засобу) для цілей лікування захворювання або порушення, асоційованого з PAI-1. Наприклад, терапевтично активну кількість поліпептиду можна варіювати залежно від таких факторів, як стадія захворювання (наприклад, стадія I порівняно зі стадією IV), вік, стать, медичні ускладнення (наприклад, імунодепресивні стани або захворювання) та маса суб'єкта, а також від здатності антитіла спричиняти потрібну відповідь у суб'єкта. Режим дозування можна регулювати для одержання оптимального терапевтичного ефекту. Наприклад, щодня можна вводити декілька розділених доз, або дозу можна пропорційно зменшити, як вказують потреби терапевтичної ситуації. Проте звичайно припускають, що ефективна доза перебуває в діапазоні від приблизно 0,05 до 100 міліграмів на кілограм маси тіла на день та у варіанті здійснення від приблизно 0,5 до 10 міліграмів на кілограм маси тіла на день.

Різні аспекти, розкриті в даному документі, та варіанти їх здійснення можна комбінувати один з одним. Крім того, будь-який з аспектів та варіантів їх здійснення, що описані вище, можна комбінувати з будь-яким з конкретних аспектів та варіантів здійснення, що описані нижче в даному документі.

Деякі конкретні аспекти та варіанти здійснення, які слугують для додаткового ілюстрування даного винаходу, наведені нижче.

#### ОПИС КОНКРЕТНИХ АСПЕКТІВ ТА ВАРІАНТІВ ЗДІЙСНЕННЯ

Пункт 1. Виділене моноклональне антитіло, що специфічно зв'язується з PAI-1, яке містить:

(a) каркасну ділянку важкого ланцюга та варіабельну ділянку важкого ланцюга, при цьому варіабельна ділянка важкого ланцюга містить CDR1-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 34, CDR2-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 33, та CDR3-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 32; та

(b) каркасну ділянку легкого ланцюга та варіабельну ділянку легкого ланцюга, при цьому варіабельна ділянка легкого ланцюга містить CDR1-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 37, CDR2-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 145, та CDR3-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 35.

Пункт 2. Виділене моноклональне антитіло, що специфічно зв'язується з PAI-1, яке містить:

(a) каркасну ділянку важкого ланцюга та варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 86, та

(b) каркасну ділянку легкого ланцюга та варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 93.

Пункт 3. Виділене моноклональне антитіло, що специфічно зв'язується з PAI-1, яке містить:

(a) варіабельну ділянку важкого ланцюга, щонайменше на 95 % ідентичну варіабельній ділянці важкого ланцюга антитіла за п. 2, та/або

(b) варіабельну ділянку легкого ланцюга, щонайменше на 95 % ідентичну варіабельній ділянці легкого ланцюга антитіла за п. 2.

Пункт 4. Виділене моноклональне антитіло, що зв'язується фактично з тим самим епітопом, що й антитіло за пунктом 1.

Пункт 5. Виділене моноклональне антитіло, що специфічно зв'язується з PAI-1, яке містить:

(a) каркасну ділянку важкого ланцюга та варіабельну ділянку важкого ланцюга, при цьому варіабельна ділянка важкого ланцюга містить CDR1-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 34, CDR2-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 33, та CDR3-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 32; та

(b) каркасну ділянку легкого ланцюга та варіабельну ділянку легкого ланцюга, при цьому варіабельна ділянка легкого ланцюга містить CDR1-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 37, CDR2-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 36, та CDR3-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 35.

Пункт 6. Антитіло за п. 5, де варіабельна ділянка важкого ланцюга містить SEQ ID NO: 6, а варіабельна ділянка легкого ланцюга містить SEQ ID NO: 7.

Пункт 7. Виділене моноклональне антитіло, що зв'язується фактично з тим самим епітопом, що й антитіло за пунктом 5.



(d) варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить CDR1-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 46, CDR2-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 45, та CDR3-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 44; та варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить CDR1-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 49, CDR2-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 48, та CDR3-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 47,

(e) варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить CDR1-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 52, CDR2-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 51, та CDR3-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 50; та варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить CDR1-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 55, CDR2-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 54, та CDR3-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 53,

(f) варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить CDR1-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 58, CDR2-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 57, та CDR3-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 56; та варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить CDR1-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 61, CDR2-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 60, та CDR3-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 59,

(g) варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить CDR1-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 64, CDR2-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 63, та CDR3-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 62; та варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить CDR1-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 67, CDR2-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 66, та CDR3-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 65,

(h) варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить CDR1-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 70, CDR2-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 69, та CDR3-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 68; та варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить CDR1-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 73, CDR2-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 72, та CDR3-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 71; або

(i) варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить CDR1-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 76, CDR2-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 75, та CDR3-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 74; та варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить CDR1-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 79, CDR2-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 78, та CDR3-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 77.

Пункт 10. Виділене моноклональне антитіло, що специфічно зв'язується з PAI-1, яке зв'язується фактично з тим самим епітопом PAI-1, що й гуманізоване моноклональне антитіло за п. 8 або п. 9.

Пункт 11. Спосіб відновлення утворення плазміну, що включає введення суб'єкту, який потребує цього, фармацевтично ефективної кількості антитіла до PAI-1 перорально, парентерально за допомогою розчину для ін'єкцій, шляхом інгаляції або місцево.

Пункт 12. Спосіб за п. 11, де за допомогою способу лікують стан, що включає підвищені рівні фіброзної тканини.

Пункт 13. Спосіб за пунктом 12, де стан являє собою фіброз, фіброз шкіри, системний склероз, фіброз легенів, ідіопатичний легеневий фіброз, інтерстиціальне захворювання легенів, хронічне захворювання легенів, фіброз печінки, фіброз нирок, хронічне захворювання нирок, тромбоз, венозний та артеріальний тромбоз, тромбоз глибоких вен, периферичну ішемію кінцівок, тромбоз з дисемінованим внутрішньосудинним згортанням крові, гострий ішемічний інсульт, що супроводжується та не супроводжується тромболізисом, або рестеноз у стенті.

Пункт 14. Спосіб за пунктами 11, 12 або 13, де антитіло до PAI-1 включає в себе антитіло за будь-яким з попередніх пунктів.

Пункт 15. Застосування фармацевтично ефективної кількості антитіла до PAI-1 для виробництва лікарського препарату для лікування стану, який спричиняють підвищені рівні PAI-1 або підвищена чутливість до PAI-1, що передбачає введення пацієнту перорально, парентерально за допомогою розчину для ін'єкцій, шляхом інгаляції або місцево.

#### ПРИКЛАДИ

Даний винахід додатково ілюструють наступні приклади, які не повинні розглядатися як додаткове обмеження. Зміст переліку послідовностей, фігур та усіх посилок, патентів та

опублікованих заявок на патент, наведених у даній заявці, явно включені в даний документ шляхом посилання.

Крім того, згідно з даним винаходом можна застосовувати звичайні методики молекулярної біології, мікробіології та рекомбінантної ДНК у межах компетенції фахівця в даній галузі. Такі методики повністю пояснені в літературі. Див., наприклад, Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (у даному документі "Sambrook et al., 1989"); DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed. 1984); Nucleic Acid Hybridization [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]; Transcription And Translation [B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)]; Animal Cell Culture [R.I. Freshney, ed. (1986)]; Immobilized Cells And Enzymes [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); F.M. Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

Приклад 1. Утворення гібридоми: імунізація мишей білком PAI-1 та утворення антитіл

Розробляли антитіла, які могли проявляти перехресну реактивність щодо активного PAI-1 людини (h) та мавпи яванської макаки (макаки-краббейда) (глікозильована або неглікозильована форма) та які могли нейтралізувати інгібіторну активність PAI-1 та відновлювати подальше утворення плазміну, являючи собою, тим самим, ефективний терапевтичний засіб для лікування фіброзу нирок, печінки або легенів або запобігання утворення спайок в черевній порожнині та утворення келоїдних рубців. Було описано, що нейтралізація інгібіторної функції PAI-1 за допомогою моноклональних антитіл включає три механізми: (1) блокування PAI-1 щодо tPA або uPA шляхом створення стеричної перешкоди, (2) перетворення PAI-1 на неактивну конформацію або (3) перетворення PAI-1 на субстратну конформацію.

а) Антигени

PAI-1 секретується з клітин у активній конформації, стабілізованій завдяки його зв'язуванню з вітронектином за субнаномольної спорідненості. PAI-1 піддається спонтанній конформаційній зміні з активної конформації на неактивну конформацію протягом декількох хвилин при 37 °C та протягом декількох годин за кімнатної температури. Після зв'язування з вітронектином PAI-1 стає більш стійким до конформаційної зміни, що збільшує період напіввиведення PAI-1 в активній конформації від декількох хвилин до декількох годин. Для подовження періоду напіввиведення PAI-1 в активній конформації у імунізованих тварин та для забезпечення можливості для імунної системи миші розпізнавати активну конформацію PAI-1 для імунізацій застосовували комплекс вітронектину та PAI-1.

Глікозильований PAI-1 людини, що продукується в клітинах комах, купували в Innovative Research (кат. № IGLYHPAI-A). Вітронектин (кат. № IHVN) та tPA (кат. № HTPA-TC) також купували в Innovative Research. Для одержання імуногенів PAI-1 інкубували з вітронектином за молярного відношення 1:1 протягом 1 години за кімнатної температури або з tPA за молярного відношення 1:1 протягом 15 хвилин при 37 °C. Усі імуногени одержували із застосуванням стерильного фізіологічного розчину як розріджувача.

б) Здійснення імунізацій

Стандартні протоколи одержання гібридом, відомі з рівня техніки, здійснювали для одержання антитіл. У стандартних підходах, раніше описаних у літературі, застосовували лише PAI-1 або комплекс PAI-1/tPA. Замість цього автори даного винаходу одержували антитіла проти активної конформації PAI-1. Комплекс PAI-1/вітронектин застосовували у ролі нового підходу для одержання антитіл до PAI-1. Для одержання антитіл застосовували стратегію трьох контактів, викладену нижче:

(1) класична імунізація мишей за допомогою комплексу PAI-1/вітронектин з одержанням мишачих спленоцитів для злиття з лінією клітин мієломи миші як партнера злиття з одержанням гібридоми;

(2) класична імунізація мишей за допомогою комплексу PAI-1/tPA з одержанням мишачих спленоцитів для злиття з лінією клітин мієломи миші як партнера злиття з одержанням гібридоми; та

(3) класична імунізація мишей за допомогою лише PAI-1 з одержанням мишачих спленоцитів для злиття з лінією клітин мієломи миші як партнера злиття з одержанням гібридоми.

У дослідженні застосовували по три миші на антиген (лише PAI-1, комплекс Vn/PAI-1, комплекс tPA/PAI-1). Миші являли собою самок мишей BALB/c, яких раніше не піддавали впливу, віком 9-20 тижнів (Charles River, код лінії 028). У день 0 дев'ять мишей імунізували внутрішньочеревинно за допомогою лише PAI-1, комплексів Vn/PAI-1 або tPA/PAI-1 у фосфатно-сольовому буфері (PBS). Усього 10 мкг антигену на мишу змішували у відношенні 1:1

об'єм/об'єм з Sigma Adjuvant System (Sigma, кат № 6322) у загальному об'ємі 200 мкл на мишу. У день 14 мишей повторно імунізували за допомогою такої самої кількості антигену, приготованого таким самим способом, що й у день 0. У день 21 збирали зразки крові для оцінки титру специфічних антитіл до PAI-1. У мишей, імунізованих за допомогою комплексів PAI-1/tPA, виявили дуже низьку специфічну реактивність проти PAI-1 та високі титри до tPA та їх не застосовували для здійснення подальших процедур злиття.

У день 51 мишей з найвищим титром специфічного антитіла до PAI-1 та найнижчим титром проти білка, з яким PAI-1 перебував у комплексі (тобто або Vn, або tPA), які при цьому мали найвищий титр проти ортологів PAI-1 миші та щура, відбирали для здійснення злиття. Мишей, відібраних для здійснення злиття, повторно імунізували за допомогою лише PAI-1 або комплексу PAI-1/Vn у PBS, при цьому антиген у загальній кількості 10 мкг на мишу змішували в співвідношенні 1:1 з Sigma Adjuvant System (Sigma, кат. № 6322) у загальному об'ємі 200 мкл на мишу, як описано вище. У день 55 мишей умертвляли за допомогою камери з CO<sub>2</sub>, кров збирали через серцеву пункцію та селезінку збирали для одержання гібридом. Решту з чотирьох мишей піддавали тій самій процедурі в пізніші моменти часу (через 2-4 місяці після того, як першу мишу застосовували для здійснення злиття).

Титрування сироватки здійснювали для трьох мишей щодо лише PAI-1 та PAI-1/tPA та для двох мишей щодо PAI-1/Vn із застосуванням протоколу ELISA, описаного в прикладі 2 (аналіз зв'язування ELISA).

Таблиця 3

Сироваткові титри в мишей, імунізованих за допомогою PAI-1, PAI-1/Vn або PAI-1/tPA

| Імуноген  | Сироватковий титр антитіла до PAI-1 (OD <sub>405</sub> ) |          |           |            |
|-----------|----------------------------------------------------------|----------|-----------|------------|
|           | № миші                                                   | OD 1:100 | OD 1:1000 | OD 1:10000 |
| PAI-1     | 1                                                        | 2,1      | 1,9       | 1          |
| PAI-1     | 2                                                        | 2,1      | 1,4       | 1          |
| PAI-1     | 3                                                        | 2,0      | 1,4       | 1          |
| PAI-1/Vn  | 2                                                        | 2,15     | 1,5       | 1          |
| PAI-1/Vn  | 3                                                        | 1,7      | 1,25      | 1          |
| PAI-1/tPA | 1                                                        | 1,2      | 0,8       | 0,3        |
| PAI-1/tPA | 2                                                        | 1,3      | 0,9       | 0,7        |
| PAI-1/tPA | 3                                                        | 1,3      | 0,9       | 0,5        |
| NMS       | n/a                                                      | 0,4      | 0,12      | 0,07       |

NMS=сироватка нормальної миші; n/a=не є застосовуваним;  
OD<sub>405</sub> із застосуванням пристрою BioTek Synergy HT

У мишей, імунізованих за допомогою комплексу PAI-1/tPA, не досягалися критеріїв високого специфічного титру та їх не застосовували для здійснення процедур злиття (таблиця 3). Базуючись на сироваткових титрах, представлених у таблиці 3, загалом 5 мишей з високим специфічним титром проти PAI-1 відбирали для здійснення процедур злиття.

б) Здійснення процедур злиття

П'ять мишей, що мали найвищий специфічний титр проти PAI-1, відбирали для здійснення процедур злиття. У день здійснення процедури злиття мишей умертвляли в камері з CO<sub>2</sub>, кров збирали через серцеву пункцію та селезінку видаляли та вміщали в чашку Петрі, що містила 10 мл безсироваткового Hybridoma Fusion Medium (IMDM; середовище Дульбекко, модифіковане за способом Ісков, 500 мл (HyClone SH30259.01)). Спленоцити вичавлювали з оболонки, що складається з фіброзної та еластичної тканини, за допомогою пінцета та двічі промивали у 10 мл безсироваткового IMDM (в тому числі початкове центрифугування).

Клітини рахували в автоматичному лічильнику клітин Countess. Клітини-партнери злиття (мієлома: FO (номер за ATCC CRL-1646)) та спленоцити згодом об'єднували в одній 50 мл пробірці у співвідношенні 1:2-1:10 (за числом клітин) та осаджували центрифугуванням при 970 об./хв. протягом 10 хв. (повільне центрифугування) з одержанням пухкого осаду. 1 мл попередньо підігрітого (при 37 °C) PEG (PEG 1500 у 75 мМ Hepes 50 % вага/об'єм, Roche кат. № 783641 (10783641001) додавали краплина за краплиною до осаду клітин протягом періоду часу 1 хвилини та клітини змішували після додавання кожної краплини PEG. Осадок інкубували з PEG протягом ще 1 хвилини з наступним додаванням 10 мл безсироваткового середовища IMDM протягом 1 хвилини, таким чином, що перший 1 мл з 10 додавали протягом 30 с. Клітини

піддавали повільному центрифугуванню при 970 об./хв. протягом 10 хв. для збереження життєздатності. Злиті клітини висівали в 96-лункові планшети з розрахунку 200 мкл у селективне середовище (200 мл Gibco Hybridoma (SFM № 12045), 20 мл 10 % HyClone SuperLow IgG Defined FBS (№ SH30898.03), 2 мл пеніциліну/стрептоміцину, 4 мл (домішка для злиття та клонування гібридом (Roche Diagnostics 11 363 735 001 (50X)) та 4 мл HAT (гіпоксанти-аміноптерин-тимідин) (Sigma-Aldrich № HO262 (50X)). Продукти злиття були готовими для скринінгу через приблизно 10-14 днів, або коли середовище в лунках ставало жовтим. Потім надосадові рідини від розвинених гібридом тестували за допомогою ELISA (приклад 2) щодо присутності антитіл, що зв'язуються з PAI-1 та комплексами PAI-1/Vn.

Приклад 2. Аналіз зв'язування ELISA для скринінгу надосадової рідини гібридами щодо специфічності до комплексу PAI-1 – вітронектин

Кожне злиття з селезінок п'яти відібраних мишей давало приблизно 5000 клонів, які потребували скринінгу щодо зв'язування з комплексом PAI-1/Vn у ролі першої стадії первинного скринінгу. Первинний скринінг надосадових рідин гібридами здійснювали паралельно із застосуванням ELISA щодо або PAI-1, або комплексів PAI-1-вітронектин для добору гібридом, що специфічно зв'язуються з PAI-1 у комплексі з вітронектином. Матеріали, які застосовували в аналізах ELISA, були наступними: планшети для ELISA Immulon 4 HBX (Dynax, кат. № N0541216); мономерний вітронектин людини з розрахунку 5 мкг/мл (Innovative Research, кат. № IHVN); глікозилізований PAI-1 людини (активна форма) (Molecular Innovations, кат. № GLYHPAI-A); неглікозилізований PAI-1 миші в деяких продуктах злиття (Molecular Innovations, кат. № MPAL-A); вторинне антитіло, яке являло собою кон'юговане з HRP антитіло кози до IgG миші (H+L) (Jackson ImmunoResearch Labs № 115-035-166); та субстрат ABTS: Roche Diagnostics (№ 11 204 521 001).

Застосовували наступні контрольні антитіла:

а) 33B8, моноклональне інгібіторне антитіло миші проти PAI-1 (IgG1; Innovative Research, кат. № IMA-33B8);

б) 33H1, моноклональне інгібіторне антитіло миші проти PAI-1 (IgG1; Innovative Research, кат. № IMA-33H1);

в) 31C9, моноклональне неінгібіторне антитіло миші проти PAI-1 (IgG1; Innovative Research, кат. № IMA-31C9); та

г) 1B7.11, антитіло ізотипічного контролю IgG1 (mAb до TNP – одержане на місці з лінії клітин гібридами, яку купували в ATCC (кат. № TIB-191).

Спосіб ELISA був наступним: планшети покривали за допомогою 5 мкг/мл Vn у PBS протягом ночі при 4 °C з розрахунку 50 мкл/лунку; наступного дня планшети блокували 1 годину за допомогою 200 мкл 1 % альбуміну бичачої сироватки в PBS (BSA/PBS); планшети промивали чотири рази PBS у кількості 200 мкл/лунку; активний PAI-1 з розрахунку 2 мкг/мл у 1 % BSA/PBS додавали в планшети з розрахунку 50 мкл/лунку та інкубували 1 годину; планшети промивали чотири рази PBS у кількості 200 мкл/лунку; розведення антитіл у 1 % BSA/PBS або надосадові рідини гібридами з вихідних 96-лункових планшетів додавали в планшети для ELISA з розрахунку 50 мкл/лунку; планшети інкубували протягом 1 години за кімнатної температури (RT); планшети промивали чотири рази PBS у кількості 200 мкл/лунку; додавали кон'юговане з HRP антитіло до IgG миші з розрахунку 50 мкл 1:2000 у 1 % BSA/PBS та інкубували протягом 1 години за кімнатної температури; планшети промивали чотири рази PBS у кількості 200 мкл/лунку; в планшети додавали субстрат ABTS (одна пігулка, розчинена в 5 мл) з розрахунку 50 мкл/лунку та потім планшети зчитували на пристрої BioTek Synergy HT із застосуванням OD<sub>405</sub>. Типова калібрувальна крива для титрування антитіла в аналізі зв'язування ELISA показана на фігурі 2. Антитіла 31C9, 33B8 та 33H1 слугували позитивними контролями, а IgG1 слугував негативним контролем. В таблиці 4 показано, що з приблизно 5000 одержаних клонів 675 клонів були позитивними щодо зв'язування як з PAI-1, так і з PAI-1/Vn. Потім ці клони піддавали скринінгу щодо спорідненості з PAI-1.

Таблиця 4

Число клонів, позитивних щодо зв'язування як з PAI-1, так і з PAI-1/Vn

| Злиття | Імуноген | № миші | Число клонів, позитивних щодо зв'язування як з PAI-1, так і з PAI-1/Vn |
|--------|----------|--------|------------------------------------------------------------------------|
| A      | PAI-1/Vn | 2      | 131                                                                    |
| B      | PAI-1    | 2      | 146                                                                    |
| C      | PAI-1/Vn | 3      | 145                                                                    |
| D      | PAI-1    | 3      | 104                                                                    |
| E      | PAI-1    | 1      | 149                                                                    |

Приклад 3. Скринінг надосадових рідин гібридами шляхом ранжування спорідненості за допомогою Biotacore

5 Подальший добір антитіла з високою спорідненістю, що має низьку швидкість дисоціації, здійснювали за допомогою Biotacore. Скринінг надосадової рідини гібридами за допомогою Biotacore проводили одним з двох способів: (1) шляхом зворотного скринінгу із застосуванням іммобілізованих антитіл до антитіла миші до PAI-1 або (2) шляхом прямого скринінгового аналізу із застосуванням вільного PAI-1 як ліганда або з іммобілізованим Vn.

10 Застосовані пристрої являли собою BIACORE 2000 або BIACORE 3000 (GE Healthcare), розроблені для аналізу біомолекулярної взаємодії (BIA) у режимі реального часу. Застосований сенсорний чип являв собою чип CM5 (GE Healthcare) з матрицею на основі карбоксиметильованого декстрану на поверхні. Кожний сенсорний чип має чотири паралельні проточні комірки (Fc). З кожною проточною коміркою зв'язували mAb до Fc IgG миші шляхом

15 стандартного амінного зв'язування згідно з протоколом виробника для підготовки чипа. В аналізі зворотного скринінгу за допомогою Biotacore позитивні за ELISA зразки надосадової рідини гібридами відбирали та фільтрували крізь 0,2 мкм фільтри перед нанесенням на поверхню чипа Biotacore. Кожну надосадову рідину гібридами вводили над поверхню однієї проточної комірки з проточних комірок Fc2-Fc4, та при цьому IgG у надосадовій рідині гібридами

20 буде захоплюватися поверхнею чипа за допомогою mAb до Fc IgG миші, у той самий час Fc1 залишали чистими як контрольні комірки. Потім у Fc1-Fc4 вводили білок PAI-1 людини в PBS. Буфер PBS також вводили над поверхню чипа як контроль. Після віднімання сигналів Fc1 та прогонів контрольного буфера спорідненість зв'язування (KD)/швидкість дисоціації (kd) антитіла з надосадових рідин щодо білка PAI-1 аналізували та ранжували із застосуванням програмного

25 забезпечення Scrubber 2. В аналізі прямого скринінгу за допомогою Biotacore очищений білок вітронектин людини іммобілізували на проточних комірках Fc1-Fc4 чипа CM5. PAI-1 людини або макаки-крабїда захоплювався на поверхні всіх проточних комірок. Потім відфільтровані відібрані надосадові рідини гібридами вводили зверху захопленого PAI-1, по одній на проточну комірку, за винятком Fc1, яку зберігали як контрольну проточну комірку. Буфер PBS також вводили над поверхню чипа як контроль. Після віднімання сигналів Fc1 та прогонів контрольного буфера спорідненість зв'язування антитіла в надосадовій рідині гібридами щодо захопленого вітронектином PAI-1

30 аналізували та ранжували із застосуванням програмного забезпечення Scrubber 2 (версія 2.0a, 2005; BioLogic Software, BioLogic Software Pty Ltd., 116 Blamey Court, Кемпбел, ACT 2612, Австралія).

35 У таблиці 5 показаний добір позитивних та негативних клонів антитіл з продуктів злиття A, B, C, D та E. Показані не всі дані через велику кількість клонів антитіл, які піддавали скринінгу. Лише клони антитіл, які продемонстрували кращу ( $kd < 10^{-4}$  1/с) швидкість дисоціації зв'язування щодо білків PAI-1 людини та макаки-крабїда, відбирали для функціонального хромогенного

40 аналізу.

Таблиця 5

Скринінг спорідненості/швидкості дисоціації при зв'язуванні надосадових рідин гібридами з PAI-1 людини в аналізі Biacore

| КЛОН | Зв'язування з hPAI-1 |                                           | PAI-1<br>макаки-<br>крабоїда | КЛОН | Зв'язування з hPAI-1 |                                           | PAI-1<br>макаки-<br>крабоїда |
|------|----------------------|-------------------------------------------|------------------------------|------|----------------------|-------------------------------------------|------------------------------|
|      | Зв'язування          | Швидкість<br>дисоціації<br>$\leq 10^{-4}$ |                              |      | Зв'язування          | Швидкість<br>дисоціації<br>$\leq 10^{-4}$ |                              |
| A9   | ND                   | ND                                        | ND                           | C26  | +                    | -                                         | -                            |
| A20  | +                    | -                                         | -                            | C45  | +                    | +                                         | +/-                          |
| A37  | +                    | -                                         | -                            | C46  | +                    | +                                         | +                            |
| A39  | +                    | +                                         | -                            | C49  | +                    | +/-                                       | ND                           |
| A41  | ND                   | ND                                        | ND                           | C61  | +                    | +/-                                       | +/-                          |
| A44  | +                    | +                                         | +                            | C66  | +                    | -                                         | -                            |
| A47  | +                    | +                                         | +                            | C69  | +                    | +                                         | +/-                          |
| A52  | ND                   | ND                                        | ND                           | C76  | ND                   | ND                                        | ND                           |
| A71  | +                    | +                                         | +                            | C79  | +                    | -                                         | -                            |
| A75  | +                    | +/-                                       | +/-                          | C85  | ND                   | ND                                        | ND                           |
| A83  | +                    | +/-                                       | -                            | C109 | +                    | -                                         | -                            |
| A89  | +                    | +/-                                       | -                            | C118 | +                    | +/-                                       | ND                           |
| A93  | +                    | +/-                                       | -                            | C134 | ND                   | ND                                        | ND                           |
| A98  | +                    | -                                         | -                            | C145 | +                    | -                                         | +/-                          |
| A99  | +                    | +                                         | +/-                          | D4   | -                    | -                                         | -                            |
| A105 | +                    | +                                         | +                            | D12  | +                    | -                                         | -                            |
| A107 | +                    | -                                         | -                            | D13  | -                    | -                                         | ND                           |
| A113 | +                    | +                                         | +                            | D15  | -                    | -                                         | ND                           |
| A119 | +                    | +/-                                       | +/-                          | D31  | +                    | -                                         | -                            |
| B16  | ND                   | ND                                        | ND                           | D33  | +                    | +/-                                       | -                            |
| B18  | +                    | -                                         | -                            | D37  | +                    | -                                         | -                            |
| B28  | +                    | +                                         | -                            | D48  | +                    | +                                         | +/-                          |
| B29  | +                    | -                                         | -                            | D52  | +                    | +                                         | +                            |
| B32  | +                    | +                                         | +                            | E4   | +                    | +                                         | -                            |
| B58  | +                    | +                                         | -                            | E5   | +                    | +                                         | -                            |
| B85  | ND                   | ND                                        | ND                           | E11  | +                    | +                                         | -                            |
| B89  | +                    | +                                         | +/-                          | E16  | +                    | +                                         | +/-                          |
| B99  | +                    | -                                         | +/-                          | E20  | +                    | ND                                        | ND                           |
| B105 | +                    | +                                         | +/-                          | E21  | +                    | +                                         | -                            |
| B109 | +                    | +                                         | +                            |      |                      |                                           |                              |
| B118 | ND                   | ND                                        | ND                           |      |                      |                                           |                              |

“+” = означає позитивне зв'язування з h/cPAI-1 або швидкість дисоціації, що менша або дорівнює  $10^{-4}$ ;

“+/-” = означає часткове зв'язування з h/cPAI-1 або швидкість дисоціації, що дещо вища за  $10^{-4}$ ;

“-” = означає низьке зв'язування з h/cPAI-1 або його відсутність або швидкість дисоціації, вищу за  $10^{-4}$ ;

ND = не визначено.

Приклад 4. Функціональний ELISA для скринінгу надосадової рідини гібридами для добору антитіл, які блокують взаємодію PAI-1 з tPA

5 Для забезпечення можливості добору функціональних антитіл розробили новий ELISA, який дозволяє розрізняти антитіла, які лише зв'язуються з PAI-1, та такі антитіла, які блокують функцію PAI-1 як інгібітора tPA (функціональний ELISA).

10 Надосадові рідини гібридами піддавали скринінгу в новому функціональному ELISA для ідентифікації надосадової рідини гібридами від різних клонів, що має здатність блокувати взаємодію tPA-PAI-1. Схема функціонального ELISA була наступною: (1) якщо антитіло зв'язується з PAI-1, але зв'язування антитіла не блокує утворення ковалентного зв'язку між PAI-



1 та tPA, то антитіло до tPA буде зв'язуватися з tPA, що зв'язана з планшетом через PAI-1, та забезпечується позитивна зареєстрована величина; (2) якщо антитіло блокує PAI-1 і, внаслідок цього, блокує взаємодію з tPA шляхом або зміни конформації PAI-1, або створення стеричної перешкоди, то антитіло до tPA не буде здатним зв'язуватися з планшетом та зареєстрована величина буде негативною (нижче OD<sub>405</sub>). Паралельно, надосадові рідини гібридами тестували щодо зв'язування з PAI-1 в ELISA, описаному в прикладі 2. Оскільки кількість антитіла в надосадовій рідині гібридами невідома, вважали, що величини, нижчі за контрольне (тобто нижче показання для ізотипічного контролю), вказують на антитіло, що становить інтерес. Через змінливу концентрацію антитіла в надосадовій рідині в деяких випадках блокування було лише частковим.

Вкриті стрептавідином планшети (NUNC, № 436014) інкубували протягом 2 годин при RT з 2 мкг/мл біотин-PAI-1 (PAI-1 людини, з N-кінцевою біотиновою міткою, активна фракція; Molecular Innovations, кат. № NTBIOPAI-A) в 1 % BSA/PBS з розрахунку 50 мкл/мл. Планшети блокували протягом 1 години за допомогою 200 мкл 1 % BSA/PBS при RT та промивали чотири рази PBS у кількості 200 мкл/лунку. Розведення очищеного антитіла та надосадові рідини гібридами додавали в лунки з розрахунку 50 мкл/лунку та інкубували протягом 15 хвилин. Планшети промивали чотири рази PBS у кількості 200 мкл/лунку. Дволанцюгову tPA (Innovative Research, кат. № HTPA-TC) при 1 мкг/мл додавали в планшети з розрахунку 50 мкл/лунку та інкубували протягом 30 хвилин при RT. Планшети промивали чотири рази PBS у кількості 200 мкл/лунку. В планшети додавали кон'юговане з HRP антитіло до tPA (Life Span Technologies, кат. № LS-C39721) при розведенні 1:3000 та інкубували протягом 45 хвилин. Планшети промивали чотири рази PBS у кількості 200 мкл/лунку. В планшети додавали субстрат ABTS (одна таблетка, розчинена в 5 мл; Roche Diagnostics № 11 204 521 001) з розрахунку 50 мкл/лунку та залишали протягом терміну, необхідного для появи кольору. Планшети зчитували на пристрої BioTek Synergy HT із застосуванням OD<sub>405</sub>. Значення OD, які були нижчими, ніж у IgG ізотипічного контролю, вказують на блокування зв'язування tPA з PAI-1.

У деяких випадках функціональний ELISA здійснювали перед скринінгом надосадової рідини за допомогою Bioscore, та він слугував у ролі стадії добору, що була більш важливою для розвитку гібридами. Ілюстративна крива з 33H1 у ролі позитивного контролю, IgG1 у ролі негативного контролю та A44 у ролі ідентифікованого позитивного клону антитіла показана на фігурі 3.

Таблиця 6

Функціональний ELISA для скринінгу надосадової рідини гібридами для добору антитіл, які блокують взаємодію PAI-1 з tPA

| КЛОН | PAI-1 ELISA | Інгібування зв'язування tPA/PAI-1 | Відібрані | КЛОН | PAI-1 ELISA | Інгібування зв'язування tPA/PAI-1 | Відібрані |
|------|-------------|-----------------------------------|-----------|------|-------------|-----------------------------------|-----------|
| A9   | +           | -                                 | ні        | C26  | +           | +                                 | так       |
| A20  | +           | -                                 | ні        | C45  | +           | +                                 | так       |
| A37  | +           | +                                 | так       | C46  | +           | -                                 | ні        |
| A39  | +           | +/-                               | так       | C49  | +           | -                                 | ні        |
| A41  | +           | +                                 | так       | C61  | +           | +                                 | так       |
| A44  | +           | +                                 | так       | C66  | +           | +                                 | так       |
| A47  | +           | +                                 | так       | C69  | +           | +                                 | так       |
| A52  | +           | -                                 | ні        | C76  | +           | -                                 | ні        |
| A71  | +           | +                                 | так       | C79  | +           | +                                 | так       |
| A73  | +           | -                                 | ні        | C85  | +           | -                                 | ні        |
| A75  | +           | +                                 | так       | C109 | +           | +                                 | так       |
| A83  | +           | +                                 | так       | C118 | +           | +                                 | так       |
| A89  | +           | +                                 | так       | C134 | +           | -                                 | ні        |
| A93  | +           | -                                 | ні        | C145 | +           | +                                 | так       |
| A98  | +           | +                                 | так       | D4   | +           | -                                 | ні        |
| A99  | +           | -                                 | ні        | D12  | +           | +                                 | так       |
| A105 | +           | +                                 | так       | D13  | +           | +                                 | так       |
| A107 | +           | +                                 | так       | D15  | +           | +                                 | так       |
| A113 | +           | +                                 | так       | D31  | +           | +                                 | так       |

| КЛОН | PAI-1 ELISA | Інгібування зв'язування tPA/PAI-1 | Відібрані | КЛОН | PAI-1 ELISA | Інгібування зв'язування tPA/PAI-1 | Відібрані |
|------|-------------|-----------------------------------|-----------|------|-------------|-----------------------------------|-----------|
| A119 | +           | +                                 | так       | D33  | +           | +                                 | так       |
| B16  | +           | -                                 | ні        | D37  | +           | +                                 | так       |
| B18  | +           | +                                 | так       | D44  | +           | +                                 | так       |
| B28  | +           | +/-                               | так       | D47  | +           | +                                 | так       |
| B29  | +           | +                                 | так       | D48  | +           | +                                 | так       |
| B32  | +           | +                                 | так       | D52  | +           | +                                 | так       |
| B58  | +           | +                                 | так       | D55  | +           | +                                 | так       |
| B85  | +           | -                                 | ні        | E4   | +           | -                                 | ні        |
| B89  | +           | +                                 | так       | E5   | +           | -                                 | ні        |
| B99  | +           | +                                 | так       | E11  | +           | +                                 | так       |
| B105 | +           | +                                 | так       | E16  | +           | +                                 | так       |
| B109 | +           | +                                 | так       | E20  | +           | -                                 | ні        |
| B118 | +           | +                                 | так       | E21  | +           | +                                 | так       |

PAI-1 ELISA = "+" означає зв'язування з PAI-1 (див. приклад 2);

Інгібування зв'язування tPA/PAI-1 = бал "+" означає, що взаємодія tPA з PAI-1 інгібється; +/- = часткове інгібуння взаємодії tPA з PAI-1.

Скринінгу піддавали більше 200 надосадових рідин. В таблиці 6 показаний добір позитивних та негативних надосадових рідин гібридами. Приблизно по 10 гібридом на злиття демонстрували здатність блокувати PAI-1 від зв'язування з tPA в функціональному ELISA. Виходячи з даних, одержаних на основі надосадових рідин гібридами, відбирали гібридами для секвенування та одержання антитіл у середньому масштабі. Навіть незважаючи на те, що D4 не зв'язувався достатньою мірою з неглікозильованим PAI-1, його відбирали для очищення та секвенування, на основі його зв'язування у Віасоре з глікозильованим PAI-1. Очищені антитіла піддавали додатковому визначенню характеристик за допомогою Віасоре щодо кінетики спорідненості, а також за допомогою хромогенного та клітинного аналізів для визначення ефективності порівняно з комерційно доступними антитілами.

Приклад 5. Секвенування за допомогою 5'-RACE (швидка ампліфікація кінців кДНК) та очищення антитіла миші

Антитіла для специфічної мішені, одержані з серії продуктів злиття, можуть мати однакові послідовності. Шляхом здійснення секвенування гена антитіла на ранній стадії одержання антитіла виключали будь-які можливі зайві антитіла та правильні послідовності гена антитіла керували добором та гуманізацією антитіл, а також конструюванням химерного антитіла.

5'-RACE являє собою процедуру для ампліфікації послідовностей нуклеїнових кислот на основі шаблону матричної РНК між визначеним внутрішнім сайтом та невідомими послідовностями на 3'- або 5'-кінці мРНК. Ця методика ампліфікації зі специфічністю до одного боку була описана як "однобічна" ПЛР або "заякорена" ПЛР. Вихідну послідовність варіабельної ділянки антитіла миші до PAI-1 людини лідерного антитіла визначали за допомогою секвенування кДНК 5'-RACE та підтверджували за допомогою N-кінцевого секвенування білка.

Для визначення послідовностей варіабельних ділянок важкого (VH) та легкого ланцюга (VL) IgG загальну РНК з клітин гібридами виділяли із застосуванням RNeasy Mini Kit (QIAGEN, кат. № 74104) згідно з інструкціями виробника. Коротко, клітини (5 × 10<sup>6</sup> клітин) піддавали лізису в 350 мкл буфера RLT з набору з подальшим захопленням загальних РНК на центрифужній колонці. РНК елювали в буфер TE з набору та зберігали на льоду.

кДНК першої нитки одержували із застосуванням набору для ампліфікації кДНК SMARTer™ RACE (Clontech, кат. № 634923). Протокол 5'-RACE здійснювали згідно з інструкціями виробника. кДНК VH- та VL-ланцюгів ампліфікували окремо за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із застосуванням 5'-праймерів, які постачаються в наборі SMARTer™, та VH- та VL-ген-специфічних 3'-праймерів, наведених нижче:

3'-праймер важкого ланцюга: 5'-TATGCAAGGCTTACAACCACA-3" (SEQ ID NO: 105)

3'-праймер легкого ланцюга: 5'-CTCATTCCTGTTGAAGCTCTTGAG-3" (SEQ ID NO: 106)

Ампліфіковані гени VH та VL окремо клонували у вектор TOPO із застосуванням набору для клонування TOPO TA (Invitrogen, кат. № K4520-01). Процедури здійснювали згідно з інструкціями виробника. Для трансформації бактерій реакційні суміші додавали до компетентних клітин E. coli та інкубували на льоду протягом 20 хвилин. Пробірки, які містили клітини E. coli та реакційну суміш, нагрівали при 42 °C протягом 40 секунд та додавали 250

мікролітрів середовища SOC з набору. Після інкубації *E. coli* при 37 °C протягом 60 хвилин за струшування зі швидкістю 300 об./хв. бактерій розподіляли по чашці з агаровим середовищем LB, що містило 100 мікрограмів на мл ампіциліну з подальшою інкубацією при 37 °C протягом ночі.

Після підтвердження вбудовування гена VH та VL за допомогою ПЛР відбирали по п'ять клонів бактерій та їх розмножували в бульйоні LB, що містив 100 мікрограмів на мл ампіциліну для одержання плазмідної ДНК. Плазмідні ДНК виділяли із застосуванням набору QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN, кат. № 27104) згідно з інструкціями виробника. Гени VH та VL IgG з гібридом секвенували за способом Сенгера, а CDR визначали із застосуванням контактного визначення (MacCallum et al.).

Моноклональні антитіла одержували в біореакторних флаконах CELLline (Wilson Wolf Manufacturing Corp.; кат. № CL350 або кат. № CL1000) згідно з інструкціями виробника в безсироватковому середовищі (Gibco, кат. № 12045) та очищали за допомогою хроматографії з білками A/G (GE Healthcare Life Sciences, кат. № 28-4083-47 та № 28-4082-53). Очищені антитіла піддавали додатковому визначенню характеристик за допомогою Віасоре щодо кінетики спорідненості, а також за допомогою хромогенного та клітинного аналізів для визначення ефективності порівняно з комерційно доступними антитілами.

Приклад 6. Функціональний хромогенний аналіз із застосуванням очищеного антитіла

Очищені антитіла тестували в хромогенному аналізі щодо здатності блокувати PAI-1. PAI-1 інгібує функцію tPA, отже, антитіла, які блокують PAI-1, будуть призводити до відновлення функції tPA. У хромогенних аналізах використовують протеолітичні ферменти, які діють на свої природні субстрати (білки та пептиди) шляхом гідролізу одного або декількох пептидних зв'язків. Даний процес, як правило, є високоспецифічним в тому сенсі, що розщеплюються лише пептидні зв'язки, суміжні з певними амінокислотами. Хромогенні субстрати являють собою пептиди, які вступають у реакцію з протеолітичними ферментами, що веде до виникнення кольору, який вимірюють кількісно. Хромогенні субстрати одержують синтетичним шляхом, та їх розробляють таким чином, аби вони мали селективність, подібну до селективності природного субстрату для ферменту. До пептидної частини хромогенного субстрату прикріплена хімічна група, яка при вивільненні після розщеплення ферментом, веде до виникнення кольору. Зміну кольору можна відслідковувати за допомогою спектрофотометрії, та вона пропорційна протеолітичній активності.

Хромогенний аналіз застосовували для підтвердження здатності антитіла нейтралізувати функцію PAI-1 у ролі інгібітора tPA. tPA здатний вивільняти pNA з хромогенного субстрату S2288. S2288 в розчині не має кольору, але під дією tPA та подальшого вивільнення pNA розчин набуває жовтого кольору, який можна зчитувати при OD<sub>405</sub>. Виникнення кольору можна спостерігати протягом 2-3 годин для визначення кінетики ферментативної реакції. PAI-1 здатний блокувати ферментативну активність tPA залежним від концентрації способом.

Здійснювали двостадійний хромогенний аналіз. Усі реагенти мали 10х концентрацію аж до тієї стадії, коли їх додавали до розчину субстрату. На першій стадії ефективність PAI-1 в інгібуванні tPA вимірювали із застосуванням хромогенного аналізу (титрування PAI-1 за постійної концентрації tPA). Титраційну криву PAI-1 аналізували для визначення IC<sub>50</sub> для PAI-1, що блокує активність tPA. Після цього IC<sub>80</sub>, розраховану з кривої, відбирали для подальшої перевірки антитіла щодо здатності нейтралізувати блокувальну функцію PAI-1 та відновлювати ферментативну активність tPA. Рівні об'єми (25 мкл) tPA (з розрахунку 14 нМ) (Innovative Research, кат. № INTPA-TC) та глікозильованого (активна форма) PAI-1 людини (Molecular Innovations, кат. № GLYHPAI-A) або неглікозильованого (активна форма) PAI-1 миші (Molecular Innovations, кат. № IMPAI) об'єднували та інкубували із застосуванням 3-кратних серійних розведень PAI-1, починаючи від 108 нМ, та постійної концентрації tPA. Все розведення білка проводили за допомогою 1 % BSA/PBS. Суміш інкубували в лунках 96-лункового титраційного мікропланшета протягом 15 хвилин за кімнатної температури. Потім 200 мкл хромогенного субстрату S2288 (1,25 мМ) (Chromogenix, кат. № S-820852), розведеного згідно з інструкціями виробника, додавали в лунки та зміну поглинання OD<sub>405</sub> при 405 нм реєстрували протягом 2 годин кожні 10 хвилин для вимірювання залишкової активності tPA. Стосовно контролів фоновий рівень вимірювали за відсутності tPA (ферментативна реакція відсутня), при цьому позитивним контролем слугувала відсутність PAI-1 (100 % активність tPA), а негативним контролем слугував PAI-1 з розрахунку 10-кратного надлишку порівняно з tPA (повне блокування активності tPA). Див. на фігурі 4 ілюстративні криві для 33B8, A44, 33H1 та IgG1.

Стосовно другої стадії функціональні властивості антитіл визначали шляхом оцінки їхньої здатності інгібувати активний PAI-1 та відновлювати функцію tPA із застосуванням аналізу нейтралізації PAI-1. Стосовно даної стадії 12,5 мкл активного PAI-1 (при 56 нМ) інкубували з

рівним об'ємом або PBS (Invitrogen, кат. № 14190-144), що містив 1 % BSA (Sigma, кат. № A3059), або з серійними 3-кратними розведеннями антитіла, починаючи з 2 мкМ. Контрольні та невідомі антитіла інкубували з концентрацією (5-кратні розведення) в діапазоні від 0,1 до 300 нМ з 3 нМ PAI-1 та до суміші додавали tPA. Всі інгредієнти інкубували з 10х концентрацією за кімнатної температури та додатково у 10 разів розводили субстратом S2288 для tPA, який після розщеплення за допомогою tPA змінює колір з прозорого на жовтий. Зразки зчитували при OD 405 протягом 2 годин кожні 10 хвилин при 37 °C. Суміш залишали реагувати в лунках 96-лункового титраційного мікропланшета протягом 30 хвилин за кімнатної температури, аби досягти утворення комплексу антитіло-антиген. Потім у лунки додавали 25 мкл tPA (при 14 нМ, що відповідає IC<sub>80</sub> інгібування активності tPA) та інкубували протягом 15 хвилин за кімнатної температури. Нарешті, до суміші додавали 200 мкл 1,25 мМ субстрату S2288, розведеного згідно з інструкціями виробника. Зміну поглинання при 405 нм реєстрували протягом 2 годин кожні 10 хвилин для вимірювання залишкової активності tPA. Стовідсоткову активність PAI-1 визначали як активність PAI-1, яку спостерігали за відсутності антитіла. Нейтралізацію активності PAI-1 антитілом розраховували, виходячи з залишкової активності PAI-1, які вимірювали в присутності антитіла. Контролями були IgG1 як ізотипічний контроль (негативний) та mAb 33H1 та mAb 33B8 як позитивні контролю. Див. на фігурі 5 ілюстративні криві для B28, E16, E21, A75 та IgG1.

Ортологи PAI-1 людини, які інгібують tPA людини, тестували в системі двостадійного хромогенного аналізу. Титрування ортологів здійснювали, як описано вище для PAI-1 людини (див. на фігурі 6 ілюстративні криві титрувань), та активність tPA визначали за допомогою хромогенного способу (див. на фігурі 7 ілюстративні криві для 33B8 та A44 проти PAI-1 макаки-крабоїда та миші). Кінцева концентрація tPA людини, яку застосовували в аналізі, становила 1,4 нМ. 12,5 мкл активного PAI-1 (56 нМ) інкубували з рівним об'ємом або PBS, що містив 1 % BSA, або з серійними 3-кратними розведеннями антитіла, починаючи з 2 мкМ. Суміш залишали реагувати в лунках 96-лункового титраційного мікропланшета протягом 30 хвилин за кімнатної температури. Потім у лунки додавали по 25 мкл tPA (14 нМ) та інкубували протягом 15 хвилин за кімнатної температури. Для завершення реакції до суміші додавали 200 мкл субстрату S2288 для tPA (Chromogenix) (1,25 мМ). Ортологи PAI-1 одержували від Molecular Innovations: PAI-1 миші (активна фракція білка дикого типу; кат. № MPAL); PAI-1 щура (активна фракція білка дикого типу; кат. № RPAI); а PAI-1 кролика (стабільний мутант; кат. № RbPAI-I91L) та PAI-1 макаки-крабоїда (активний PAI-1 макаки-крабоїда) одержували на місці за допомогою E.coli. Через низькі швидкості дисоціації ортологів кролика та щура в скринінгу за допомогою Bioscore (дані не показані) скринінг антитіл проти даних ортологів не проводили.

Таблиця 7

Активність антитіл проти ортологів та стан глікозилювання PAI-1 у функціональному хромогенному аналізі

| ID клону | Ізотип | Ортолог PAI-1 та стан глікозилювання |                       |                         |                         |
|----------|--------|--------------------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|
|          |        | Неглікозилюваний hPAI-1              | Глікозилюваний hPAI-1 | Неглікозилюваний cPAI-1 | Неглікозилюваний mPAI-1 |
| A37      | IgG1   | +/-                                  | -                     | -                       | -                       |
| A39      | IgG1   | -                                    | +++                   | -                       | -                       |
| A41      | IgG1   | +/-                                  | -                     | -                       | -                       |
| A44      | IgG1   | +++                                  | +++                   | +++                     | -                       |
| A47      | IgG1   | nd                                   | -                     | -                       | -                       |
| A71      | IgG1   | +++                                  | +++                   | +++                     | -                       |
| A75      | IgG2a  | +++                                  | +++                   | +++                     | -                       |
| A83      | IgG1   | nd                                   | +/-                   | +/-                     | -                       |
| A89      | IgG2b  | -                                    | -                     | -                       | -                       |
| A98      | IgG1   | nd                                   | nd                    | nd                      | nd                      |
| A105     | IgG1   | +++                                  | +++                   | +++                     | -                       |
| A107     | IgG1   | +/-                                  | -                     | -                       | -                       |
| A113     | IgG1   | -                                    | -                     | -                       | -                       |
| A119     | IgG2a  | -                                    | -                     | -                       | -                       |
| B18      | IgG1   | +                                    | +                     | +                       | -                       |

| ID клону | Ізотип | Ортолог PAI-1 та стан глікозилювання |                       |                         |                         |
|----------|--------|--------------------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|
|          |        | Неглікозилюваний hPAI-1              | Глікозилюваний hPAI-1 | Неглікозилюваний cPAI-1 | Неглікозилюваний mPAI-1 |
| B28      | IgG2b  | -                                    | +++                   | -                       | -                       |
| B29      | IgG1   | -                                    | -                     | -                       | -                       |
| B32      | IgG1   | nd                                   | -                     | -                       | -                       |
| B58      | IgG1   | nd                                   | +                     | +                       | -                       |
| B89      | IgG1   | nd                                   | -                     | -                       | -                       |
| B99      | IgG2a  | nd                                   | +                     | +                       | -                       |
| B105     | IgG1   | -                                    | -                     | -                       | -                       |
| B109     | IgG1   | +++                                  | +++                   | +++                     | -                       |
| B118     | IgG1   | +                                    | +                     | +                       | -                       |
| C26      | IgG1   | ++                                   | ++                    | ++                      | +                       |
| C45      | IgG2b  | +++                                  | +++                   | +++                     | -                       |
| C61      | IgG1   | +                                    | +                     | +                       | -                       |
| C66      | IgG1   | +                                    | +                     | +                       | -                       |
| C69      | IgG1   | ++                                   | ++                    | ++                      | -                       |
| C79      | IgG2b  | +/-                                  | +/-                   | +/-                     | -                       |
| C109     | IgG2b  | +/-                                  | +/-                   | +/-                     | -                       |
| C118     | IgG1   | ++                                   | ++                    | ++                      | -                       |
| C145     | IgG2b  | ++                                   | ++                    | ++                      | -                       |
| D4       | IgG2a  | +                                    | ++                    | +                       | -                       |
| D12      | IgG1   | +                                    | +                     | +                       | -                       |
| D13      | IgG1   | -                                    | -                     | -                       | -                       |
| D15      | IgG1   | +                                    | +                     | +                       | -                       |
| D31      | IgG1   | ++                                   | ++                    | ++                      | -                       |
| D33      | IgG1   | -                                    | -                     | -                       | -                       |
| D37      | IgG2a  | -                                    | -                     | -                       | -                       |
| D48      | IgG2a  | -                                    | +/-                   | -                       | -                       |
| D52      | IgG1   | +                                    | +                     | +                       | -                       |
| E11      | IgG1   | ++                                   | ++                    | ++                      | -                       |
| E16      | IgG1   | +++                                  | +++                   | +++                     | -                       |
| E21      | IgG2b  | +++                                  | +++                   | +++                     | -                       |

h=людина, c=мавпа яванська макака (крабоїд), m=миша, nd=не визначено,  
 “-“=активність відсутня, “+/-“=часкова активність, “+“=слабка активність, “++“=помірна активність, “+++“=сильна активність.

У цьому аналізі одне або декілька антитіл з кожного злиття демонстрували здатність блокувати інгібіторну функцію PAI-1 як макаки-крабоїда, так і людини, при цьому приблизно 14 антитіл мали блокувальну активність від помірної до сильної. A39 та B28 мали унікальний профіль, що полягав у тому, що ці два антитіла блокували глікозилюваний hPAI-1, але не мали активності проти неглікозилюваного PAI-1 людини або макаки-крабоїда. Жодне з антитіл не мало здатності ефективно блокувати активність PAI-1 миші (в межах 10-кратного значення порівняно з PAI-1 людини), за винятком C26.

#### Приклад 7. Механізм дії моноклональних антитіл

Моноклональні антитіла можуть інгібувати PAI-1 завдяки трьом різним механізмам: а) шляхом створення стеричної перешкоди, б) шляхом перетворення PAI-1 на неактивну конформацію після зв'язування та с) шляхом перетворення PAI-1 на конформацію субстрату для tPA замість інгібіторної ("субстратна конформація"). PAI-1 утворює ковалентний зв'язок з tPA під час взаємодії з сериною протеазою.

Хромогенний аналіз та методики SDS-PAGE застосовували для ідентифікації механізму дії антитіла. Реакцію між моноклональним антитілом (або контрольними антитілами), PAI-1 та tPA здійснювали, як описано вище для функціонального хромогенного аналізу. Зразки змішували з буфером для зразків Лемлі, та завантажували в гель SDS-PAGE за невідновних умов, та проганяли протягом 30 хвилин. Після цього гелі фарбували Кумасі синім для візуалізації білків,

- 5 комплексів та розщепленої форми PAI-1. Контрольні моноклональні антитіла з відомим механізмом дії застосовували для порівняння. Як відомо, 33B8 перетворює PAI-1 на неактивну конформацію, а 33H1, як відомо, перетворює PAI-1 на субстратну конформацію. В даному аналізі можливо точно визначати субстратну конформацію, але неможливо розрізнити неактивну конформацію або створення стеричної перешкоди. Ілюстративні SDS-гелі показані на фігурах 8, 9 та 10.

Таблиця 8

## Механізм дії моноклональних антитіл

| Антитіло | Механізм дії                                                                       |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------|
| A44      | перетворює PAI-1 з активної → субстратну конформацію                               |
| C26      | перетворює PAI-1 з активної → субстратну конформацію                               |
| C45      | перетворює PAI-1 з активної → субстратну конформацію                               |
| E21      | перетворює PAI-1 з активної → субстратну конформацію                               |
| A39      | перетворює PAI-1 з активної → неактивну конформацію або створює стеричну перешкоду |
| B109     | перетворює PAI-1 з активної → неактивну конформацію або створює стеричну перешкоду |
| E16      | перетворює PAI-1 з активної → неактивну конформацію або створює стеричну перешкоду |

- 10 A44, C26, C45 та E21 блокують активність PAI-1 шляхом перетворення PAI-1 з активної конформації на субстратну конформацію. A39 та B109 мають різні механізми дії, але в цьому аналізі неможливо розрізнити, чи блокують ці антитіла активність PAI-1 шляхом зміни PAI-1 з активної конформації на неактивну конформацію або шляхом створення стеричної перешкоди.

Приклад 8. Кінетика зв'язування очищеного антитіла

- 15 У вимірюваннях кінетики антитіла оцінювали в зворотному аналізі при 25 °C. У зворотному аналізі антитіла до PAI-1 захоплювалися поверхнею з антитілами до Fc IgG миші, одержаній на чипі CM5, з подальшим введенням 2х серійних розведень білків PAI-1 (людини або макаки-крабоїда), починаючи з 40 нМ. Високу швидкість потоку вибирали з розрахунку 50 мкл/хв., аби уникнути обмеження переносу мас. Передбачали час дисоціації, що становив дві тисячі секунд, для пристосування до низької швидкості дисоціації відібраних антитіл. Чип регенерували за допомогою буфера гліцин-HCl, pH 1,7, після кожного циклу зв'язування антитіло-PAI-1. Аналіз даних кінетики здійснювали із застосуванням програмного забезпечення Biacore BIAevaluation. Сенсограми піддавали процедурі подвійного контролю шляхом віднімання значень контрольної проточної комірки та значень контрольного буфера. Сенсограми апроксимували із застосуванням імітаційної 1:1 моделі кінетики (Ленгмюра) з локальним Rmax. Дані для протестованих антитіл показані нижче в таблиці 9.

Таблиця 9

## Кінетика зв'язування за допомогою зворотного аналізу Biacore

| Антитіло | PAI-1 людини                  |                      | PAI-1 макаки-крабоїда         |                      |
|----------|-------------------------------|----------------------|-------------------------------|----------------------|
|          | Швидкість дисоціації kd (1/c) | Спорідненість KD (M) | Швидкість дисоціації kd (1/c) | Спорідненість KD (M) |
| A39      | 7,09E-05                      | 1,16E-11             | ND                            | ND                   |
| A44      | 1,49E-05                      | 3,76E-12             | <= 1,0E-6                     | <=1,0E-13            |
| A75      | 4,76E-04                      | 1,20E-10             | ND                            | ND                   |
| A105     | 1,64E-04                      | 4,23E-11             | ND                            | ND                   |
| B28      | 4,61E-04                      | 6,5E-10              | ND                            | ND                   |

ND = не визначено

- 30 Кінетику зв'язування ілюстративних антитіл додатково аналізували та порівнювали в прямому аналізі Biacore з комплексом вітронектину та PAI-1. В прямому аналізі білок вітронектин людини іммобілізували на чипі CM5 в проточних комірках Fc1-Fc4 шляхом амінного зв'язування. Потім PAI-1 людини захоплювався поверхнею з вітронектином в проточних

комірках Fc2-Fc4 як ліганд. Fc1 зберігали як контрольну комірку. Антитіла розводили 2х, починаючи з 40 нМ, та вводили в Fc1-4. Аналіз даних кінетики здійснювали із застосуванням програмного забезпечення Biacore BIAevaluation. Спочатку сенсограми піддавали процедурі подвійного контролю шляхом віднімання значень контрольної комірки та значень контрольного буфера, а потім апроксимували за допомогою 1:1 моделі (Ленгмюра), яку застосовували з глобальним Rmax.

Таблиця 10

Кінетика зв'язування A44 з захопленим вітронектином людини PAI-1 людини в прямому аналізі Biacore

| Зв'язування A44 з Vn-захопленим hPAI-1 | kd (1/c)      | KD (M)         |
|----------------------------------------|---------------|----------------|
|                                        | $\leq 1,0E-6$ | $\leq 1,0E-12$ |

Дані в таблиці 10 вказують на те, що A44 зв'язує вільний PAI-1 людини, а також PAI-1 в комплексі з вітронектином.

Приклад 9. Функціональний аналіз на первинних клітинах людини

Для додаткового дослідження здатності кожного антитіла відновлювати подальше утворення плазміну в первинних клітинах людини застосовували аналіз утворення плазміну. Для тестування в даному аналізі застосовували лише антитіла, які продемонстрували високу ефективність у хромогенному аналізі та достатню спорідненість в аналізі Biacore.

У день 1 первинні зірчасті клітини печінки людини (Sciencell CA, кат. № SC5300) висівали з розрахунку 20000 клітин/лунку в мінімальному середовищі (DMEM Gibco+glutamax-1 4,5 г/л D-глюкози, піруват (31966-021), 0,2 % фетальної бичачої сироватки gold PAA (A11-152)) при 37 °C у 5 % CO<sub>2</sub>. У день 2 для нейтралізації активності PAI-1 антитіла попередньо інкубували з рекомбінантним PAI-1 (Molecular Innovation, кат. № IGLYHPAI-A, рекомбінантний глікозилований PAI-1 людини, кінцева концентрація 5 нМ) протягом 15 хвилин за кімнатної температури. У той самий час tPA (Molecular Innovations (кат. № HTPA-TC), 5 нМ у DMEM без фенолового червоного) інкубували з клітинами протягом 15 хвилин при 37 °C. Після відмивання незв'язаного tPA суміші PAI-1/mAb додавали до клітин та потім вимірювали залишкову активність tPA шляхом додавання субстратної суміші глутамін-плазміногену (Glu-Pg: Sigma, кат. № 9001-91-6; кінцева концентрація 0,5 мкМ) та хромогенного субстрату для плазміну: (CBS00.65 Stago, кат. № 00128, кінцева концентрація 0,5 мМ).

Активацію плазміногену в плазмін визначали шляхом зчитування кінетики кожні 45 секунд при A405/492 нм із застосуванням спектрофотометра (IEMS, Thermofisher), термостатованого при 37 °C. За допомогою програмного забезпечення Biolise (Thermofischer) розраховували максимальну швидкість розщеплення хромогенного субстрату: утворення плазміну, виражене як Vmax: максимальна швидкість при A405/492 нм в хвилину (mDO/хв.). Потім розраховували інгібування PAI-1 із застосуванням як контролю tPA окремо (100 % інгібування), так і PAI-1 (без mAb, як відсутність інгібування) та наносили на графік за допомогою програмного забезпечення швидкої дії Biostat для розрахунку IC<sub>50</sub> та I<sub>max</sub>.

Таблиця 11

Утворення плазміногену в первинних зірчастих клітинах печінки людини

| Антитіло | Середнє значення IC <sub>50</sub> abs ± sem (нМ) | Середнє значення I <sub>max</sub> (%) | n |
|----------|--------------------------------------------------|---------------------------------------|---|
| A44      | 3,32±0,34                                        | 97                                    | 7 |
| A39      | 5,4±0,8                                          | 99                                    | 3 |
| A71      | 8,61±3,6                                         | 90                                    | 3 |
| A75      | 22,6±8,2                                         | 66                                    | 4 |
| A105     | 27±7,8                                           | 88                                    | 3 |
| B28      | 7,28±2,7                                         | 90                                    | 3 |
| B109     | 6,11±0,88                                        | 94                                    | 3 |
| C26      | Неактивне                                        | n/a                                   | 2 |
| C45      | 6,5±1,11                                         | 97                                    | 4 |

| Антитіло | Середнє значення IC50abs ± sem (нМ) | Середнє значення I <sub>max</sub> (%) | n |
|----------|-------------------------------------|---------------------------------------|---|
| E16      | 4,74±2,27                           | 95                                    | 3 |
| E21      | Неактивне                           | n/a                                   | 3 |
| 33H1     | 22,92±12                            | 56                                    | 3 |
| 33B8     | Неактивне                           | n/a                                   | 3 |

n/a = не застосовуване

Приклад 10. Пошук епітопу для зв'язування антитілом за допомогою конкурентного аналізу Bıascore

Вибрану групу антитіл до PAI-1 з кращими активностями зв'язування та блокування досліджували щодо їх потенційних епітопів для зв'язування в конкурентному аналізі Bıascore. В аналізах нові виявлені антитіла, а також декілька комерційно доступних антитіл до PAI-1 з відомим сайтом зв'язування на PAI-1 людини готували для проведення аналізу конкуренції за зв'язування з білком PAI-1 людини. Кожне антитіло іммобілізували на проточній комірці в чипі CM5 Bıascore із застосуванням стандартної реакції амінного зв'язування. Усі протестовані антитіла, за винятком клону B28, зберігали активність сайту зв'язування після амінного зв'язування. Білок PAI-1 людини захоплювався іммобілізованим антитілом на чипі з подальшим введенням кожного антитіла як досліджуваної речовини. Лише досліджувані антитіла, що мають сайти зв'язування на PAI-1 людини, які відрізняються від таких іммобілізованого антитіла, демонструватимуть додаткові сигнали зв'язування в Bıascore. Експерименти з аналізом конкуренції повторювали двічі для кожного іммобілізованого антитіла, та результати показані в наступній таблиці.

Таблиця 12

Зведена інформація за епітопами для зв'язування на основі конкурентного аналізу Bıascore

| Досліджуване антитіло   |      |      |      |     |      |     |     |      |     |     |     |     |     |
|-------------------------|------|------|------|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Іммобілізоване антитіло |      | 33H1 | 33B8 | A44 | 31C9 | A71 | A75 | B109 | B28 | C45 | C26 | E16 | E21 |
|                         | 33H1 | c/c  | b/c  | b/b | b/b  | b/b | b/b | b/b  | b/b | b/b | c/c | b/b | b/c |
|                         | 33B8 | b/b  | c/c  | b/b | b/c  | b/b | b/b | b/b  | p/b | b/b | b/b | b/b | b/b |
|                         | A44  | b/b  | b/b  | c/c | b/b  | b/b | b/b | b/b  | b/b | c/c | b/b | c/c | b/b |
|                         | 31C9 | nt   | nt   | nt  | nt   | nt  | nt  | nt   | nt  | nt  | nt  | nt  | nt  |
|                         | A71  | b/b  | b/c  | b/b | b/b  | c/c | c/c | b/b  | b/b | b/b | b/b | b/b | b/b |
|                         | A75  | b/b  | p/p  | b/b | p/p  | c/c | c/c | b/b  | b/b | b/b | b/b | b/b | b/b |
|                         | B109 | b/b  | c/c  | b/b | b/b  | b/b | b/b | c/c  | c/c | b/b | b/b | b/c | b/b |
|                         | B28  | -    | -    | -   | -    | -   | -   | -    | -   | -   | -   | -   | -   |
|                         | C45  | b/b  | p/b  | c/c | b/b  | b/b | b/b | b/b  | b/b | c/c | b/b | b/b | b/b |
|                         | C26  | b/c  | p/c  | b/b | b/b  | b/b | b/b | b/b  | b/c | b/b | c/c | b/b | c/c |
|                         | E16  | b/b  | p/b  | b/c | b/b  | b/b | p/b | b/b  | b/c | b/b | b/b | c/c | b/b |
|                         | E21  | b/c  | b/c  | b/b | b/c  | b/c | b/b | b/b  | b/c | b/b | b/c | b/b | c/c |

p=часткове зв'язування досліджуваним антитілом, c=конкуренція з досліджуваним антитілом, b=зв'язування досліджуваним антитілом; "–" – " = відсутність зв'язування PAI-1 з іммобілізованим антитілом; nt = не тестували.

Якщо A44 є іммобілізованим та зв'язує PAI-1, C45 (досліджуване антитіло) не здатне зв'язуватися з PAI-1, який зв'язаний за допомогою A44. Отже, C45 конкурує за той самий сайт



зв'язування, завдяки якому A44 зв'язується на PAI-1 (позначено в таблиці 12 як "с/с") або зв'язування A44 з PAI-1 перешкоджає зв'язуванню C45 з PAI-1. Даний аналіз підтверджується, якщо експеримент повторюють у зворотному порядку. А саме, якщо C45 є іммобілізованим антитілом та зв'язується з PAI-1, A44 як досліджуване антитіло не є здатним зв'язувати PAI-1, який зв'язаний з C45 (позначено в таблиці 12 як "с/с"). В аналогічному аналізі A71 та A75 конкурують за той самий сайт на PAI-1. Аналіз Biscore підтвердив, що A44 та C45, а також A71 та A75 конкурують або перешкоджають одне одному під час зв'язування з PAI-1.

Навпаки, комерційно доступні антитіла, 33H1 та 33B8, не конкурують з A44. Якщо A44 є іммобілізованим антитілом та зв'язується з PAI-1, як 33H1, так і 33B8 усе ще здатні зв'язуватися з PAI-1, який зв'язаний з A44 (позначено як "b/b" в таблиці 12). Це підтверджується у зворотному експерименті. Якщо PAI-1 є зв'язаним з іммобілізованим 33H1 або іммобілізованим 33B8, A44 все ще є здатним зв'язуватися з PAI-1. Таким чином, комерційні антитіла 33H1 та 33B8 не конкурують або не перешкоджають зв'язуванню A44 з PAI-1.

Цікаво, що деякі іммобілізовані антитіла (тобто B109) блокували досліджуване антитіло (тобто 33B8) від зв'язування з захопленим білком PAI-1; але за умови заміни положення іммобілізованого антитіла на досліджуване антитіло (наприклад, перегортання пари на чипі) пара антитіл більше не конкурувала між собою за зв'язування з PAI-1. Наприклад, якщо B109 було іммобілізованим антитілом, зв'язаним з PAI-1, 33B8 було нездатним зв'язувати PAI-1. Проте, якщо 33B8 було іммобілізованим антитілом, що зв'язує PAI-1, B109 було здатним зв'язувати PAI-1. Одним можливим поясненням цього результату є наступне: якщо іммобілізоване антитіло є зв'язаним з PAI-1, PAI-1 може переходити до конформації, несприятливої для другого або досліджуваного антитіла, та запобігати зв'язуванню досліджуваного антитіла (наприклад, якщо B109 є іммобілізованим антитілом, а 33B8 є досліджуваним антитілом). Проте, коли пару антитіл міняють місцями, іммобілізоване антитіло може зв'язуватися таким чином, що конформація PAI-1 практично не змінюється, внаслідок цього забезпечується можливість зв'язування досліджуваного антитіла зі зв'язаним PAI-1 (тобто досліджуване антитіло B109 здатне зв'язувати PAI-1, який є зв'язаним іммобілізованим антитілом 33B8). Отже, конкуренція, яку спостерігали між 33B8 та B109, зумовлена не перекриттям сайтів зв'язування на PAI-1, а, ймовірно, зумовлена конформаційною зміною в PAI-1 після зв'язування з B109.

Іншим цікавим спостереженням було те, що B28 втрачає здатність зв'язування з PAI-1 людини після іммобілізації шляхом амінного зв'язування, що дозволяє припустити, що CDR-ділянки B28 включають амінокислоти з первинною аміногрупою(ами).

Приклад 11. Добір моноклонального антитіла миші для гуманізації

В таблиці 13 показана зведена інформація даних *in vitro*, що характеризують найбільш активні моноклональні антитіла з п'яти здійснених процедур злиття. На основі цих даних для гуманізації відібрали A44, оскільки A44 було найбільш ефективним антитілом у хромогенному аналізі та в утворенні плазміну, при цьому мало найвищу спорідненість в аналізі Biscore.

Таблиця 13

Зведена інформація стосовно спорідненості та ефективності моноклональних антитіл проти глікозильованого PAI-1 людини

| Антитіло      | Хромогенні аналізи (нМ) | Утворення плазміну (нМ) | Kd спорідненості (М) | Механізм дії     |
|---------------|-------------------------|-------------------------|----------------------|------------------|
| A39 (IgG1/k)  | 1,70, 1,00              | 5,4                     | 1,16E-11             | SH або неактивне |
| A44 (IgG1/k)  | 1,66, 1,50, 1,70        | 3,32                    | 4,20E-14             | Субстрат         |
| A71 (IgG1/k)  | Приблизно 4,00          | 8,61                    | ND                   | SH або неактивне |
| A75 (IgG2a/k) | 3,00                    | 22,6                    | 1,20E-10             | SH або неактивне |
| A105 (IgG1/k) | 7,00                    | 27,0                    | 4,20E-11             | SH або неактивне |
| B28 (IgG2b/k) | 1,80                    | 7,28                    | 6,5E-10              | SH або неактивне |

| Антитіло | Хромогенні аналізи (нМ) | Утворення плазміну (нМ) | Kd спорідненості (М) | Механізм дії |
|----------|-------------------------|-------------------------|----------------------|--------------|
|----------|-------------------------|-------------------------|----------------------|--------------|

|               |      |           |    |                  |
|---------------|------|-----------|----|------------------|
| B109 (IgG1/k) | 0,23 | 6,11      | ND | SH або неактивне |
| C26 (IgG1/k)  | 5,00 | Неактивне | ND | Субстрат         |
| C45 (IgG2b)   | 0,5  | 10,6      | ND | Субстрат         |
| E16 (IgG1)    | 1,1  | 4,74      | ND | SH або неактивне |
| E21 (IgG2b)   | 1,3  | 216,0     | ND | Субстрат         |

SH = стерична перешкода; ND = не визначено.

Послідовності важкого та легкого ланцюга, показані в таблиці 1, піддавали вирівнюванню на фігурі 12, та CDR, визначені за допомогою IMGT, виділені жирним шрифтом. На основі даних *in vitro*, наведених у таблиці 13, для гуманізації відібрали A44.

5 Приклад 12. Конструювання антитіла Fab A44 до PAI-1: гуманізація, стабілізація та піддавання мутації небажаних мотивів послідовності

Декілька підходів, що обговорюються нижче, застосовували для гуманізації, стабілізації та оптимізації мотивів послідовності антитіла A44 миші проти PAI-1.

1) Гуманізація

10 Застосовуваний протокол гуманізації був описаний у PCT/US08/74381 (US20110027266), що включена в даний документ шляхом посилання в своїй повноті. Послідовності варіабельної ділянки легкого ланцюга (VL) та варіабельної ділянки важкого ланцюга (VH) A44 миші застосовували для побудови гомологічної моделі легкого ланцюга (LC) та важкого ланцюга (HC) антитіла A44 до PAI-1 у Molecular Operating Environment (MOE; v. 2010.10; Chemical Computing Group). Застосовували наступні шаблони: каркасна ділянка легкого ланцюга – 1D5I (94 % ідентичність у каркасних ділянках), каркасна ділянка важкого ланцюга – 3KSO (96 % ідентичність у каркасних ділянках), L1 – 1D5I (94 % ідентичність), L2 – 1D5I (94 % ідентичність), L3 – 1AXS (72 % ідентичність), H1 – 1IC7 (82 % ідентичність), H2 – 1MBU (68 % ідентичність) та H3 – 2WDB (62 % ідентичність). H3-петлю було особливо важко моделювати, оскільки першим залишком є Trp. 2WDB, хоча є більш короткою петлею, також несе Trp на початку петлі та таку саму послідовність Phe-Asp-Tyr на кінці H3-петлі. Відтворювали бічні ланцюги Glu-105 (LC) та His-99 та наступну модель будували із застосуванням способу мінімізації енергії за допомогою стандартних процедур, реалізованих у MOE. Далі здійснювали моделювання молекулярної динаміки (MD) мінімізованої 3D-гомологічної моделі A44 миші з обмеженнями щодо кістяка білка за температури 500 K протягом 1,1 наносекунди (нс) з неявним розчинником Generalized Born. Десять різноманітних конформацій отримали з цього першого прогону MD через кожні 100 пікосекунд (пс) протягом останньої 1 нс. Потім кожну з цих різноманітних конформацій піддавали MD-моделюванню з відсутністю обмежень щодо кістяка білка та за температури 300 K протягом 2,3 нс. Для кожного з 10 прогонів MD останні 2000 моментальних знімків, один у кожну пс, з MD-траєкторії застосовували для розрахунку, для кожної амінокислоти A44 миші, її середньоквадратичного відхилення (rmsd) порівняно з положенням контрольного медоїда. Шляхом порівняння середнього значення rmsd за 10 окремими прогонами MD вказаної амінокислоти з загальним середнім значенням rmsd всіх амінокислот A44 вирішували, чи є амінокислота достатньо гнучкою, як видно під час MD, щоб вважатися такою, що, ймовірно, взаємодіє з рецепторами T-клітин та відповідає за активацію імунної відповіді. В антитілі A44 миші як гнучкими ідентифікували 37 амінокислот, за винятком CDR та їх безпосереднього оточення в межах 5 Å.

Потім рухливість 62 найбільш гнучких амінокислот A44 миші протягом 20 нс (10 × 2 нс) порівнювали з рухливістю відповідних гнучких амінокислот з 49 гомологічних моделей антитіл зародкового типу людини, для кожної з яких проводили MD-моделювання з 10 × 2 нс. 49 моделей антитіл зародкового типу людини створювали шляхом систематичного комбінування 7 найбільш поширених легких ланцюгів антитіл зародкового типу людини (vk1, vk2, vk3, vk4, v-лямбда-1, v-лямбда-2, v-лямбда-3) та 7 найбільш поширених важких ланцюгів антитіл зародкового типу людини (vh1a, vh1b, vh2, vh3, vh4, vh5, vh6). Антитіло зародкового типу людини vk1-vh2 демонструвало 4D-подібність своїх гнучких амінокислот зі значенням 0,58 при порівнянні з гнучкими амінокислотами антитіла A44 миші; отже, антитіло зародкового типу vk1-vh2 застосовували для гуманізації антитіла A44, при цьому зосередилися на гнучких амінокислотах. Антитіло зародкового типу людини v-лямбда-3-vh4 демонструвало другу за величиною 4D-подібність, що становила 0,57, та його також застосовували як основу для гуманізації антитіла A44. Для визначення попарних асоціацій амінокислот між амінокислотами A44 миші та vk1-vh2 2 послідовності вирівнювали, виходячи з оптимального 3D-накладання

альфа-вуглецевих атомів у 2 відповідних гомологічних моделях. Визначення попарних асоціацій амінокислот між A44 миші та v-лямбда-3-vh4 здійснювали аналогічним чином. На фігурі 13 показане вирівнювання легкого ланцюга A44 миші з vk1 та v-лямбда-3. На фігурі 14 показане вирівнювання важкого ланцюга A44 миші з vh2 та vh4.

5 2) Стабілізація

а) Підхід, заснований на знаннях

Амінокислоти легкого та важкої ланцюгів з низькою частотою поширеності порівняно з їх відповідними канонічними послідовностями, за винятком CDR, запропонували для здійснення мутації з отриманням амінокислот, що зустрічаються найбільш часто ( $\Delta\Delta G_{th} > 0,5$  ккал/моль; (E. Monsellier, H. Bedouelle. J. Mol. Biol. 362, 2006, р. 580-593)). Перший перелік консенсусних мутацій для LC та HC був скорочений до амінокислот, що зустрічаються у найбільш близькому антитілі зародкового типу людини (vk1-vh2). Передбачувані заміни в безпосередній близькості від CDR (5 ангстрем, зона "Vernier" (J. Mol. Biol. 224, 1992, р. 487-499)) виключали з розгляду. Внаслідок цього одержали дві стабілізуювальні мутації в LC (див. таблицю 15) та п'ять стабілізуювальних мутацій в HC (див. таблицю 16). Інші критерії брали до уваги для розгляду цих мутацій щодо потенційної стабілізації антитіла A44 до PAI-1. Ці критерії являли собою сприятливу зміну гідрофобності на поверхні або механіку молекули, виходячи з передбаченої стабілізації мутанта. Також про додаткові стабілізуювальні мутації, що були успішними, повідомлялося в літературі (E. Monsellier & H. Bedouelle, J. Mol. Biol., 362, 2006, р. 580-593; B.J. Steipe et al. J. Mol. Biol, 1994, 240, 188-192), та їх розглядали (див. таблиці 17 та 18), проте, не рекомендували ніяких додаткових мутацій.

Таблиця 15

Стабілізуювальні зміни, запропоновані у легкому ланцюзі

| Залишок | Запропонована зміна | Розрахований $\Delta\Delta G_{th}$ | Прийнята зміна                                 |
|---------|---------------------|------------------------------------|------------------------------------------------|
| Lys-3   | Val                 | 2,23998                            | Ні – відсутня в послідовності зародкового типу |
| Met-11  | Leu                 | 0,766432                           | Вже змінена під час гуманізації                |
| Tyr-12  | Ser                 | 2,04389                            | Вже змінена під час гуманізації                |
| Leu-36  | Val                 | 2,17091                            | Ні - Vernier                                   |
| Lys-42  | Gln                 | 0,939652                           | Ні – відсутня в послідовності зародкового типу |
| Thr-46  | Leu                 | 2,01966                            | Ні - Vernier                                   |
| Gln-69  | Thr                 | 2,16357                            | Ні - Vernier                                   |
| Tyr-80  | Ala                 | 2,92454                            | Вже змінена під час гуманізації                |
| Met-83  | Leu                 | 2,57007                            | Вже змінена під час гуманізації                |
| Gly-84  | Ala                 | 0,597822                           | Так                                            |
| Ile-85  | Thr                 | 1,27255                            | Так                                            |

Таблица 16

Стабілізувальні зміни, запропоновані у важкому ланцюзі

| Залишок | Запропонована зміна | Розрахований $\Delta\Delta G_{th}$ | Прийнята зміна                                 |
|---------|---------------------|------------------------------------|------------------------------------------------|
| Glu-1   | Gln                 | 0,562423                           | Так                                            |
| Met-2   | Val                 | 3,41361                            | Ні – Vernier                                   |
| Glu-6   | Gln                 | 0,655069                           | Ні – відсутня в послідовності зародкового типу |
| Pro-9   | Ala                 | 0,505324                           | Ні – відсутня в послідовності зародкового типу |
| Ser-10  | Glu                 | 2,40018                            | Вже змінена під час гуманізації                |
| Gln-16  | Ala                 | 1,11244                            | Ні – відсутня в послідовності зародкового типу |
| Thr-17  | Ser                 | 1,79135                            | Ні – відсутня в послідовності зародкового типу |
| Leu-18  | Val                 | 0,760243                           | Ні – відсутня в послідовності зародкового типу |
| Ser-19  | Lys                 | 1,20539                            | Ні – відсутня в послідовності зародкового типу |
| Thr-21  | Ser                 | 1,3289                             | Ні – відсутня в послідовності зародкового типу |
| Ser-23  | Lys                 | 1,82798                            | Ні – відсутня в послідовності зародкового типу |
| Val-24  | Ala                 | 1,35286                            | Ні – відсутня в послідовності зародкового типу |
| Thr-25  | Ser                 | 1,72008                            | Так                                            |
| Ile-37  | Val                 | 1,66985                            | Ні – відсутня в послідовності зародкового типу |
| Arg-38  | Lys                 | 0,568427                           | Ні – відсутня в послідовності зародкового типу |
| Lys-39  | Gln                 | 2,27769                            | Так                                            |
| Phe-40  | Arg                 | 1,81199                            | Ні – відсутня в послідовності зародкового типу |
| Asn-43  | Lys                 | 1,42568                            | Вже змінена під час гуманізації                |
| Lys-44  | Gly                 | 2,01606                            | Вже змінена під час гуманізації                |
| Tyr-47  | Trp                 | 2,62805                            | Ні – Vernier                                   |
| Met-48  | Ile                 | 1,67766                            | Ні – Vernier                                   |
| Pro-61  | Glu                 | 1,08569                            | Ні – відсутня в послідовності зародкового типу |

| Залишок | Запропонована зміна | Розрахований $\Delta\Delta G_{th}$ | Прийнята зміна                                 |
|---------|---------------------|------------------------------------|------------------------------------------------|
| Ser-62  | Lys                 | 0,840485                           | Ні – відсутня в послідовності зародкового типу |
| Leu-63  | Phe                 | 1,25428                            | Ні – відсутня в послідовності зародкового типу |
| Arg-66  | Lys                 | 0,528008                           | Ні – відсутня в послідовності зародкового типу |
| Ile-67  | Ala                 | 1,93707                            | Ні – Vernier                                   |
| Ser-68  | Thr                 | 1,36475                            | Так                                            |
| Ile-69  | Leu                 | 0,550185                           | Ні – Vernier                                   |
| Arg-71  | Val                 | 0,61536                            | Ні – Vernier                                   |
| Asn-72  | Asp                 | 3,40632                            | Так                                            |
| Thr-73  | Lys                 | 0,5597                             | Ні – Vernier                                   |
| Lys-75  | Ser                 | 0,81321                            | Ні – відсутня в послідовності зародкового типу |
| Asn-76  | Ser                 | 0,744463                           | Ні – відсутня в послідовності зародкового типу |
| Gln-77  | Thr                 | 1,30652                            | Ні – відсутня в послідовності зародкового типу |
| Tyr-78  | Ala                 | 2,54699                            | Ні – Vernier                                   |
| Val-85  | Leu                 | 1,71111                            | Ні – відсутня в послідовності зародкового типу |
| Thr-87  | Ser                 | 1,30394                            | Ні – відсутня в послідовності зародкового типу |
| Thr-90  | Ser                 | 0,557686                           | Ні – відсутня в послідовності зародкового типу |
| Thr-92  | Val                 | 1,13795                            | Ні – відсутня в послідовності зародкового типу |

Таблиця 17

## Комбінації оцінених стабілізувальних мутацій

| Комбінація*               | Рекомендовані додаткові зміни                        | Прийнята зміна |
|---------------------------|------------------------------------------------------|----------------|
| L1 (40→P & 42→Q)          | Відсутні – жодна не змінена                          | Змін нема      |
| L2 (45→K)                 | Відсутні – вже K45                                   | Відсутня       |
| L3 (74→T)                 | Відсутні – вже T74                                   | Відсутня       |
| L4 (76→S)                 | Відсутні – вже S76                                   | Відсутні       |
| L5 (84→A, 85→T)           | Відсутні – вже змінені під час стабілізації          | Відсутні       |
| H1 (15→G)                 | Відсутні – відсутні в послідовності зародкового типу | Відсутні       |
| H2 (61→E, 62→Lys, 63→Phe) | Відсутні в послідовності зародкового типу            | Відсутні       |
| H3 (86→T, 87→S, 88→E)     | 87 та 88 відсутні в послідовності зародкового типу   | Відсутні       |
| S1 (L1 & L5)              | Відсутні                                             | Ні             |
| S2 (H1 & H3)              | Відсутні                                             | Ні             |

\*Примітка. Для посилання на залишки застосовували нумерацію з послідовності

Таблиця 18\*.

## Оцінені мутації стабілізації

| Залишок легкого ланцюга* | Рекомендовані додаткові зміни | Прийнята зміна                                |
|--------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------------|
| 15→L                     | V15→L                         | Hi – V15 в послідовності зародкового типу Vk1 |
| 90→Q                     | Відсутні – вже Q90            | Відсутні                                      |
| 32→Y                     | Відсутні – вже Y32            | Відсутні                                      |
| 106→I                    | Відсутні – вже I106           | Відсутні                                      |
| 63→S                     | Відсутні – вже S63            | Відсутні                                      |
| 21→I                     | Відсутні – вже M21            | Відсутні                                      |

\*Примітка. Для посилання на залишки застосовували нумерацію з послідовності

## b) Підходи на основі 3D та MD

5 Про підходи на основі 3D та MD повідомлялося раніше (Seco J., Luque F.J., Barril X., J. Med. Chem. 2009 Apr 23;52(8):2363-71; Malin Jonsson et al., J. Phys. Chem. B 2003, 107:5511-5518). Гідрофобні ділянки антитіла однозначно ідентифікували шляхом аналізу моделювання молекулярної динаміки Fab у бінарному розчиннику (20 % ізопропанолу у воді, моделювання одержання при 20 нс). Виконували додатковий аналіз із застосуванням карти гідрофобної поверхні в межах програмного забезпечення maestro від Schrodinger (v. 8.5.207). Поверхня

10 білка, проаналізована за допомогою цих двох способів, є цілком гідрофільною. Навіть за допомогою обох цих методик не встановлена наявність залишків, що беруть участь у будь-яких гідрофобних зонах на поверхні, отже, не пропонували жодних мутацій, спрямованих на зниження агрегації.

## 3) Гуманізація шляхом трансплантації

15 Про гуманізацію із застосуванням методик трансплантації повідомлялося раніше (P. T. Jones, P.H. Dear, J. Foote, M.S. Neuberger, G. Winter, Nature 1986, 321:522-525). Гуманізацію розпочинали шляхом ідентифікації двох найбільш близьких послідовностей зародкового типу людини з варіабельним доменом легкого та важкого ланцюгів антитіла A44 до PA11. Це проводили шляхом здійснення пошуку BLAST відносно всіх послідовностей зародкового типу

20 людини, які систематично нумерували (всі можливі комбінації V- та J-домени для каппа- та лямбда-ланцюгів; V-, D- та J-домени для важких ланцюгів). Пошуки BLAST здійснювали із застосуванням інтранет-програми, зв'язаної з сервісом Пошук та аналіз інформації про послідовність (SIRA), наданим Національним центром біотехнологічної інформації США (NCBI).

25 Ідентифікували найбільш близькі послідовності зародкового типу людини, які мали 70 % та 67 % ідентичність послідовності з варіабельним доменом легкого та важкого ланцюгів антитіла A44 до PA11, відповідно. Із застосуванням внутрішніх послідовностей зародкового типу з VBASE виявили, що легкий ланцюг був близьким до локуса Vk-O18 (приблизно 64 % ідентичність), а важкий ланцюг був близьким до локуса 4-30 (приблизно 69 % ідентичність) з підсімейства VH4. CDR-ділянки (на основі Kabat) та залишки Vernier позначені курсивом у легкому ланцюзі mA44

30 (A44LC) та в IGVK1-33-01\_IGKJ4-01 (IGVK1). Залишки Vernier, як визначено в J. Mol. Biol., 1992, 224, 487, підкреслені. Мутації гуманізації (виділені жирним шрифтом) одержували шляхом здійснення попарного порівняння двох підданих вирівнюванню послідовностей, за винятком CDR та залишків з зони Vernier (також підкреслені в антитілі миші), як визначено вище. T46L та Q69T з легкого ланцюга миші та M2V у важкому ланцюзі миші (залишок з зони Vernier)

35 піддавали мутації у переважно консервативну послідовність зародкового типу людини як одну частину гуманізації за допомогою підходу трансплантації (LC5a, HC5a). В іншому варіанті здійснення ці три залишки з зони Vernier залишали такими, як в оригінальній послідовності миші (LC5b, HC5b).

mA44 – легкий ланцюг (SEQ ID NO: 141)

DKMTQSPSS MYASLGERTV ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GKSPKTLIYR  
ANRSVDGVPS RFSGSGSGQD ISLTISSLEY EDMGIYYCLQ YDEFPPTEGG  
 GTKLEIK

IGKV1-33-01\_IGKJ4-01 (SEQ ID NO: 107)

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCQASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYD  
 ASNLETGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLPQ EDIATYYCQQ YDNLPLTFGG  
 GTKVEIK

mA44 – важкий ланцюг (SEQ ID NO: 140)

EMQLQESGPS LVKPSQTLSL TCSVTGDSMT NGIWNWIRKF  
 PGNKLEYMGY ITYSGSTYN PSLKGRISIT RNTSKNQFYL  
 QLSSVTTEDT ATYYCARWHY GSPYFDYWG QGTTLTVSS

IGHV4-59-02\_IGHD6-13-01\_IGHJ4-02 (SEQ ID NO: 108)

QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSVS SYYWSWIRQP  
 PGKGLEWIGY IVYSGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL  
 KLSSVTAADT AVYYCARGYS SSWYYFDYWG QGTTLTVSS

Ідентифікували наступні найбільш близькі послідовності зародкового типу людини, які мали 59 % та 58 % ідентичність послідовності з варіабельним доменом легкого та важкого ланцюгів антитіла A44 до PA11, відповідно. Із застосуванням внутрішніх послідовностей зародкового типу з VBASE виявили, що цей легкий ланцюг був близьким до локуса VκIII-L6 (~56 % ідентичність), а важкий ланцюг був близьким до локуса 6-01 з підсімейства VH6. CDR-ділянки (на основі Kabat) та ділянки Vernier позначені курсивом. Ділянки Vernier (як визначено в J. Mol. Biol., 1992, 224, 487) підкреслені. Мутації гуманізації одержували шляхом здійснення попарного порівняння 2 підданих вирівнюванню послідовностей, за винятком CDR та залишків з зони Vernier (також підкреслені в антитілі миші), як визначено вище, та вони виділені жирним шрифтом.

mA44 – легкий ланцюг (SEQ ID NO: 141)

DKMTQSPSS MYASLGERTV ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GKSPKTLIYR  
ANRSVDGVPS RFSGSGSGQD ISLTISSLEY EDMGIYYCLQ YDEFPPTEGG  
 GTKLEIK

IGKV3-11-02\_IGKJ4-01 (SEQ ID NO: 143)

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD  
 ASNRATGIPA RFSGSGSGRD FTLTISSELP EDFAVYYCQQ RSNWPLTFGG  
 GTKVEIK

mA44 – важкий ланцюг (SEQ ID NO: 140)

EMQLQESGPS LVKPSQTLSL TCSVTGDSMT NGIWNWIR  
 KFPNGKLEYM GYIT YSGS TYNPSLKGR ISITRNTSKN  
QFYLQLSSVT TEDTATYYCA RWHYGSPYF DYWGQGTTLT VSS

IGHV6-1-02\_IGHD6-13-01\_IGHJ4-02 (SEQ ID NO: 144)

QVQLQQSGPG LVKPSQTLSL TCAISGDSVS SNSAAWNWIR  
 QSPSRGLEWL GRYYRSKWY NDYAVSVKSR ITENPDTSKN  
 QFSLQLNSVT PEDTAVYYCA RGYSSSWYYF DYWGQGTILVT VSS

15 4) Піддання мутації небажаних мотивів послідовності

Розглядали наступні мотиви послідовностей: Asp-Pro (кислотонестійкий зв'язок), Asn-X-Ser/Thr (глікозилювання, X=будь-яка амінокислота, крім Pro), Asp-Gly/Ser/Thr (утворення сукцинімід/iso-asr в гнучких ділянках), Asn-Gly/His/Ser/Ala/Cys (поверхневі сайти дезамідування) та Met (окиснення в поверхневих зонах). VL- та VH-домени антитіла A44 миші до PAI1 несуть два потенційні сайти глікозилювання: N<sup>52</sup>RS (у CDR2) у LC та N<sup>72</sup>TS у HC. Один поверхневий сайт дезамідування присутній у CDR1 HC (N<sup>31</sup>G). Три потенційних сайти утворення сукцинімиду ідентифікували в оригінальній послідовності антитіла миші: D<sup>56</sup>G (кінець CDR2) у LC та D<sup>27</sup>S (у CDR1), а також D<sup>89</sup>T у HC. Обидва проблемні мотиви LC, N<sup>52</sup>RS та D<sup>56</sup>G, містяться у CDR2. Оскільки ці мутації перебувають у CDR, їх усували шляхом мутації в двох запропонованих сконструйованих послідовностях нижче (LC2 та LC4). N<sup>52</sup> піддавали консервативній мутації у Gln, а D<sup>56</sup> піддавали мутації в Glu. В HC існують чотири проблемних залишки. Перші два перебувають у CDR1: потенційний сайт утворення сукцинімиду, D<sup>27</sup>S, та сайт дезамідування, N<sup>31</sup>G. Два додаткові проблемні мотиви також перебувають у третій каркасній ділянці. У CDR1 D<sup>27</sup> піддавали мутації в E для уникнення утворення сукцинімиду, у той час як N<sup>31</sup> змінювали на Q. N<sup>72</sup> та D<sup>89</sup> змінювали на Q та E, відповідно. Ці проблемні мотиви усували в сконструйованих послідовностях HC2a та HC4, описаних нижче. Варіант HC2b містить лише мутацію сайту дезамідування, N<sup>31</sup>G.

Одержані гуманізовані послідовності піддавали пошуку за допомогою blast щодо подібності послідовностей у порівнянні з базою даних IEDB (знаходиться в мережі Інтернет на сайті [immuneepitope.com](http://immuneepitope.com), версія червень 2009 р.; Vita R., Zarebeski L., Greenbaum J.A., Emami H., Hoof I., Salimi N., Damle R., Sette A., Peters B. The immune epitope database 2.0 Nucleic Acids Res. 2010, Jan, 38 (Database issue):D854-62. Epub 2009, Nov 11), аби переконатися, що жодна з послідовностей не містить яких-небудь відомих епітопів для В- або Т-клітин людини (ідентичність послідовності, що становила 70 %, застосовували як порогове значення для результатів, одержаних за допомогою пошуку BLAST, та розглядали лише результати для виду людина). DeClerck, et al. (публікація міжнародної заявки WO 2002034776) розкрили епітопи для зв'язування антитіла в PAI-1, жоден з яких не був проблематичним з точки зору епітопів, розкритих в даному документі.

Для LC A44 миші існує один епітоп людини з Kirschmann et al. (The Journal of Immunology, 1995, 155, 5655-5662). Він має ~71 % ідентичність на відрізку з 14 амінокислот, як видно нижче. Заявлена послідовність являла собою часткову послідовність, яка не була підтверджена за допомогою мас-спектрометрії. Жодних даних про зв'язування для цього пептиду не повідомляли. Цей епітоп представлений у всіх запропонованих варіантах LC. Жодних потенційних проблематичних епітопів не ідентифікували, якщо подібний пошук здійснювали для HC.

5) Оригінальні послідовності з варіабельних доменів антитіла до PAI1

CDR позначені жирним шрифтом, а ділянки Vernier (як визначено за Foote & Winter, J. Mol. Biol., 1992, 224:487-499) підкреслені.

Легкий ланцюг (SEQ ID NO: 142)

```
1 DIKMTQSPSS MYASLGERVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GKSPKTLIYR
51 ANRSVDCVPS RFSGSGSGQD YSLTISSLEY EDMGIYYCLQ
YDEFPTIEGG
```

Показник ідентичності з послідовністю зародкового типу = 70 % з IGKV1-33-01\_IGKJ4-01 [Vκ-O18]

Важкий ланцюг (SEQ ID NO: 140)

```
1 EMQLQESGPS LVKPSQTLSL TCSVTGDSMT NGYWNWIRKF
PGNKLEYMGY
51 ITYSGSTYYN PSLKGRISIT RNISKNQYYL QLSSVTTEDT
ATYYCARWHY
101 GSPYYFDYWG QGTTLTVSS
```

Показник ідентичності з послідовністю зародкового типу = 67 % з IGHV4-59-02\_IGHD6-137-01\_IGHJ4-02 [VH4 4-30]

6) Сконструйовані послідовності



Підходи 4D-гуманізації та трансплантації застосовували до двох найбільш близьких послідовностей зародкового типу людини

а) Сконструйовані послідовності легкого ланцюга

LC1a містить сім мутацій, що походять від способу 4D-гуманізації із застосуванням найбільш близької послідовності зародкового типу,  $\nu k1$ . LC1b має 12 мутацій, що походять від 4D-гуманізації з другою найбільш близькою послідовністю зародкового типу людини,  $\nu 13$ . LC2 містить 2 додаткові мутації в CDR2 порівняно з LC1a. Ці мутації усувають потенційний сайт глікозилювання ( $N^{52}RS$ ) та потенційний сайт утворення сукциніміду ( $D^{56}G$ ). LC3 містить мутації від 4D-гуманізації з найбільш близькою послідовністю зародкового типу з додатковими 2 стабілізуючими мутаціями. LC4 комбінує мутації гуманізації, стабілізації та здійснення мутації небажаних мотивів. CDR та зони *verrier* позначені курсивом, залишки *verrier* підкреслені, мутації гуманізації виділені жирним шрифтом, проблемні мотиви позначені подвійним закреслюванням, а стабілізуючі мутації показані за допомогою літер нижнього регістру. На фігурах 16 та 17 показана зведена інформація стосовно мутацій.

LC1a (SEQ ID NO: 91):

1 DKMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GKSPKTLIIR  
51 ANRSVDGVPS RFSGSGSGQD ISLTISSLQP EDLGIIYYCLQ YDEFPPTFGG  
101 GTKLEIK

Жодних додаткових епітопів людини для послідовності LC1a в базі даних IEDB не знайдено. Показник ідентичності LC1a з послідовністю зародкового типу = 76 % з IGKV1-33-01\_IGKJ4-01 [Vkl-O18].

LC1b (SEQ ID NO: 92):

1 DKMTQSPSS VSVSPGQTVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GQSPKTLIIR  
51 ANRSVDGVPS RFSGSGSGQD ISLTISSLQA MDEGIYYCLQ YDEFPPTFGG  
101 GTKLTIK

Окрім епітопа, описаного в розділі 4 вище, K39PGQSPKTLI має 70 % ідентичність послідовності з KPGQPPRLLI (Kirschmann et al. J. Immun., 1995, 155, 5655-5662). Повідомляється, що цей пептид має IC50 >100000 нМ проти всіх алелів HLA-DR, з яким проводили його тестування. Показник ідентичності LC1b з послідовністю зародкового типу = 67 % з IGKV1-33-01\_IGKJ4-01 [Vkl-O18].

LC2 (SEQ ID NO: 93):

1 DKMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GKSPKTLIIR  
51 ANRSVDGVPS RFSGSGSGQD ISLTISSLQP EDLGIIYYCLQ YDEFPPTFGG  
101 GTKLEIK

Жодних додаткових епітопів людини для послідовності LC2 в базі даних IEDB не знайдено. Показник ідентичності LC2 з послідовністю зародкового типу = 76 % з IGKV1-33-01\_IGKJ4-01 [Vkl-O18].

LC3 (SEQ ID NO: 94):

1 DKMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GKSPKTLIIR  
51 ANRSVDGVPS RFSGSGSGQD ISLTISSLQP EDLatYYCLQ YDEFPPTFGG  
101 GTKLEIK

Жодних додаткових епітопів людини для послідовності LC3 в базі даних IEDB не знайдено. Показник ідентичності LC3 з послідовністю зародкового типу = 78 % з IGKV1-33-01\_IGKJ4-01 [Vkl-O18].

LC4 (SEQ ID NO: 95):

1 DKMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GKSPKLLIYR  
51 AQRSVDGVPS RFSGSGSGOD YSLTISSLQP EDLATYYCLQ YDEFPPTFGG  
101 GTKLEIK

Жодних додаткових епітопів людини для послідовності LC4 в базі даних IEDB не знайдено. Показник ідентичності LC4 з послідовністю зародкового типу = 78 % з IGKV1-33-01\_IGKJ4-01 [Vkl-O18].

LC5a (SEQ ID NO: 96):

1 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GKAPKLLIYR  
51 ANRSVDGVPS RFSGSGSGID YTFTISSLQP EDIATYYCLQ YDEFPPTFGG  
101 GTKVEIK

Крім епітопа, описаного в розділі 4 вище, A43PKLLIYRAN має 80 % ідентичність послідовності з APKLLIYAASSL (Kirschmann et al. J. Immun., 1995, 155, 5655-5662). Для цього пептиду не визначали молекулярну масу та не повідомлялося жодних даних про зв'язування. Показник ідентичності LC5a з послідовністю зародкового типу = 85 % з IGKV1-33-01\_IGKJ4-01 [Vkl-O18].

LC5b (SEQ ID NO: 97):

1 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIN SYLSWLQQKP GKAPKLLIYR  
51 ANRSVDGVPS RFSGSGSGOD YTFTISSLQP EDIATYYCLQ YDEFPPTFGG  
101 GTKVEIK

Жодних додаткових епітопів людини для послідовності LC5b в базі даних IEDB не ідентифіковано.

Показник ідентичності LC5b з послідовністю зародкового типу = 83 % з IGKV1-33-01\_IGKJ4-01 [Vkl-O18].

LC5c (SEQ ID NO: 98):

1 EIVMTQSPAT LSLSPGERAT LSCKASQDIN SYLSWLQQKP GQAPRTLIYR  
51 ANRSVDGIPA RFSGSGSGOD YTLTISSLEP EDFAVYYCLQ YDEFPPTFGG  
101 GTKVEIK

Крім епітопа, описаного в розділі 4 вище, K<sup>39</sup>PGQAPRTLI має 80 % ідентичність послідовності з KPGQPPRLLI (Kirschmann et al. J. Immun., 1995, 155, 5655-5662). Повідомляється, що цей пептид має IC<sub>50</sub> >100000 нМ проти всіх алелів HLA-DR, з яким проводили його тестування. Показник ідентичності LC5c з послідовністю зародкового типу = 79 % з IGKV3-11-02\_IGKJ4-01 [Vkl-L6]. Схематичне зображення всіх мутацій легкого ланцюга показано на фігурі 15.

б) Сконструйовані послідовності важкого ланцюга

HC1a містить вісім мутацій, що походять від способу 4D-гуманізації з найбільш близькою послідовністю зародкового типу людини. HC1b містить шість мутацій, що походять від способу 4D-гуманізації з 2<sup>ою</sup> найбільш близькою послідовністю зародкового типу. HC2a містить чотири додаткові мутації порівняно з HC1a, які усувають небажані мотиви послідовності. У HC2b усунений лише сайт дезамідування в CDR1 (N<sup>31</sup>G). HC3 містить мутації гуманізації з HC1a з додатковими п'ятьма стабілізуювальними мутаціями. HC4 містить мутації гуманізації з HC1a, стабілізуювальні мутації з HC3 та мутації, що усувають проблемні мотиви з HC2a. CDR та зони вертєг позначені курсивом, залишки вертєг підкреслені, мутації гуманізації виділені жирним шрифтом, проблемні мотиви позначені подвійним закреслюванням, а стабілізуювальні мутації показані за допомогою літер нижнього регістру.

HC1a (SEQ ID NO: 82):

1 EMTLKESGPT LVKPTQTL~~SL~~ TCSVTGDSMT NGYWNWIRKF PGKALEYMGY  
 51 ITYSGSTIYN PSLKGR~~IS~~IT RNTSKNQFY~~L~~ TLSSVTTVD~~T~~ ATYYCARWHY  
 101 GSPYYFDYWG QGTTLTVSS

Жодних епітопів людини не ідентифікували для послідовності HC1a в базі даних IEDB.  
 Показник ідентичності HC1a з послідовністю зародкового типу = 68 % з IGHV4-31-03\_IGHD6-25-01\_IGHJ4-02.

HC1b (SEQ ID NO: 83):

1 EMQLQESGPG LVKPSETL~~SL~~ TCSVTGDSMT NGYWNWIRKF PGKGLEIYMGY  
 51 ITYSGSTIYN PSLKGR~~IS~~IT RNTSKNQFY~~L~~ KLSSVTTAD~~T~~ ATYYCARWHY  
 101 GSPYYFDYWG QGTTLTVSS

Жодних епітопів людини не ідентифікували для послідовності HC1b в базі даних IEDB.  
 Показник ідентичності HC1b з послідовністю зародкового типу = 73 % з IGHV4-31-03\_IGHD6-25-01\_IGHJ4-02.

HC2a (SEQ ID NO: 84):

1 EMTLKESGPT LVKPTQTL~~SL~~ TCSVTGESMT QGYWNWIRKF PGKALEIYMGY  
 51 ITYSGSTIYN PSLKGR~~IS~~IT RNTSKNQFY~~L~~ TLSSVTTVET ATYYCARWHY  
 101 GSPYYFDYWG QGTTLTVSS

Жодних епітопів людини не ідентифікували для послідовності HC2a в базі даних IEDB.  
 Показник ідентичності HC2a з послідовністю зародкового типу = 67 % з IGHV4-31-03\_IGHD6-25-01\_IGHJ4-02.

HC2b (SEQ ID NO: 85):

1 EMTLKESGPT LVKPTQTL~~SL~~ TCSVTGDSMT QGYWNWIRKF PGKALEIYMGY  
 51 ITYSGSTIYN PSLKGR~~IS~~IT RNTSKNQFY~~L~~ TLSSVTTVD~~T~~ ATYYCARWHY  
 101 GSPYYFDYWG QGTTLTVSS

Жодних епітопів людини не ідентифікували для послідовності HC2b в базі даних IEDB.  
 Показник ідентичності HC2b з послідовністю зародкового типу = 67 % з IGHV4-31-03\_IGHD6-25-01\_IGHJ4-02.

HC3 (SEQ ID NO: 86):

1 qMTLKESGPT LVKPTQTL~~SL~~ TCSVsGESMT NGYWNWIRqF PGKALEIYMGY  
 51 ITYSGSTIYN PSLKGRMT RNTSKNQFY~~L~~ TLSSVTTVD~~T~~ ATYYCARWHY  
 101 GSPYYFDYWG QGTTLTVSS

Жодних епітопів людини не ідентифікували для послідовності HC3 в базі даних IEDB.  
 Показник ідентичності HC3 з послідовністю зародкового типу = 72 % з IGHV4-31-03\_IGHD6-25-01\_IGHJ4-02.

HC4 (SEQ ID NO: 87):

1 qMTLKESGPT LVKPTQTL~~SL~~ TCSVsGESMT QGYWNWIRqF PGKALEIYMGY  
 51 ITYSGSTIYN PSLKGRMT RNTSKNQFY~~L~~ TLSSVTTVET ATYYCARWHY  
 101 GSPYYFDYWG QGTTLTVSS

Жодних епітопів людини не ідентифікували для послідовності HC4 в базі даних IEDB. Показник ідентичності HC4 з послідовністю зародкового типу = 70 % з IGHV4-31-03\_IGHD6-25-01\_IGHJ4-02.

HC5a (SEQ ID NO: 88):

1 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGDSMT NGYWNWIRQP  
PGKGLEIMGY  
51 ITYSGSTYYN PSLKSRITIS RNISKNOYSL KLSSVTAADT AVYYCARWHY  
101 GSPYYFDYWG QGTLVTVSS

Жодних епітопів людини не ідентифікували для послідовності HC5a в базі даних IEDB. Показник ідентичності HC5a з послідовністю зародкового типу = 84 % з IGHV4-59-02\_IGHD6-13-01\_IGHJ4-02 [VH4 4-59].

HC5b (SEQ ID NO: 89):

1 QMQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGDSMT NGYWNWIRQP  
PGKGLEIMGY  
51 ITYSGSTYYN PSLKSRITIS RDISKNOYSL KLSSVTAADT AVYYCARWHY  
101 GSPYYFDYWG QGTLVTVSS

Жодних епітопів людини не ідентифікували для послідовності HC5b в базі даних IEDB. Показник ідентичності HC5b з послідовністю зародкового типу = 84 % з IGHV4-59-02\_IGHD6-13-01\_IGHJ4-02 [VH4 4-59].

HC5c (SEQ ID NO: 90):

1 QMQLQQSGPG LVKPSQTLTL TCAISGDSMT NGYWNWIRQS PSRGLEIMGY  
51 ITYSGSTYYA VSVKSRITIN RDISKNOYSL QLSSVTPEDT AVYYCARWHY  
101 GSPYYFDYWG QGTLVTVSS

Жодних епітопів людини не ідентифікували для послідовності HC5c в базі даних IEDB. Показник ідентичності HC5c з послідовністю зародкового типу = 78 % з IGHV6-1-02\_IGHD6-13-01\_IGHJ4-02 [VH6 6-01].

Схематичне зображення всіх мутацій важкого ланцюга показане на фігурі 16.

с) Комбінації варіантів послідовностей важкого та легкого ланцюга

Для трансплантації створювали три версії легкого ланцюга (LC5a, LC5b, LC5c) та три версії важкого ланцюга (HC5a, HC5b, HC5c). LC5a містить 16 мутацій, що походять від трансплантації у найбільш близьку послідовність зародкового типу людини, та зберігає CDR миші та більшість залишків з зони Vernier миші. Два залишки Vernier миші, T46 та N69, не присутні в якій-небудь послідовності зародкового типу людини, та їх піддівали консервативній мутації. LC5b містить 14 мутацій, що походять від трансплантації в найбільш близьку послідовність зародкового типу людини, та зберігає CDR миші та всі залишки з зони Vernier миші. LC5c містить 22 мутації, що походять від трансплантації у другу найбільш близьку послідовність зародкового типу людини, та зберігає CDR миші та всі залишки з зони Vernier миші.

HC5a містить 20 мутацій, що походять від трансплантації в найбільш близьку послідовність зародкового типу людини, та зберігає CDR миші та більшість залишків з зони Vernier миші за винятком M2V. Met зустрічається з дуже низькою ймовірністю в цьому положенні в послідовностях зародкового типу людини. HC5b містить 20 мутацій, що походять від трансплантації в найбільш близьку послідовність зародкового типу людини, та зберігає CDR миші та всі залишки з зони Vernier миші. HC5c містить 23 мутації, що походять від трансплантації у другу найбільш близьку послідовність зародкового типу людини, та зберігає CDR миші та всі залишки з зони Vernier миші.

Усього одержали десять комбінацій (узагальнені в таблиці 19):

- LC1a x HC1a (мутації, пов'язані з 4D-гуманізацією на основі найбільш близької послідовності зародкового типу)
- LC1b x HC1b (мутації, пов'язані з 4D-гуманізацією на основі 2<sup>ої</sup> найбільш близької послідовності зародкового типу)
- 5    • LC2 x HC2a (мутації, пов'язані з 4D-гуманізацією та піддаванням мутації небажаних послідовностей)
- LC2 x HC2b (мутації, пов'язані з 4D-гуманізацією та піддаванням мутації небажаних послідовностей)
- 10   • LC1a x HC2b (мутації, пов'язані з 4D-гуманізацією та піддаванням мутації небажаних послідовностей)
- LC3 x HC3 (мутації, пов'язані з 4D-гуманізацією та стабілізацією)
- LC4 x HC4 (мутації, пов'язані з 4D-гуманізацією, піддаванням мутації небажаних послідовностей та стабілізацією)
- 15   • LC5a x HC5a (мутації, пов'язані з гуманізацією шляхом трансплантації зі збереженням CDR та включенням 3 консервативних модифікацій Vernier)
- LC5b x HC5b (мутації, пов'язані з гуманізацією шляхом трансплантації зі збереженням ділянок CDR та Vernier)
- 20   • LC5c x HC5c (мутації, пов'язані з гуманізацією шляхом трансплантації зі збереженням ділянок CDR та Vernier)

Таблица 19

Зведена інформація стосовно десяти комбінацій LC x HC

|                 | LC1a<br>(H) | LC1b<br>(H) | LC2<br>(H+UM) | LC3<br>(H+S) | LC4<br>(H+UM+S) | LC5a<br>(G) | LC5b<br>(G) | LC5c<br>(G)      |
|-----------------|-------------|-------------|---------------|--------------|-----------------|-------------|-------------|------------------|
| HC1a<br>(H)     | X(1)        |             |               |              |                 |             |             |                  |
| HC1b<br>(H)     |             | X(2)        |               |              |                 |             |             |                  |
| HC2a<br>(H+UM)  |             |             | X(3)<br>Low   |              |                 |             |             |                  |
| HC2b<br>(H+UM)  | X(4)        |             | X(5)          |              |                 |             |             |                  |
| HC3<br>(H+S)    |             |             | X(11)         | X(6)         | X (12)          |             |             |                  |
| HC4<br>(H+UM+S) |             |             |               |              | X(7)<br>Low     |             |             |                  |
| HC5a<br>(G)     |             |             |               |              |                 | X(8)        |             |                  |
| HC5b<br>(G)     |             |             | X(13)         |              | X(14)           |             | X(9)        |                  |
| HC5c<br>(G)     |             |             |               |              |                 |             |             | X(10)<br>Низький |

H=гуманізація; UM= небажані мотиви; S=стабілізація; G=трансплантація.

Низький=низькі рівні експресії.

Число в () вказує на номер варіанта; примітка: варіанти 11 – 14 додавали після визначення характеристик десяти оригінальних варіантів (варіанти 1-10).

Таблиця 21

## Мутації у восьми варіантах LC з антитіла A44 до PAI1

| Нумерація в послідовності LC | LC1a (H) | LC1b (H) | LC2 (H-UM) | LC3 (H+S) | LC4 (H-UM+S) | LC5a (G) | LC5b (G) | LC5c (G) |
|------------------------------|----------|----------|------------|-----------|--------------|----------|----------|----------|
| Asp1                         |          |          |            |           |              |          |          | Glu      |
| Lys3                         |          |          |            |           |              | Gln      | Gln      | Val      |
| Ser9                         |          |          |            |           |              |          |          | Ala      |
| Ser10                        |          |          |            |           |              |          |          | Thr      |
| Met11                        | Leu      | Val      | Leu        | Leu       | Leu          | Leu      | Leu      | Leu      |
| Tyr12                        | Ser      | Ser      | Ser        | Ser       | Ser          | Ser      | Ser      | Ser      |
| Ala13                        |          | Val      |            |           |              |          |          | Leu      |
| Leu15                        | Val      | Pro      | Val        | Val       | Val          | Val      | Val      | Pro      |
| Glu17                        | Asp      | Gln      | Asp        | Asp       | Asp          | Asp      | Asp      |          |
| Arg18                        |          | Thr      |            |           |              |          |          |          |
| Val19                        |          |          |            |           |              |          |          | Ala      |
| Ile21                        |          |          |            |           |              |          |          | Leu      |
| Thr22                        |          |          |            |           |              |          |          | Ser      |
| Lys42                        |          | Gln      |            |           |              |          |          | Gln      |
| Ser43                        |          |          |            |           |              | Ala      | Ala      | Ala      |
| Lys45                        |          |          |            |           |              |          |          | Arg      |
| Thr46                        |          |          |            |           |              | Leu      |          |          |
| Asn52                        |          |          | Gln        |           | Gln          |          |          |          |
| Asp56                        |          |          | Glu        |           | Glu          |          |          |          |
| Val58                        |          |          |            |           |              |          |          | Ile      |
| Ser60                        |          |          |            |           |              |          |          | Ala      |
| Gln69                        |          |          |            |           |              | Thr      |          |          |
| Ser72                        |          |          |            |           |              | Thr      | Thr      | Thr      |
| Leu73                        |          |          |            |           |              | Phe      | Phe      |          |
| Glu79                        | Gln      | Gln      | Gln        | Gln       | Gln          | Gln      | Gln      |          |
| Tyr80                        | Pro      | Ala      | Pro        | Pro       | Pro          | Pro      | Pro      | Pro      |
| Glu81                        |          | Met      |            |           |              |          |          |          |
| Met83                        | Leu      | Glu      | Leu        | Leu       | Leu          | Ile      | Ile      | Phe      |
| Gly84                        |          |          |            | Ala       | Ala          | Ala      | Ala      | Ala      |
| Ile85                        |          |          |            | Thr       | Thr          | Thr      | Thr      | Val      |
| Leu104                       |          |          |            |           |              | Val      | Val      | Val      |
| Glu105                       |          | Thr      |            |           |              |          |          |          |
| Число мутацій                | 7        | 12       | 9          | 9         | 11           | 16       | 14       | 22       |

H=гуманізація; UM= небажані мотиви; S=стабілізація; G=трансплантація.

Таблиця 22

## Мутації в дев'яти варіантах HC з антитіла A44 до PAI1

| Нумерація в послідовності HC | HC1a (H) | HC1b (H) | HC2a (H-UM) | HC2b (H-UM) | HC3 (H+S) | HC4 (H-UM+S) | HC5a (G) | HC5b (G) | HC5c (G) |
|------------------------------|----------|----------|-------------|-------------|-----------|--------------|----------|----------|----------|
| Glu1                         |          |          |             |             | Gln       | Gln          | Gln      | Gln      | Gln      |
| Met2                         |          |          |             |             |           |              | Val      |          |          |
| Gln3                         | Thr      |          | Thr         | Thr         | Thr       | Thr          |          |          |          |
| Glu5                         | Lys      |          | Lys         | Lys         | Lys       | Lys          |          |          | Gln      |
| Ser10                        | Thr      | Gly      | Thr         | Thr         | Thr       | Thr          | Gly      | Gly      | Gly      |
| Ser15                        | Thr      |          | Thr         | Thr         | Thr       | Thr          |          |          |          |
| Gln16                        |          | Glu      |             |             |           |              | Glu      | Glu      |          |
| Ser23                        |          |          |             |             |           |              | Thr      | Thr      | Ala      |
| Val24                        |          |          |             |             |           |              |          |          | Ile      |
| Thr25                        |          |          |             |             | Ser       | Ser          | Ser      | Ser      | Ser      |
| Asp27                        |          |          | Glu         |             |           | Glu          |          |          |          |
| Asn31                        |          |          | Gln         | Gln         |           | Gln          |          |          |          |
| Lys39                        |          |          |             |             | Gln       | Gln          | Gln      | Gln      | Gln      |
| Phe40                        |          |          |             |             |           |              | Pro      | Pro      | Ser      |
| Gly42                        |          |          |             |             |           |              |          |          | Ser      |
| Asn43                        | Lys      | Lys      | Lys         | Lys         | Lys       | Lys          | Lys      | Lys      | Arg      |
| Lys44                        | Ala      | Gly      | Ala         | Ala         | Ala       | Ala          | Gly      | Gly      | Gly      |
| Asn60                        |          |          |             |             |           |              |          |          | Ala      |
| Pro61                        |          |          |             |             |           |              |          |          | Val      |
| Leu63                        |          |          |             |             |           |              |          |          | Val      |
| Gly65                        |          |          |             |             |           |              | Ser      | Ser      | Ser      |
| Ser68                        |          |          |             |             | Thr       | Thr          | Thr      | Thr      | Thr      |
| Thr70                        |          |          |             |             |           |              | Ser      | Ser      | Asn      |
| Asn72                        |          |          | Gln         |             | Asp       | Gln          |          | Asp      | Asp      |
| Tyr79                        |          |          |             |             |           |              | Ser      | Ser      | Ser      |
| Gln81                        | Thr      | Lys      | Thr         | Thr         | Thr       | Thr          | Lys      | Lys      |          |
| Thr87                        |          |          |             |             |           |              | Ala      | Ala      | Pro      |
| Glu88                        | Val      | Ala      | Val         | Val         | Val       | Val          | Ala      | Ala      |          |
| Asp89                        |          |          | Glu         |             |           | Glu          |          |          |          |
| Thr92                        |          |          |             |             |           |              | Val      | Val      | Val      |
| Thr114                       |          |          |             |             |           |              | Leu      | Leu      | Leu      |
| Leu115                       |          |          |             |             |           |              | Val      | Val      | Val      |
| Число мутацій                | 8        | 6        | 12          | 9           | 13        | 16           | 20       | 20       | 23       |

H=гуманізація; UM= небажані мотиви; S=стабілізація; G=трансплантація

Загалом, під час процесу гуманізації одержали десять варіантів. Ці варіанти експресували та визначали їхні характеристики в декількох аналізах *in vitro*, як описано нижче.

5 7) Визначення характеристик варіантів гуманізації

Виходячи з моделювання *in silico*, наведеного вище у прикладі, одержували десять варіантів (варіанти 1 – 8 за допомогою 4D-гуманізації та варіанти 9 – 10 за допомогою трансплантації CDR; варіанти 3 та 10 створювали за допомогою другої найбільш близької послідовності зародкового типу). ДНК варіабельної ділянки легкого ланцюга та важкого ланцюга гуманізованого A44 одержували для експресії в HEK293. Білки одержували після клонування відповідної ДНК у плазмиди pXL (New England Biolabs; NheI/Eco47III для HC, NheI/BsiWI для LC). Гуманізовані послідовності піддавали процедурі оптимізації кодонів для експресії в HEK та ген синтезували за допомогою GeneArt (дочірня компанія Life Technologies). Одержані плазмиди сумісно трансфікували та піддавали тимчасовій експресії в системі експресії FreeStyleTM293 (Invitrogen, кат. № K9000-01). Варіанти 3 та 10 експресувалися дуже погано та не досліджувалися у подальшому. Решту варіантів експресували та очищали із застосуванням

колонки з білком А. За допомогою аналітичних гелів було показане часткове глікозилювання (приблизно 5 – 10 %) легких ланцюгів у варіантах 6 та 9 та важких ланцюгів у варіантах 5 та 7 (дані не показані). Решту вісім варіантів тестували за допомогою хромогенного аналізу із застосуванням hPAI та в аналізі утворення плазміну на зірчастих клітинах людини із застосуванням глікозилюваного PAI людини. Результати показані в таблиці 23.

Таблиця 23

Визначення характеристик варіантів гуманізації в аналізі утворення плазміну та хромогенному аналізі

| mAb     | Активация плазминогену |              | Хромогенний аналіз |
|---------|------------------------|--------------|--------------------|
|         | IC50 (нМ)              | Y50 %        | IC50 (нМ)          |
| A44     | 3,17                   | 45,99        | 0,44               |
| A44-hv1 | 3,12                   | 44,99        | 0,49               |
| A44-hv2 | Не визначено           | Не визначено | 0,60               |
| A44-hv4 | Неактивне              | 26,00        | 0,52               |
| A44-hv5 | Не визначено           | Не визначено | 1,11               |
| A44-hv6 | 1,78                   | 56,94        | 0,82               |
| A44-hv7 | Не визначено           | Не визначено | 0,59               |
| A44-hv8 | Неактивне              | 11,00        | 0,76               |
| A44-hv9 | 1,9                    | 46,53        | 0,86               |

Варіанти 6 та 9 демонстрували найкращу ефективність в аналізі утворення плазміну, але мали часткове (5–10 %) глікозилювання легкого ланцюга. На основі цих результатів одержали нові варіанти 11-14 із застосуванням комбінацій важких ланцюгів від варіантів 6 та 9 та легких ланцюгів від варіантів 5 та 7. В таблиці 24 узагальнені всі створені варіанти.

Таблиця 24

Варіанти гуманізації

| № варіанта | Опис        | SEQ ID NO |
|------------|-------------|-----------|
| A44-hv1    | LC1a x HC1a | 109       |
| A44-hv2    | LC1b x HC1b | 110       |
| A44-hv3    | LC2 x HC2a  | 111       |
| A44-hv4    | LC1a x HC2b | 112       |
| A44-hv5    | LC2 x HC2b  | 113       |
| A44-hv6    | LC3 x HC3   | 114       |
| A44-hv7    | LC4 x HC4   | 115       |
| A44-hv8    | LC5a x HC5a | 116       |
| A44-hv9    | LC5b x HC5b | 117       |
| A44-hv10   | LC5c x HC5c | 118       |
| A44-hv11   | LC2 x HC3   | 119       |
| A44-hv12   | LC4 X HC3   | 120       |
| A44-hv13   | LC2 x HC5b  | 121       |
| A44-hv14   | LC4 x HC5b  | 122       |



## ДНК-послідовність варіантів гуманізації

|      | Ген                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Білок                                                                                                                                                      |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HC1a | GAGATGACCCTGAAAGAGTCCGGCCCCACCCT<br>GGTCAAACCCACCCAGACCCTGAGCCTGACCT<br>GCAGCGTGACCGGCGACAGCATGACCAACGGC<br>TACTGGAAGTGGATCCGGAAGTTCCCCGGCAA<br>GGCCCTCGAGTACATGGGCTACATCACCTACA<br>GCGGCAGCACCTACTACAACCCCAGCCTGAAG<br>GGCCGGATCAGCATCACCCGGAACACCAGCAA<br>GAACCAGTACTACCTGACCCTGTCCAGCGTG<br>(SEQ ID NO: 123) | EMTLKESGPTLVKPTQTLSTLTCVS<br>TGDSMTNGYWNWIRKFPKALEY<br>MGYITYSGSTYYNPSLKGRISITRN<br>TSKNQYYLTLSSVTTVDATYYCA<br>RWHYGSPYYFDYWQGTTTLTVSS<br>(SEQ ID NO: 82)  |
| HC1b | GAGATGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCT<br>GGTCAAACCCAGCGAGACACTGAGCCTGACCT<br>GCAGCGTGACCGGCGACAGCATGACCAACGGC<br>TACTGGAAGTGGATCCGGAAGTTCCCCGGCAA<br>GGGCCTCGAGTACATGGGCTACATCACCTACA<br>GCGGCAGCACCTACTACAACCCCAGCCTGAAG<br>GGCCGGATCAGCATCACCCGGAACACCAGCAA<br>GAACCAGTACTACCTGAAGCTGTCCAGCGTG<br>(SEQ ID NO: 124) | EMQLQESGPGLVKPSETLSLTCVS<br>TGDSMTNGYWNWIRKFPKGLEY<br>MGYITYSGSTYYNPSLKGRISITRN<br>TSKNQYYLKLSSVTTADATYYCA<br>RWHYGSPYYFDYWQGTTTLTVSS<br>(SEQ ID NO: 83)   |
| HC2a | GAGATGACCCTGAAAGAGTCCGGCCCCACCCT<br>GGTCAAACCCACCCAGACCCTGAGCCTGACCT<br>GCAGCGTGACCGGCGAGAGCATGACCCAGGG<br>CTACTGGAAGTGGATCCGGAAGTTCCCCGGCA<br>AGGCCCTCGAGTACATGGGCTACATCACCTACA<br>GCGGCAGCACCTACTACAACCCCAGCCTGAAG<br>GGCCGGATCAGCATCACCCGGCAGACCAGCAA<br>GAACCAGTACTACCTGACCCTGTCCAGCGTG<br>(SEQ ID NO: 125) | EMTLKESGPTLVKPTQTLSTLTCVS<br>TGESMTQGYWNWIRKFPKALEY<br>MGYITYSGSTYYNPSLKGRISITRQ<br>TSKNQYYLTLSSVTTVETATYYCA<br>RWHYGSPYYFDYWQGTTTLTVSS<br>(SEQ ID NO: 84) |
| HC2b | GAGATGACCCTGAAAGAGTCCGGCCCCACCCT<br>GGTCAAACCCACCCAGACCCTGAGCCTGACCT<br>GCAGCGTGACCGGCGACAGCATGACCCAGGG<br>CTACTGGAAGTGGATCCGGAAGTTCCCCGGCA<br>AGGCCCTCGAGTACATGGGCTACATCACCTACA<br>GCGGCAGCACCTACTACAACCCCAGCCTGAAG<br>GGCCGGATCAGCATCACCCGGAACACCAGCAA<br>GAACCAGTACTACCTGACCCTGTCCAGCGTG<br>(SEQ ID NO: 126) | EMTLKESGPTLVKPTQTLSTLTCVS<br>TGDSMTQGYWNWIRKFPKALEY<br>MGYITYSGSTYYNPSLKGRISITRN<br>TSKNQYYLTLSSVTTVDATYYCA<br>RWHYGSPYYFDYWQGTTTLTVSS<br>(SEQ ID NO: 85)  |
| HC3  | CAGATGACCCTGAAAGAGTCCGGCCCCACCCT<br>GGTCAAACCCACCCAGACCCTGAGCCTGACCT<br>GCAGCGTGTCCGGCGACAGCATGACCAACGGC<br>TACTGGAAGTGGATCCGGCAGTTCCCCGGCAA<br>GGCCCTCGAGTACATGGGCTACATCACCTACA<br>GCGGCAGCACCTACTACAACCCCAGCCTGAAG<br>GGCCGGATCACCATCACCCGGGACACCAGCAA<br>GAACCAGTACTACCTGACCCTGAGCAGCGTG<br>(SEQ ID NO: 127) | QMTLKESGPTLVKPTQTLSTLTCVS<br>SGDSMTNGYWNWIRQFPKALEY<br>MGYITYSGSTYYNPSLKGRITITRD<br>TSKNQYYLTLSSVTTVDATYYCA<br>RWHYGSPYYFDYWQGTTTLTVSS<br>(SEQ ID NO: 86)  |
| HC4  | CAGATGACCCTGAAAGAGTCCGGCCCCACCCT<br>GGTCAAACCCACCCAGACCCTGAGCCTGACCT<br>GCAGCGTGTCCGGCGAGAGCATGACCCAGGG<br>CTACTGGAAGTGGATCCGGCAGTTCCCCGGCA<br>AGGCCCTCGAGTACATGGGCTACATCACCTACA<br>GCGGCAGCACCTACTACAACCCCAGCCTGAAG<br>GGCCGGATCACCATCACCCGGCAGACCAGCAA<br>GAACCAGTACTACCTGACCCTGAGCAGCGTG<br>(SEQ ID NO: 128) | QMTLKESGPTLVKPTQTLSTLTCVS<br>SGESMTQGYWNWIRQFPKALEY<br>MGYITYSGSTYYNPSLKGRITITRQ<br>TSKNQYYLTLSSVTTVETATYYCA<br>RWHYGSPYYFDYWQGTTTLTVSS<br>(SEQ ID NO: 87) |

|      | Ген                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Білок                                                                                                                                                           |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HC5a | CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCT<br>GGTCAAACCCAGCGAGACACTGAGCCTGACCT<br>GCACCGTGTCCGGCGACAGCATGACCAACGGC<br>TACTGGAAGTGGATCCGGCAGCCCCCTGGCAA<br>GGGCCTCGAGTACATGGGCTACATCACCTACA<br>GCGGCAGCACCTACTACAACCCCAGCCTGAAG<br>TCCCGGATCACCATCAGCCGGAACACCAGCAA<br>GAACCAGTACAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTG<br>(SEQ ID NO: 129)     | QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTV<br>SGDSMTNGYWNWIRQPPGKGLE<br>YMGYITYSGSTYYNPSLKSRLTISR<br>NTSKNQYSLKLSSVTAADTAVYYC<br>ARWHYGSPYYFDYWGGGTLTVTS<br>S<br>(SEQ ID NO: 88) |
| HC5b | CAGATGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCT<br>GGTCAAACCCAGCGAGACACTGAGCCTGACCT<br>GCACCGTGTCCGGCGACAGCATGACCAACGGC<br>TACTGGAAGTGGATCCGGCAGCCCCCTGGCAA<br>GGGCCTCGAGTACATGGGCTACATCACCTACA<br>GCGGCAGCACCTACTACAACCCCAGCCTGAAG<br>TCCCGGATCACCATCAGCCGGGACACCAGCAA<br>GAACCAGTACAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTG<br>(SEQ ID NO: 130)     | QMQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTV<br>SGDSMTNGYWNWIRQPPGKGLE<br>YMGYITYSGSTYYNPSLKSRLTISR<br>DTSKNQYSLKLSSVTAADTAVYYC<br>ARWHYGSPYYFDYWGGGTLTVTS<br>S<br>(SEQ ID NO: 89) |
| HC5c | CAGATGCAGCTGCAGCAGAGCGGCCCTGGCCT<br>GGTCAAACCCAGCCAGACCCTGAGCCTGACCT<br>GCGCCATCAGCGGCGACAGCATGACCAACGGC<br>TACTGGAAGTGGATCCGGCAGAGCCCCAGCAG<br>AGGCCTCGAGTACATGGGCTACATCACCTACAG<br>CGGCAGCACCTACTACGCCGTGTCCGTGAAGT<br>CCCGGATCACCATCAACCGGGACACCAGCAAG<br>AACCAGTACAGCCTGCAGCTGAGCAGCGTG<br>(SEQ ID NO: 131)     | QMQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAI<br>SGDSMTNGYWNWIRQSPSRGLEY<br>MGYITYSGSTYYAVSVKSRITINRD<br>TSKNQYSLQLSSVTPEDTAVYYCA<br>RWHYGSPYYFDYWGGGTLTVTVSS<br>(SEQ ID NO: 90)     |
| LC1a | GACATCAAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCT<br>GAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCA<br>CATGCAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTAC<br>CTGAGCTGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCAAGAG<br>CCCCAAGACCCTGATCTACCGGGCCAACCGCA<br>GCGTGGACGGCGTGCCAAGCAGATTTTCCGGC<br>AGCGGCAGCGGCCAGGACTACAGCCTGACCAT<br>CAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACCTGGGCATC<br>(SEQ ID NO: 132)    | DIKMTQSPSSLSASVGDRTITCKA<br>SQDINSYLSWLQKPGKSPKTLIY<br>RANRSVDGVPSRFSGSGSGQDYS<br>LTISSLQPEDLGIYYCLQYDEFPPT<br>FGGGTKLEIK<br>(SEQ ID NO: 91)                    |
| LC1b | GACATCAAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCT<br>GTCCGTGTCTCCTGGCCAGACCGTGACCATCA<br>CATGCAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTAC<br>CTGAGCTGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCCAGTC<br>CCCCAAGACCCTGATCTACCGGGCCAACCGCA<br>GCGTGGACGGCGTGCCAAGCAGATTTTCCGGC<br>AGCGGCAGCGGCCAGGACTACAGCCTGACCAT<br>CAGCAGCCTGCAGGCCATGGACGAGGGCATC<br>(SEQ ID NO: 133)     | DIKMTQSPSSSVSPGQTVTITCK<br>ASQDINSYLSWLQKPGQSPKTLI<br>YRANRSVDGVPSRFSGSGSGQDYS<br>LTISSLQAMDEGIYYCLQYDEFPPT<br>TFGGGTKLTIK<br>(SEQ ID NO: 92)                   |
| LC2  | GACATCAAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCT<br>GAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCA<br>CATGCAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTAC<br>CTGAGCTGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCCAGCGGA<br>CCCCAAGACCCTGATCTACCGGGGCCAGCGGA<br>GCGTGGAAAGGCGTGCCAAGCAGATTCAGCGGC<br>AGCGGCTCCGGCCAGGACTACAGCCTGACCAT<br>CAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACCTGGGCATC<br>(SEQ ID NO: 134) | DIKMTQSPSSLSASVGDRTITCKA<br>SQDINSYLSWLQKPGKSPKTLIY<br>RAQRSVEGVPSRFSGSGSGQDYS<br>LTISSLQPEDLGIYYCLQYDEFPPT<br>FGGGTKLEIK<br>(SEQ ID NO: 93)                    |

|      | Ген                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Білок                                                                                                                                         |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| LC3  | GACATCAAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCT<br>GAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCA<br>CATGCAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTAC<br>CTGAGCTGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCAAGAG<br>CCCCAAGACCCTGATCTACCGGGCCAACCGCA<br>GCGTGGACGGCGTGCCAAGCAGATTTTCCGGC<br>AGCGGCAGCGGCCAGGACTACAGCCTGACCAT<br>CAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACCTGGCCACC<br>(SEQ ID NO: 135)  | DIKMTQSPSSLSASVGDRVITITCKA<br>SQDINSYLSWLQKPGKSPKTLIY<br>RANRSVDGVPSRFSGSGSGQDYS<br>LTISSLQPEDLATYYCLQYDEFPP<br>FGGGTKLEIK<br>(SEQ ID NO: 94) |
| LC4  | GACATCAAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCT<br>GAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCA<br>CATGCAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTAC<br>CTGAGCTGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCAAGAG<br>CCCCAAGACCCTGATCTACCGGGCCCAGCGGA<br>GCGTGGAAGGCGTGCCAAGCAGATTTCAGCGGC<br>AGCGGCTCCGGCCAGGACTACAGCCTGACCAT<br>CAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACCTGGCCACC<br>(SEQ ID NO: 136) | DIKMTQSPSSLSASVGDRVITITCKA<br>SQDINSYLSWLQKPGKSPKTLIY<br>RAQRSVEGVPSRFSGSGSGQDYS<br>LTISSLQPEDLATYYCLQYDEFPP<br>FGGGTKLEIK<br>(SEQ ID NO: 95) |
| LC5a | GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCT<br>GAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCA<br>CATGCAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTAC<br>CTGAGCTGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCAAGGC<br>CCCCAAGCTGCTGATCTACCGGGCCAACCGCA<br>GCGTGGACGGCGTGCCAAGCAGATTTTCCGGC<br>AGCGGCTCCGGCACCGACTACACCTTCACCAT<br>CAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGATATCGCCACC<br>(SEQ ID NO: 137)  | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCK<br>ASQDINSYLSWLQKPGKAPKLLI<br>YRANRSVDGVPSRFSGSGSGTDY<br>TFTISSLQPEDLATYYCLQYDEFPP<br>TFGGGKVEIK<br>(SEQ ID NO: 96) |
| LC5b | GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCT<br>GAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCA<br>CATGCAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTAC<br>CTGAGCTGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCAAGGC<br>CCCCAAGACCCTGATCTACCGGGCCAACCGCA<br>GCGTGGACGGCGTGCCAAGCAGATTTTCCGGC<br>AGCGGCAGCGGCCAGGACTACACCTTCACCAT<br>CAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGATATCGCCACC<br>(SEQ ID NO: 138)  | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCK<br>ASQDINSYLSWLQKPGKAPKTLI<br>YRANRSVDGVPSRFSGSGSGQDY<br>TFTISSLQPEDLATYYCLQYDEFPP<br>TFGGGKVEIK<br>(SEQ ID NO: 97) |
| LC5c | GAGATCGTGATGACCCAGAGCCCCGCCACCCT<br>GTCTCTGAGCCCTGGCGAGAGGCCACCCTGA<br>GCTGCAAGGCCAGCCAGGACATCAACAGCTAC<br>CTGAGCTGGCTGCAGCAGAAGCCCGGCCAGGC<br>CCCCAGAACCCTGATCTACCGGGCCAACAGAA<br>GCGTGGACGGCATCCCCGCCAGATTCAGCGGC<br>AGCGGCTCCGGCCAGGACTACACCCTGACCAT<br>CAGCAGCCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTG<br>(SEQ ID NO: 139)    | EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCK<br>ASQDINSYLSWLQKPGQAPRTLI<br>YRANRSVDGIPARFSGSGSGQDY<br>TLTISSLEPEDFAVYYCLQYDEFPP<br>TFGGGKVEIK<br>(SEQ ID NO: 98)  |
|      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                               |
|      | Білок                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                               |
| CH   | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS<br>SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG<br>GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ<br>YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR<br>DELTKNQVSLTCLVKGF (SEQ ID NO: 99)                    |                                                                                                                                               |
| CL   | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ<br>DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC<br>(SEQ ID NO: 100)                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                               |

Усі варіанти, за винятком варіантів 3 та 10 з низькою експресією, тестували за допомогою Біасоре проти PAI-1 людини та макаки-крабодіа та комплексу вітронектин-PAI-1. Дані наведені в таблиці 26.

## Визначення характеристик варіантів гуманізації за допомогою Biacore

| Вітронектин на чипі/PAI-1 людини                        |            |            |          |
|---------------------------------------------------------|------------|------------|----------|
| mAb/hPAI-1/Vn                                           | ka1 (1/Mc) | kd 1 (1/c) | KD (M)   |
| Початкове A44*                                          | 5,68E+06   | 2,29E-04   | 4,04E-11 |
| A44-hv1*                                                | 1,10E+07   | 5,55E-04   | 5,26E-11 |
| A44-hv2**                                               | 2,99E+06   | 4,03E-04   | 1,35E-10 |
| A44-hv4*                                                | 4,59E+06   | 8,80E-05   | 1,92E-11 |
| A44-hv5*                                                | 2,72E+06   | 2,76E-05   | 1,02E-11 |
| A44-hv6*                                                | 4,38E+06   | 5,68E-05   | 1,33E-11 |
| A44-hv7**                                               | 4,14E+06   | 3,94E-04   | 9,64E-11 |
| A44-hv8*                                                | n/a        | n/a        | n/a      |
| A44-hv9*                                                | 6,36E+06   | 1,03E-04   | 1,70E-11 |
| A44-hv11*                                               | 7,66E+06   | 1,22E-04   | 1,56E-11 |
| A44-hv12*                                               | 5,15E+06   | 8,14E-05   | 1,61E-11 |
| A44-hv13**                                              | 2,40E+06   | 4,36E-04   | 1,79E-10 |
| A44-hv14*                                               | 4,06E+06   | 3,95E-05   | 9,57E-12 |
| Вітронектин на чипі/PAI-1 макаки-крабоїда               |            |            |          |
| mAb/cPAI-1/Vn                                           | ka1 (1/Mc) | kd 1 (1/c) | KD (M)   |
| Початкове A44*                                          | 3,98E+06   | 2,75E-04   | 6,96E-11 |
| A44-hv1**                                               | 3,37E+06   | 8,27E-03   | 2,45E-09 |
| A44-hv2**                                               | 2,30E+06   | 3,14E-04   | 1,37E-10 |
| A44-hv4**                                               | 2,26E+05   | 1,70E-04   | 7,52E-10 |
| A44-hv5*                                                | 3,40E+06   | 1,11E-04   | 3,26E-11 |
| A44-hv6*                                                | 5,26E+06   | 2,51E-05   | 5,01E-12 |
| A44-hv7**                                               | 2,50E+06   | 2,39E-04   | 9,56E-11 |
| A44-hv8*                                                | n/a        | n/a        | n/a      |
| A44-hv9*                                                | 6,51E+06   | 1,34E-04   | 2,15E-11 |
| A44-hv11**                                              | 1,56E+06   | 6,00E-04   | 3,87E-10 |
| A44-hv12*                                               | 4,26E+06   | 2,35E-04   | 5,69E-11 |
| A44-hv13**                                              | 2,12E+06   | 2,43E-04   | 1,15E-10 |
| A44-hv14*                                               | 5,86E+06   | 2,13E-04   | 3,86E-11 |
| Антитіло до Fc IgG людини на чипі/PAI-1 людини          |            |            |          |
| mAb/hPAI-1*                                             | ka1 (1/Mc) | kd 1 (1/c) | KD (M)   |
| A44-hv11/hPAI-1                                         | 1,57E+06   | 6,68E-05   | 4,25E-11 |
| A44-hv12/hPAI-1                                         | 1,62E+06   | 6,70E-05   | 4,14E-11 |
| A44-hv13/hPAI-1                                         | 1,54E+06   | 2,52E-05   | 1,64E-11 |
| A44-hv14/hPAI-1                                         | 1,25E+06   | 3,42E-05   | 2,70E-11 |
| Антитіло до Fc IgG людини на чипі/PAI-1 макаки-крабоїда |            |            |          |
| mAb/cPAI-1*                                             | ka1 (1/Mc) | kd 1 (1/c) | KD (M)   |
| A44-hv11/hPAI-1                                         | 1,87E+06   | 5,60E-05   | 3,00E-11 |
| A44-hv12/hPAI-1                                         | 2,24E+06   | 5,45E-05   | 2,44E-11 |
| A44-hv13/hPAI-1                                         | 1,89E+06   | 5,08E-05   | 2,70E-11 |
| A44-hv14/hPAI-1                                         | 2,32E+06   | 2,69E-05   | 1,15E-11 |

n/a означає, що варіант не зв'язувався ефективно з комплексом вітронектин/PAI-1.

\*Модель молекулярної взаємодії 1:1.

\*\*Модель реакції за участі двох станів (конформаційна зміна).

Дані Biacore не виявили значних відмінностей між гуманізованими варіантами. Усі гуманізовані варіанти, за винятком варіанта 8, демонстрували спорідненість з обома PAI-1 макаки-крабоїда та PAI-1 людини, а також PAI-1 у комплексі з вітронектином в межах діапазону

припустимих значень. При порівнянні з початковим A44 виявилось, що гуманізація не змінює спорідненість антитіл.

Хоча спорідненість та ефективність гуманізованих варіантів не відрізнялися значною мірою в хромогенному аналізі та аналізі за допомогою Біасоре, здатність варіантів до відновлення утворення плазміну в клітинних аналізах була значно нижчою, ніж у початкового антитіла миші для деяких варіантів (див. таблицю 27, що узагальнює порівняння хромогенного аналізу та клітинних аналізів нижче). Гуманізовані варіанти 11–14 тестували щодо здатності блокувати PAI-1 у клітинному аналізі.

Таблиця 27

## Визначення характеристик варіантів гуманізації 11-14 в утворенні плазміну

| mAb      | Активіація плазміногену |       |   |
|----------|-------------------------|-------|---|
|          | IC50 (нМ)               | Y50 % | n |
| A44      | 3,13                    | 79,79 | 6 |
| A44-hv11 | 2,01                    | 85,82 | 6 |
| A44-hv12 | 1,99                    | 76,70 | 6 |
| A44-hv13 | 1,82                    | 71,10 | 6 |
| A44-hv14 | 1,82                    | 61,22 | 6 |
| A44-hv9  | 1,51                    | 50,92 | 4 |
| A44-hv1  | 2,08                    | 58,50 | 2 |

Варіанти 11-14 демонстрували достатню ефективність в аналізі утворення плазміну, та їхні характеристики додатково визначали в додаткових аналізах *in vitro*.

8) Визначення характеристик варіантів гуманізації за допомогою печінки людини

Додатковий скринінг гуманізованих варіантів 11–14 здійснювали із застосуванням виробленого ендогенним шляхом PAI-1 людини з плазми крові людини та зразків фіброзних ділянок печінки людини.

Активність PAI-1 оцінювали шляхом вимірювання здатності цього білка *serpin* утворювати стабільний комплекс з урокіназою, іммобілізованою на 96-лункових планшетах. Після відмивання незв'язаного PAI-1 комплекси uPA-PAI-1 виявляли за допомогою застосування поліклональних антитіл до PAI-1. Потім зв'язані поліклональні антитіла до PAI-1 (кількість яких пропорційна вмісту активного PAI-1 у зразку) виявляли із застосуванням вторинного антитіла, кон'югованого з пероксидазою хрому (Molecular Innovation кат. № HPAIKT). Різні концентрації гуманізованих варіантів A44 інкубували протягом 15 хвилин за кімнатної температури з одним з рекомбінантних PAI-1 людини або макаки-крабоїда (кінцева концентрація 0,31 нМ), а потім тестували щодо функціонально активного PAI-1 за допомогою комплексу uPA-PAI-1 із застосуванням ELISA, описаного вище. Зразки порівнювали зі стандартом PAI-1 людини. Плазму крові людини від пацієнтів з високим BMI з високими рівнями активного PAI-1 розводили в 4 рази та інкубували зі зростаючими кількостями гуманізованих варіантів A44. Рівні активного PAI-1, що залишився, визначали із застосуванням виявлення комплексу uPA-PAI-1 за допомогою ELISA. Нейтралізацію рекомбінантного PAI-1 макаки-крабоїда також тестували за допомогою утворення плазміну для підтвердження перехресної реактивності.

Таблиця 28

## Здатність гуманізованих варіантів блокувати активність ендогенного PAI-1

| Стандарт hPAI-1 |       |   | TH1782 плазма крові людини |          |       |   | PAI-1 макаки-крабоїда |       |   |
|-----------------|-------|---|----------------------------|----------|-------|---|-----------------------|-------|---|
| IC50(нМ)        | Y50 % | n | mAb                        | IC50(нМ) | Y50 % | N | IC50(нМ)              | Y50 % | n |
| 1,31E-01        | 50,80 | 2 | A44-hv11                   | 1,57E-02 | 37,50 | 2 | 4,24E-02              | 50,80 | 2 |
| 1,14E-01        | 53,45 | 2 | A44-hv12                   | 3,35E-03 | 37,68 | 2 | 2,66E-02              | 53,45 | 2 |
| 1,66E-01        | 52,82 | 2 | A44-hv13                   | 3,11E-02 | 61,35 | 2 | 2,81E-02              | 52,82 | 2 |
| 5,63E-02        | 52,47 | 2 | A44-hv14                   | 5,86E-02 | 73,90 | 2 | 2,87E-02              | 52,47 | 2 |

Зразки фіброзних ділянок печінки людини (надані Biopredic International, Ренн, Франція, результат хірургічного видалення печінкових метастазів раку товстої кишки) гомогенізували наступним чином: зважені заморожені зразки печінки гомогенізували в сухих пробірках, що містили керамічні гранули (кат. № 03961-1-003, Bertin Technology, Франція) із застосуванням

гомогенізатора Precellys (Bertin Technology, Франція; 4 °C, 2 × 30 секунд при 6800 об./хв.) та потім розчиняли із застосуванням 1 мл/г буфера для лізису (1,5 M NaCl в TBS – розчин буфера Tris 0,1 M Tris+0,15 M NaCl, pH 7,4). Після центрифугування при 4 °C при 5000g протягом 10 хвилин лізат печінки в надосадовій рідині збирали та зберігали замороженим при -80 °C.

Визначення загальної концентрації білка із застосуванням стандартного аналізу BCA та рівнів активного та загального PAI-1 (визначали за допомогою ELISA за комплексом UK-PAI, наданим Mol Innov, кат. № HPAIKT та кат. № MPAIKT-TOT) здійснювали згідно з інструкціями виробника за допомогою нанесення на графік концентрації стандарту PAI-1 людини відносно A450 нм із застосуванням програмного забезпечення Biostat Calibration. Зростаючі концентрації гуманізованих варіантів A44 інкубували з лізатом печінки, розведеним до 2,5 нМ активного PAI-1, оцінювали, як описано вище, та дані аналізували. Інгібування активності PAI-1 (активність PAI-1 за відсутності mAb являє собою 0 % інгібування, з IgG1 не спостерігали значного та залежного від дози інгібування PAI-1) розраховували для кожної концентрації mAb. Відсоткове значення інгібування активності PAI-1 наносили графік залежно від концентрації mAb та визначали IC50 та I<sub>max</sub> за допомогою програмного забезпечення швидкої дії Biostat. Дані показані на фігурі 17 та в таблиці 29.

Таблиця 29

## Нейтралізація активності PAI-1 за допомогою A44-hv11 у печінці людини

|                          | IC50 (нМ)        | I <sub>max</sub> (%) |
|--------------------------|------------------|----------------------|
| A44-hv11 (1 нМ)          | 0,0365           | 99,997               |
| A44-hv11 (2 нМ)          | 0,0503           | 99,99                |
| A44-hv11 (3 нМ)          | 0,0465           | 99,99                |
| Середнє значення +/- sem | 0,0444 +/- 0,004 | 99,99                |

Виходячи з вищенаведених даних, A44-hv11 відбирали для додаткового визначення характеристик у додаткових структурних дослідженнях та додаткових дослідженнях *in vitro* та *in vivo*.

## Приклад 13. Гуманізація антитіла APG за допомогою трансплантації

Про гуманізацію з застосуванням методики трансплантації повідомлялося раніше (Р. Т. Jones, et al., Nature 1986, 321:522-525). Гуманізацію антитіла APG миші до PAI1 розпочинали з легкого ланцюга миші (SEQ ID NO: 148) та важкого ланцюга миші (SEQ ID NO: 149) згідно з заявкою на патент Німеччини № DE2000153251; це антитіло миші також описане в Debrock et al., Biochimica et Biophysica Acta, 1337(2):257–266 (1997). За допомогою ідентифікації послідовностей зародкового типу та канонічних класів HC- та LC-ланцюга антитіла миші одержували muIGHV1-39 та muIGKV14-111, відповідно. Потім ідентифікували перелік послідовностей зародкового типу людини, близьких до варіабельного домену легкого та важкого ланцюгів антитіла APG до PAI1, та ранжували їх згідно з відсотковим значенням ідентичності. Обидві стадії проводили шляхом здійснення пошуку BLAST відносно всіх послідовностей зародкового типу людини, які систематично нумерували (всі можливі комбінації V- та J-доменів для каппа- та лямбда-ланцюгів; V-, D- та J-домени для важких ланцюгів). Пошуки BLAST здійснювали із застосуванням інструмента IMGT/DomainGapAlign, доступного на сайті <http://www.imgt.org>. (див. Ehrenmann, et al. Cold Spring Harbor Protocols 2011.6 (2011)). Ідентифікували найбільш близькі послідовності зародкового типу людини, які характеризувались 67,4 % та 63,3 % ідентичністю послідовності з варіабельним доменом легкого та важкого ланцюгів антитіла APG до PAI1, відповідно. Із застосуванням бази даних IMGT виявили, що легкий ланцюг був близьким до HuIGKV1-33, а важкий ланцюг був близьким до HuIGHV1-46. Виявили, що найбільш близька послідовність зародкового типу людини з варіабельним доменом важкого ланцюга антитіла APG до PAI1 з канонічним класом, що збігається, являла собою HuIGHV7-4-1 з ідентичністю послідовності, що становила 62,2 %.

CDR-ділянки (на основі комбінації Kabat та IMGT для APG) та залишки Vernier позначені курсивом для легкого ланцюга початкового APG миші (mAPG) (SEQ ID NO: 148), IGKV1-33-01\_IGKJ4-01 (IGKV1a) (SEQ ID NO: 107) та для IGKV1-33-01\_IGKJ2-02 (IGKV1b) (SEQ ID NO: 150) (див. таблицю 30, нижче). Залишки Vernier, як визначено в Foote, et al. J. Mol. Biol. 224(2):487-99 (1992), підкреслені. Мутації гуманізації (виділені жирним шрифтом) одержували шляхом здійснення попарного порівняння двох підданих вирівнюванню послідовностей, за винятком CDR та залишків з зони Vernier (також підкреслені в послідовностях mAPG, таблиця

30), як визначено вище. Жодного додаткового конструювання стосовно антитіла APG миші не здійснювали. Ці гуманізовані антитіла назвали APGv2 та APGv4.

Таблиця 30

## Послідовності гуманізації APG

|                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| APG<br>Легк<br>ий<br>ланц<br>юг                          | <u>D</u> <u>K</u> <u>L</u> TQSPSS MYASLGERTV ITC <u>A</u> SQDIY <u>S</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>W</u> FQQKP GKSPK <u>T</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>R</u><br>ANRLIDGVPS RFS <u>G</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>Q</u> D <u>I</u> SLTISSLEY EHMGIYYCLQ YDEFPPTFGS<br>GTKLEIK<br>(SEQ ID NO: 148)                                       |
| APG<br>Важк<br>ий<br>ланц<br>юг                          | <u>Q</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>L</u> QESGPE LVKPGASVKI SCKAS <u>G</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>F</u> T DYNMNWVKQS KGKSLE <u>W</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>I</u><br>IHPNSGTTTY NQKF <u>K</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>L</u> T <u>V</u> DQSSSTAY LQLNSLTSED SAVYYC <u>A</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>K</u><br>LRFFDYWGQG TTVTVSS<br>(SEQ ID NO: 149) |
| IGK<br>V1-<br>33-<br>01_I<br>GKJ4<br>-01<br>(IGK<br>V1a) | DIQMTQSPSS LSASVGDRVITTCQASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYD<br>ASNLETGVPS RFS <u>G</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>T</u> D FTFTISSLQP EDIATYYCQQ YDNLPLTFGG<br>GTKVEIK<br>(SEQ ID NO: 107)                                                                                                                                                      |
| IGK<br>V1-<br>33-<br>01_<br>IGKI<br>2-02<br>(IGK<br>V1b) | DIQMTQSPSS LSASVGDRVITTCQASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYD<br>ASNLETGVPS RFS <u>G</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>T</u> D FTFTISSLQP EDIATYYCQQ YDNLPCSFQQ<br>GTKLEIK<br>(SEQ ID NO: 150)                                                                                                                                                      |

|                                          |                                                                                                                                                                                        |
|------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IGH<br>V7-4<br>1-02_<br>IGHJ<br>4-03     | QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMNWVRQAPGQGLEWMGW<br>INTNTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSSLKAEDTAVYYCARxxxxxYF<br>DYWGQGTLVTVSS<br>(SEQ ID NO: 151)                                    |
| IGH<br>V1-<br>46-<br>01_<br>IGHJ<br>4-03 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWRQAPGQGLEWMGII<br>NPSGGSTSYAQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARxxxxxY<br>FDYWGGQTLVTVSS<br>(SEQ ID NO: 152)                                     |
| APG<br>v2_V<br>L2                        | DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDIY SYLSWFQKKP GKAPKTLIYR AN<br>RLIDGVPS RFSGSGSGQD ITFTISSLPQ EDIATYYC LQ YDEFPFT FGQ<br>GTKLEIK<br>(SEQ ID NO: 153)                                     |
| APG<br>v2_V<br>H2                        | QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKAS GYSFT DYN MNWVRQA PGQGLEWIGI<br>IHPNSGTTTY NQKFKGR <del>AVL</del> SVDQSVSTAY LQISSSLKAED TAVYYCAR <del>SK</del><br>LRFFDYWGQG TLVTVSS<br>(SEQ ID NO: 154)  |
| APG<br>v4_V<br>H4                        | QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKAS GYSFT DYN MNWVRQA PGQGLEWI<br>GI IHPNSGTT TY NQKFKGR <del>ATL</del> TVDQSTSTAY MELSSLRSED TAVYYC <del>ARSK</del><br>LRFFDYWGQG TLVTVSS<br>(SEQ ID NO: 155) |

## Сконструйовані послідовності

- Підходи 4D-гуманізації та трансплантації застосовували до збігів з послідовностями зародкового типу людини, описаними вище. Стосовно сконструйованих послідовностей легкого ланцюга, APGv2 містить CDR легкого ланцюга, трансплантовані в послідовність IGKV1-33 зародкового типу людини (показник ідентичності APGv2 з послідовністю зародкового типу = 94 % з IGKV1-33-01\_IGKJ2-01). Стосовно сконструйованих послідовностей важкого ланцюга, APGv2 та APGv4 містять CDR важкого ланцюга миші, трансплантовані в послідовності IGHV7-4-1 та IGHV1-46 зародкового типу людини, відповідно (показник ідентичності APG\_VH2 з послідовністю зародкового типу = 91 % з IGHV7-4-1-02\_IGHD6-25-01\_IGHJ4-02; показник ідентичності APG\_VH4 з послідовністю зародкового типу = 91 % з IGHV1-46-01\_IGHD6-25-01\_IGHJ4-02). Див. таблицю 30 вище.

Комбінації варіантних послідовностей важкого та легкого ланцюгів

- За допомогою трансплантації створювали одну версію легкого ланцюга (APGv2\_VL2; SEQ ID NO: 153) та дві версії важкого ланцюга (APGv2\_VH2; SEQ ID NO: 154 та APGv4\_VH4; SEQ ID NO: 155). APG\_VL2 містить 15 мутацій, що походять від трансплантації в найбільш близьку послідовність зародкового типу людини, та зберігає залишки з CDR та зони Vernier миші.



APG\_VH2 містить 21 мутацію, що походять від трансплантації в найбільш близьку послідовність зародкового типу людини канонічного класу, що збігається, та зберігає залишки з CDR та зони Vernier миші. APG\_VH4 містить 20 мутацій, що походять від трансплантації в найбільш близьку послідовність зародкового типу людини, та зберігає залишки з CDR та зони Vernier миші.

5 Границі CDR для цього протоколу трансплантації були приблизними, на основі багатьох різних визначень, доступних в літературі.

- APG\_VL2 x APG\_VH2 (мутації, пов'язані з гуманізацією шляхом трансплантації зі збереженням ділянок CDR та Vernier).

- APG\_VL2 x APG\_VH4 (мутації, пов'язані з гуманізацією шляхом трансплантації зі збереженням ділянок CDR та Vernier).

10 Протягом цієї операції гуманізації одержали два варіанти mAPG, які назвали APGv2 та APGv4. Ці варіанти експресували та визначали їхні характеристики в декількох аналізах *in vitro*, як описано нижче.

15 Приклад 14. Кінетика спорідненості для антитіл APG за допомогою поверхневого плазмонного резонансу

Спорідненість з глікозилізованим PAI-1 людини (GLYHPAI-A, Molecular Innovation) досліджували за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (SPR) для APG миші та двох гуманізованих варіантів (APGv2 та APGv4) із застосуванням пристрою Biacore 2000 (GE Healthcare, Уппсала, Швеція).

20 По-перше, підготовували поверхню сенсорного чипа CM5 (GE Healthcare, Уппсала, Швеція) із застосуванням традиційного амінного зв'язування для захоплення антитіла до Fc миші та людини (набори з антитілом до IgG (Fc) людини та антитілом до IgG миші, GE Healthcare). Усі моноклональні антитіла (mAb) розводили до 5 нМ із застосуванням рухомого буфера HBS-EP. Кожне очищене mAb захоплювали протягом трьох хвилин на поверхні різних проточних комірок.

25 PAI-1 людини вводили з різними концентраціями (2,5, 5, 10, 20 та 40 нМ) з короткими періодами дисоціації між ними та довгим періодом дисоціації на завершальній стадії (час контакту: 120 секунд, коротка дисоціація: 90 секунд; тривала дисоціація: 1800 секунд, швидкість потоку: 50 мкл/хв.). Чип регенерували за допомогою буфера гліцин-HCl, pH 1,7, після кожного циклу зв'язування антитіло-PAI-1. Аналіз даних кінетики здійснювали із застосуванням програмного забезпечення Biacore BIAevaluation. Сенсограми піддавали процедурі подвійного контролю шляхом віднімання значень контрольної проточної комірки та значень контрольного буфера. Сенсограми апроксимували із застосуванням імітаційної 1:1 моделі кінетики (Ленгмюра) з локальним R<sub>max</sub>. (Див. фігуру 19). Дані для трьох антитіл APG показані в таблиці 31.

Таблиця 31

Кінетика зв'язування за допомогою зворотного аналізу Biacore

| Антитіло | PAI-1 людини                             |                                  |                      |
|----------|------------------------------------------|----------------------------------|----------------------|
|          | $k_a$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) | Швидкість дисоціації $k_d$ (1/s) | Спорідненість KD (M) |
| APG      | 3,82E+06                                 | 4,32E-04                         | 1,131E-10            |
| APGv2    | 6,58E+06                                 | 2,69E-04                         | 4,080E-11            |
| APGv4    | 9,48E+06                                 | 3,59E-04                         | 3,800E-11            |

35

Приклад 15. Визначення характеристик антитіл APG за допомогою плазми крові людини

APG миші та гуманізовані варіанти APGv2 та APGv4 піддавали скринінгу щодо їхньої здатності блокувати PAI-1 згідно з функціональними аналізами, розкритими в даному документі (див., наприклад, приклади 6 та 9 вище). Коротко, активність PAI-1 оцінювали за здатністю цього білка *serpin* утворювати стабільний комплекс з урокіназою, іммобілізованою на 96-лункових планшетах. Після відмивання незв'язаного PAI-1 комплекси uPA-PAI-1 виявляли за допомогою застосування поліклональних антитіл до PAI-1. Потім зв'язані поліклональні антитіла до PAI-1 (кількість яких пропорційна вмісту активного PAI-1 у зразку) виявляли із застосуванням вторинного антитіла, кон'югованого з пероксидазою хрому, згідно з інструкціями виробника (Molecular Innovation кат. № HPAIKT).

45 Різні концентрації гуманізованих варіантів APG (APGv2, APGv4) та початкових антитіл APG миші інкубували протягом 15 хвилин за кімнатної температури з нерозведеною плазмою крові людини з високим рівнем активного PAI-1. Рівень активного PAI-1, що залишився, визначали із застосуванням виявлення комплексу uPA-PAI-1 за допомогою ELISA, як описано вище (див., наприклад, приклад 6) та згідно з інструкцією виробника.

50

Інгібування активності PAI-1 розраховували для кожної концентрації mAb. Відсоткове значення інгібування активності PAI-1 наносили на графік залежно від концентрації гуманізованих варіантів APG (APGv2, APGv4) або початкового антитіла APG миші. Програмне забезпечення швидкої дії Biostat застосовували для визначення IC<sub>50</sub> та I<sub>max</sub> після трьох незалежних експериментів (в двох повторностях)(див. фігуру 20). Дані наведені нижче в таблиці 32.

Таблиця 32:

## Утворення плазміногену у плазмі крові людини

| Антитіло | Середнє значення IC <sub>50</sub> abs ± sem (нМ) | Середнє значення I <sub>max</sub> (%) |
|----------|--------------------------------------------------|---------------------------------------|
| mAPG     | 1,81                                             | 89,7                                  |
| APGv2    | 9,62 E-1                                         | 94,5                                  |
| APGv4    | 1,28                                             | 94,4                                  |

Приклад 16. Аналіз лізису згустків в плазмі крові людини: активність A44V11, mAPG та варіантів APG

Фібринолітична система у пацієнтів з інсультом часто піддається зміні. Аналіз лізису згустків можна застосовувати для визначення фібринолітичної активності шляхом вимірювання ступеня руйнування фібрину. Див., загалом, Lindgren, A. et al. Stroke 27:1066-1071 (1996). Аналізи лізису згустків були описані докладно в іншому місці. Див., наприклад, Beebe, et al. Thromb. Res. 47:123-8 (1987); Tilley et al., J. Vis. Exp.67:e3822.

Функціональну активність A44V11 та інших антитіл, що нейтралізують PAI-1, визначали із застосуванням аналізу лізису згустків у плазмі крові людини. Коротко, в аналізі, який застосовували в даному документі, утворення згустку індукували із застосуванням суміші тканинного фактора/Ca<sup>2+</sup> в присутності tPA та визначеної концентрації PAI-1, яка, як відомо, інгібує лізис згустків. Полімеризація фібрину спричиняє підвищення значення при турбідиметричному вимірюванні, що виявляли за допомогою вимірювання поглинання при 340 нм. Здатність антитіла відновлювати лізис згустків визначали за допомогою інкубації зростаючих доз антитіла з нормальною збідненою тромбоцитами плазмою крові людини.

Коротко, експерименти з лізису згустків здійснювали в титраційних мікропланшетах. Плазму крові людини з цитратом (Biopredic International, Ренн, Франція) інкубували з антитілом до PAI-1 або IgG ізотипічного контролю, розведеним в буфері для аналізу (NaCl, Tris-HCl, pH=7,4). Після 15 хвилин інкубації за кімнатної температури додавали глікозильований PAI-1 людини (GLYHPAI-A, Molecular Innovation) до кінцевої концентрації 3 нМ та інкубували протягом додаткових 10 хвилин. Потім додавали t-PA (scfPA, Molecular Innovation) до кінцевої концентрації 1 нМ. Утворення згустку індукували за допомогою суміші для активації, що містила тканинний фактор (Innovin®, Siemens Healthcare Diagnostics, Марбург, Німеччина), розведений до кінцевої концентрації 7,5 мМ в кальцієвому буфері для аналізу (CaCl<sub>2</sub>).

Зчитування кінетики поглинання при 340 нм здійснювали кожні 30 с протягом 5 годин за допомогою зчитувального пристрою для мікропланшетів iEMS (ThermoFischer) або SpectrostarNano (BMG Labtech). Для кількісної оцінки ефекта на лізис згустків площу під кривою (AUC), яка відображає рівновагу між утворенням згустків та лізисом згустків, розраховували із застосуванням програмного забезпечення GraphPad Prism. Відновлення лізису згустків після обробки антитілом визначали згідно з наступною формулою:

$$\text{Відновлення} = 100 \times \frac{AUC_{\text{максимальний лізис}} - AUC_{\text{оброблені}}}{AUC_{\text{відсутність лізису}} - AUC_{\text{максимальний лізис}}}$$

IC<sub>50</sub> та I<sub>max</sub> розраховували за допомогою програмного забезпечення швидкої дії Biostat.

1 нМ концентрація t-PA призводила до повного лізису в нормальній плазмі крові протягом 2 годин. 3 нМ концентрація PAI-1 інгібувала індукований t-PA лізис згустків. Додавання або t-PA, або PAI-1 окремо не впливало на утворення згустку. Відсутність додавання як t-PA, так і PAI-1 не впливала на утворення згустку.

Антитіло A44V11 до PAI-1 відновлювало лізис згустків у збідненій тромбоцитами плазмі крові людини (див. фігуру 21), у той час як ізотипічний IgG1 не відновлював (див. фігуру 22). A44V11 проявляло IC<sub>50</sub>, що становила 2 нМ, при цьому I<sub>max</sub> становила 103 % при 100 нМ (див. фігуру 23).

Гуманізовані варіанти антитіла APG до PAI-1 також відновлювали лізис згустків у збідненій тромбоцитами плазмі крові людини (див. фігуру 24). APGv2 проявляло  $IC_{50}$ , що становила 2,1 нМ, а  $I_{max}$  становила 114 % при 100 нМ. APGv4 проявляло  $IC_{50}$ , що становила 2,8 нМ, а  $I_{max}$  становила 116 % при 100 нМ (див. фігуру 25). Дані з лізису згустків узагальнені нижче в таблиці 33.

Таблиця 33:

## Інгібування лізису згустків за допомогою антитіла до PAI-1

| Антитіло | $IC_{50}$ (нМ) | $I_{max}$ при 100 нМ |
|----------|----------------|----------------------|
| A44V11   | 1,38           | 113 %                |
| APG V2   | 2,08           | 114 %                |
| APG V4   | 2,82           | 116 %                |
| mAPG     | 2,34           | 123 %                |

Приклад 17. Оцінка нейтралізації PAI-1 за допомогою A44V11 у первинних клітинах легені людини

Ефект антитіла A44V11 на нейтралізацію PAI-1 досліджували в системі на основі клітин легені. Вважають, що TGF $\beta$  є найбільш сильним та універсальним профіброгенним цитокіном. Було показано, що TGF $\beta$  індукуює експресію PAI-1 та інгібування активності t-PA та плазміну, а також розпад колагену в ембріональних фібробластах миші у культурі (клітини NIH3T3). Див. Liu, R-M. Antioxid Redox Signal. 10(2): 303-319 (2008). Лінії первинних фібробластів легені LL29 (CCL-134) та LL97A (CCL-191) з ATCC (Манассас, Вірджія) вирощували протягом ночі в 12-лунковому планшеті за концентрації 200000 клітин на лунку. Клітини інкубували протягом 48 годин з антитілом A44V11 або ізотипічним контролем (IgG) та TGF $\beta$  (R&D Systems, Міннеаполіс, Міннесота, кат. № 100-B-001) за концентрації 5 нг/мл. Через 48 годин надосадові рідини клітин збирали та аналізували за допомогою вестерн-блотингу для виявлення форм PAI-1 за допомогою pAb кролика до PAI-1 (abcam, ab66705).

У клітин, оброблених за допомогою антитіла A44V11 після стимуляції TGF $\beta$ , смуга PAI-1 виглядала як подвійна лінія, що відповідає розщепленій формі PAI-1 (див. фігуру 26, доріжка 5). У клітин, оброблених за допомогою контрольного IgG, не відмічали утворення такої подвійної лінії (див. фігуру 26, доріжка 6). Це дослідження демонструє, що обробка первинних клітин легені людини за допомогою A44V11 індукуює субстратну конформацію в ендогенного PAI-1, що забезпечує можливість розщеплення PAI-1 за допомогою протеази.

Приклад 18. A44V11 підвищує активацію MMP

Плазмін може активувати MMP, ферменти які можуть руйнувати більшість білків ECM, у тому числі колаген, головний білковий компонент фібрознаї тканини. У зв'язку з цим, плазмін часто згадують як головний активатор MMP. (Див. Loskutoff, et al. J. Clin. Invest. 106(12):1441-43 (2000)). PAI-1 знижує активацію MMP та руйнування матриксу шляхом блокування утворення плазміну з подальшим інгібуванням апоптозу фібробластів. Здатність A44v11 стимулювати активацію MMP досліджували в системі на основі клітин легені. Первинні фібробласти легені LL29 (CCL-134) та LL97A (CCL-191) з ATCC (Манассас, Вірджія) вирощували протягом ночі в 12-лунковому планшеті за концентрації 250 000 клітин на лунку. Клітини інкубували протягом 48 годин з A44V11 або ізотипічним контролем (IgG) та Lys-плазміногеном (Molecular Innovation, кат. № HGPG-712) за концентрації 0,1 мкМ. Через 48 годин надосадові рідини клітин збирали та активності низки MMP (у тому числі, наприклад, MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 12, 13 та 14) виявляли із застосуванням набору для аналізу загальних MMP Sensolyte 520 (AnaSpec, Фремонт, Каліфорнія, кат. № 71158) згідно з інструкціями виробника.

Як показано на фігурі 27, A44V11 стимулює активацію плазмін-залежних MMP у фібробластах легені людини. На діаграмі показані два ілюстративних окремих експерименти. У клітин, оброблених за допомогою A44V11 та плазміногену, показана суттєвим чином підвищена активація порівняно з клітинами, обробленими за допомогою антитіла IgG1 негативного контролю. Це дослідження демонструє, що A44V11 стимулює активацію MMP за допомогою опосередкованого плазміном механізму.

Приклад 19. Аналіз ефективності A44V11 на мишачій моделі фіброзу легенів (провокаційна проба з блеоміцином)

Експериментальний фіброз легенів, індукований за допомогою блеоміцину, являє собою добре досліджену модель фіброгенезу, яка підкріплена безліччю літературних джерел. Ця модель легеневого фіброзу нагадує фіброз, який спостерігають у людини, та її застосовували

для оцінки ефектів потенційних терапевтичних засобів, а також для теоретичних досліджень. (Див., наприклад, Molina-Molina et al. Thorax 61:604–610 (2006)).

Дослідження фармакодинаміки на мишах, оброблених блеоміцином (модель фіброзу)

Трансгенних мишей, в яких експресується PAI-1 людини (трансгенні миші з гуманізованим PAI-1), одержували шляхом заміни CDS (екзони та інтрони) гена (SERPINE1) PAI-1 миші (реєстр. № в NCBI NM\_008871) на відповідний CDS гена PAI-1 дикого типу людини (реєстр. № в NCBI NM\_000602.3; NC\_000007.13) (див. Klinger, K.W. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:8548 (1987)) під контролем ендогенних регуляторних послідовностей гена PAI-1 миші у мишей C57BL/6 × 129 (The Jackson Laboratory, Бар Харбор, Мен). Молекулярне клонування та одержання трансгенних мишей здійснювали згідно з традиційними методиками та згідно з інструкціями виробника та фахівця з розведення тварин. Експресію PAI-1 людини та відсутність експресії PAI-1 миші підтверджували у гомозиготних мишей. Рівні мРНК та білка підтверджували за допомогою стандартної qPCR та за допомогою ELISA, відповідно. Для даних процедур застосовували гомозиготних самок трансгенних мишей з гуманізованим PAI-1 віком 8-9 тижнів та вагою 22-25 г. Гризунів забезпечували кормом та водою без обмежень.

Миші отримували 50 мкл Bleomycin® (Sanofi, Франція), розчиненого в 0,9 % NaCl, шляхом внутрішньотрахеального введення за допомогою мікропульверизатора з розрахунку дози 2 мг/кг. Контрольні миші отримували 50 мкл 0,9 % NaCl. Для цих процедур мишей анестезували шляхом інгаляції ізофлурану (TEM, Лормонт, Франція) та потім інтубували за допомогою канюлі 18G. Канюлю приєднували до апарата штучної вентиляції легенів з сумішшю кисень/ізофлуран для підтримання анестезії. Після анестезії мікропульверизатор вводили в канюлю для введення блеоміцину безпосередньо в легені. Потім проводили екстубацію та мишам забезпечували можливість відновлення після анестезії. У день 4, після рандомізації на 3 групи, мишей обробляли одноразово шляхом внутрішньочеревинного введення або A44v11, або IgG1 миші як негативного контролю з розрахунку 10 мг/кг в PBS (1 мг/мл).

В позначені моменти часу (день 7 або день 9) після провокаційної проби з блеоміцином мишей анестезували за допомогою суміші ксилазин/кетамін та піддавали евтаназії за допомогою розкриття грудної клітини. Збір крові здійснювали шляхом внутрішньосерцевого збору у вкриту цитратом пробірку. На лівий бронх накладали затискач та ліву легеню видаляли та для гістологічного аналізу фіксували в фіксаторі (FineFix®, Leica Biosystems, Буффало Гроув, Іллінойс) за умов контрольованого тиску. Потім канюлю вміщали в трахею для проведення процедури бронхоальвеолярного лаважу (BAL) (вводили 1,5 мл 0,9 % NaCl за допомогою трьох введеннь по 0,5 мл та виконували збір). Потім збирали чотири частки правої легені, розрізали на два шматки та піддавали лізису для аналізу білків. Всі експерименти здійснювали згідно з європейськими правилами етичного поводження з тваринами та вони були ухвалені внутрішнім комітетом з етики (CEPAL, sanofi).

Рівні A44V11 визначали із застосуванням ELISA (Molecular Innovation, кат. № HPAIKT) за допомогою планшетів, вкритих біотинільованим PAI-1 людини, та виявляли із застосуванням вторинного антитіла до IgG миші, міченого sulfo-tag (MesoScale Discovery, Гейтерсбург, Мериленд). У мишей з групи дня 7, оброблених A44V11, результат становив 200 нМ в плазмі крові, 11 нМ в BALF та 12 нМ в лізаті легені.

Як показано на фігурі 28, при внутрішньочеревинному введенні одноразової дози (10 мг/кг) A44V11 в день 4 досягалось практичне повне інгібування активного PAI-1 людини як в рідині BAL, так в лізаті легені у тварин, яких умертвляли у день 7 після провокаційної проби з блеоміцином. Стосовно тварин з групи дня 9, за допомогою A44V11 (10 мг/кг) досягалось практично повне інгібування активного PAI-1 людини в лізатах легені, але досягалось лише часткове інгібування в BALF.

D-димери, продукт розпаду фібрину можна вимірювати для оцінки ступеню руйнування фібрину. Для вимірювання розпаду фібрину рівні D-димеру в BALF визначали за допомогою ELISA (Asserachrom D-Di, Diagnostica Stago, Аньєр, Франція) згідно з інструкціями виробника. Рівні D-димеру в BALF у групи, обробленої A44V11, підвищувалися приблизно в 2,8 рази в день 7 та в 1,6 разу в день 9 порівняно з групою негативного контролю IgG1, що дозволяє припускати, що обробка A44V11 підвищує розпад фібрину (див. фігуру 29).

Додаткові дослідження здійснювали для додаткової оцінки активності A44V11 в зниженні фіброзу в легені миші, спричиненого провокаційною пробю з блеоміцином. Для цих досліджень мишей піддавали аналогічному протоколу для дослідження фармакодинаміки, описаному вище, за винятком того, що тривалість часу дослідження становила 21 день після провокаційної проби з блеоміцином, а обробку антитілом (або A44V11, або контрольним антитілом IgG1 з розрахунку 10 мг/кг) повторювали кожні 3 дні, починаючи з дня 4 до дня 20. В день 21 після провокаційної проби з блеоміцином тварин умертвляли, як описано вище.

Збільшення маси легені, як відомо, є показником підвищеного фіброзу. Масу правої легені, як кількісну оцінку фіброзу, визначали для мишей у всіх експериментальних групах. Як показано на фігурі 30, інстиляція блеоміцину спричиняє підвищення маси правої легені, яке частково інгібувалось повторним введенням доз антитіла A44V11 з розрахунку 10 мг/кг. Повторне введення доз антитіла негативного контролю IgG1 не інгібувало підвищення маси правої легені, зумовлене провокаційною пробою з блеоміцином. Зменшення індукованого блеоміцином підвищення маси правої легені у мишей, оброблених A44V11, було статистично значущим порівняно з аналогічними індукованими блеоміцином мишами, яких обробляли за допомогою антитіла негативного контролю IgG1 ( $p < 0,001$ ). Статистичний аналіз здійснювали за допомогою однофакторного ANOVA з наступним застосуванням критерію Ньюмена-Кейлса. Цей результат вказує на те, що A44V11 інгібує індукований блеоміцином фіброз в легені мишей з гуманізованим PAI-1, тоді як контрольне антитіло IgG1 не інгібує.

Відкладення колагену в легені є іншим відомим показником фіброзу. Для аналізу відкладення колагену тканини легені від мишей, яких умертвляли в день 21, готували та розділяли за допомогою HPLC, з подальшим вимірюванням гідроксипроліну. Ця методика детально описана в іншому місці, наприклад, у Hattori, et al. J Clin Invest.106(11):1341–1350 (2000). Коротко, тканину легені готували за допомогою гідролізу за кислотних умов (6M HCl) протягом 22 годин при 105 °C з подальшим випарюванням. Первинні аміни блокували в тканині легені за допомогою OPA (фталевий альдегід), та пролін/гідроксипроліни специфічно мітили із застосуванням NBD (4-хлор-7-нітробензофуран) (Santa Cruz Biotech., Санта-Круз, Каліфорнія). Гідролізати потім розділяли на колонках Synergi™ 4 мкм Hydro-RP 80 Å, колонці для LC 150 × 3 мм (Phenomenex, Торренс, Каліфорнія, кат. № 00F-4375-Y0) із застосуванням HPLC (Shimadzu Corp., Кіото, Японія) з градієнтом ацетонітрилу. Калібрувальні криві з відомими кількостями гідроксипроліну застосовували як еталон для кількісної оцінки піка(ів). Зображення кількісних даних показане на фігурі 31.

Відкладення колагену в легені, як виявлено за допомогою вмісту гідроксипроліну, підвищувалося в тварин, підданих провокаційній пробі з блеоміцином. Це підвищення відкладення колагену в легені статистично знижувалося ( $p < 0,08$ ) при повторному введенні доз антитіла A44V11 з розрахунку 10 мг/кг. (Див. фігуру 31). Повторне введення доз антитіла негативного контролю IgG1 не інгібувало підвищення відкладення колагену в легені, зумовлене провокаційною пробою з блеоміцином. Зменшення індукованого блеоміцином відкладення колагену в мишей, оброблених A44V11, було статистично значущим порівняно з аналогічними індукованими блеоміцином мишами, яких обробляли за допомогою антитіла негативного контролю IgG1 ( $p < 0,05$ ). Підвищення відкладення колагену в мишей, оброблених A44V11, було приблизно на 44 % меншим, ніж у мишей, оброблених контрольним IgG1.

Приклад 20. Оцінка активності A44V11 на моделі з провокаційною пробою LPS у мавп

Гостру модель з провокаційною пробою ліпополісахаридом (LPS) у мавп застосовували для визначення ефективності нейтралізації PAI-1 за допомогою A44V11 in vivo. Модель з провокаційною пробою LPS описана в Hattori, et al. J Clin Invest.106(11):1341–1350 (2000). Оцінювали активність mAb A44V11 щодо PAI-1 в плазмі крові та зразках печінки мавп. А саме, експеримент розробляли для оцінки впливу високої дози LPS (100 мкг/кг - IV) на рівні PAI-1 в плазмі крові та тканинах у підданих анестезії мавп, попередньо оброблених (за 24 години) за допомогою або A44V11 (5 мг/кг, IP), або IgG1 (негативний контроль, 5 мг/кг, внутрішньочеревинне введення). Експерименти здійснювали згідно з європейськими правилами етичного поводження з тваринами, та вони були ухвалені внутрішнім комітетом з етики (CEPAL, sanofi).

Макак-крабоїдів *Macaca fascicularis* (самці та самки) вагою 4-9 кг не годували протягом ночі перед проведенням довготривалої анестезії (щонайменше 8 годин), що передбачала ІМ-індукцію за допомогою Zoletil 50 (Virbac, Tarir Citi, Філіппіни) з розрахунку 0,12-0,16 мл/кг, з наступною інгаляцією газоподібною сумішшю повітря/кисню та ізофлурану (1-3 %). Температуру тіла мавпи підтримували в межах фізіологічних значень із застосуванням грілки-подушки. Після введення катетера LPS (серотип 0127-B8) вводили 1 хв. як болюс в головну додаткову вену з дозою 100 мкг/кг (0,4 мл/кг). В різні моменти часу відбирали зразки крові та зразки печінки. Зразки крові (цитрат/EDTA) збирали та центрифугували для виділення збідненої тромбоцитами плазми крові. Біоптати печінки та матеріал термінальної некропсії зберігали при -80 °C.

Рівні активного PAI-1, D-димеру та плазміну- $\alpha 2$  антиплазміну визначали із застосуванням комерційно доступних аналізів ELISA (Mol. Innovation, кат. № HPAIKT; Asserachrom D-Dimer; Plasmin-A2 antiplasmin, Diagnostica Stago) згідно з інструкціями виробника.

В плазмі крові рівень активного PAI-1 знижувався від приблизно 30 нг/мл до нижчого за 10 нг/мл у всіх мавп, яким вводили A44v11. (Див. фігуру 32(A)). Не спостерігалось підвищення

рівнів активного PAI-1 після введення LPS (100 мкг/кг). (Див. фігуру 32(A)). Навпаки, у мишей, оброблених IgG1 негативного контролю, показане сильне підвищення рівнів активного PAI-1 після введення LPS, при цьому максимум спостерігали через приблизно 4 години (приблизно від 50 до майже 250 нг/мл). (Див. фігуру 32(B)). Таким чином, обробка IgG1 негативного контролю не знижує рівні активного PAI-1 в плазмі крові, які були сильно підвищені після введення LPS. (Див. фігуру 32(B)).

В лізатах біоптатів печінки спостерігали аналогічну ситуацію. У мавп, яких обробляли mAb A44V11, не показане підвищення рівнів активного PAI-1 після обробки за допомогою LPS. (Див. фігуру 33(A)). Навпаки, введення LPS призводило до сильного підвищення активного PAI-1 (аж до 3 нг/мл) в лізатах біоптатів печінки від мавп, оброблених IgG1 негативного контролю (див. фігуру 33(B)).

Одночасно з нейтралізацією PAI-1 виявили, що рівні D-димеру у мавп, оброблених A44V11 (див. фігуру 34(A)), загалом були вищими, ніж у мавп, оброблених IgG негативного контролю (див. фігуру 34(B)), що, таким чином, дозволяє припускати, що обробка A44V11 у мавп також спричиняє підвищення розпаду фібрину в плазмі крові.

Нарешті, в зразках плазми крові мавп, оброблених A44V11, показаний підвищений рівень комплексів плазміну-α2 антиплазміну (PAP) порівняно з рівнями PAP у мавп, оброблених IgG негативного контролю. (Див. фігуру 35(A) та (B)). Підвищення вмісту PAP-комплексу та D-димеру в присутності A44V11 вказує на підвищення утворення плазміну.

Приклад 21: Оцінка активності A44V11 на мишачій моделі спайок черевної порожнини

Ефект обробки антитілом A44V11 до PAI-1 на утворення спайок оцінювали на мишачій моделі хірургічного ушкодження рогів матки. Зближення рогів матки миші та процедура електрокаутеризації порушують поверхню серозної оболонки, спричиняють термічне пошкодження тканини матки та зближують поверхні пошкоджених тканин під час процесу загоєння, що, в підсумку, призводить до утворення післяопераційних спайок у 100 % тварин, яких не піддають обробці. Модель та хірургічна процедура були описані раніше у Haney A.F. et al., (1993). *Fertility and Sterility*, 60(3): 550-558.

Для цих досліджень утворення спайок застосовували самок трансгенних мишей, одержаних вище, в яких експресувався трансген гуманізованого PAI-1, віком приблизно 9, з масою приблизно 20 г. Сорок дві дорозрі самки трансгенних мишей розділяли на дві групи та піддавали хірургічній процедурі, розробленій для створення спайок між рогами матки (UH), як детально описано у Haney A.F. et al., (1993). Коротко, кожну тварину анестезували за допомогою ізофлурану для проведення операції згідно з методичними вказівками IACUC та стандартну серединну лапаротомію проводили приблизно на 1,0 см каудальніше за мечеподібний відросток. UH виявляли, зближували медіально за допомогою одного шва за допомогою Prolene 7-0 (Ethicon Inc., Сомервілл, Нью-Джерсі), який акуратного походив через м'язову стінку кожного рога, та рога зв'язували разом безпосередньо нижче місця приєднання яйцепроводів у матково-трубному з'єднанні. Діяли обережно, аби не пошкодити систему кровопостачання яєчників. Для індукування пошкодження за допомогою електрокаутера застосовували біполярний електрокаутерний апарат (Valley Lab Surgistat, напівпровідниковий апарат для електрохірургії, модель № B-20) на медіальній поверхні кожного рога матки, покриваючи зону розміром приблизно 2 × 6 мм. Каутерний апарат мав наступні налаштування: 100 Вольт, 130 Гц, 50-60 Ампер. Наконечник каутера шириною 3 мм застосовували з чистим коагуляційним струмом у положенні 3, подавали живлення та торкалися тканини протягом 1 секунди в двох точках нанесення опіку на ріг. Розріз м'язів зашивали за допомогою Vicryl 5-0, колючої голки BV-1 (Ethicon Inc.), за схемою безперервного шва. Шкіру зашивали за допомогою Prolene 5-0, колючої голки BV-1 (Ethicon Inc.), за схемою горизонтального матрацного шва.

Після створення пошкодження UH тварин групи 1 обробляли за допомогою антитіла ізотипічного контролю (30 мг/кг) в об'ємі 0,16 мл, яке наносили на опіки, спричинені каутеризацією. Тварин групи 2 обробляли за допомогою антитіла A44V11 (30 мг/кг) в об'ємі 0,16 мл тим самим способом. Стосовно кожної групи, тварин піддавали евтаназії через 6 годин (n=5), 72 години (n=4) або в день 7 (n=12). (Див. таблицю 34 нижче). Тваринам, у яких евтаназія планувалася через 72 години або в день 7, давали другу дозу антитіла (30 мг/кг), яку ін'єктували внутрішньочеревинно (IP) через 48 годин після операції.

Таблиця 34:

Схема обробки для досліджень з пошкодженням рогів матки.

| Група   | Обробка                                 | Момент часу евтаназії | Число тварин | Введення дози (30 мг/кг) |
|---------|-----------------------------------------|-----------------------|--------------|--------------------------|
| Група 1 | mAb ізотипічного контролю (0,16 мл)     | 6 годин               | 5            | Момент часу 0            |
|         |                                         | 72 годин              | 4            | Момент часу 0+48 годин   |
|         |                                         | День 7                | 12           | Момент часу 0+48 годин   |
| Група 2 | Гуманізоване mAb A44 до PAI-1 (0,16 мл) | 6 годин               | 5            | Момент часу 0            |
|         |                                         | 72 годин              | 4            | Момент часу 0+48 годин   |
|         |                                         | День 7                | 12           | Момент часу 0+48 годин   |

Примітка: У всіх тварин роги матки зближували за допомогою шва та опіки, спричинені каутеризацією, створювали перед обробкою.

5 Оцінка та аналіз ефективності

Тварин піддавали евтаназії в зазначені моменти часу та оцінювали утворення спайок. Коротко, довжину рогів вимірювали від місця біфуркації матки до зближувального шва безпосередньо під яйцепроводами. Два зовнішні шви, що оточують роги матки, видаляли та довжину спайки між рогами матки вимірювали за допомогою мікроскопа, документували та відмічали як наявну або відсутню (так/ні). Також, будь-які тканини, залучені в утворення спайок, слід реєструвати, але можна не включати до довжини зони спайки. Розподіл середнього відсоткового значення довжини спайки між рогами матки перевіряли щодо нормальності із застосуванням критерію Шапіро-Уїлка. Групи порівнювали одну з одною із застосуванням аналізу Тьюкі-Крамера за нормального розподілу та аналізу суми рангів Уїлкоксона за відсутності нормального розподілу. У всіх випадках, р-значення  $\leq 0,05$  вважали статистично значущим. У тварин, оброблених A44V11, показане значно більш низьке відсоткове значення довжини утворення спайок між зближеними рогами матки (див. таблицю 35)

Таблиця 35

Результати вимірювання довжини рогів матки.

| Група                               | N  | % довжини спайок між рогами матки (Середнє значення $\pm$ SEM) |
|-------------------------------------|----|----------------------------------------------------------------|
| mAb ізотипічного контролю (0,16 мл) | 12 | 84 $\pm$ 3                                                     |
| mAb A44V11 (0,16 мл)                | 11 | 61 $\pm$ 7* (p=0,02)                                           |

\*p= статистична значущість відносно ізотипічного контролю за допомогою аналізу суми рангів Уїлкоксона, наближення за критерієм хі-квадрат.

20 Визначення рівнів активного PAI-1 та tPA

Після евтаназії у тварин збирали кров (плазму крові), внутрішньочеревну рідину (IPF) та зразки рогів матки для проведення оцінювання. Збір зразків здійснювали із застосуванням традиційних методик. Плазму крові, IPF та зразки рогів матки оцінювали щодо рівнів активного PAI-1 та tPA із застосуванням ELISA. (Набори ELISA для визначення активності PAI-1 людини, кат. № HPAIKT, Molecular Innovations, Нові, Мічиган). Дані обробляли із застосуванням програмного забезпечення Excel, JMP та Prism Graph pad. У всіх випадках, р-значення  $\leq 0,05$  вважали статистично значущим. У моменти часу 6 годин та день 7 знижені рівні активного PAI-1 виявляли у IP-рідині та лізатах рогів матки у тварин, оброблених за допомогою A44V11, порівняно з обробленими ізотипічним контролем. (Див. фігуру 36). Знижені рівні активного PAI-1 у IPF через 6 годин являли собою статистично значущий результат, як показано в IP-рідині в

момент часу 6 годин у тварин, оброблених за допомогою A44, порівняно з обробленими ізотипічним контролем ( $p < 0,001$  згідно з Т-критерієм Стюдента).

Приклад 22: Кристалічна структура гуманізованого антитіла A44V11

Експресія та очищення Fab A44V11

5 Рекомбінантний Fab (rFab) одержували від тимчасово трансфікованих клітин HEK293 із застосуванням двох плазмід, що кодували легкий ланцюг або важкий ланцюг з С-кінцевою His-міткою. Після центрифугування та фільтрації rFab з надосадової рідини клітин наносили на смолу для афінної хроматографії на іммобілізованих іонах металу. Після елюювання зі смоли rFab піддавали ретельному діалізу проти PBS та зберігали при 4 °C.

10 Джерело PAI-1 *Macaca fascicularis*, який називають PAI-1 яванської макаки або макаки-крабоїда

Рекомбінантний зрілий PAI-1 яванської макаки (24-402) експресували як тільця включення в E. coli та рекомбінантний білок очищали із застосуванням традиційних способів.

Джерело PAI-1 людини

15 Рекомбінантний зрілий PAI-1 людини (24-402) купували в Molecular Innovations Inc. (номер за каталогом CPAI). Він був стабілізований в активній конформації шляхом введення мутацій (N150H, K154T, Q319L, M354I), як описано в Berkenpas et al. (1995, EMBO J., 14, 2969-2977).

Одержання та очищення комплексів

20 Рекомбінантний Fab та антиген змішували при молярному співвідношенні 1,5:1, інкубували 30 хвилин за кімнатної температури та комплекси піддавали додатковому очищенню за допомогою препаративної гель-фільтрації на колонці Superdex 200 PG (GE Healthcare), врівноваженій 25 mM MES, pH 6,5, 150 mM NaCl.

Кристалізація комплексу Fab A44V11+PAI-1 макаки-крабоїда

25 Комплекс концентрували до 10 мг/мл в 25 mM MES, pH 6,5, 150 mM NaCl. Його кристалізували в 16-24 % етанолі, 100 mM Tris, pH 8,5. Етиленгліколь (30 %) застосовували як криопротектор. Дифракцію на кристалах здійснювали до приблизно 3,3Å в просторовій групі P321 ( $a=b=193\text{\AA}$ ,  $c=144\text{\AA}$ ) на канал синхротронного випромінення ID29 ESRF. Дані обробляли за допомогою комбінації XDS та Scala (GlobalPhasing Ltd., Кембридж, Великобританія)

Визначення структури комплексу Fab A44V11/PAI-1 макаки-крабоїда:

30 Модель варіабельного домену Fab конструювали із застосуванням Prime in Maestro (Schrodinger, Нью-Йорк, Нью-Йорк). Константний домен одержували на основі опублікованої структури 3FO2. Застосовували дві різні моделі PAI-1 людини: неактивну конформацію одержували на основі 1LJ5, активну конформацію на основі 1OC0. Розрахунок коефіцієнту Метьюса ( $V_M$ , об'єм кристала на одиницю молекулярної маси білка) дозволив припустити існування до чотирьох комплексів в асиметричній комірці ( $V_M$  2, 2) припускає розмір комплексу в 90 кілодальтон (KD). Молекулярне заміщення проводили із застосуванням Phaser (пакет програм CCP4) (McCooy, et al. J. Appl. Cryst. 40: 658-674 (2007), за допомогою якого виявили два мономери неактивного PAI-1 та два варіабельних домени Fab. Додаткова щільність була явно видимою для константних доменів, яку необхідно було розміщувати вручну. Цей розчин, який

40 відповідав значенню  $V_M$  4,3 (71 % розчинника), також ретельно перевіряли щодо стабільності пакування. Структуру доопрацьовували за допомогою Buster (GlobalPhasing) із застосуванням некристалографічної симетрії, до Rfree 29,2 % (Rfactor 25,8 %). Константні домени не стабілізуються за допомогою пакування кристала та мають слабе розділення на карті електронної щільності.

45 Кристалізація комплексу Fab A44V11+PAI-1 людини

Кристалізація білка являє собою "вузьке місце" у визначенні структури біомолекул за допомогою способів рентгенівської кристалографії. Успіх у кристалізації білка прямо пропорційно пов'язаний з якістю білкових молекул, які застосовують в експериментах з кристалізації, при цьому найбільш важливими критеріями якості є чистота та однорідність (як молекулярна, так і конформаційна) білків у розчині.

50 Спочатку для визначення структури комплексу PAI-1/Fab mAb нативний mAb A44 застосовували для одержання його Fab-фрагмента шляхом розщеплення папаїном. Таке одержання Fab у збільшеному масштабі призводило до гетерогенних Fab-фрагментів, які вводили в комплекс та очищували в комплексі з білком PAI-1 дикого типу людини (wt). Одержаний білковий комплекс концентрували до концентрації 7 мг/мл та проводили скринінг щодо кристалізації за 800 індивідуальних умов кристалізації при двох різних температурах, 4 °C та 19 °C. Визначали відсутність успішних кристалізацій. Для поліпшення однорідності білкових комплексів рекомбінантний Fab A44 з міткою 6-His одержували, очищали та об'єднували в комплекс з білком PAI-1 дикого типу людини (див. фігуру 36).



Скринінг кристалізації комплексу виявив перші успішні кристалізації за умов 20 % PEG 10K+0,1 М ацетат натрію, pH 4,6. Оптимізація кристалізації за допомогою традиційних способів кристалізації, методу мікроперенесення кристалів та кристалізації трипсінолізісом *in situ*, суттєво не поліпшувала якість кристалів. Найкращі одержані кристали були голкоподібними та характеризувалися дифракцією рентгенівських променів при розділенні, недостатньому для визначення структури (10Å).

Невдачу з кристалізацією комплексних кристалів, імовірно, можна було пояснити конформаційною неоднорідністю комплексів. Молекула PAI-1 дикого типу, як відомо, набуває трьох окремих конформацій (активної, неактивної та субстратної), які можуть перешкоджати кристалізації. Для поліпшення якості кристалів одержували Fab A44 з міткою 6-His в комплексі з неактивним PAI-1. (Див. фігуру 37).

Відповідний комплекс одержували та піддавали скринінгу щодо кристалізації *de novo* та за умов, які раніше застосовували для комплексу Fab A44 з міткою 6-His/білок PAI-1. Ідентифікували лише одну успішну кристалізацію з більш ніж 1000 протестованих умов для комплексу за умов 20 % PEG3350+0,2 М pH4 ацетату +4 % MPD+50 mM Mes, pH 6 (див. фігуру 39(a)). Після інтенсивної оптимізації одержували 3D-кристали. Тести з рентгенівською дифракцією із застосуванням каналу синхротронного рентгенівського випромінювання високої інтенсивності показали відсутність ознаки дифракції (див. фігуру 39(b), на якій зображені ілюстративні оптимізовані кристали).

Для зниження гнучкості частин білка вирішили одержувати Fab-фрагмент A44 рекомбінантним шляхом, але без штучної мітки, такої як мітка 6-His, яку застосовували раніше. Для додаткового підвищення шансів успішної кристалізації активну форму мутантного PAI-1 (N150H, K154T, Q319L, M354I) купували в Molecular Innovations (кат. № CPAI, Нові, Мічиган) та застосовували для одержання комплексів з білком Fab A44 без штучної мітки. Комплекс концентрували до 12 мг/мл в 25 mM MES, pH 6,5, 150 mM NaCl. Одержували прийнятні окремі паличкоподібні кристали у 10 % PEG3350, 100 mM сульфаті амонію та кріопротекцію здійснювали шляхом додавання 30 % етиленгліколю (див. фігуру 40). Дифракцію на кристалах здійснювали до розділення приблизно 3,7Å та після інтенсивної оптимізації кріопротекції одержували набір даних рентгенівської дифракції, що був придатним для визначення структури (3,3Å). Набір даних збирали до 3,3Å при каналі випромінювання Proxima 1 синхротрона SOLEIL (Сент-Обен, Франція). Просторова група представляла собою P212121 (a=105, b=152, c=298). Дані обробляли із застосуванням сценаріїв XDSme (XDS ref, Xdsme ref).

Визначення структури комплексу Fab A44V11/PAI-1 людини

Pointless (CCP4) виявив лише 40 % надійності в ідентифікації просторової групи. Внаслідок цього початкове молекулярне заміщення проводили за допомогою Amore (CCP4) для тестування всіх можливих варіантів просторової групи з точкової групи P222: P212121 однозначно підтвердилася. Кінцеве молекулярне заміщення за допомогою Phaser (Phaser, CCP4) виявило чотири димери активного PAI-1/варіабельного домену Fab в асиметричній комірці. Константні домени додавали вручну на карті електронної щільності. Структуру допрацьовували за допомогою Buster (GlobalPhasing) із застосуванням некристалографічної симетрії до Rfree 28 % (Rfactor 24,1 %).

Аналіз структури епітопу та паратопу

Ділянки епітопу та паратопу ідентифікували як сформовані в комплексах з білком макаки-крабоїда та людини та комплекси порівнювали. Структуру кристалів визначали до 3,3Å для A44V11 в комплексі з PAI-1 людини та макаки-крабоїда. Накладання обох структур (див. фігуру 40) показує, що паратоп A44V11 є аналогічним у випадку як неактивної, так і активної форм PAI-1. Fab A44 розпізнавав активну форму PAI-1 людини та неактивну форму PAI-1 макаки-крабоїда. На фігурі 42 показаний епітоп PAI-1, який розпізнає Fab A44, як в активного PAI-1 людини (фігура 42(A)), так і в неактивного PAI-1 макаки-крабоїда (фігура 42(B)). Частина неактивної конформації, яку розпізнає паратоп, є частиною активної конформації, яку розпізнає паратоп.

PAI-1 переважно взаємодіє з важким ланцюгом A44V11, як можна побачити з аналізу взаємодії ділянок поверхні. Зона поверхні взаємодії між активним PAI-1 людини та важким ланцюгом (середнє значення для 4 комплексів) становить 674Å<sup>2</sup>. Зона поверхні взаємодії між активним PAI-1 людини та легким ланцюгом (середнє значення для 4 комплексів) становить 372Å<sup>2</sup>. Зона поверхні взаємодії між неактивним PAI-1 макаки-крабоїда та важким ланцюгом (середнє значення для 2 комплексів) становить 703Å<sup>2</sup>. Зона поверхні взаємодії між неактивним PAI-1 макаки-крабоїда та легким ланцюгом (середнє значення для 2 комплексів) становить 360Å<sup>2</sup>. Див. фігури 43 та 44, на яких зображені паратопи важкого ланцюга та легкого ланцюга, відповідно.

Залишки в частині A44V11, що є паратопом, показані нижче в таблиці 36. Залишки, позначені курсивом, залучені у взаємодію з активним PAI-1, але не з неактивною формою, при цьому підкреслені залишки взаємодіють лише з неактивною формою. Решта залишків залучені в обидві поверхні контакту.

5

Таблиця 36:

Залишки A44V11, залучені в паратоп, що взаємодіє з PAI-1

| Розташування                       | Залишки                                                                       |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Важкий ланцюг (фігура 43)</b>   |                                                                               |
| Петля H1                           | <i>Thr30, Asn31, Gly32, Tyr33 та Asn35</i>                                    |
| Петля H2 та суміжні $\beta$ -нитки | <i>Tyr47, Tyr50, Thr52, Tyr53, Ser54, <u>Gly55</u>, Ser56, Thr57 та Tyr58</i> |
| Петля H3                           | <i>Trp98, Tyr100 та Tyr104</i>                                                |
| <b>Легкий ланцюг (фігура 44)</b>   |                                                                               |
| Петля L1:                          | <i>Asn30 та Tyr32</i>                                                         |
| Петля L2:                          | <i>Arg50 та Arg53</i>                                                         |
| Петля L3:                          | <i>Tyr91, Asp92, <u>Glu93</u>, Phe94 та Pro96</i>                             |

Незважаючи на різні конформації молекул PAI-1 людини та макаки-крабоїда, однакові залишки залучені у взаємодію з Fab A44 (залишки, виділені жирним шрифтом, показані нижче в послідовності PAI-1 людини) (SEQ ID NO:1):

10

VHHPPSYVAHLASDFGVRVFQQVAQASKDRNVVFSPYGVASVLAMLQLTTG  
 GETQQQIQAAAMGFKIDDKGMAPALRHLYKELMGPWNKDEISTTDAIFVQRDLKLQVQ  
 GFMPHFFRLFRSTVKQVDFSEVERARFIINDWVKTHTKGMISHLLGTGAVDQLTRLV  
 LVNALYFNGQWKTPFPDSSTHRRLFHKSDGSTVSVPMMAQTNKFNYTEFTTPDGHY  
 YDILELPYHGDTLMSMFLAAPYEKEVPLSALTNILSAQLISHWKGNMTRLPRLLVLPKFS  
 LETEVDLRKPLENLGMTDMFRQFQADFTSLSDQEPLHVALALQKVKIEVNESGTVA  
 SSSTAVIVSARMAPEEIIIDRPFLFVVRHNPTGTVLFGQVMEP

Короткий запис епітопу для зв'язування з A44V11 у PAI-1 людини є наступним:

15

E-X-X-Q (SEQ ID NO: 156);

L-X-R (SEQ ID NO: 157);

T-D-X-X-R-Q-F-Q-A-D-F-T-X-X-S-D-Q-E-P-L (SEQ ID NO: 158)

Таким чином, епітопи PAI-1 макаки-крабоїда та людини, які розпізнає FabA44, є ідентичними в обох конформаціях. Fab A44 розпізнає PAI-1 як людини, так і макаки-крабоїда, але, ймовірно, не розпізнає PAI-1 миші або щура.

20

Приклад 23. Визначення специфічності та перехресної реактивності A44V11

Для визначення специфічності та реактивності A44V11 послідовність епітопу для A44V11 (див. вище) застосовували для пошуку подібних епітопів у інших білках із застосуванням пошуку мотиву за допомогою бази даних ScanProsite (SIB, Швейцарський інститут біоінформатики). Для одержання додаткової інформації див. Artimo, P. et al. Nucleic Acids Res. 40(W1):W597-603 (2012). Усі збіги з послідовностями епітопів, які виявили під час пошуку, були пов'язані з PAI-1, що дозволяє припускати, що антитіло A44V11 є специфічним до PAI-1.

25

Епітоп для A44V11 також порівнювали з іншими відомими рентгенівськими структурами (3D-пошук) із застосуванням аналізу профілю *in silico* та молекулярного моделювання згідно з Med-

SuMo, що забезпечує виявлення та порівняння біохімічних функціональних груп на поверхнях білків, в тому числі, наприклад, водневих зв'язків, зарядів, гідрофобних та ароматичних груп. Молекулярне моделювання Med-SuMo додатково описане в Jambon, et al. *Bioinformatics* 21(20):3929-30 (2005). 3D-пошук епітопу для A44V11 виявив подібний мотив у альфа-1-антитрипсині людини (AAT1). Однак під час подальшого дослідження виявили, що мотив AAT1 має значні відмінності порівняно з епітопом для A44V11, внаслідок чого A44V11 зв'язуватиметься з ним з малою вірогідністю. Отже, аналіз структури послідовності та 3D-структури епітопу для A44V11 дозволяє припускати, що може спостерігатися мінімальна перехресна реактивність з іншими білками людини.

Епітопи PAI-1 людини та макаки-крабоїда для A44V11 порівнювали з запропонованими епітопами PAI-1 миші та щура. Послідовності відібрані з SEQ ID NO:1 (PAI-1 людини), SEQ ID NO:162 (PAI-1 макаки-крабоїда), SEQ ID NO:163 (PAI-1 миші) та SEQ ID NO:164 (PAI-1 щура). PAI-1 щура та миші характеризуються, відповідно, 75 % та 79 % ідентичністю послідовності з PAI-1 людини. Під час вирівнювання різних послідовностей PAI-1 показані значні відмінності між послідовностями щура/миші та людини/макаки-крабоїда в їхніх відповідних епітопах, що дозволяє припускати, що A44V11, ймовірно, не розпізнає PAI-1 щура або миші (див. фігуру 45). Наприклад, амінокислоти Ser300, Thr302, Gln314 з PAI-1 миші відрізняються в аналогів PAI-1 людини/макаки-крабоїда. Відмінності в даних залишках являють собою зміну в запропонованих епітопах, внаслідок чого PAI-1 миші не може розпізнаватися A44V11. Порівняння структури PAI-1 миші зі структурою комплексу PAI-1 людини/A44V11 (фігура 46) додатково вказує на те, що антитіло A44V11 не може проявляти активність як щодо білка людини, так і щодо білка миші.

Для подальшої перевірки ідентифікованого епітопу для A44V11 епітопи для A44V11 білків людини та макаки-крабоїда порівнювали відносно ділянок зв'язування вібронектину. Була опублікована структура PAI1 людини в комплексі з соматомедин В-подібним доменом вібронектину (1OC0). Структури цих двох комплексів порівнювали (див. фігуру 47). Порівняння структури дозволяє припустити, що зв'язування A44V11 не впливатиме на взаємодію PAI-1 з вібронектином.

Епітоп для A44V11 порівнювали з епітопами для інших опублікованих антитіл до PAI1. Не виявили перекривання епітопів для A44V11 з іншими опублікованими антитілами до PAI-1, MA-55F4C2 та MA-33H1, які зв'язують залишки ділянці 128-156 (див. Debrock et al. *Thromb Haemost*, 79:597-601 (1998)).

Нарешті, специфічність та відсутність перехресної реактивності антитіла A44V11 підтверджували за допомогою Віасоге. Базуючись на передбаченій унікальній послідовності та 3D-структурі епітопу для A44V11 дослідження з молекулярного моделювання переконливо вказують на те, що A44V11 є специфічним для PAI-1 людини та макаки-крабоїда.

Приклад 24. Картування епітопів за допомогою мас-спектрометрії, заснованої на воднево-дейтерієвому обміні (HDX MS)

Воднево-дейтерієвий обмін (HDX), який відслідковують за допомогою мас-спектрометрії (MS), застосовували до антитіл, які зв'язують PAI-1, розкритих в даному документі, для подальшого визначення характеристик епітопів для кожного антитіла. HDX MS являє собою особливо застосовувану методику для порівняння декількох станів одного білка. Детальна методологія та способи застосування HDX MS щодо терапевтичних засобів на основі білка розкриті в Wei, et al., *Drug Discovery Today*, 19(1): 95-102 (2014). Коротко, якщо водний, повністю на основі H<sub>2</sub>O, розчинник заміщують на такий, що містить ізотоп водню, який має відмінні спектроскопічні властивості, то можна відслідковувати цей процес обміну. Для найбільш сучасних HDX-експериментів застосовують дейтеровану або "важку" воду (D<sub>2</sub>O). Зокрема, водень, зв'язаний з азотом кістяка (який також називають амідний водень кістяка) є застосовуваним для дослідження конформації білка. Див., наприклад, Marcsisin, et al. *Anal Bioanal Chem.* 397(3): 967-972 (2010). Поверхневі та динамічні ділянки білків будуть швидко здійснювати обмін, в той час як захищені та жорсткі ділянки білків будуть здійснювати обмін повільніше. Всі умови (pH, температура, іонна сила тощо), що мають значення, підтримують постійними, таким чином лише відмінності в структурі (доступність для розчинника, утворення водневих зв'язків) здійснює вплив на даний обмін. Взаємодія антитіла з PAI-1 блокуватиме мічення визначених частин антигена, таким чином даючи відмінну зареєстровану величину залежно від сайту зв'язування (епітоп).

Експериментальний спосіб

Маточні розчини PAI-1 макаки-крабоїда (10 мкМ), PAI-1 макаки-крабоїда, зв'язаного з A44v11 (по 10 мкМ кожний), та PAI-1 макаки-крабоїда, зв'язаного з APGv2 (по 10 мкМ кожний), готували в PBS, pH 7,2. Розчинам білка забезпечували можливість досягнення рівноваги зв'язування шляхом інкубації протягом 1 години за кімнатної температури. Виходячи зі значення K<sub>d</sub> <50 пМ,

кожний з комплексів антитіло:антиген характеризувався >99 % зв'язування за умов мічення, описаних нижче.

Дейтерієвий обмін, гасіння та введення зразка здійснювали за допомогою автоматизованої роботизованої системи (LEAP Tech., Каррборо, Північна Кароліна). Аліквоту розчину білка розводили в 10 разів за допомогою буфера для мічення (PBS в 99,9 % D<sub>2</sub>O, рD 7,2) та залишали для інкубації при 20 °C протягом 10 с, 1 хв., 5 хв. або 4 годин. Після закінчення часу дейтерієвого обміну реакцію мічення гасили шляхом додавання 50 мкл розчину для мічення до рівного об'єму попередньо охолоджених (0 °C) 100 мМ фосфату натрію, 4 М гуанідину гідрохлориду, 0,5 М TCEP, рН 2,5. Недейтеровані контролю готували ідентичним способом шляхом розведення в 10 разів за допомогою PBS в H<sub>2</sub>O.

Кожний підданий гасінню зразок (50 мкл, 50 пмоль кожного білка) негайно вводили в Waters nanoAcquity з технологією HDX (Waters Corp., Мілфорд, Массачусетс). Білки піддавали розщепленню в реальному часі за допомогою колонки з пепсином 2,1 мм x 30 мм Enzymate BEN (Waters Corp.), яку підтримували при 20 °C. Всі складові для хроматографії підтримували при 0,0±0,1 °C в камері охолодження системи недефективної рідинної хроматографії (UPLC). Одержані пептиди захоплювали та піддавали знесолюванню протягом 3 хв. за швидкості 100 мкл/хв. та потім розділяли на колонці 1,0 x 100,0 мм HSS T3 ACQUITY (Waters Corp.) протягом 12 хв. з градієнтом 2-40 % ацетонітрил:вода за швидкості 40 мкл/хв. Для рівнів дейтерію не робили поправку на зворотний обмін, та їх реєстрували як відносні. Всі експерименти з порівняння здійснювали за ідентичних умов, що усувало потребу в поправці на зворотний обмін. Всі експерименти здійснювали в трьох повторностях. Перенесенню пептидів між різними введеннями запобігали шляхом введення 50 мкл 1,5 М гуанідину гідрохлориду, 0,8 % мурашиної кислоти та 4 % ацетонітрилу у всі колонки після кожного прогону.

Мас-спектри одержували за допомогою пристрою Waters Synapt G2-Si, оснащеного стандартним джерелом електророзпилення (Waters Corp.), з прогоном у режимі HDMSe. Налаштування пристрою були наступними: напруга на капілярі - 3,5 кВ, пробовідбірному конусі - 30 В, зсуві джерела - 30 В, температура джерела становила 80°C, температура десольватації становила 175°C, швидкість газу в конусі становила 50 л/год., швидкість газу під час десольватації становила 600 л/ч та тиск газу-розпилювача становив 6,5 бар. Мас-спектри одержували в межах діапазону маса/заряд 50-1700. Точність мас-спектрометрії забезпечували в кожному прогоні завдяки одночасній інфузії 100 фмоль/мкл [Glu1]-фібринопептиду В людини у пробі з фіксованою масою.

MSE-ідентифікацію недейтерованих пептидів, одержаних під дією пепсину, здійснювали із застосуванням програмного забезпечення ProteinLynx Global Server (Waters Corp.). Поглинання дейтерію для кожного пептиду визначали із застосуванням програмного забезпечення DynaX 2.0 (Waters Corp.). Відносні рівні дейтерію розраховували шляхом віднімання центроїду ізотопного розподілу для недейтерованих пептидів від відповідного центроїду міченого дейтерієм пептиду. Графіки поглинання дейтерію одержували автоматично за допомогою програмного забезпечення.

Відслідковування поглинання дейтерію для станів PAI-1

Після розщеплення пепсином в режимі реального часу ідентифікували 150 пептидів, одержаних під дією пепсину, що перекриваються з PAI-1 макаки-крабоїда, що призвело до 95,3 % охоплення послідовності (див. фігуру 48). Поглинання дейтерію відслідковували (від 10 с до 4 годин) у всіх 150 пептидів для трьох різних станів білка: (1) PAI-1 макаки-крабоїда окремо; (2) PAI-1 макаки-крабоїда, зв'язаний з A44v11; та (3) PAI-1 макаки-крабоїда, зв'язаний з APGv2.

Більшість пептидів PAI-1 макаки-крабоїда демонстрували практично ідентичне поглинання дейтерію в трьох станах, що вказує на відсутність взаємодії між PAI-1 макаки-крабоїда та одним з двох mAb в даних ділянках. Див. фігуру 49(A), на якій зображена одна ілюстративна ділянка пептиду з цим результатом (залишки 139-152). Навпаки, пептиди, які включають залишки 44-64, демонстрували значну захищеність від обміну (знижене поглинання дейтерію) у разі зв'язування або з A44v11, або з APGv2 (фігура 49(B)). Крім того, пептиди, які включають залишки 295-322, також демонстрували значну захищеність від обміну у разі зв'язування або з A44v11, або з APGv2 (фігура 49(C)). Для даної ділянки величина захищеності була більшою у разі зв'язування PAI-1 макаки-крабоїда з A44v11, а не з APGv2 (див. фігуру 49(C)). Це вказує на те, що A44v11 може забезпечувати більшу загальну захищеність від обміну, ніж APGv2 у разі зв'язування з PAI-1 макаки-крабоїда.

Порівняльні дослідження

Стосовно порівняльних досліджень, поглинання дейтерію відслідковували для всіх 150 пептидів, одержаних з кожного з трьох станів PAI-1 макаки-крабоїда. (Див., у цілому, Wei, et al., Drug Discovery Today, 19(1): 95-102 (2014)). Графіки даних для кожного з трьох станів

порівнювали між собою та діаграму-"метелик" одержували для полегшення інтерпретації даних (див., наприклад, фігури 50(A), 51(A) та 52(A)). Для кожної діаграми-"метелика" вісь x являє собою розраховане середнє положення пептиду, і, кожного з 150 порівнюваних пептидів; вісь y являє собою середнє значення відносного часткового обміну (співвідношення).

Для кожного порівняння між станами PAI-1 макаки-крабоїда (див., наприклад, фігури 50(B), 51(B), та 52(B)) також одержували графіки відмінностей. На цих графіках поглинання дейтерію для одного стану віднімали від іншого та відкладали на графіку, подібно до діаграм-"метеликів". Суму відмінностей для кожного пептиду зображували за допомогою вертикальної риски. Горизонтальні пунктирні лінії зображують значення, за яких будь-яке індивідуальне вимірювання ( $\pm 0,5$  Да) або сума відмінностей ( $\pm 1,1$  Да) перевищують похибку вимірювання та можуть вважатися реальними відмінностями між двома станами. Додаткові деталі стосовно даної методики розкриті в Houde D. et al., J. Pharm. Sci. 100(6):2071-86 (2011).

По-перше, PAI-1 макаки-крабоїда окремо порівнювали з PAI-1 макаки-крабоїда у зв'язаному стані з A44v11 (фігура 50). Діаграма-"метелик" для даного порівняння показана на фігурі 50(A). Графік відмінностей для даного порівняння показаний на фігурі 50(B). Відмінності, які спостерігають між PAI-1 макаки-крабоїда, зв'язаного з A44v11, та вільною формою PAI-1 макаки-крабоїда, розташовані, переважно, в двох ділянках PAI-1 макаки-крабоїда. Одна ділянка розташована поблизу N-кінця (залишки 44-64), а інша ділянка розташована поблизу C-кінця (залишки 307-321) (див. фігуру 50(B)).

Потім PAI-1 макаки-крабоїда окремо порівнювали з PAI-1 макаки-крабоїда у зв'язаному стані з APGv2 (фігура 51). Діаграма-"метелик" для даного порівняння показана на фігурі 51(A). Графік відмінностей для даного порівняння показаний на фігурі 51(B). Відмінності, які спостерігають між PAI-1 макаки-крабоїда, зв'язаного з APGv2, та вільною формою PAI-1 макаки-крабоїда, розташовані, переважно, в двох ділянках PAI-1 макаки-крабоїда. Одна ділянка розташована поблизу N-кінця, а інша - поблизу C-кінця, що є подібним до результату для A44v11:PAI-1 макаки-крабоїда. Комплекси A44v11 та APGv2 з PAI-1 макаки-крабоїда мають спільні пептиди, які демонструють знижене поглинання дейтерію в зв'язаному стані, що може вказувати на те, що епітопи для цих двох антитіл є подібними.

Нарешті, два стани PAI-1 макаки-крабоїда, зв'язаного з антитілом, порівнювали між собою (фігура 52). Діаграма-"метелик" для даного порівняння показана на фігурі 52(A). Графік відмінностей для даного порівняння показаний на фігурі 52(B). Відмінності, які спостерігають між A44v11:PAI-1 макаки-крабоїда та APGv2:PAI-1 макаки-крабоїда, розташовані в C-кінцевій ділянці PAI-1 макаки-крабоїда. (Див. фігуру 52(B)).

Приклад 25: Порівняння епітопів для антитіл A44v11 та APGv2

HDX MS застосовували для додаткового визначення епітопів для антитіл A44v11 та APGv2. Із застосуванням пептидів, що перекриваються, які одержані в HDX MS, епітоп для антитіла можна доопрацювати трохи краще, ніж при розділенні на пептидному рівні (наприклад, див. фігуру 48). Дані HDX MS для пептидів, які демонстрували значну захищеність від обміну у разі зв'язування A44v11, аналізували додатково для визначення епітопу під час взаємодії PAI-1 макаки-крабоїда:A44v11. Виявили, що дані HDX для епітопу PAI-1 макаки-крабоїда для A44v11 відповідали епітопу, визначеному із застосуванням кристалографічного підходу. Епітоп PAI-1 макаки-крабоїда для A44v11, ідентифікований із застосуванням HDX MS, показаний на фігурі 53 (жирний шрифт) та нижче в форматі короткого запису:

T-T-G-G-E-T-R-Q-Q-I-Q (SEQ ID NO: 159);

R-H-L (SEQ ID NO: 160);

T-D-M-X-X-X-F-Q-A-D-F-T-S-L-S-N-Q-E-P-L-H-V (SEQ ID NO: 161).

Дані HDX MS для пептидів PAI-1 макаки-крабоїда, які демонстрували значну захищеність від обміну у разі зв'язування APGv2, аналізували для додаткового визначення епітопу під час взаємодії PAI-1 макаки-крабоїда:APGv2. Дані HDX MS з картування епітопів для A44v11 та APGv2 показали, що епітопи містяться в одній і тій самій ділянці, як, загалом, видно на фігурі 52. В ділянці залишків 307-321 однакові пептиди демонструють захищеність у зв'язаному з антитілом стані, як для A44v11, так і для APGv2. Однак величина захищеності була більшою у разі зв'язування PAI-1 макаки-крабоїда з A44v11, а не з APGv2 (див. фігуру 49(C)). Цей результат є більш очевидним на фігурі 52(B), на якій зображені піки відмінностей у ділянці залишків 307-321 PAI-1 макаки-крабоїда. Це вказує на існування відмінностей в специфічних контактах, що здійснюються між PAI-1 макаки-крабоїда та кожним з антитіл A44v11 та APGv2. Отже, можна зробити висновок, що оскільки епітопи як для A44v11, так і для APGv2 розташовані в подібній ділянці PAI-1, епітопи для кожного антитіла не є однаковими.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Санофі

<120> АНТИТІЛА ДО ІНГІБІТОРА АКТИВАТОРА ПЛАЗМІНОГЕНУ 1 (РАІ-1) ТА  
ШЛЯХИ ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

<130> 13-596-WO

<140> РСТ/US2014/050896

<141> 2014-08-13

<160> 170

<170> PatentIn версія 3.5

<210> 1

<211> 379

<212> БІЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 1

Val His His Pro Pro Ser Tyr Val Ala His Leu Ala Ser Asp Phe Gly  
1 5 10 15

Val Arg Val Phe Gln Gln Val Ala Gln Ala Ser Lys Asp Arg Asn Val  
20 25 30

Val Phe Ser Pro Tyr Gly Val Ala Ser Val Leu Ala Met Leu Gln Leu  
35 40 45

Thr Thr Gly Gly Glu Thr Gln Gln Gln Ile Gln Ala Ala Met Gly Phe  
50 55 60

Lys Ile Asp Asp Lys Gly Met Ala Pro Ala Leu Arg His Leu Tyr Lys  
65 70 75 80

Glu Leu Met Gly Pro Trp Asn Lys Asp Glu Ile Ser Thr Thr Asp Ala  
85 90 95

Ile Phe Val Gln Arg Asp Leu Lys Leu Val Gln Gly Phe Met Pro His  
100 105 110

Phe Phe Arg Leu Phe Arg Ser Thr Val Lys Gln Val Asp Phe Ser Glu  
115 120 125

Val Glu Arg Ala Arg Phe Ile Ile Asn Asp Trp Val Lys Thr His Thr  
130 135 140

Lys Gly Met Ile Ser Asn Leu Leu Gly Lys Gly Ala Val Asp Gln Leu  
145 150 155 160

Thr Arg Leu Val Leu Val Asn Ala Leu Tyr Phe Asn Gly Gln Trp Lys  
165 170 175

Thr Pro Phe Pro Asp Ser Ser Thr His Arg Arg Leu Phe His Lys Ser  
180 185 190

Asp Gly Ser Thr Val Ser Val Pro Met Met Ala Gln Thr Asn Lys Phe  
195 200 205

Asn Tyr Thr Glu Phe Thr Thr Pro Asp Gly His Tyr Tyr Asp Ile Leu  
210 215 220

Glu Leu Pro Tyr His Gly Asp Thr Leu Ser Met Phe Ile Ala Ala Pro  
225 230 235 240

Tyr Glu Lys Glu Val Pro Leu Ser Ala Leu Thr Asn Ile Leu Ser Ala  
245 250 255

Gln Leu Ile Ser His Trp Lys Gly Asn Met Thr Arg Leu Pro Arg Leu  
260 265 270

Leu Val Leu Pro Lys Phe Ser Leu Glu Thr Glu Val Asp Leu Arg Lys  
275 280 285

Pro Leu Glu Asn Leu Gly Met Thr Asp Met Phe Arg Gln Phe Gln Ala  
290 295 300

Asp Phe Thr Ser Leu Ser Asp Gln Glu Pro Leu His Val Ala Gln Ala  
305 310 315 320



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

Ser Ser Thr Ala Val Ile Val Ser Ala Arg Met Ala Pro Glu Glu Ile  
340 345 350

Ile Met Asp Arg Pro Phe Leu Phe Val Val Arg His Asn Pro Thr Gly  
355 360 365

Thr Val Leu Phe Met Gly Gln Val Met Glu Pro  
370 375

<210> 2  
<211> 124  
<212> БІЛОК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> mA105 VH

<400> 2

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

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

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

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

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Phe  
65 70 75 80

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

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

Ile Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro  
115 120

<210> 3

<211> 115

<212> БІЛОК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> mA105 VL

<400> 3

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
20 25 30

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

Pro Gln Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro  
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Gly Ala Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Asp  
85 90 95

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

Arg Ala Asp  
115

<210> 4

<211> 125

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mA39 VH

<400> 4

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Asn Ile Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

50 55 60

Asp Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Ser Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met

65 70 75 80

Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Leu Gly Ile Gly Leu Arg Gly Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

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

<210> 5

<211> 110

<212> БІЛОК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> mA39 VL

<400> 5

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr  
20 25 30

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

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Asn Ile Lys Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Thr Phe Tyr Cys Gln His Arg Tyr Gly Ser Pro Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp  
100 105 110

<210> 6

<211> 125

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mA44 VH

<400> 6

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly  
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met  
35 40 45

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

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

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

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

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

<210> 7

<211> 110

<212> БІЛОК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> mA44 VL

<400> 7

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

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

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp  
100 105 110

<210> 8

<211> 124

<212> БІЛОК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> mA71 VH

<400> 8

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



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

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

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

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

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

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

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

<210> 9

<211> 115

<212> БІЛОК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> mA71 VL

<400> 9

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro  
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Asp  
85 90 95

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

Arg Ala Asp  
115

<210> 10  
 <211> 140  
 <212> БІЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> m8109 VH

<400> 10

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

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

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

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Gly Gln Gly Leu Asp Trp Ile Gly  
 50 55 60

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Glu  
 65 70 75 80

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

Glu Val Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr  
 100 105 110

Arg Gly Leu Arg Arg Trp Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 115 120 125

Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro  
 130 135 140

<210> 11  
 <211> 110  
 <212> БІЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> m8109 VL

<400> 11

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Ala Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Pro Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Ala  
 20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala  
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp  
100 105 110

<210> 12

<211> 125

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> m828 VH

<400> 12

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

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

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

Lys Ile Leu Pro Gly Ser Gly Gly Ala Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
50 55 60

Gly Lys Ala Thr Val Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr Met  
65 70 75 80

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

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

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

<210> 13

<211> 110

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> m828 VL

<400> 13

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

Ala Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr  
20 25 30

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

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Tyr Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Asp  
100 105 110

<210> 14

<211> 121

<212> БІЛОК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> mC45 VH

<400> 14

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

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

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

Gly Val Ile His Pro Gly Ser Gly Val Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Ile Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser His Gly Leu Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
115 120



<210> 15

<211> 107

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mC45 VL

<400> 15

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

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

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Arg  
85 90 95

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

<210> 16

<211> 118

<212> БІЛОК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> mE16 VH

<400> 16

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

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

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

Ala Ser Leu Arg Thr Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys  
50 55 60

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 17  
<211> 107  
<212> БІЛОК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> ME16 VL

<400> 17

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Asn Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala  
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala  
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Ser Pro Trp  
85 90 95

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

<210> 18

<211> 118

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mE21 VH

<400> 18

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

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

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

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

Gln Ala Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Met Tyr Gly Asn Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115

<210> 19

<211> 107

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mE21 VL

<400> 19

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp  
85 90 95

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

<210> 20

<211> 11

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mA105 HCDR3

<400> 20

Ala Arg Gly Gly Leu Tyr Tyr Asp Leu Asp Tyr  
1 5 10

<210> 21

<211> 8

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mA105 HCDR2

<400> 21

Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr  
1 5

<210> 22

<211> 8

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mA105 HCDR1

<400> 22

Gly Phe Thr Phe Ser Ile Tyr Trp  
1 5

<210> 23

<211> 9

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mA105 LCDR3

<400> 23

Trp Gln Asp Arg His Phe Pro Arg Thr

1 5

<210> 24

<211> 3

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mA105 LCDR2

<400> 24

Leu Val Ser

1

<210> 25

<211> 11

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність



<220>

<223> mA105 LCDR1

<400> 25

Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr

1 5 10

<210> 26

<211> 13

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mA39 HCDR3

<400> 26

Ala Arg Leu Gly Ile Gly Leu Arg Gly Ala Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 27

<211> 7

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mA39 HCDR2

<400> 27

Ile Leu Pro Gly Ser Asn Thr

1 5

<210> 28  
 <211> 8  
 <212> БЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> MA39 HCDR1

<400> 28

Gly Tyr Thr Phe Asn Ile Tyr Trp  
 1 5

<210> 29  
 <211> 9  
 <212> БЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> MA39 LCDR3

<400> 29

Gln His Arg Tyr Gly Ser Pro Trp Thr  
 1 5

<210> 30  
 <211> 3  
 <212> БЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> mA39 LCDR2

<400> 30

Asn Ala Lys

1

<210> 31

<211> 6

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mA38 LCDR1

<400> 31

Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr

1

5

<210> 32

<211> 13

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mA44 HCDR3

<400> 32

Ala Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 33

<211> 7

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mA44 HCDR2

<400> 33

Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr  
1 5

<210> 34

<211> 8

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mA44 HCDR1

<400> 34

Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr  
1 5

<210> 35

<211> 9

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mA44 LCDR3

<400> 35

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro Thr

1

5

<210> 36

<211> 3

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mA44 LCDR2

<400> 36

Arg Ala Asn

1

<210> 37

<211> 6

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mA44 LCDR1

<400> 37

Gln Asp Ile Asn Ser Tyr

1 5

<210> 38

<211> 11

<212> БІЛОК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> mA71 HCDR3

<400> 38

Ala Arg Gly Gly Leu Tyr Tyr Asn Leu Asp Ser

1 5 10

<210> 39

<211> 8

<212> БІЛОК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> mA71 HCDR2

<400> 39

Ile Leu Pro Gly Ser Gly Asn Thr

1 5

<210> 40  
 <211> 8  
 <212> БІЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> mA71 HCDR1

<400> 40

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Trp  
 1 5

<210> 41  
 <211> 9  
 <212> БІЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> mA71 LCDR3

<400> 41

Trp Gln Asp Thr His Phe Pro Arg Thr  
 1 5

<210> 42  
 <211> 3  
 <212> БІЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> mA71 LCDR2

<400> 42

Leu Val Ser

1

<210> 43

<211> 11

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mA71 LCDR1

<400> 43

Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr

1 5 10

<210> 44

<211> 11

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mA75 HCDR3

<400> 44

Ala Arg Gly Gly Leu Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10



<210> 45  
 <211> 8  
 <212> БІЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> mA75 HCDR2

<400> 45

Ile Leu Pro Gly Ser Gly Leu Thr  
 1 5

<210> 46  
 <211> 8  
 <212> БІЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> mA75 HCDR1

<400> 46

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Trp  
 1 5

<210> 47  
 <211> 9  
 <212> БІЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> mA75 LCDR3

<400> 47

Trp Gln Gly Ser His Phe Pro Gln Thr

1 5

<210> 48

<211> 3

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mA75 LCDR2

<400> 48

Leu Val Cys

1

<210> 49

<211> 11

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mA75 LCDR1

<400> 49

Gln Ser Leu Leu Asp Ser Glu Gly Lys Thr Tyr  
1 5 10

<210> 50

<211> 12

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> m8109 HCDR3

<400> 50

Thr Arg Gly Leu Arg Arg Trp Gly Ala Met Asp Tyr  
1 5 10

<210> 51

<211> 8

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> m8109 HCDR2

<400> 51

Ile Leu Pro Gly Ser Gly Leu Thr  
1 5

<210> 52

<211> 8

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> m8109 HCDR1

<400> 52

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Trp

1 5

<210> 53

<211> 9

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> m8109 LCDR3

<400> 53

Gln Gln His Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr

1 5

<210> 54

<211> 3

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> m8109 LCDR2

<400> 54

Ser Ala Ser

1

<210> 55

<211> 6

<212> БЛОК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> m8109 LCDR1

<400> 55

Gln Asp Val Ser Ser Ala

1 5

<210> 56

<211> 13

<212> БЛОК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> m828 HCDR3

<400> 56

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

1 5 10

<210> 57  
 <211> 8  
 <212> БІЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> m828 HCDR2

<400> 57

Ile Leu Pro Gly Ser Gly Gly Ala  
 1 5

<210> 58  
 <211> 8  
 <212> БІЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> m828 HCDR1

<400> 58

Gly Tyr Thr Phe Ser Ile Ser Trp  
 1 5

<210> 59  
 <211> 9  
 <212> БІЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> m828 LCDR3

<400> 59

Gln His His Tyr Gly Thr Pro Pro Thr

1 5

<210> 60

<211> 3

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> m828 LCDR2

<400> 60

Asn Ala Lys

1

<210> 61

<211> 6

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> m828 LCDR1

<400> 61

Glu Asn Val Tyr Ser Tyr

1 5

<210> 62  
 <211> 14  
 <212> БІЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> mC45 HCDR3

<400> 62

Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser His Gly Leu Met Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 63  
 <211> 8  
 <212> БІЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> mC45 HCDR2

<400> 63

Ile His Pro Gly Ser Gly Val Thr  
 1 5

<210> 64  
 <211> 8  
 <212> БІЛОК  
 <213> Штучна послідовність



<220>

<223> mC45 HCDR1

<400> 64

Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Leu

1 5

<210> 65

<211> 9

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mC45 LCDR3

<400> 65

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Arg Thr

1 5

<210> 66

<211> 3

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mC45 LCDR2

<400> 66

Arg Ala Asn

1

<210> 67

<211> 6

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mC45 LCDR1

<400> 67

Gln Asp Ile Asn Ser Tyr

1

5

<210> 68

<211> 12

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mE16 HCDR3

<400> 68

Ala Arg Gly Leu Arg His Trp Gly Tyr Phe Asp Val

1

5

10

<210> 69

<211> 7

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> ME16 HCDR2

<400> 69

Leu Arg Thr Gly Gly Asn Thr

1 5

<210> 70

<211> 8

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> ME16 HCDR1

<400> 70

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly

1 5

<210> 71

<211> 9

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> ME16 LCDR3

<400> 71

Gln Gln His Tyr Ser Ser Pro Trp Thr  
1 5

<210> 72

<211> 3

<212> БЛОК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> ME16 LCDR2

<400> 72

Ser Ala Ser  
1

<210> 73

<211> 6

<212> БЛОК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> ME16 LCDR1

<400> 73

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
1 5

<210> 74  
 <211> 11  
 <212> БІЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> ME21 HCDR3

<400> 74

Met Tyr Gly Asn Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 75  
 <211> 8  
 <212> БІЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> ME21 HCDR2

<400> 75

Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr  
 1 5

<210> 76  
 <211> 8  
 <212> БІЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> mE21 HCDR1

<400> 76

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr

1 5

<210> 77

<211> 9

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mE21 LCDR3

<400> 77

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 78

<211> 3

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mE21 LCDR2

<400> 78

Tyr Thr Ser

1

<210> 79  
 <211> 6  
 <212> БЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> ME21 LCDR1

<400> 79

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 1 5

<210> 80  
 <211> 124  
 <212> БЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> MA75 VH

<400> 80

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

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

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

Ala Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Leu Thr Asn Tyr Asn Glu Ile Phe  
50 55 60

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

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

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

Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro  
115 120

<210> 81

<211> 114

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mA75 VL

<400> 81



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

Gln Pro Ala Ser Ile Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Glu  
20 25 30

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

Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Cys Lys Leu Asp Cys Gly Val Pro Asp  
50 55 60

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

Arg Val Glu Gly Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Ser  
85 90 95

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

Ala Asp

<210> 82

<211> 119

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> NC1a

<400> 82

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly  
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met  
35 40 45

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

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

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

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 83

<211> 119

<212> БІЛОК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> NC1b

<400> 83

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly

20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met

35 40 45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

Gly Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asn Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu

65 70 75 80

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

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115

<210> 84

<211> 119

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> HC2a

<400> 84

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Glu Ser Met Thr Gln Gly  
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met  
35 40 45

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

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

Thr Leu Ser Ser Val Thr Thr Val Glu Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115

<210> 85

<211> 119

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> HC2b

<400> 85

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Gln Gly  
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met  
35 40 45

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

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

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

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115

<210> 86

<211> 119

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> HC3

<400> 86

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly  
20 25 30

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

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

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

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

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115

<210> 87

<211> 119

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> HC4

<400> 87

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Glu Ser Met Thr Gln Gly  
20 25 30

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

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

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



Thr Leu Ser Ser Val Thr Thr Val Glu Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115

<210> 88

<211> 119

<212> БІЛОК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> HC5a

<400> 88

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 Asp Ser Met Thr Asn Gly  
20 25 30

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

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

Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asn Thr Ser Lys Asn Gln Tyr 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

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 89

<211> 119

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> NC5b

<400> 89

Gln Met 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 Asp Ser Met Thr Asn Gly  
20 25 30

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

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

Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr 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

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 90

<211> 119

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> HC5c

<400> 90

Gln Met Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly

20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Tyr Met

35 40 45

Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Val Ser Val Lys

50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu

65 70 75 80

Gln Leu Ser Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 91

<211> 107

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> LC1a

<400> 91

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro  
85 90 95

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

<210> 92

<211> 107

<212> БІЛЛОК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> LC1b

<400> 92

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

Gln Thr Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Thr Leu Ile  
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala  
65 70 75 80

Met Asp Glu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro  
85 90 95

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

<210> 93

<211> 107

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> LC2

<400> 93

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile  
35 40 45

Tyr Arg Ala Gln Arg Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro  
85 90 95

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

<210> 94

<211> 107

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> LC3

<400> 94

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile  
35 40 45



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

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

Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro  
85 90 95

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

<210> 95

<211> 107

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> LC4

<400> 95

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile  
35 40 45

Tyr Arg Ala Gln Arg Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro  
85 90 95

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

<210> 96

<211> 107

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> LC5a

<400> 96

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 97

<211> 107

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> LC5b

<400> 97

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile  
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 98

<211> 107

<212> БІЛОК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> LC5c

<400> 98

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 99

<211> 255

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CH

<400> 99

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
 245 250 255

<210> 100

<211> 107

<212> БІЛОК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> CL

<400> 100

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 1 5 10 15

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 50 55 60

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



Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
100 105

<210> 101

<211> 107

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> vk1

<400> 101

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro  
85 90 95

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

<210> 102

<211> 106

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> v-лямбда-3

<220>

<221> інша\_ознака

<222> (22)..(22)

<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>

<221> інша\_ознака

<222> (87)..(87)

<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<400> 102

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

Thr Ala Ser Ile Thr Xaa Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala  
20 25 30

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

Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met  
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Xaa Gln Ala Trp Asp Ser Ser Ala Val Val  
85 90 95

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

<210> 103

<211> 120

<212> E1NOK

<213> штучна послідовність

<220>

<223> vh2

<400> 103

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
20 25 30

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

Trp Leu Ala Arg Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser  
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 104

<211> 118

<212> БІЛОК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> vh4

<220>

<221> інша\_ознака

<222> (22)..(22)

<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>

<221> інша\_ознака

<222> (95)..(95)

<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<400> 104

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 Xaa Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

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

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

Arg Gly Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 105

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> 3'-праймер для важкого ланцюга

<400> 105

tatgcaaggc ttacaaccac a

21

<210> 106

<211> 24

<212> днк

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> 3'-праймер для легкого ланцюга

<400> 106

ctcattctctg ttgaagctct tgag

24

<210> 107

<211> 107

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> IGKV1-33-01\_IGKJ4-01

<400> 107

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 108

<211> 119

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> IGHV4-59-02\_IGHD6-13-01\_IGHJ4-02

<400> 108

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 Gly Ser Val Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe 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

Arg Gly Tyr Ser Ser Ser Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 109

<211> 226

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> A44-hv1LC1a x HC1a

<400> 109

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Met Thr Leu Lys  
100 105 110

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

Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile  
130 135 140

Arg Lys Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr  
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Ser Ile  
165 170 175

Thr Arg Asn Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val  
180 185 190

Thr Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly  
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val  
210 215 220

Ser Ser  
225

<210> 110

<211> 226

<212> БІЛОК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> A44-hv2LC1b x HC1b

<400> 110

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

Gln Thr Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Thr Leu Ile  
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala  
65 70 75 80

Met Asp Glu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Ile Lys Glu Met Gln Leu Gln  
100 105 110

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

Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile  
 130 135 140

Arg Lys Phe Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr  
 145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Ser Ile  
 165 170 175

Thr Arg Asn Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Lys Leu Ser Ser Val  
 180 185 190

Thr Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly  
 195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val  
 210 215 220

Ser Ser  
 225

<210> 111

<211> 226

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> A44-hv3LC2 x HC2a

<400> 111

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr

20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile

35 40 45

Tyr Arg Ala Gln Arg Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Met Thr Leu Lys

100 105 110

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

Cys Ser Val Thr Gly Glu Ser Met Thr Gln Gly Tyr Trp Asn Trp Ile  
130 135 140

Arg Lys Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr  
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Ser Ile  
165 170 175

Thr Arg Gln Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val  
180 185 190

Thr Thr Val Glu Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly  
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val  
210 215 220

Ser Ser  
225

<210> 112

<211> 226

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> A44-hv4LC1a x HC2b

<400> 112

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr

20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile

35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Ser Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro

85 90 95



Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Met Thr Leu Lys  
100 105 110

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

Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Gln Gly Tyr Trp Asn Trp Ile  
130 135 140

Arg Lys Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr  
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Ser Ile  
165 170 175

Thr Arg Asn Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val  
180 185 190

Thr Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly  
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val  
210 215 220

Ser Ser  
225

<210> 113

<211> 226

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> A44-hv5LC2 x HC2b

<400> 113

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile  
35 40 45

Tyr Arg Ala Gln Arg Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Met Thr Leu Lys  
100 105 110

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

Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Gln Gly Tyr Trp Asn Trp Ile  
130 135 140

Arg Lys Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr  
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Ser Ile  
165 170 175

Thr Arg Asn Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val  
180 185 190

Thr Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly  
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val  
210 215 220

Ser Ser

225

<210> 114

<211> 226

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> A44-hv6LC3 x HC3

<400> 114

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr

20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile

35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Ser Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln Met Thr Leu Lys  
100 105 110

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

Cys Ser Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile  
130 135 140

Arg Gln Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr  
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Thr Ile  
165 170 175

Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val  
180 185 190

Thr Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly  
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val  
210 215 220

Ser Ser

225

<210> 115

<211> 226

<212> БІЛОК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> A44-hv7LC4 x HC4

<400> 115

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr

20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile

35 40 45

Tyr Arg Ala Gln Arg Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln Met Thr Leu Lys  
100 105 110

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

Cys Ser Val Ser Gly Glu Ser Met Thr Gln Gly Tyr Trp Asn Trp Ile  
130 135 140

Arg Gln Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr  
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Thr Ile  
165 170 175

Thr Arg Gln Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val  
180 185 190

Thr Thr Val Glu Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly  
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val  
210 215 220

Ser Ser  
225

<210> 116

<211> 226

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> A44-hv8LC5a x HC5a

<400> 116

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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



Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro  
85 90 95

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

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

Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile  
130 135 140

Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr  
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile  
165 170 175

Ser Arg Asn Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val  
180 185 190

Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly  
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
210 215 220

Ser Ser  
225

<210> 117  
<211> 226  
<212> БІЛЛОК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> A44-hv9LC5b x HCSb

<400> 117

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile  
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gln Met Gln Leu Gln  
100 105 110

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

Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile  
130 135 140

Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr  
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile  
165 170 175

Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val  
180 185 190

Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly  
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
210 215 220

Ser Ser  
225

<210> 118

<211> 226

<212> БЛОК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> A44-hv10LC5c x HC5c

<400> 118

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gln Met Gln Leu Gln  
100 105 110

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

Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile  
130 135 140

Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr  
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile  
165 170 175

Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu Gln Leu Ser Ser Val  
180 185 190

Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly  
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
210 215 220

Ser Ser  
225

<210> 119  
<211> 226  
<212> БІЛОК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> A44-hv11LC2 x HC3

<400> 119

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile  
35 40 45

Tyr Arg Ala Gln Arg Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln Met Thr Leu Lys  
100 105 110

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

Cys Ser Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile  
130 135 140

Arg Gln Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr  
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Thr Ile  
165 170 175

Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val  
180 185 190

Thr Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly  
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val  
210 215 220

Ser Ser  
225

<210> 120  
<211> 226  
<212> БІЛОК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> A44-hv12LC4 X HC3

<400> 120

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
20 25 30



Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile  
35 40 45

Tyr Arg Ala Gln Arg Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln Met Thr Leu Lys  
100 105 110

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

Cys Ser Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile  
130 135 140

Arg Gln Phe Pro Gly Lys Ala Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr  
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly Arg Ile Thr Ile  
165 170 175

Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu Thr Leu Ser Ser Val  
180 185 190

Thr Thr Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly  
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val  
210 215 220

Ser Ser  
225

<210> 121  
<211> 226  
<212> БІЛОК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> A44-hv13LC2 x HC5b

<400> 121

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile  
35 40 45

Tyr Arg Ala Gln Arg Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln Met Gln Leu Gln  
100 105 110

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

Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile  
130 135 140

Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr  
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile  
165 170 175

Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val  
180 185 190

Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly  
195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
210 215 220

Ser Ser  
225

<210> 122

<211> 226

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> A44-hv14LC4 x HCSb

<400> 122

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile  
35 40 45

Tyr Arg Ala Gln Arg Ser Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln Met Gln Leu Gln  
100 105 110

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

Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Ile  
130 135 140

Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met Gly Tyr Ile Thr Tyr  
145 150 155 160

Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile  
 165 170 175

Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val  
 180 185 190

Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Tyr Gly  
 195 200 205

Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 210 215 220

Ser Ser  
 225

<210> 123  
 <211> 255  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> NC1a

<400> 123  
 gagatgaccc tgaagagtc cggccccacc ctggtcaaac ccaccagac cctgagcctg 60  
 acctgcagcg tgaccggcga cagcatgacc aacggctact ggaactggat ccggaagttc 120

cccggcaagg ccctcgagta catgggctac atcacctaca ggggcagcac ctactacaac 180  
cccagcctga agggccggat cagcatcacc cggaacacca gcaagaacca gtactacctg 240  
acctgtcca gcgtg 255

<210> 124  
<211> 255  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> NC1b

<400> 124  
gagatgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaaac ccagcgagac actgagcctg 60  
acctgcagcg tgaccggcga cagcatgacc aacggctact ggaactggat ccggaagttc 120  
cccggcaagg ccctcgagta catgggctac atcacctaca ggggcagcac ctactacaac 180  
cccagcctga agggccggat cagcatcacc cggaacacca gcaagaacca gtactacctg 240  
aagctgtcca gcgtg 255

<210> 125  
<211> 255  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> NC2a

<400> 125

|            |            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| gagatgacc  | tgaagagtc  | cgccccacc  | ctggtcaaac | ccaccagac  | cctgagcctg | 60  |
| acctgcagcg | tgaccggcga | gagcatgacc | cagggctact | ggaactggat | ccggaagtgc | 120 |
| cccggcaagg | ccctcgagta | catgggctac | atcacctaca | gggcagcac  | ctactacaac | 180 |
| cccagcctga | agggccggat | cagcaccacc | cggcagacca | gcaagaacca | gtactacctg | 240 |
| acctgtcca  | gcgtg      |            |            |            |            | 255 |

<210> 126

<211> 255

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> NC2b

<400> 126

|            |            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| gagatgacc  | tgaagagtc  | cgccccacc  | ctggtcaaac | ccaccagac  | cctgagcctg | 60  |
| acctgcagcg | tgaccggcga | gagcatgacc | cagggctact | ggaactggat | ccggaagtgc | 120 |
| cccggcaagg | ccctcgagta | catgggctac | atcacctaca | gggcagcac  | ctactacaac | 180 |
| cccagcctga | agggccggat | cagcaccacc | cggaacacca | gcaagaacca | gtactacctg | 240 |
| acctgtcca  | gcgtg      |            |            |            |            | 255 |



<210> 127  
 <211> 255  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> НС3

<400> 127  
 cagatgaccc tgaagagtc cggccccacc ctgggtcaaac ccacccagac cctgagcctg 60  
 acctgcagcg tgtccggcga cagcatgacc aacggctact ggaactggat cgggcagttc 120  
 cccggcaagg cctcgagta catgggtac atcacctaca gcggcagcac ctactacaac 180  
 cccagcctga agggccggat caccatcacc cgggacacca gcaagaacca gtactacctg 240  
 acctgagca gcgtg 255

<210> 128  
 <211> 255  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> НС4

<400> 128  
 cagatgaccc tgaagagtc cggccccacc ctgggtcaaac ccacccagac cctgagcctg 60  
 acctgcagcg tgtccggcga gagcatgacc cagggtact ggaactggat cgggcagttc 120  
 cccggcaagg cctcgagta catgggtac atcacctaca gcggcagcac ctactacaac 180

cccagcctga agggccggat caccatcacc cggcagacca gcaagaacca gtactacctg 240

accctgagca gcgtg 255

<210> 129

<211> 255

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> NC5a

<400> 129

caggtgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaaac ccagcgagac actgagcctg 60

acctgcaccg tgtccggcga cagcatgacc aacggctact ggaactggat cgggcagccc 120

cctggcaagg gccctgagta catgggctac atcactaca ggggcagcac ctactacaac 180

cccagcctga agtcccggat caccatcagc cggaacacca gcaagaacca gtacagcctg 240

aagctgagca gcgtg 255

<210> 130

<211> 255

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> NC5b

<400> 130

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| cagatgcagc tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaaac ccagcgagac actgagcctg | 60  |
| acctgcaccg tgtccggcga cagcatgacc aacggctact ggaactggat ccggcagccc | 120 |
| cctggcaagg gccctgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacaac | 180 |
| cccagcctga agtcccggat caccatcagc cgggacacca gcaagaacca gtacagcctg | 240 |
| aagctgagca gcgtg                                                  | 255 |

<210> 131

<211> 255

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> NC5c

<400> 131

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| cagatgcagc tgcagcagag cggccctggc ctggtcaaac ccagccagac cctgagcctg | 60  |
| acctgcgcca tcagcggcga cagcatgacc aacggctact ggaactggat ccggcagagc | 120 |
| cccagcagag gccctgagta catgggctac atcacctaca gcggcagcac ctactacgcc | 180 |
| gtgtccgtga agtcccggat caccatcaac cgggacacca gcaagaacca gtacagcctg | 240 |
| cagctgagca gcgtg                                                  | 255 |

<210> 132

<211> 255

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> LC1a

<400> 132

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| gacatcaaga tgacccagag cccacagcagc ctgagcgcca gcgtggcgga cagagtgacc | 60  |
| atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc  | 120 |
| ggcaagagcc ccaagaccct gatctaccgg gccaaccgca gcgtggacgg cgtgccaaagc | 180 |
| agattttccg gcagcggcag cggccaggac tacagcctga ccatcagcag cctgcagccc  | 240 |
| gaggacctgg gcac                                                    | 255 |

<210> 133

<211> 255

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> LC1b

<400> 133

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| gacatcaaga tgacccagag cccacagcagc gtgtccgtgt ctctggcca gaccgtgacc  | 60  |
| atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc  | 120 |
| ggccagtcgc ccaagaccct gatctaccgg gccaaccgca gcgtggacgg cgtgccaaagc | 180 |
| agattttccg gcagcggcag cggccaggac tacagcctga ccatcagcag cctgcagccc  | 240 |

atggacgagg gcac 255

<210> 134

<211> 255

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> LC2

<400> 134

gacatcaaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtggcgga cagagtgaac 60

atcacatgca aggcagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc 120

ggcaagagcc ccaagaccct gatctaccgg gccagcgga gcgtggaagg cgtgccaaagc 180

agattcagcg gcagcggctc cggccaggac tacagcctga ccatcagcag cctgcagccc 240

gaggacctgg gcac 255

<210> 135

<211> 255

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> LC3

<400> 135

gacatcaaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtggcgga cagagtgaac 60

atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc 120  
 ggcaagagcc ccaagacct gatctaccgg gccaacccga gcgtggacgg cgtgccaaagc 180  
 agattttccg gcagcggcag cggccaggac tacagcctga ccacacagcag cctgcagccc 240  
 gaggacctgg ccacc 255

<210> 136  
 <211> 255  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> LC4

<400> 136  
 gacatcaaga tgaccacagag cccacagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca cagagtgacc 60  
 atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc 120  
 ggcaagagcc ccaagacct gatctaccgg gccacaccca gcgtgggaagg cgtgccaaagc 180  
 agattcagcg gcagcggctc cggccaggac tacagcctga ccacacagcag cctgcagccc 240  
 gaggacctgg ccacc 255

<210> 137  
 <211> 255  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> LC5a

<400> 137

gacatccaga tgacccagag cccacagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60  
atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc 120  
ggcaaggccc ccaagctget gatctaccgg gccaacgca gcgtggacgg cgtgccaaagc 180  
agattttccg gcagcggctc cggcaccgac tacaccttca ccacacagcag cctgcagccc 240  
gaggatatcg ccacc 255

<210> 138

<211> 255

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> LC5b

<400> 138

gacatccaga tgacccagag cccacagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60  
atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc 120  
ggcaaggccc ccaagacctt gatctaccgg gccaacgca gcgtggacgg cgtgccaaagc 180  
agattttccg gcagcggcag cggccaggac tacaccttca ccacacagcag cctgcagccc 240  
gaggatatcg ccacc 255

<210> 139

<211> 255

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> LC5c

<400> 139

gagatcgtga tgacccagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 60

ctgagctgca aggcagacca ggaatcaaac agctacctga gctggctgca gcagaagccc 120

ggccaggccc ccagaacct gatctaccgg gccaacagaa gctgggacgg catccccgcc 180

agattcagcg gcagcggctc cggccaggac tacacctga ccctcagcag cctggaaccc 240

gaggacttcg ccgtg 255

<210> 140

<211> 119

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mA44 VH

<400> 140

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

1 5 10 15



Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Met Thr Asn Gly  
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met  
35 40 45

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

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

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

Arg Trp His Tyr Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115

<210> 141

<211> 107

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mA44 VL

<400> 141

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

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

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro  
85 90 95

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

<210> 142

<211> 118

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> mA44 VL

<400> 142

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr

20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile

35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Ser Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr

65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala  
100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe  
115

<210> 143

<211> 107

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> IGKV3-11-02\_IGKJ4-0

<400> 143

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 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 144

<211> 123

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> IGHV6-1-02\_IGHD6-13-01\_IGHJ4-02

<400> 144

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn  
20 25 30

Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu  
35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala  
50 55 60

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

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val  
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Ser Ser Ser Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
100 105 110

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

<210> 145

<211> 3

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична

<400> 145

Arg Ala Gln

1

<210> 146  
 <211> 8  
 <212> БІЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтетична

<400> 146

Gly Glu Ser Met Thr Gln Gly Tyr  
 1 5

<210> 147  
 <211> 8  
 <212> БІЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтетична

<400> 147

Gly Asp Ser Met Thr Gln Gly Tyr  
 1 5

<210> 148  
 <211> 117  
 <212> БІЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична

<400> 148

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Lys Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ile Ile His Pro Asn Ser Gly Thr Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Gln Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Lys Leu Arg Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115



<210> 149

<211> 107

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична

<400> 149

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

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

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu His Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Phe  
85 90 95

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

<210> 150

<211> 107

<212> БІЛОК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична

<400> 150

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Cys  
85 90 95

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

<210> 151

<211> 118

<212> БІЛЮК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична

<220>

<221> інша\_ознака

<222> (99)..(103)

<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<400> 151

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 152

<211> 118

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична

<220>

<221> інша\_ознака

<222> (99)..(103)

<223> Xaa може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<400> 152

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 153

<211> 107

<212> БІЛОК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична

<400> 153

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Tyr Ser Tyr

20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile

35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Ile Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Phe  
85 90 95

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

<210> 154

<211> 117

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична

<400> 154

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 155

<211> 117

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична

<400> 155

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

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



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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 156

<211> 4

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична

<220>

<221> інша\_ознака

<222> (2)..(3)

<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<400> 156

Gln Хаа Хаа Gln

1

<210> 157

<211> 3

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична

<220>

<221> інша\_ознака

<222> (2)..(2)

<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<400> 157

Leu Хаа Arg

1

<210> 158  
 <211> 20  
 <212> БЛОК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Синтетична

<220>  
 <221> інша\_ознака  
 <222> (3)..(4)  
 <223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>  
 <221> інша\_ознака  
 <222> (13)..(14)  
 <223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<400> 158

Thr Asp Xaa Xaa Arg Gln Phe Gln Ala Asp Phe Thr Xaa Xaa Ser Asp  
 1 5 10 15

Gln Glu Pro Leu  
 20

<210> 159  
 <211> 11  
 <212> БЛОК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> штучна послідовність

<400> 159

Thr Thr Gly Gly Glu Thr Arg Gln Gln Ile Gln  
1 5 10

<210> 160

<211> 3

<212> БІЛОК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> штучна послідовність

<400> 160

Arg His Leu

1

<210> 161

<211> 22

<212> БІЛОК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> штучна послідовність

<220>

<221> інша\_ознака

<222> (4)..(6)

<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<400> 161

Thr Asp Met Хаа Хаа Хаа Phe Gln Ala Asp Phe Thr Ser Leu Ser Asn  
1 5 10 15

Gln Glu Pro Leu His Val  
20

<210> 162

<211> 402

<212> БЛОК

<213> яванська макака

<400> 162

Met Gln Met Ser Pro Ala Leu Ala Cys Leu Val Leu Gly Leu Ala Phe  
1 5 10 15

Val Phe Gly Glu Gly Ser Thr Val His His Pro Pro Ser Tyr Val Ala  
20 25 30

His Leu Ala Ser Asp Phe Gly Val Arg Val Phe Gln Gln Val Ala Gln  
35 40 45

Ala Ser Lys Asp Arg Asn Val Val Phe Ser Pro Tyr Gly Val Ala Ser  
50 55 60

Val Leu Ala Met Leu Gln Leu Thr Thr Gly Gly Glu Thr Arg Gln Gln  
65 70 75 80

Ile Gln Ala Ala Met Gly Phe Lys Ile Asp Asp Lys Gly Met Ala Pro  
85 90 95

Ala Leu Arg His Leu Tyr Lys Glu Leu Leu Gly Pro Trp Asn Lys Asp  
100 105 110

Glu Ile Ser Thr Thr Asp Ala Ile Phe Val Gln Arg Asp Leu Lys Leu  
115 120 125

Val Gln Gly Phe Met Pro His Phe Phe Arg Leu Phe Arg Ser Thr Val  
130 135 140

Lys Gln Val Asp Phe Ser Glu Ala Glu Arg Ala Arg Phe Ile Ile Asn  
145 150 155 160

Asp Trp Val Lys Thr His Thr Lys Gly Met Ile Ser Asp Leu Leu Gly  
165 170 175

Lys Gly Ala Val Asp Gln Leu Thr Arg Leu Val Leu Val Asn Ala Leu  
180 185 190

Tyr Phe Asn Gly His Trp Lys Thr Pro Phe Pro Asp Ser Ser Thr His  
195 200 205

Arg Arg Leu Phe His Lys Ser Asp Gly Ser Thr Val Ser Val Pro Met  
210 215 220

Met Ala Gln Thr Asn Lys Phe Asn Tyr Thr Glu Phe Thr Thr Pro Asp  
225 230 235 240

Gly His Tyr Tyr Asp Ile Leu Glu Leu Pro Tyr His Gly Asn Thr Leu  
245 250 255

Ser Met Phe Ile Ala Ala Pro Tyr Glu Lys Gln Val Pro Leu Ser Ala  
260 265 270

Leu Thr Asn Ile Leu Ser Ala Gln Leu Ile Ser His Trp Lys Gly Asn  
275 280 285

Met Thr Arg Leu Pro Arg Leu Leu Val Leu Pro Lys Phe Ser Leu Glu  
290 295 300

Thr Glu Val Asp Leu Arg Lys Pro Leu Glu Asn Leu Gly Met Thr Asp  
305 310 315 320

Met Phe Arg Gln Phe Gln Ala Asp Phe Thr Ser Leu Ser Asn Gln Glu  
325 330 335

Pro Leu His Val Ala Gln Ala Leu Gln Lys Val Lys Ile Glu Val Asn  
340 345 350

Glu Ser Gly Thr Val Ala Ser Ser Ser Thr Ala Val Ile Val Ser Ala  
355 360 365

Arg Met Ala Pro Glu Glu Ile Ile Met Asp Arg Pro Phe Leu Phe Val  
370 375 380

Val Arg His Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Phe Met Gly Gln Val Met  
385 390 395 400

Glu Pro

<210> 163

<211> 402

<212> B1D0K

<213> Mus musculus

<400> 163

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

Val Ser Gly Lys Gly Phe Thr Leu Pro Leu Arg Glu Ser His Thr Ala  
20 25 30



His Gln Ala Thr Asp Phe Gly Val Lys Val Phe Gln Gln Val Val Gln  
35 40 45

Ala Ser Lys Asp Arg Asn Val Val Phe Ser Pro Tyr Gly Val Ser Ser  
50 55 60

Val Leu Ala Met Leu Gln Met Thr Thr Ala Gly Lys Thr Arg Arg Gln  
65 70 75 80

Ile Gln Asp Ala Met Gly Phe Lys Val Asn Glu Lys Gly Thr Ala His  
85 90 95

Ala Leu Arg Gln Leu Ser Lys Glu Leu Met Gly Pro Trp Asn Lys Asn  
100 105 110

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

Val Gln Gly Phe Met Pro His Phe Phe Lys Leu Phe Gln Thr Met Val  
130 135 140

Lys Gln Val Asp Phe Ser Glu Val Glu Arg Ala Arg Phe Ile Ile Asn  
145 150 155 160

Asp Trp Val Glu Arg His Thr Lys Gly Met Ile Ser Asp Leu Leu Ala  
165 170 175

Lys Gly Ala Val Asp Glu Leu Thr Arg Leu Val Leu Val Asn Ala Leu  
180 185 190

Tyr Phe Ser Gly Gln Trp Lys Thr Pro Phe Leu Glu Ala Ser Thr His  
195 200 205

Gln Arg Leu Phe His Lys Ser Asp Gly Ser Thr Val Ser Val Pro Met  
210 215 220

Met Ala Gln Ser Asn Lys Phe Asn Tyr Thr Glu Phe Thr Thr Pro Asp  
225 230 235 240

Gly Leu Glu Tyr Asp Val Val Glu Leu Pro Tyr Gln Gly Asp Thr Leu  
245 250 255

Ser Met Phe Ile Ala Ala Pro Phe Glu Lys Asp Val His Leu Ser Ala  
260 265 270

Leu Thr Asn Ile Leu Asp Ala Glu Leu Ile Arg Gln Trp Lys Gly Asn  
275 280 285

Met Thr Arg Leu Pro Arg Leu Leu Ile Leu Pro Lys Phe Ser Leu Glu  
290 295 300

Thr Glu Val Asp Leu Arg Gly Pro Leu Glu Lys Leu Gly Met Pro Asp  
305 310 315 320

Met Phe Ser Ala Thr Leu Ala Asp Phe Thr Ser Leu Ser Asp Gln Glu  
325 330 335

Gln Leu Ser Val Ala Gln Ala Leu Gln Lys Val Arg Ile Glu Val Asn  
340 345 350

Glu Ser Gly Thr Val Ala Ser Ser Ser Thr Ala Phe Val Ile Ser Ala  
355 360 365

Arg Met Ala Pro Thr Glu Met Val Ile Asp Arg Ser Phe Leu Phe Val  
370 375 380

Val Arg His Asn Pro Thr Glu Thr Ile Leu Phe Met Gly Gln Val Met  
385 390 395 400

Glu Pro

<210> 164

<211> 402

<212> E1AOK

<213> Rattus norvegicus

<400> 164

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

Val Phe Gly Lys Gly Phe Ala Ser Pro Leu Pro Glu Ser His Thr Ala  
20 25 30

Gln Gln Ala Thr Asn Phe Gly Val Lys Val Phe Gln His Val Val Gln  
35 40 45

Ala Ser Lys Asp Arg Asn Val Val Phe Ser Pro Tyr Gly Val Ser Ser  
50 55 60

Val Leu Ala Met Leu Gln Leu Thr Thr Ala Gly Lys Thr Arg Gln Gln  
65 70 75 80

Ile Gln Asp Ala Met Gly Phe Asn Ile Ser Glu Arg Gly Thr Ala Pro  
85 90 95

Ala Leu Arg Lys Leu Ser Lys Glu Leu Met Gly Ser Trp Asn Lys Asn  
100 105 110

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

Val Gln Gly Phe Met Pro His Phe Phe Lys Leu Phe Arg Thr Thr Val  
130 135 140

Lys Gln Val Asp Phe Ser Glu Val Glu Arg Ala Arg Phe Ile Ile Asn  
145 150 155 160

Asp Trp Val Glu Arg His Thr Lys Gly Met Ile Ser Asp Leu Leu Ala  
165 170 175

Lys Gly Ala Val Asn Glu Leu Thr Arg Leu Val Leu Val Asn Ala Leu  
180 185 190

Tyr Phe Asn Gly Gln Trp Lys Thr Pro Phe Leu Glu Ala Ser Thr His  
195 200 205

Gln Arg Leu Phe His Lys Ser Asp Gly Ser Thr Ile Ser Val Pro Met  
210 215 220

Met Ala Gln Asn Asn Lys Phe Asn Tyr Thr Glu Phe Thr Thr Pro Asp  
225 230 235 240

Gly His Glu Tyr Asp Ile Leu Glu Leu Pro Tyr His Gly Glu Thr Leu  
245 250 255

Ser Met Phe Ile Ala Ala Pro Phe Glu Lys Asp Val Pro Leu Ser Ala  
260 265 270

Ile Thr Asn Ile Leu Asp Ala Glu Leu Ile Arg Gln Trp Lys Ser Asn  
275 280 285

Met Thr Arg Leu Pro Arg Leu Leu Ile Leu Pro Lys Phe Ser Leu Glu  
290 295 300

Thr Glu Val Asp Leu Arg Gly Pro Leu Glu Lys Leu Gly Met Thr Asp  
305 310 315 320

Ile Phe Ser Ser Thr Gln Ala Asp Phe Thr Ser Leu Ser Asp Gln Glu  
325 330 335

Gln Leu Ser Val Ala Gln Ala Leu Gln Lys Val Lys Ile Glu Val Asn  
340 345 350

Glu Ser Gly Thr Val Ala Ser Ser Ser Thr Ala Ile Leu Val Ser Ala  
355 360 365

Arg Met Ala Pro Thr Glu Met Val Leu Asp Arg Ser Phe Leu Phe Val  
370 375 380

Val Arg His Asn Pro Thr Glu Thr Ile Leu Phe Met Gly Gln Leu Met  
385 390 395 400

Glu Pro

<210> 165

<211> 6

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична

<400> 165

Gln Asp Ile Tyr Ser Tyr

1 5

<210> 166

<211> 9

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична

<400> 166

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Phe Thr

1 5

<210> 167

<211> 3

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична

<400> 167

Arg Ala Asn

1

<210> 168

<211> 8

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична

<400> 168

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Asn

1

5

<210> 169

<211> 9

<212> БЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична



&lt;400&gt; 169

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Phe Thr

1

5

&lt;210&gt; 170

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; БЛОК

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Синтетична

&lt;400&gt; 170

Arg Ala Asn

1

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Виділене моноклональне антитіло, що специфічно зв'язується з PAI-1, яке містить:
  - (а) каркасну ділянку важкого ланцюга та варіабельну ділянку важкого ланцюга, при цьому варіабельна ділянка важкого ланцюга містить CDR1-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 34, CDR2-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 33, та CDR3-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 32; та
  - 10 (б) каркасну ділянку легкого ланцюга та варіабельну ділянку легкого ланцюга, при цьому варіабельна ділянка легкого ланцюга містить CDR1-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 37, CDR2-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 145, та CDR3-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 35.
- 15 2. Виділене моноклональне антитіло, що специфічно зв'язується з PAI-1, яке містить:
  - (а) каркасну ділянку важкого ланцюга та варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 86, та
  - (б) каркасну ділянку легкого ланцюга та варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 93.
- 20 3. Виділене моноклональне антитіло, що специфічно зв'язується з PAI-1, яке містить:
  - (а) каркасну ділянку важкого ланцюга та варіабельну ділянку важкого ланцюга, при цьому варіабельна ділянка важкого ланцюга містить CDR1-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 34, CDR2-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 33, та CDR3-ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 32; та
  - 25 (б) каркасну ділянку легкого ланцюга та варіабельну ділянку легкого ланцюга, при цьому варіабельна ділянка легкого ланцюга містить CDR1-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 37, CDR2-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 36, та CDR3-ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 35.
- 30 4. Антитіло за п. 3, де варіабельна ділянка важкого ланцюга містить SEQ ID NO: 6, а варіабельна ділянка легкого ланцюга містить SEQ ID NO: 7.
5. Гуманізоване моноклональне антитіло, що специфічно зв'язується з PAI-1 людини, де антитіло містить:
  - (а) важкий ланцюг, що має варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить SEQ ID NO: 82, або його антигензв'язувальний фрагмент, і легкий ланцюг, що має варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить SEQ ID NO: 91, або його антигензв'язувальний фрагмент;

(b) важкий ланцюг, що має варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить SEQ ID NO: 83, або його антигензв'язувальний фрагмент, і легкий ланцюг, що має варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить SEQ ID NO: 92, або його антигензв'язувальний фрагмент;

5 (c) важкий ланцюг, що має варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить SEQ ID NO: 84, або його антигензв'язувальний фрагмент, і легкий ланцюг, що має варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить SEQ ID NO: 93, або його антигензв'язувальний фрагмент;

(d) важкий ланцюг, що має варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить SEQ ID NO: 85, або його антигензв'язувальний фрагмент, і легкий ланцюг, що має варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить SEQ ID NO: 91, або його антигензв'язувальний фрагмент;

10 (e) важкий ланцюг, що має варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить SEQ ID NO: 85, або його антигензв'язувальний фрагмент, і легкий ланцюг, що має варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить SEQ ID NO: 93, або його антигензв'язувальний фрагмент;

(f) важкий ланцюг, що має варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить SEQ ID NO: 86, або його антигензв'язувальний фрагмент, і легкий ланцюг, що має варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить SEQ ID NO: 94, або його антигензв'язувальний фрагмент;

15 (g) важкий ланцюг, що має варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить SEQ ID NO: 87, або його антигензв'язувальний фрагмент, і легкий ланцюг, що має варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить SEQ ID NO: 95, або його антигензв'язувальний фрагмент;

20 (h) важкий ланцюг, що має варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить SEQ ID NO: 88, або його антигензв'язувальний фрагмент, і легкий ланцюг, що має варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить SEQ ID NO: 96, або його антигензв'язувальний фрагмент;

(i) важкий ланцюг, що має варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить SEQ ID NO: 89, або його антигензв'язувальний фрагмент, і легкий ланцюг, що має варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить SEQ ID NO: 97, або його антигензв'язувальний фрагмент;

25 (j) важкий ланцюг, що має варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить SEQ ID NO: 90, або його антигензв'язувальний фрагмент, і легкий ланцюг, що має варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить SEQ ID NO: 98, або його антигензв'язувальний фрагмент;

(k) важкий ланцюг, що має варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить SEQ ID NO: 86, або його антигензв'язувальний фрагмент, і легкий ланцюг, що має варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить SEQ ID NO: 95, або його антигензв'язувальний фрагмент;

30 (l) важкий ланцюг, що має варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить SEQ ID NO: 89, або його антигензв'язувальний фрагмент, і легкий ланцюг, що має варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить SEQ ID NO: 93, або його антигензв'язувальний фрагмент; або

35 (m) важкий ланцюг, що має варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить SEQ ID NO: 89, або його антигензв'язувальний фрагмент, і легкий ланцюг, що має варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить SEQ ID NO: 95, або його антигензв'язувальний фрагмент.

6. Застосування фармацевтично ефективної кількості антитіла до PAI-1 за будь-яким з попередніх пунктів для виробництва лікарського засобу для лікування фіброзу, фіброзу шкіри, системного склерозу, фіброзу легенів, ідіопатичного легеневого фіброзу, інтерстиціального захворювання легенів, хронічного захворювання легенів, фіброзу печінки, фіброзу нирок, хронічного захворювання нирок, тромбозу, венозного і артеріального тромбозу, тромбозу глибоких вен, периферичної ішемії кінцівок, тромбозу по типу дисемінованого внутрішньосудинного згортання, гострого ішемічного інсульту, що супроводжується та не супроводжується тромболізом або рестенозу в стенті.

45 7. Застосування за п. 6, де лікарський засіб вводять перорально, парентерально за допомогою розчину для ін'єкцій, шляхом інгаляції або місцево.

8. Застосування фармацевтично ефективної кількості антитіла до PAI-1 за будь-яким з пп. 1, 2, 3, 4 або 5 для виробництва лікарського препарату для лікування фіброзу, фіброзу шкіри, системного склерозу, фіброзу легенів, ідіопатичного легеневого фіброзу, інтерстиціального захворювання легенів, хронічного захворювання легенів, фіброзу печінки, фіброзу нирок, хронічного захворювання нирок, тромбозу, венозного і артеріального тромбозу, тромбозу глибоких вен, периферичної ішемії кінцівок, тромбозу по типу дисемінованого внутрішньосудинного згортання, гострого ішемічного інсульту, що супроводжується та не супроводжується тромболізом або рестенозу в стенті, що викликаються підвищеними рівнями PAI-1 або підвищеною чутливістю до PAI-1, де вказаний лікарський засіб вводять пацієнту перорально, парентерально за допомогою розчину для ін'єкцій, шляхом інгаляції або місцево.

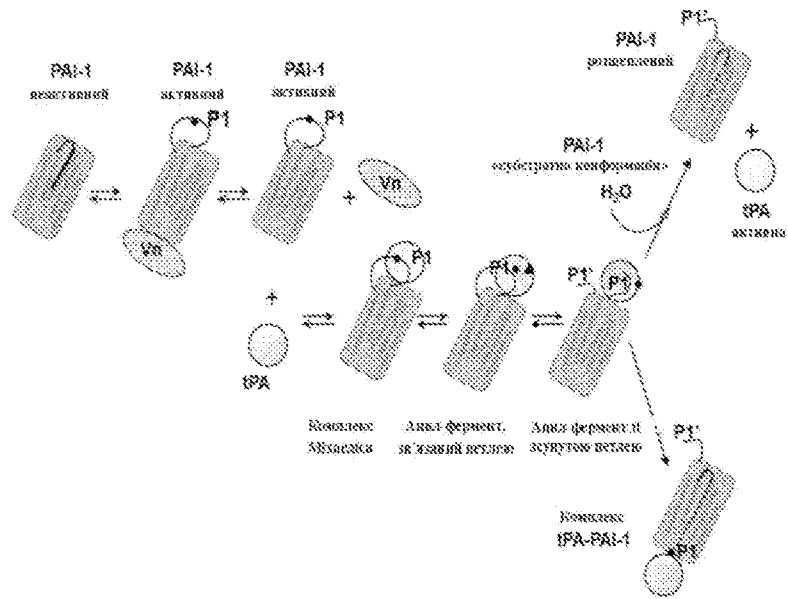


Fig. 1

Титрование mAb щодо комплексу Vn/PAI-1 (ELISA)

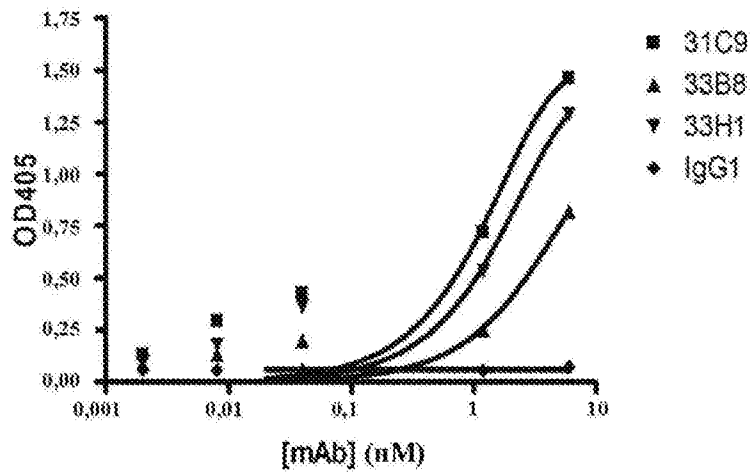
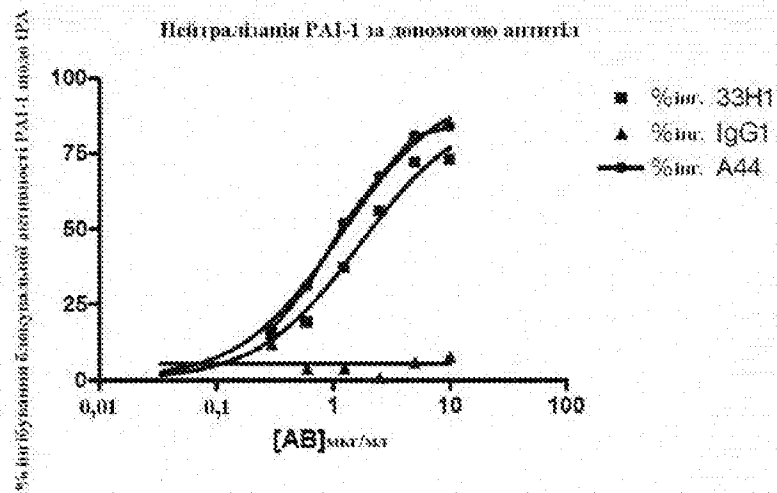
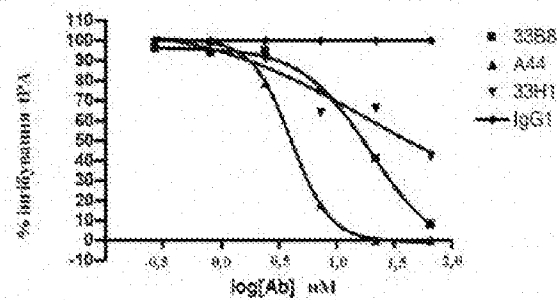


Fig. 2



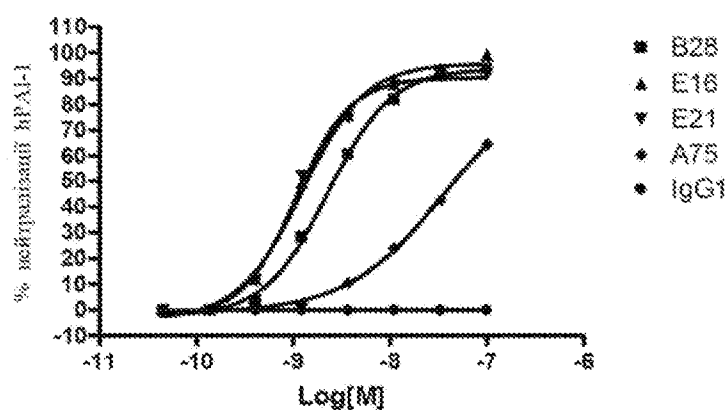
Фиг. 3

% інгібування ТРА за допомогою PAI-1, інкубованого з mAb



| Співвідношення проті до антигену (мол/мол проті) | 33B8   | A44    | 33H1    |
|--------------------------------------------------|--------|--------|---------|
| Значення кінцевої концентрації                   | 7,036  | 4,0570 | 14,38   |
| INHIBIC                                          | 96,58  | 100,8  | 108,9   |
| LOGEC50                                          | 1,297  | 0,8048 | 1,249   |
| КОЕФІЦІЄНТ ХУДІС                                 | -1,449 | -2,528 | -0,5931 |
| EC50                                             | 19,38  | 4,826  | 17,76   |

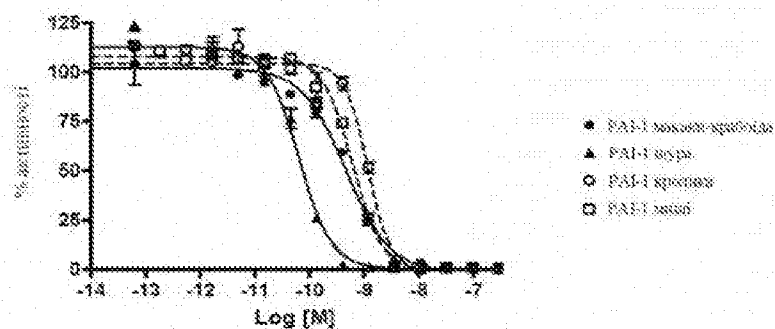
Фиг. 4



|                   | B28        | E16        | E21        | A75      |
|-------------------|------------|------------|------------|----------|
| КОЕФІЦІЄНТ ХІДІЛА | 1,336      | 1,338      | 1,555      | 0,8527   |
| EC50              | 2,302e-009 | 1,237e-009 | 1,081e-009 | 3,820e-0 |

Фіг. 5

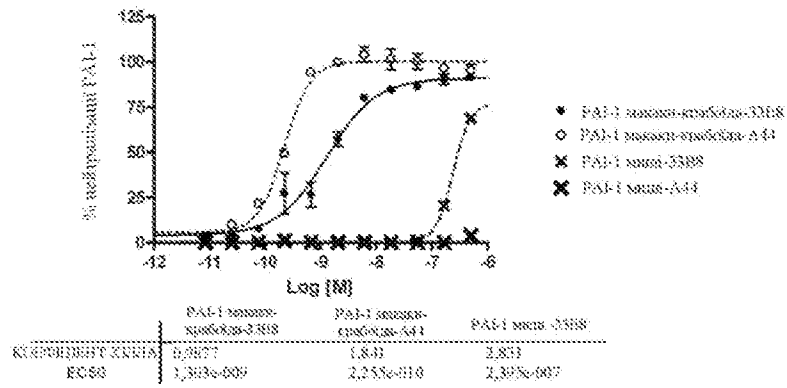
% активності 1,4 нМ tPA залежно від PAI-1 мінні,  
максимі-кровофіза, щура та кролика



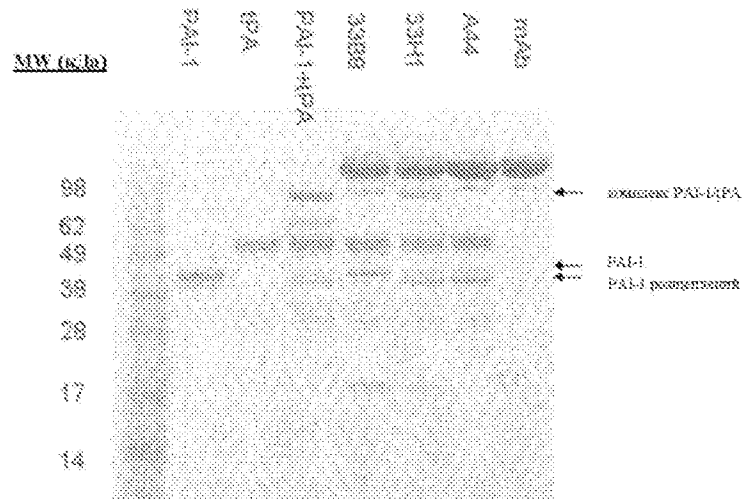
|                   | PAI-1 максимі-кровофіза | PAI-1 щура | PAI-1 кролика | PAI-1 мінні |
|-------------------|-------------------------|------------|---------------|-------------|
| КОЕФІЦІЄНТ ХІДІЛА | 1,683                   | 1,683      | 2,079         | 1,686       |
| EC50              | 4,633e-010              | 6,425e-011 | 1,169e-009    | 6,143e-010  |

Фіг. 6

% нейтралізації 2,8 нМ PAI-1 максимі-спрабів та 2,8 нМ PAI-1 мінімі  
залежно від mAb ISLA-33B8 та A44



Фиг. 7



Фиг. 8

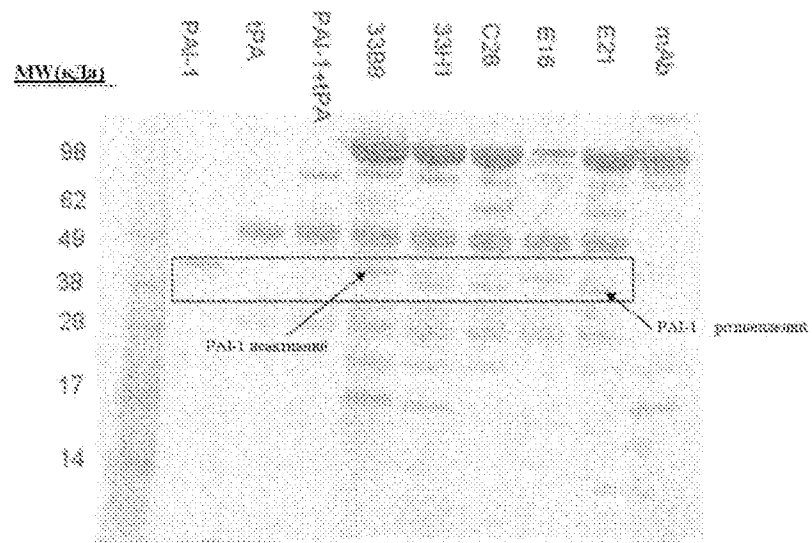


Fig. 9

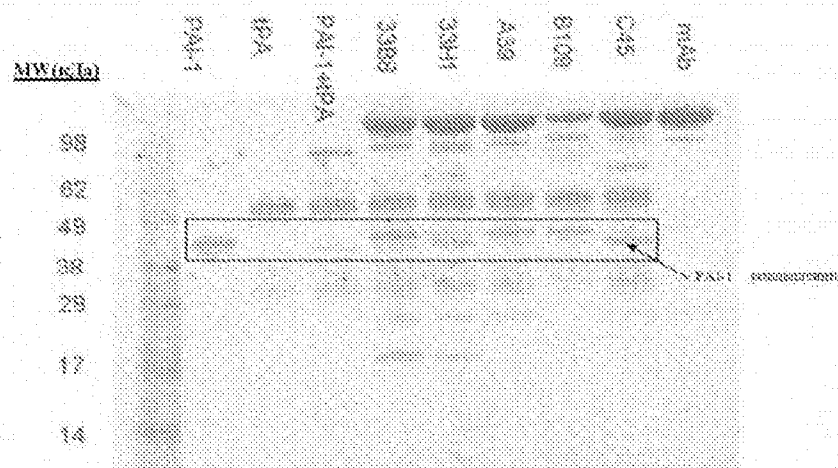


Fig. 10

BBPBBBBAHHB VL

A105: DVVNTQTFFFLSVTTIQVASTICKSSQGLLDSDGKTYLWLLQHPQQSPQALSLVSEK  
 A39: STQMTSPFSLGASVQSTVTTTCHASENIX-----SYLAWYQXKQKPPQLLVNAKT  
 A44: DAKMTQEPSENYAHLCSPVTTICKAQDIN-----SYLAWYQXKQKPPQLLVNAKT  
 A71: DVVNTQTFFFLSVTTIQVASTICKSSQGLLDSDGKTYLWLLQHPQQSPQALSLVSEK  
 A75: DVVNTQTFFFLSVTTIQVASTICKSSQGLLDSDGKTYLWLLQHPQQSPQALSLVSEK  
 B109: DIVNTQCHKPTSTAGDVSINPKAQQVS-----SAVANTQXKQKPPQLLVNAKT  
 B28: DQCLTQSPFSLGASVQSTVTTTCHASENIX-----SYLAWYQXKQKPPQLLVNAKT  
 C45: DAKMTQEPSENYAHLCSPVTTICKAQDIN-----SYLAWYQXKQKPPQLLVNAKT  
 E16: DIVNTQCHKPTSTAGDVSINPKAQQVS-----TAVQNTQXKQKPPQLLVNAKT  
 E21: DQMTQTTFSLGASVQSTVTTTCHASQD18-----NYLAWYQXKQKPPQLLVNAKT

A105: LDDGVFPAPFTGGGSDTDFILSLKSVVGGSLAVVYQWQDRHFFFTTGGGTHLEIKKAS  
 A39: LAGVPSERFEGGSDTDFILSLKSVVGGSLAVVYQWQDRHFFFTTGGGTHLEIKKAS  
 A44: LAGVPSERFEGGSDTDFILSLKSVVGGSLAVVYQWQDRHFFFTTGGGTHLEIKKAS  
 A71: LDDGVFPAPFTGGGSDTDFILSLKSVVGGSLAVVYQWQDRHFFFTTGGGTHLEIKKAS  
 A75: LDDGVFPAPFTGGGSDTDFILSLKSVVGGSLAVVYQWQDRHFFFTTGGGTHLEIKKAS  
 B109: RYTGVPFAPFTGGGSDTDFILSLKSVVGGSLAVVYQWQDRHFFFTTGGGTHLEIKKAS  
 B28: LAGVPSERFEGGSDTDFILSLKSVVGGSLAVVYQWQDRHFFFTTGGGTHLEIKKAS  
 C45: LAGVPSERFEGGSDTDFILSLKSVVGGSLAVVYQWQDRHFFFTTGGGTHLEIKKAS  
 E16: RYTGVPFAPFTGGGSDTDFILSLKSVVGGSLAVVYQWQDRHFFFTTGGGTHLEIKKAS  
 E21: LAGVPSERFEGGSDTDFILSLKSVVGGSLAVVYQWQDRHFFFTTGGGTHLEIKKAS

Fig. 11

BBPBBBBAHHB VB

A105: QVQLQSGAEIMKPKASVYKISCKATGYTENVYKIQWVQKQKH-----GLEWIGILPGSGST  
 A39: QVQLQSGAEIMKPKASVYKISCKATGYTENVYKIQWVQKQKH-----GLEWIGILPGSGST  
 A44: QVQLQSGAEIMKPKASVYKISCKATGYTENVYKIQWVQKQKH-----GLEWIGILPGSGST  
 A71: QVQLQSGAEIMKPKASVYKISCKATGYTENVYKIQWVQKQKH-----GLEWIGILPGSGST  
 A75: QVQLQSGAEIMKPKASVYKISCKATGYTENVYKIQWVQKQKH-----GLEWIGILPGSGST  
 B109: QVQLQSGAEIMKPKASVYKISCKATGYTENVYKIQWVQKQKH-----GLEWIGILPGSGST  
 B28: QVQLQSGAEIMKPKASVYKISCKATGYTENVYKIQWVQKQKH-----GLEWIGILPGSGST  
 C45: QVQLQSGAEIMKPKASVYKISCKATGYTENVYKIQWVQKQKH-----GLEWIGILPGSGST  
 E16: QVQLQSGAEIMKPKASVYKISCKATGYTENVYKIQWVQKQKH-----GLEWIGILPGSGST  
 E21: QVQLQSGAEIMKPKASVYKISCKATGYTENVYKIQWVQKQKH-----GLEWIGILPGSGST

A105: NYNENYKATFTADSTSTAYVQLESLDSDGKTYLWLLQHPQQSPQALSLVSEK  
 A39: NYNENYKATFTADSTSTAYVQLESLDSDGKTYLWLLQHPQQSPQALSLVSEK  
 A44: NYNENYKATFTADSTSTAYVQLESLDSDGKTYLWLLQHPQQSPQALSLVSEK  
 A71: NYNENYKATFTADSTSTAYVQLESLDSDGKTYLWLLQHPQQSPQALSLVSEK  
 A75: NYNENYKATFTADSTSTAYVQLESLDSDGKTYLWLLQHPQQSPQALSLVSEK  
 B109: NYNENYKATFTADSTSTAYVQLESLDSDGKTYLWLLQHPQQSPQALSLVSEK  
 B28: NYNENYKATFTADSTSTAYVQLESLDSDGKTYLWLLQHPQQSPQALSLVSEK  
 C45: NYNENYKATFTADSTSTAYVQLESLDSDGKTYLWLLQHPQQSPQALSLVSEK  
 E16: NYNENYKATFTADSTSTAYVQLESLDSDGKTYLWLLQHPQQSPQALSLVSEK  
 E21: NYNENYKATFTADSTSTAYVQLESLDSDGKTYLWLLQHPQQSPQALSLVSEK

Fig. 12



## Вирівнювання LC A44 з vk1:

A44: DIKMTQSPFS MYASLGERVT ITCKASQBIN SYLWLLQKPF GKSPKTLIYR  
 VK1: DIKMTQSPFS LSASVGERVT ITCKASQBIIS SYLWYQKPF GKAPKLLIYA  
 A44: ANRSVGVPS RFSGSGSQD YSLTISSELEY EDMGIYYCLQ YDEFPPTFGG  
 VK1: ASSELQSGVPS RFSGSGSGTD PTLTISSLQF EDLATYYCQQ SYSTFPPTFGG  
 A44: GTKLEIK  
 VK1: GKEVEIK

## Вирівнювання LC A44 з v-ламбда-3:

A44: DIKMTQSPFS MYASLGERVT ITCKASQBIN SYLWLLQKPF GKSPKTLIYR  
 VL3: ~SYELTQPPS V3VEPQQTAS ITXSGDKLSD MYASWYQKPF GQSPVLVIYQ  
 A44: ANRSVGVPS RFSGSGSQD YSLTISSELEY EDMGIYYCLQ YDEFPPTFGG  
 VL3: DSKRPSGIFE RFSGSGSGNT ATLFIISGTQA MDEADYYXQA WDSSAVVFGG  
 A44: GTKLEIK  
 VL3: GTKLTVL

Фиг. 13

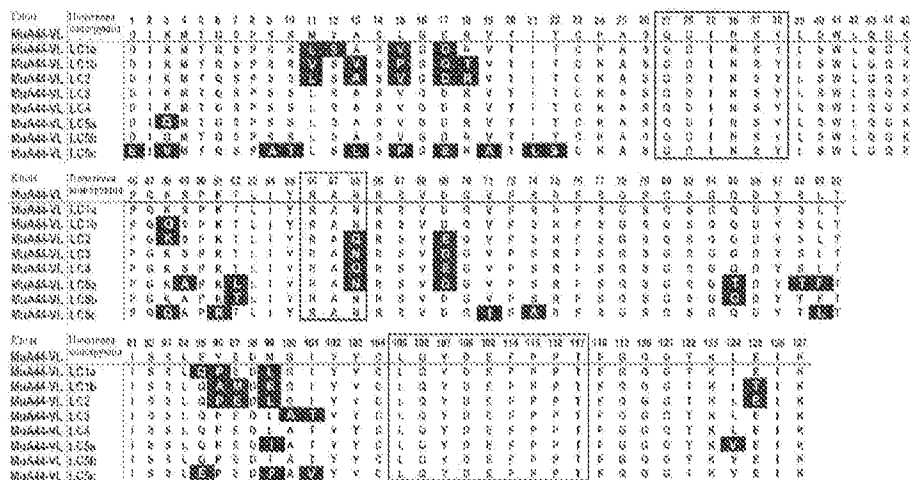
## Вирівнювання HC A44 з vk2:

A44: EMQLQESGFS LVRPSQTLSL TCSVTGDSMT ~NGYWNWIR KPPGNKLEYM  
 VH2: QVTLESGPT LVRPTQTITL TCTPSGFSLS TSGVGVGWIR QPPGKALEWL  
 A44: GYITYSGSTY FNPGLKGRIS ITNNTSKNQY YLQLSSVTE DTATYYCARN  
 VH2: ARIDWDDWY YSTSLKRLT LSKDTSENQV VLTMTNMDPV DTATYYCARN  
 A44: HYGPYYFDY WQQTTLTVSS  
 VH2: GFTG~TYFDY WQQTTLTVSS

## Вирівнювання HC A44 з vk4:

A44: EMQLQESGFS LVRPSQTLSL TXSVTGDSMT NGYWNWIRF PGNKLEYMGY  
 VH4: QVQLQESGPG LVRPSETLSL TXFVDSGSIS SYYNWIRQF PGKGLEWIGY  
 A44: IYISGSSTYN PSLKGRIBIT RNTSKNQYIL QLSSVTEDT ATYYXARWHY  
 VH4: IYYSGSTYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYXARGDS  
 A44: GSPYYFDYWG QQTTLTVSS  
 VH4: SG~YYFDYWG QQTTLTVSS

Фиг. 14



Фиг. 15

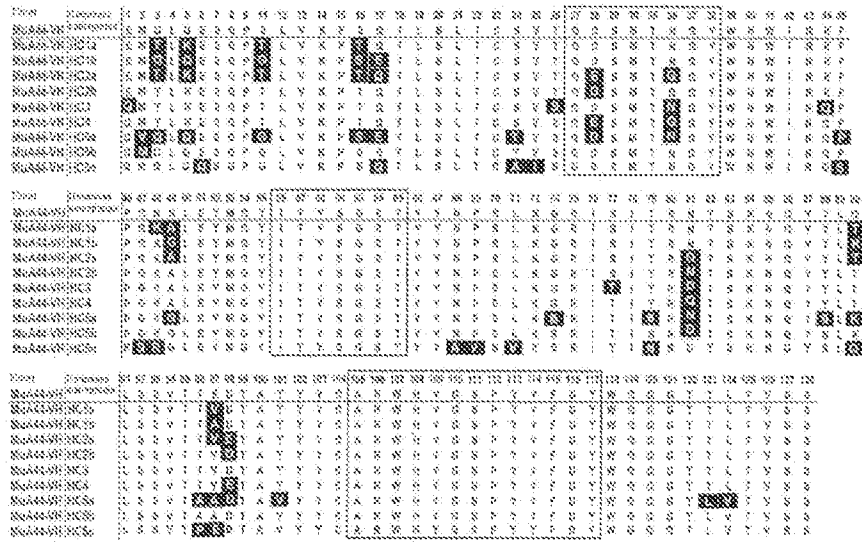
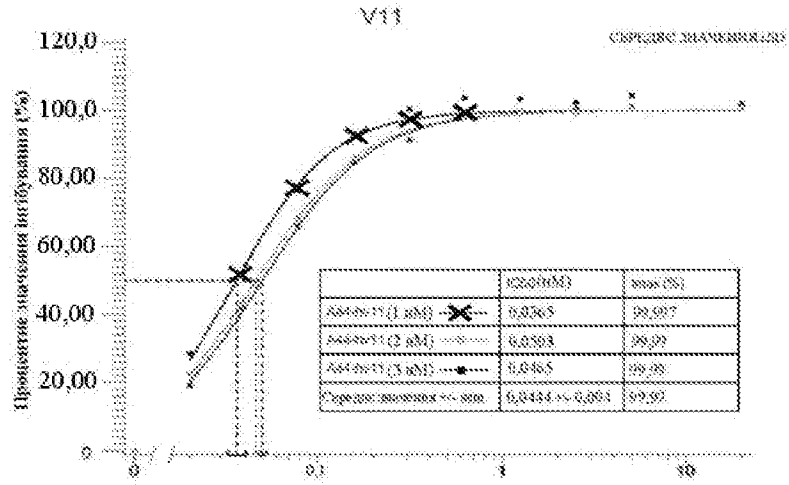
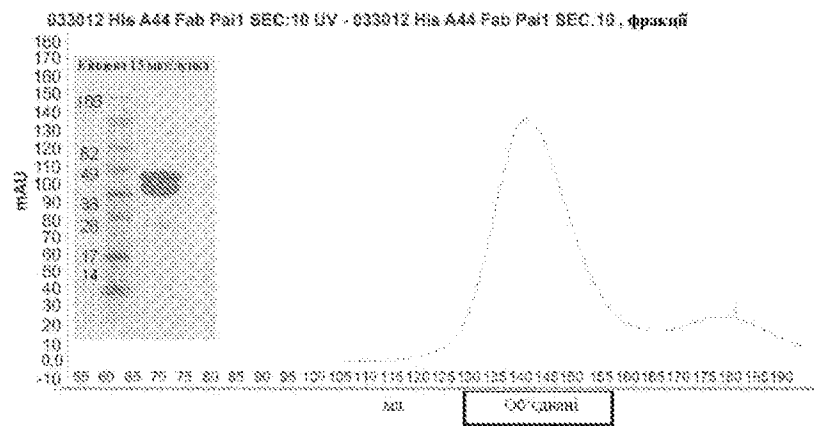


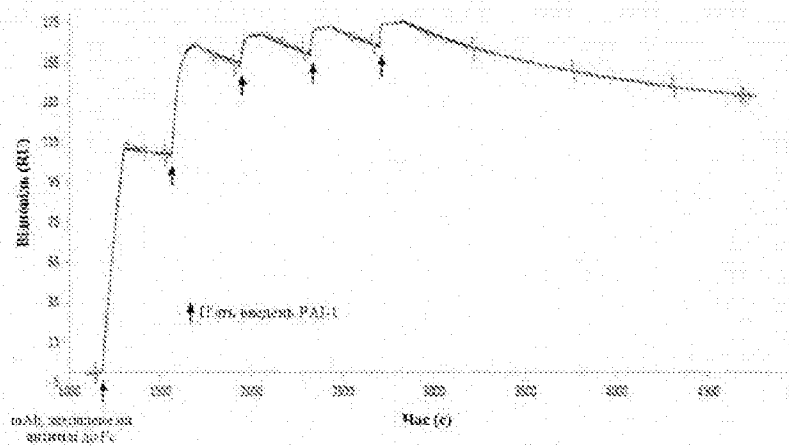
Fig. 18



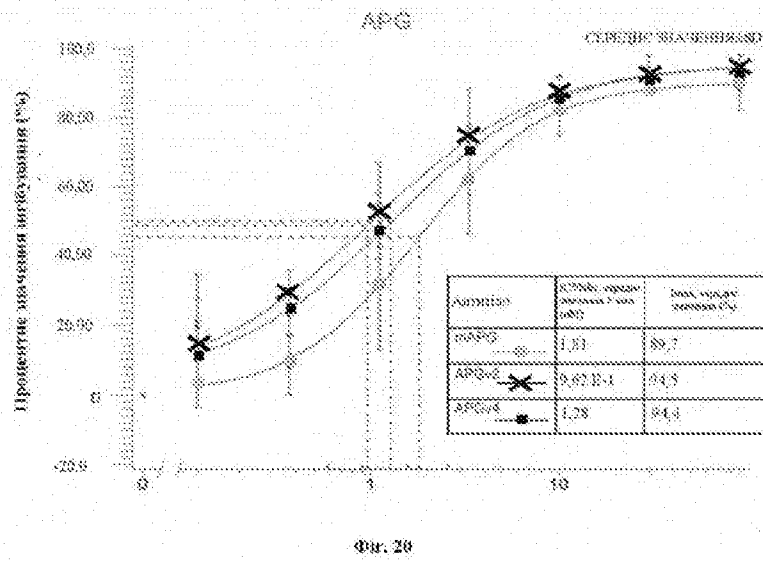
Apr. 17



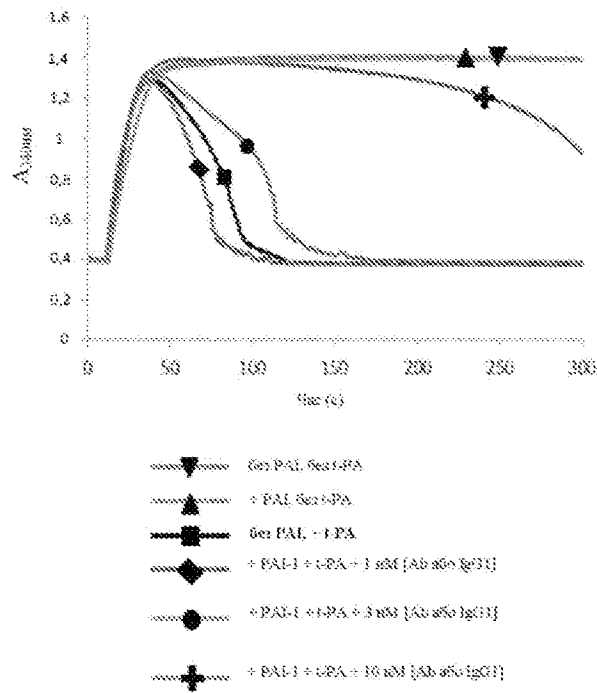
Φῖρ. 18



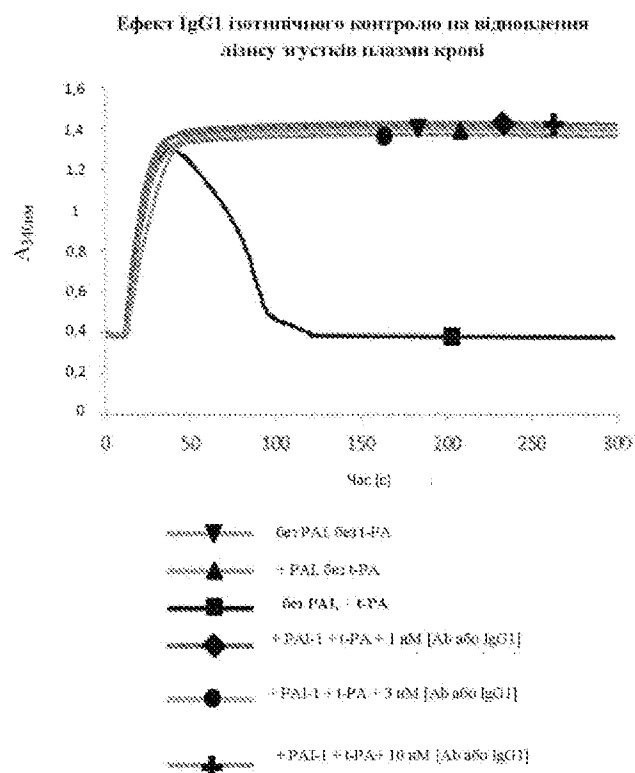
Φῖρ. 19



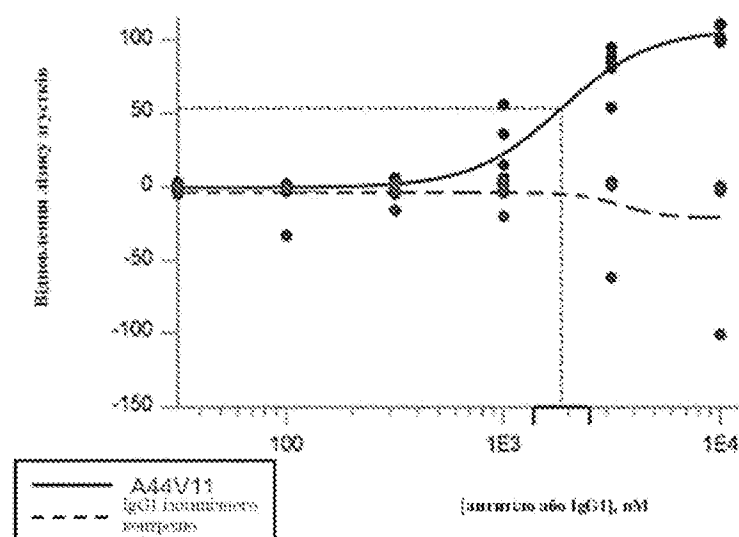
Ефект антибіотика А44У11 до ПАІ на відновлення лізису у сироватці плазми крові



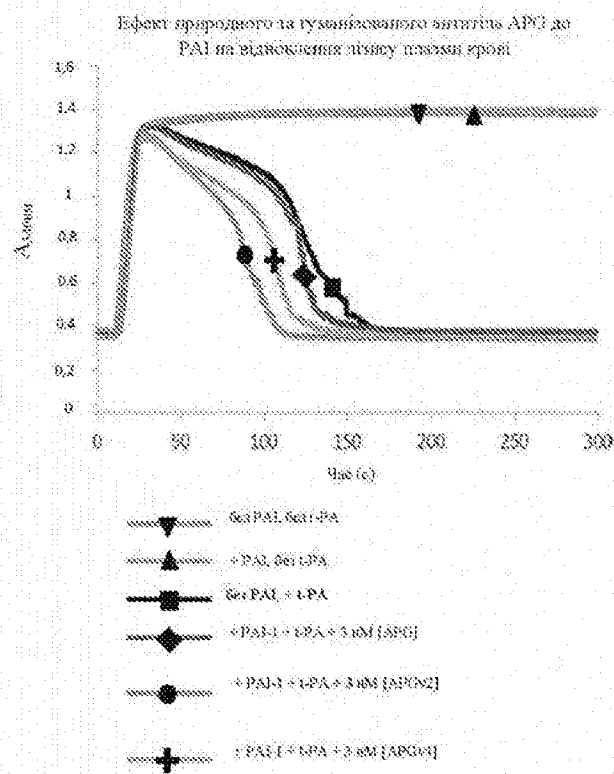
Фиг. 21



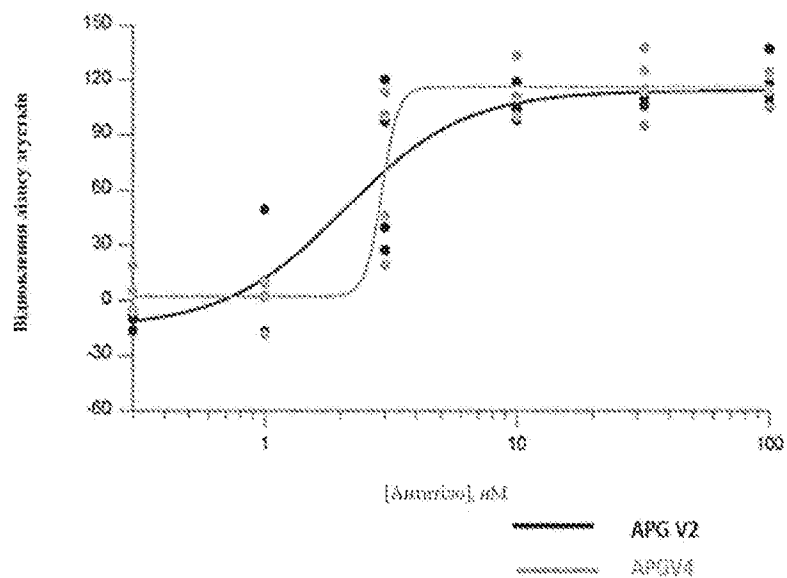
Фиг. 22



Фиг. 23



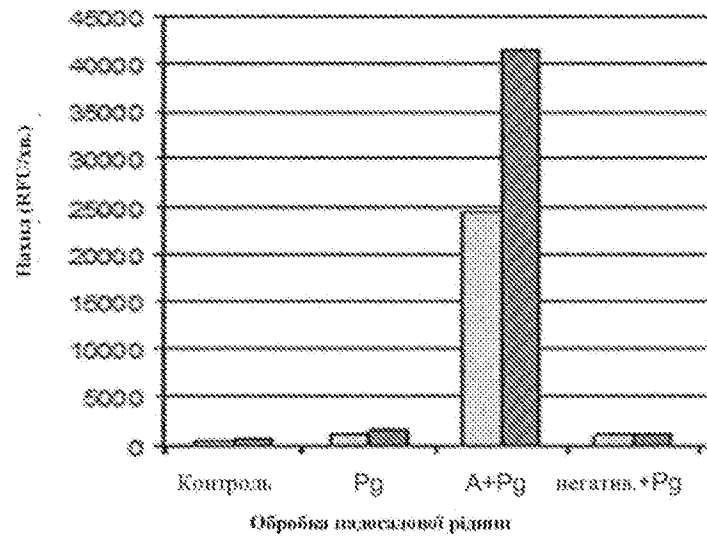
Фиг. 24



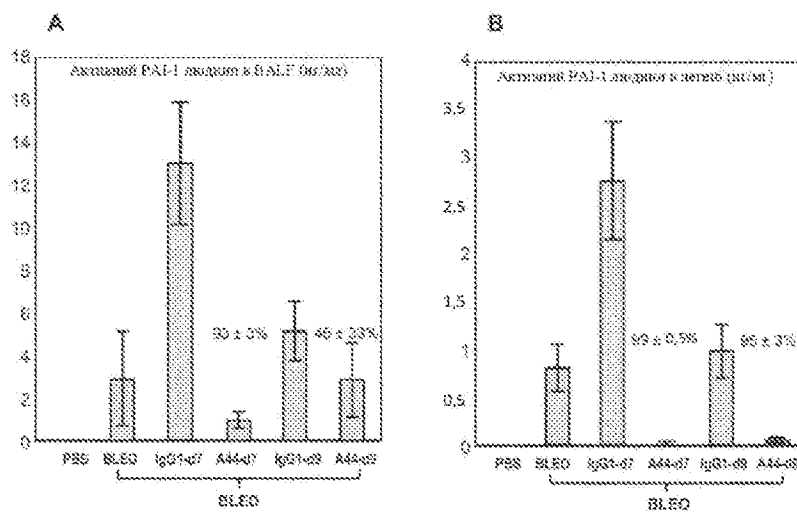
Фиг. 25



Фиг. 26

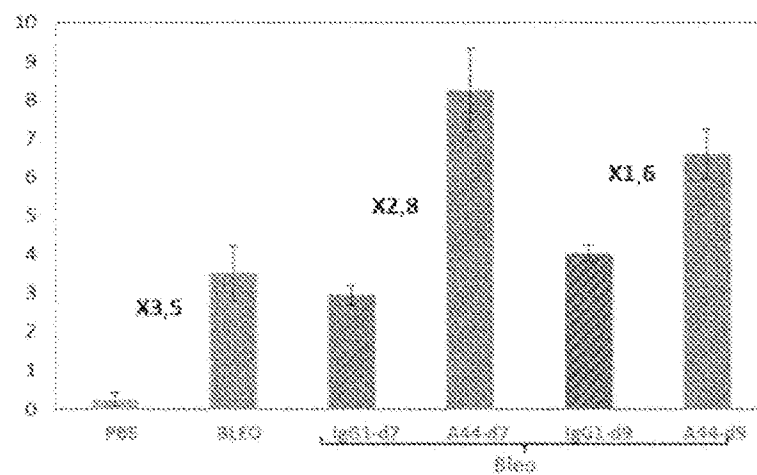


Фиг. 27



Фиг. 28

В-антитела в BALF



Фиг. 29



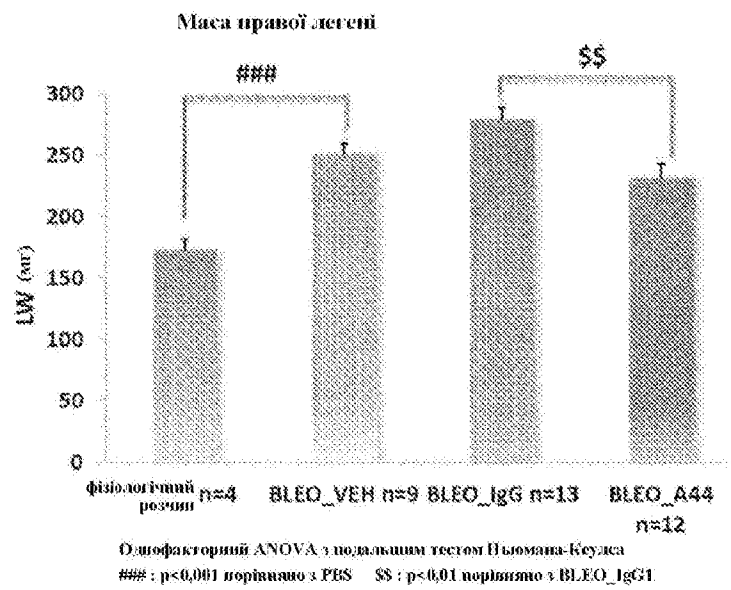


Fig. 30

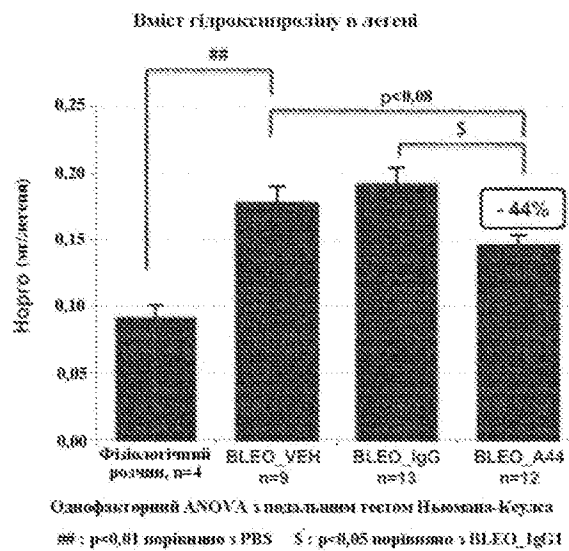
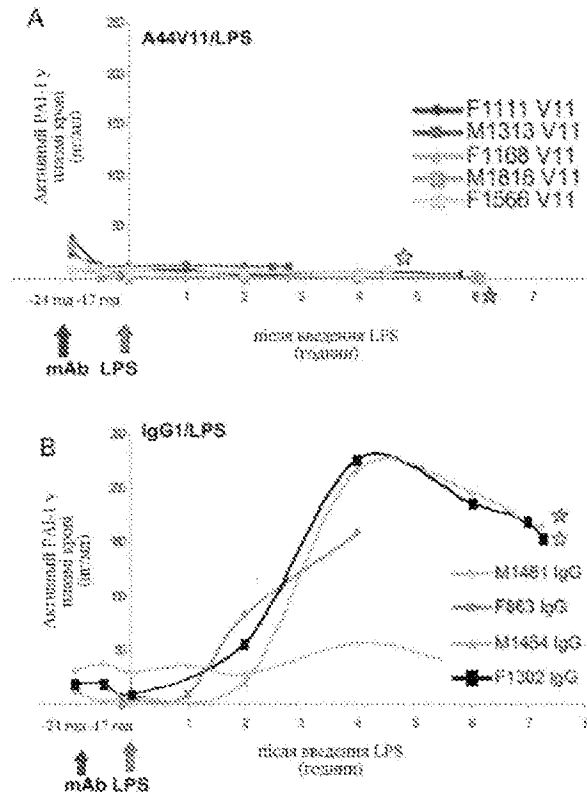
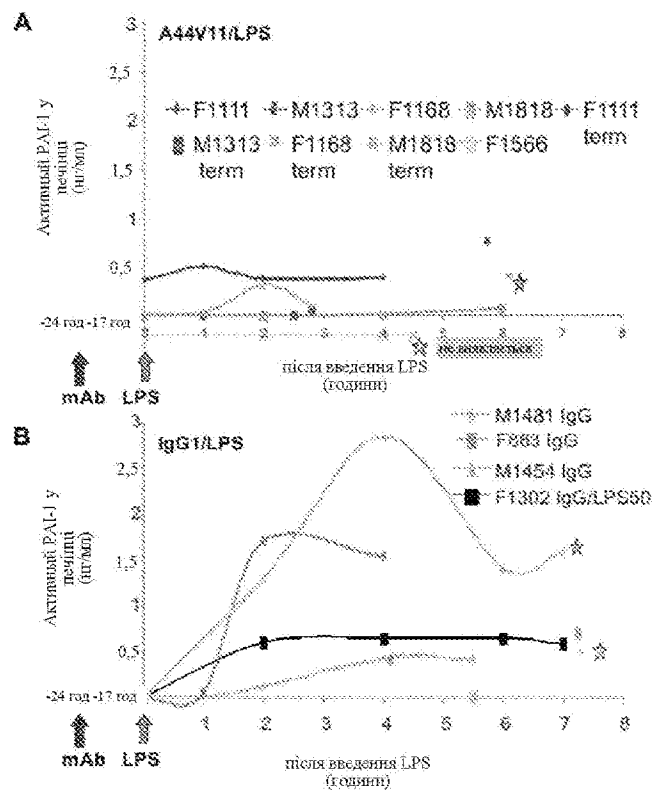


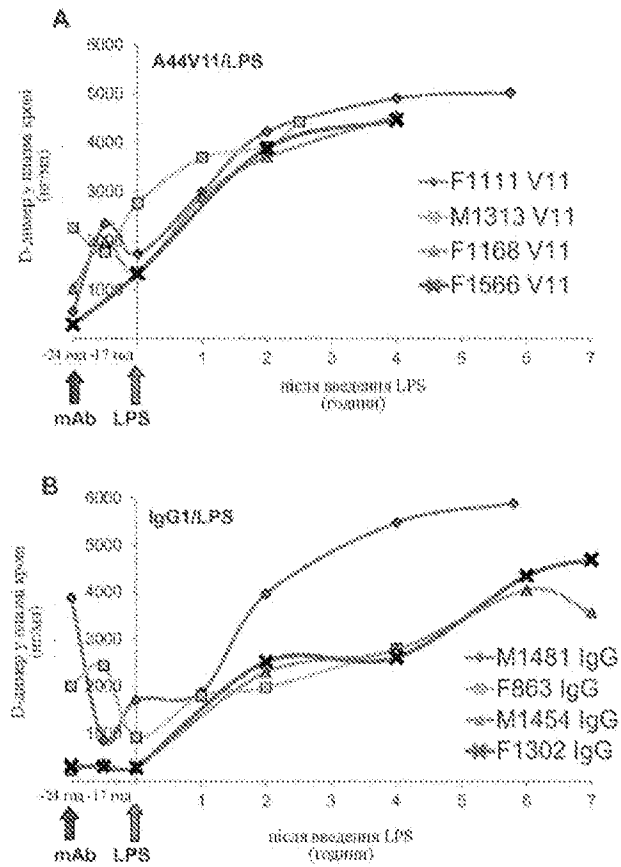
Fig. 31



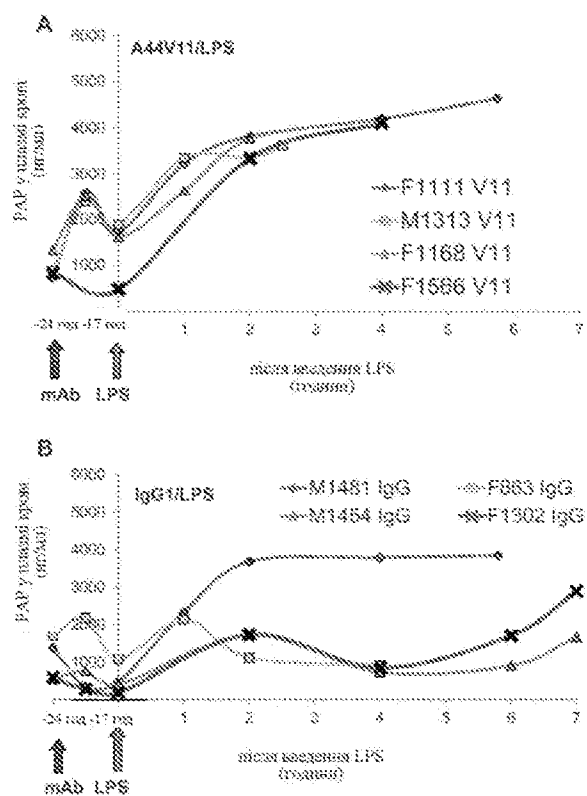
Фіг. 32



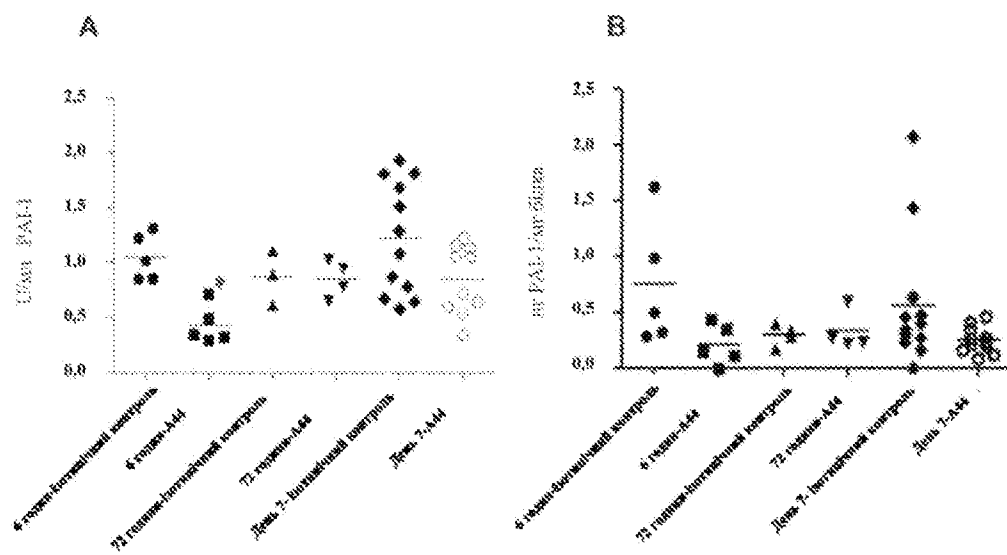
Фіг. 33



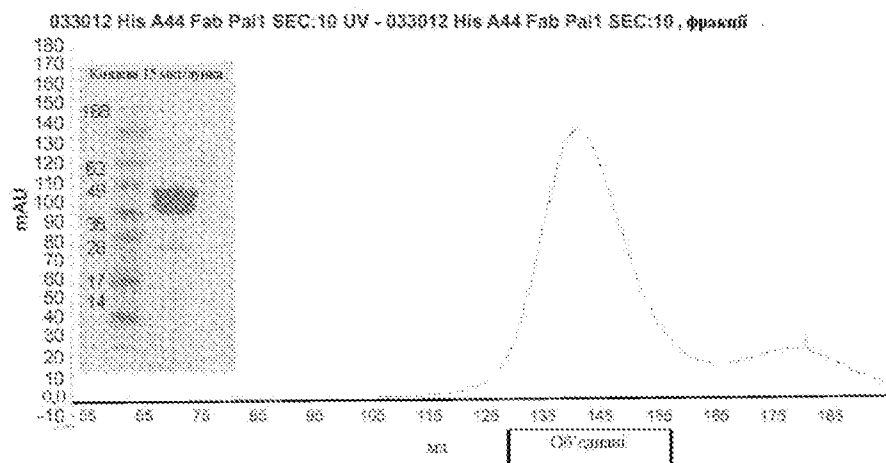
Фиг. 34



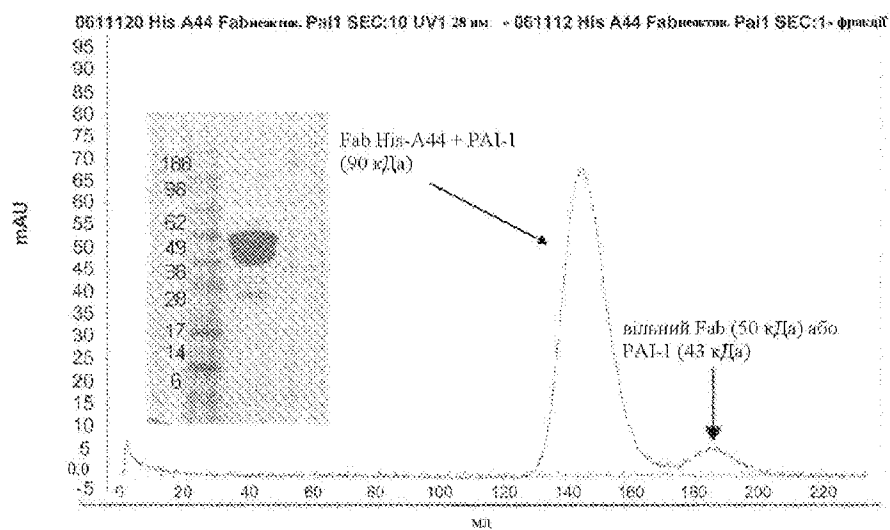
Фиг. 35



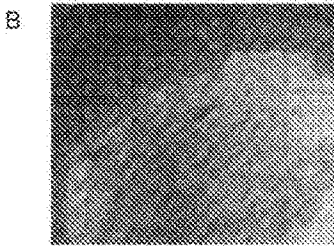
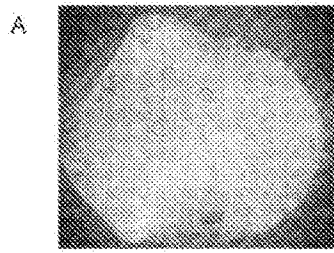
Фиг. 36



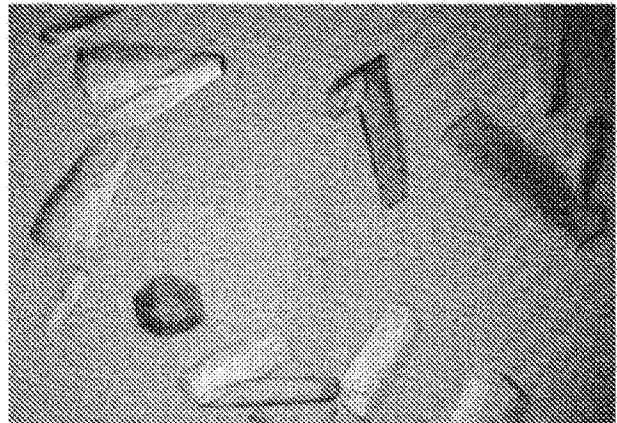
Фиг. 37



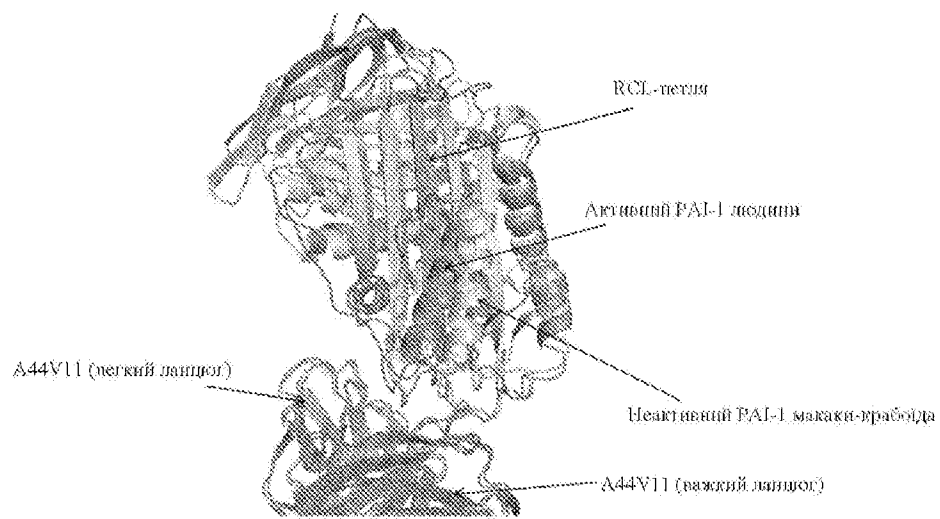
Фиг. 38



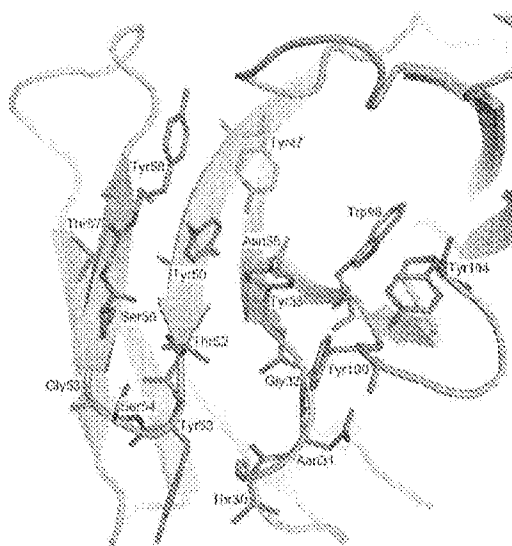
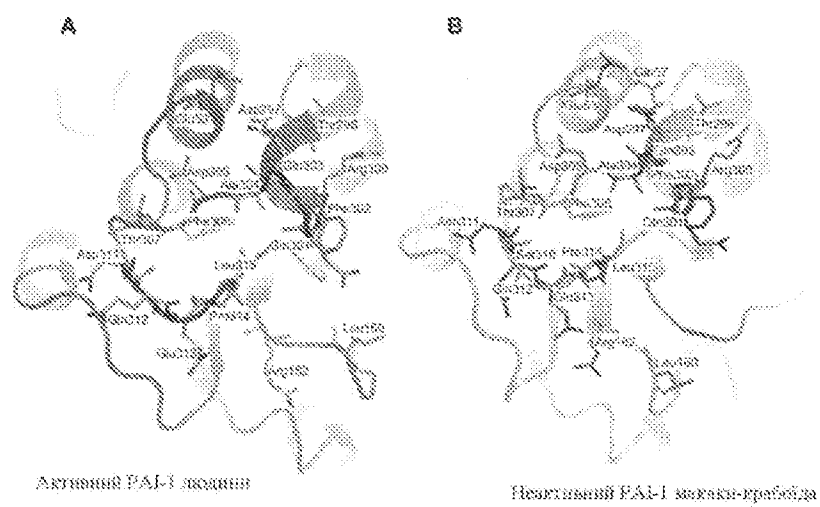
Фиг. 39



Фиг. 40



Фиг. 41



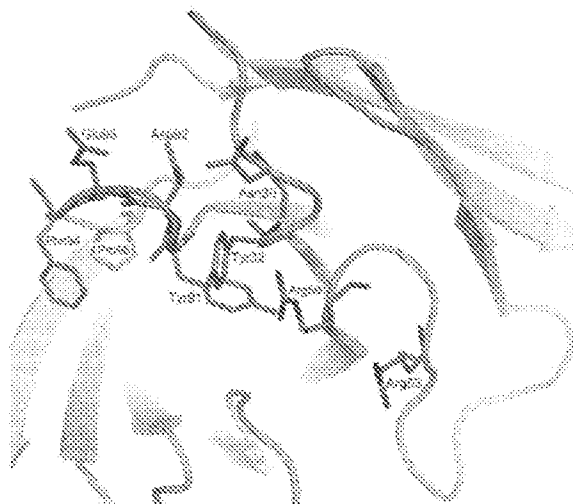


Fig. 44

|                      |                                         |
|----------------------|-----------------------------------------|
| PAI-1 макаки-крабёда | TTGGETRCQIQ                             |
| PAI-1 люднн          | TTGGETQCQIQ                             |
| PAI-1 шура           | TTACKTRCQIQ                             |
| PAI-1 мнн            | TTACKTRRQIQ                             |
| PAI-1 макаки-крабёда | GAVDQLTRVLVNA                           |
| PAI-1 люднн          | GAVDQLTRVLVNA                           |
| PAI-1 шура           | GAVNELTRVLVNA                           |
| PAI-1 мнн            | GAVNELTRVLVNA                           |
| PAI-1 макаки-крабёда | PLENLGMIDMFQGFQADFTSLSDQEFLEVAQALQKVKTE |
| PAI-1 люднн          | PLENLGMIDMFQGFQADFTSLSDQEFLEVALALQKVKTE |
| PAI-1 шура           | PLEKLGMIDMFSTQADFTSLSDQEQLEVAQALQKVKTE  |
| PAI-1 мнн            | PLEKLGMIDMFSATLADFTSLSDQEQLEVAQALQKVKTE |

Fig. 45

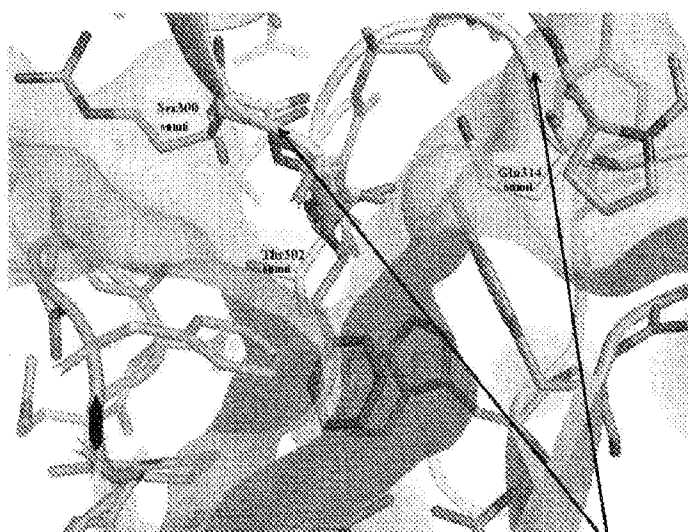
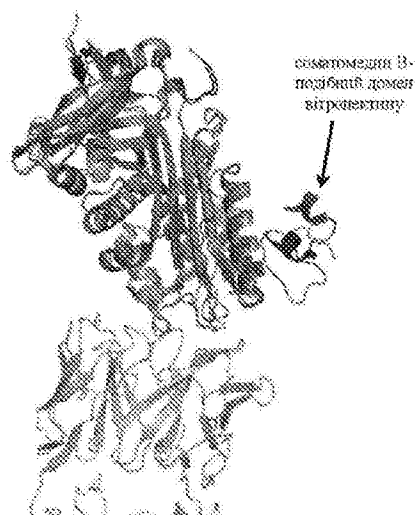
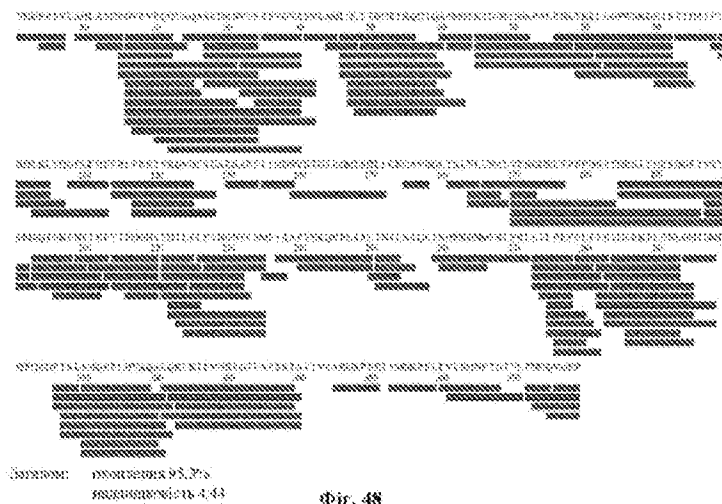


Fig. 46

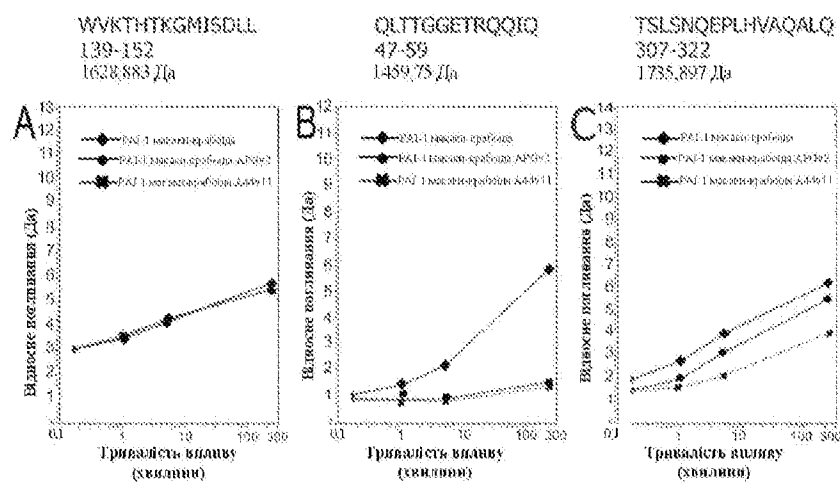




Фиг. 47



Фиг. 48



Фиг. 49

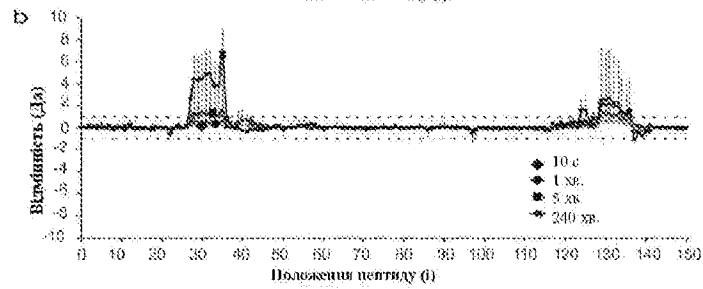
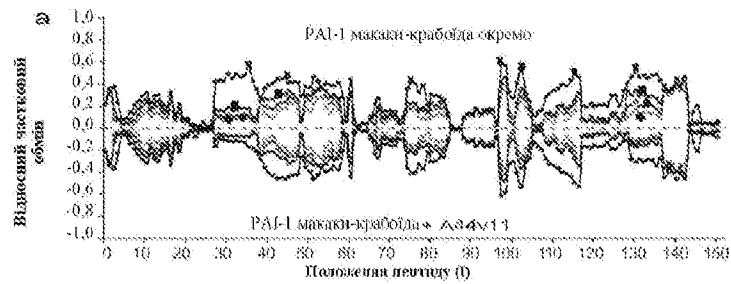


Fig. 50

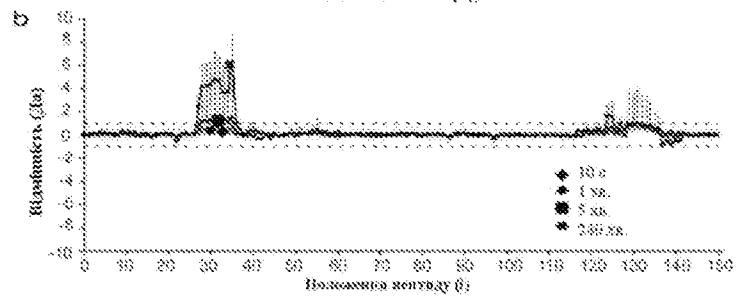
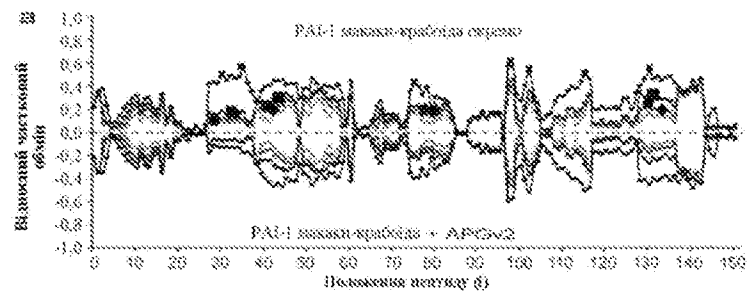
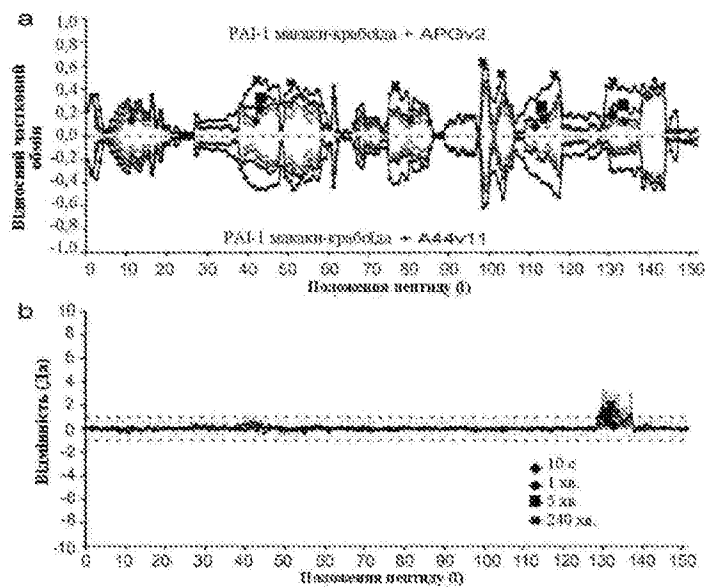


Fig. 51



Фиг. 52

```

VHPPPSYVAH LASDFGVHVF QQVAGASKDR NVVFSPYQVA SVIAMLQLTT
GGSTPQQQA ANGFNIDKQK KAPALNHLIK ELLCPWNKDE ISTTDAIFVQ
NDKLVGGFM PHFFLEFST VKQVCFSSAB KAKTINDGV STTPKEMISS
LLKCAVDO ILYLVNIALY FNGFNKTPPP DSETHRLFR KSDGSTVSVP
SMAQTNRPNY TEFTTFDCHY VOILELPYHC NTLQWFIAAP YEKQVPLSAL
TNILSAQLIS EHKQNTPLP RLLVLPKFSL ETEVDLRKPL ENLQVDSHF
QFQALFTSLN NOEPDAVACA LQVKIEVNE SGTVASSSTA VIVSARNAPE
EILNDRAFLF VVGNPTGTV LFMQVMSP

```

ЖИРНИЙ ШРИФТ == eniron та HX-MS  
 ПУСТИЙ ШРИФТ == eniron за рентгеноструктурним аналізом

Фиг. 53

---

 Комп'ютерна верстка М. Мацело
 

---

 Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна
 

---

 ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601
 

---