



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

C07K 16/24 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012122203/10, 28.10.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
28.10.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
30.10.2009 US 61/256,521

(43) Дата публикации заявки: 10.12.2013 Бюл. № 34

(45) Опубликовано: 20.11.2015 Бюл. № 32

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 2002/192212 A1, 19.12.2002. EP 1806145 A1, 11.07.2007. YOSHIKAWA MAMORU et al., "TNF-alpha and IL-4 regulate expression of fractalkine (CX3CL1) as a membrane-anchored proadhesive protein and soluble chemotactic peptide on human fibroblasts", FEBS letters (2004); 561: 105-110. WO 97/42224 A1, 13.11.1997. WO 01/60406 A1, 23.08.2001. WO 2008/021263 (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 30.05.2012

(86) Заявка РСТ:
JP 2010/069653 (28.10.2010)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2011/052799 (05.05.2011)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,
 ООО "Юридическая фирма Городисский и
 Партнеры"

(72) Автор(ы):

НИСИМУРА Миюки (JP),
 САКАМОТО Йосимаса (JP),
 КАВАНО Тецу (JP),
 ИМАИ Тосио (JP)

(73) Патентообладатель(и):

ЭЙСАЙ Ар ЭНД Ди МЕНЕДЖМЕНТ КО.,
 ЛТД. (JP)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к области иммунологии. Предложено антитело против фракталкина (ФКН, CX3CL1) и его фракталкин-связывающий фрагмент, охарактеризованные последовательностями варьируемых доменов. Рассмотрено применение данного антитела и фрагмента для лечения воспалительного нарушения и для получения лекарственного

средства, фармацевтическая композиция и способ лечения воспалительного нарушения, где указанное нарушение представляет собой язвенный колит, болезнь Крона или ревматоидный артрит. Кроме того, рассмотрены: кодирующая нуклеиновая кислота, вектор, клетка-хозяин и способ получения антитела по изобретению или его фрагмента. Антитело по

настоящему изобретению и его фрагмент нейтрализуют связывание ФКН с CX3CR1, как показано в анализе хемотаксиса. Данное изобретение может найти дальнейшее применение

в терапии воспалительных заболеваний, опосредованных связыванием ФКН с рецептором CX3CR1. 9 н. и 19 з.п. ф-лы, 14 ил., 1 табл., 14 пр.

(56) (продолжение):

A2, 21.02.2008. UMEHARA HISANORI et al. "Fractalkine in vascular biology from basic research to clinical disease", Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology (2004); 24: 34-40. ГОЖЕНКО А. И. и др.

"Механизмы хемотаксиса лейкоцитов при воспалении", Актуальные проблемы транспортной медицины (2006), 3(5):56-63.

R U 2 5 6 9 1 0 9 C 2

R U 2 5 6 9 1 0 9 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 569 109** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

C07K 16/24 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2012122203/10, 28.10.2010

(24) Effective date for property rights:
28.10.2010

Priority:

(30) Convention priority:
30.10.2009 US 61/256,521

(43) Application published: 10.12.2013 Bull. № 34

(45) Date of publication: 20.11.2015 Bull. № 32

(85) Commencement of national phase: 30.05.2012

(86) PCT application:
JP 2010/069653 (28.10.2010)

(87) PCT publication:
WO 2011/052799 (05.05.2011)

Mail address:

129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, stroenie 3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

**NISIMURA Mijuki (JP),
 SAKAMOTO Josimasa (JP),
 KAVANO Tetsu (JP),
 IMAI Tosio (JP)**

(73) Proprietor(s):

**EhJSAJ Ar EhND Di MENEDZhMENT KO.,
 LTD. (JP)**

(54) COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING INFLAMMATORY DISEASES

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: claimed are anti-fractalkine (FKN, CX3CL1) antibody and its fractalkine-binding fragment, characterised by sequences of variable domains. Application of claimed antibody and fragment for treatment of inflammatory disorder and for obtaining medication, pharmaceutical composition and method of treating inflammatory disorder, where said disorder represents ulcerous colitis, Crohn's disease or rheumatoid arthritis, is disclosed. In addition, coding

nucleic acid, vector, host-cell and method of obtaining antibody by invention or its fragment are described. Antibody in accordance with claimed invention and its fragment neutralise binding FKN with CX3CR1, as it is shown in chemotaxis analysis.

EFFECT: invention can be applied in therapy of inflammatory diseases, mediated by binding of FKN with CX3CR1 receptor.

28 cl, 14 dwg, 1 tbl, 14 ex

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к композициям и способам, относящимся к антителам, которые связывают фракталкин.

Уровень техники

5 Фракталкин (ФКН) представляет собой трансмембранный хемокин, который экспрессируется на поверхности активированных эндотелиальных клеток и связывается с рецептором CX3CR1. Связывание ФКН, связанного с мембраной, с CX3CR1, связанным с мембраной, опосредует сильную адгезию клетка-клетка без участия селектинов или интегринов. Секретированный ФКН, который отделяется от связанного с мембраной
10 ФКН, также связывается с CX3CR1 и индуцирует активацию интегрина и клеточного хемотаксиса.

Экспрессия ФКН индуцируется на поверхности эндотелиальных клеток провоспалительными цитокинами. Усиленная экспрессия ФКН и накопление
15 цитостатических эффекторных лимфоцитов CX3CR1⁺ и макрофагов отмечались у субъектов с многочисленными нарушениями, включая воспалительные и аутоиммунные нарушения, в том числе язвенный колит (ЯК), болезнь Крона (БК), ревматоидный артрит (РА), аутоиммунный гепатит (АИГ), рассеянный склероз (РС) и сахарный диабет. Umehara et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24:34-40 (2004) описывает роль ФКН при атеросклерозе и поражении сосудов. Nishimura et al., *Ann. NY Acad. Sci.* 1173:350-356
20 (2009) рассматривает ФКН в качестве потенциальной терапевтической мишени при воспалительных заболеваниях кишечника, таких как ЯК и БК.

Антитела и ФКН-связывающие фрагменты антител являются желательными терапевтическими агентами в силу своей специфичности. Антитела и ФКН-связывающие
25 фрагменты можно использовать для направленного воздействия на специфические клетки или ткани, минимизируя таким образом потенциальные побочные эффекты в случае неспецифического направленного воздействия. Существует потребность в идентификации и характеристике терапевтических антител, которые можно использовать для лечения воспалительных нарушений, включая описанные здесь нарушения.

Краткое описание изобретения

30 В первом аспекте изобретение относится к анти-ФКН антителу или его ФКН-связывающему фрагменту, где указанное антитело или его фрагмент содержит шесть CDR, выбранных из:

- (a) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28;
- (b) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29;
- 35 (c) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30;
- (d) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31;
- (e) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32; и
- (f) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33.

Антитело может представлять собой интактное антитело. В одном из примеров
40 антитело представляет собой гуманизированное антитело. Варибельный домен тяжелой цепи гуманизированного антитела может включать аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:42 или SEQ ID NO:43, а варибельный домен легкой цепи гуманизированного антитела может включать аминокислотную последовательность SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:44 или SEQ ID NO:45.

45 В одном из примеров антитело представляет собой антитело против фракталкина или его ФКН-связывающего фрагмента, где указанное антитело или его фрагмент содержит тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:37 и легкую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:44.

Антитело также может представлять собой химерное антитело. В одном из примеров переменный домен тяжелой цепи химерного антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:26, а переменный домен легкой цепи химерного антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27.

5 Также рассматриваются ФКН-связывающие фрагменты антитела. ФКН-связывающий фрагмент может представлять собой Fab, Fab', F(ab')₂ или Fv фрагмент, который сохраняет специфичность связывания с ФКН.

В некоторых примерах, когда указанное антитело или его ФКН-связывающий фрагмент содержат человеческий константный участок, такой константный участок является IgG изотипом (например, IgG2 изотипом). В других примерах указанное антитело или его ФКН-связывающий фрагмент содержит мутированный Fc участок, такой, что указанное антитело обладает пониженной способностью к активации ADCC и/или комплемента по сравнению с Fc участком, у которого такая мутация отсутствует. Например, Fc участок может быть мутирован по одному или более кислотным остаткам из следующих: V234, G237, C131 или C219.

Желательно, чтобы антитело или ФКН-связывающий фрагмент существенно уменьшал или ингибировал связывание ФКН со своим рецептором, CX3CR1, по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более, или существенно ингибировал нейтрализованный hФКН при оценке хемотаксиса, как раскрыто в настоящем описании.

Изобретение также относится к фармацевтической композиции, которая содержит антитело или его ФКН-связывающий фрагмент по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит один или несколько описанных ниже дополнительных терапевтических агентов.

25 Также рассматривается нуклеиновая кислота, кодирующая описанное выше антитело или ФКН-связывающий фрагмент. В одном из вариантов осуществления нуклеиновая кислота кодирует всю или часть тяжелой цепи антитела или его ФКН-связывающий фрагмент. В другом варианте осуществления нуклеиновая кислота кодирует всю или часть легкой цепи антитела или его ФКН-связывающий фрагмент. Нуклеиновая кислота может находиться в векторе (например, векторе экспрессии).

Изобретение также относится к клетке хозяину, которая содержит один или несколько векторов по изобретению. В одном из примеров клетка хозяин содержит два вектора, из которых первый вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь, а второй вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь описанного здесь антитела или его ФКН-связывающего фрагмента. Экспрессия тяжелой цепи и легкой цепи в клетке хозяине продуцирует антитело или ФКН-связывающий фрагмент. В одном из вариантов осуществления клетка хозяин является прокариотической. В другом варианте осуществления клетка хозяин является эукариотической. Иллюстративные клетки млекопитающих, которые можно использовать для продуцирования антител и ФКН-связывающих фрагментов, представляют собой клетки CHO и клетки NS0.

Изобретение также относится к способу получения анти-ФКН антитела или его ФКН-связывающего фрагмента. Способ включает: (а) экспрессию вектора по изобретению в подходящей клетке хозяине и (b) выделение антитела. Антитело или ФКН-связывающий фрагмент может секретироваться клеткой хозяином в культуральную среду. В одном из примеров антитело или его ФКН-связывающий фрагмент очищают до по меньшей мере 95% или более чистоты от веществ, не относящихся к антителу.

Также рассматриваются способы лечения воспалительных нарушений путем введения эффективного количества анти-ФКН антитела или ФКН-связывающего фрагмента по изобретению. Иллюстративные воспалительные нарушения представляют собой воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона и язвенный колит. В случае

5 этих нарушений способ также может включать введение одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов. Иллюстративные терапевтические агенты представляют собой опиаты, 5-аминосалициловую кислоту, 6-меркаптопурин, азатиоприн, глюкокортикоиды, метотрексат, циклоспорин и метронидазол. Другие подходящие терапевтические агенты описаны ниже.

10 Воспалительные нарушения, которые могут быть излечены введением эффективного количества анти-ФКН антитела или ФКН-связывающего фрагмента по изобретению, также включают аутоиммунные болезни печени и желчных путей (например, аутоиммунный гепатит, первичный желчный цирроз печени или первичный склерозирующий холангит). В случае этих нарушений способ может также включать

15 введение 6-меркаптопурина, урсодезоксихолевую кислоту, азатиоприн, глюкокортикоид, тиазидный диуретик, антиальдостероновый диуретик, циклоспорин, альбумин или спиронолактон.

Ревматоидный артрит (РА) также можно лечить путем введения эффективного количества анти-ФКН антитела или ФКН-связывающего фрагмента по изобретению.

20 При лечении РА способ может также включать введение нестероидного противовоспалительного лекарственного средства (НПВС), метотрексата, лефлуномида, буцилламина, 5-аминосалициловой кислоты, глюкокортикоида, гидрохлорохина, витамина D, кальция или алендроната.

Системную красную волчанку (например, волчанку с поражением центральной

25 нервной системы или волчаночный нефрит) также можно лечить введением эффективного количества анти-ФКН антитела или ФКН-связывающего фрагмента, отдельно или в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами. Иллюстративные дополнительные терапевтические агенты представляют собой глюкокортикоиды, циклофосфамид, метотрексат, циклоспорин и

30 такролимус.

Рассеянный склероз и нейромиеелит зрительного нерва также можно лечить введением эффективного количества анти-ФКН антитела или ФКН-связывающего фрагмента. Лечение также может включать введение одного или более дополнительных

35 терапевтических агентов, таких как глюкокортикоид, интерферон-Р или Копаксон®.

Демиелинизирующую полирадикулопатию (например, синдром Гийена-Барре или хроническую воспалительную демиелинизирующую полирадикулопатию) также можно

40 лечить введением эффективного количества анти-ФКН антитела или ФКН-связывающего фрагмента. И в этом случае, также рассматривается комбинированная терапия, и лечение также может включать введение одного или более дополнительных терапевтических агентов, таких как глюкокортикоид или внутривенный иммуноглобулин.

Введение эффективного количества анти-ФКН антитела или ФКН-связывающего фрагмента, отдельно или в комбинации с дополнительным терапевтическим агентом, также может быть полезным при лечении нейропатической боли. Иллюстративные

45 дополнительные агенты для лечения нейропатической боли представляют собой ламотригин, топирамат, окскарбазепин, леветирацетам, фентанил, трамадол, капсаицин, кларитин, НПВС, амитриптилин, прегабалин, лидокаин, дулоксетин и карбамазепин.

Болезнь Альцгеймера также можно лечить введением эффективного количества

анти-ФКН антитела или ФКН-связывающего фрагмента. Способ также может включать введение одного или более дополнительных терапевтических агентов, таких как такрин гидрохлорид, донепезила гидрохлорид, ривастигмина тартрат, галантамина гидробромид, мемантина гидрохлорид, пароксетин, рисперидон, кветиапин или пероспирон.

Ассоциированную с раком висцеральную боль также можно лечить введением эффективного количества анти-ФКН антитела или ФКН-связывающего фрагмента, отдельно или в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами, такими как морфий, НПВС, фентанил, лидокаин, пентазоцин или клонидин.

Атеросклероз также можно лечить введением эффективного количества анти-ФКН антитела или ФКН-связывающего фрагмента. Способ также может включать введение одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов, таких как простациклин, аспирин, клопидогрель, тиклопидин, лимапрост, простагландин Е1, ингибитор НМГ СоА редуктазы, безафибрат, лидокаин, мексилетин, диуретик, дигиталис, допамин, агонист β -адренергический рецептор, изосорбида динитрат, нитроглицерин, натрийуретический пептид, варфарин, гепарин, активатор плазминогена тканевого типа, урокиназа или прокаинамид.

Васкулопатию (например, возрастную мышечную дегенерацию, болезнь Бехчета, болезнь Гарада и саркаидозный увеит) также можно лечить введением эффективного количества анти-ФКН антитела или ФКН-связывающего фрагмента по изобретению. Способ также может включать введение одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов, выбранных из глюкокортикоидов, циклофосфамида, пегаптаниба, ранибизумаба, НПВС, колхицина, хлорамбуцила, талидомида и вертепорфина.

Нефропатии (например, волчаночный нефрит, гломерулонефрит или диабетическую нефропатию) также можно лечить введением эффективного количества анти-ФКН антитела или ФКН-связывающего фрагмента по изобретению. Способы лечения также могут включать глюкокортикоиды, сульфонилмочевину, циклофосфамид, глиниды, циклоспорин, такролимус, микофенолата мофетил, мизорибин, диуретики, инсулин, бигуанид, ингибиторы α -глюкозидазы, блокаторы рецепторов ангиотензина, тиазолидиндион, ингибиторы ангиотензин-преобразующего фермента (АПФ), блокаторы кальциевых каналов или ингибиторы β -адренергических рецепторов; способы лечения также могут включать и ингибиторы адренергических рецепторов.

Изобретение также относится к применению анти-ФКН антитела или ФКН-связывающего фрагмента по изобретению при лечении любого из описанных здесь воспалительных нарушений.

Изобретение также относится к использованию анти-ФКН антитела или ФКН-связывающего фрагмента по изобретению для получения лекарственного препарата для лечения любого из описанных здесь воспалительных нарушений.

Изобретение также раскрывает способ ингибирования рекрутинга лейкоцитов в участке воспаления у субъекта путем введения эффективного количества анти-ФКН антитела или ФКН-связывающего фрагмента нуждающемуся в таком лечении субъекту, ингибируя таким образом рекрутинг лейкоцитов на участке воспаления.

С целью терапевтических применений также могут использоваться стратегии *ex vivo*. Стратегии *ex vivo* включают трансфекцию или трансдукцию полученных от субъекта клеток полинуклеотидом, кодирующим антитело или фрагмент антитела.

Трансфицированные или трансдуцированные клетки затем возвращают субъекту.

Клетки могут быть любыми из широкого диапазона типов клеток, включая, без ограничения, гемопоэтические клетки (например, клетки костного мозга, макрофаги, моноциты, дендритные клетки, Т-клетки или В-клетки), фибробласты, эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, кератиноциты или мышечные клетки.

5 В контексте настоящего изобретения используются сокращения и термины, определения которых приводятся ниже.

Термин “антитело” (используемый здесь взаимозаменяемо с термином “иммуноглобулин”) включает интактные моноклональные и поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты
 10 антитела, которые демонстрируют необходимую биологическую активность (например, способность связать ФКН и модулировать взаимодействие между ФКН и CX3CR1). “Интактные антитела” представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины примерно 150000 дальтон, состоящие из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Каждая легкая цепь связана с тяжелой цепью одной
 15 ковалентной дисульфидной связью, при этом количество дисульфидных связей в тяжелых цепях разных изотипов иммуноглобулинов различается. Каждая тяжелая и легкая цепь также имеет дисульфидные мостики, расположенные через регулярные интервалы. Каждая тяжелая цепь имеет на одном конце переменный домен (VH), за которым следует несколько константных доменов. Каждая легкая цепь имеет переменный
 20 домен на одном конце (VL) и константный домен на другом конце. Константный домен легкой цепи выровнен относительно первого константного домена тяжелой цепи, а переменный домен легкой цепи выровнен относительно переменного домена тяжелой цепи. Предполагается, что конкретные аминокислотные остатки формируют область контакта между переменными доменами легкой цепи и тяжелой цепи.

25 Существует пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них можно дополнительно подразделить на подклассы (изотипы), например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Антитело может быть частью большой слитой молекулы, образованной при помощи ковалентной или нековалентной связи антитела с одним или несколькими другими белками или пептидами. Антитело также
 30 может быть частью иммуноконъюгата, в котором антитело конъюгировано со второй молекулой (например, токсином, радиоизотопом или меткой).

Используемый здесь термин “моноклональное антитело” относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е., отдельные антитела идентичны друг другу за исключением возможных мутаций, которые могут
 35 присутствовать в незначительном количестве.

“Гуманизированные” формы нечеловеческих антител представляют собой антитела или их фрагменты, которые содержат каркасный участок (FR), имеющий по существу аминокислотную последовательность человеческого иммуноглобулина, и гиперпеременный участок (CDR), имеющий по существу аминокислотную
 40 последовательность нечеловеческого иммуноглобулина (т.е., “импортированную” последовательность). В некоторых случаях, остатки каркасного участка человеческого иммуноглобулина заменены соответствующими остатками, не характерными для человека. Для очистки антитела могут быть выполнены дополнительные модификации гуманизированного антитела.

45 “Гиперпеременный участок” или “CDR” означает одну из трех гиперпеременных последовательностей в переменных участках внутри каждой легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина.

“Каркасный участок” или “FR” означает последовательности аминокислот,

расположенные с каждой из сторон трех CDR легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина. FR и CDR гуманизированного антитела не должны точно соответствовать родительским последовательностям, например, импортированный CDR или консенсусный FR может быть мутирован путем замены, вставки или делеции по меньшей мере одного остатка

5 таким образом, чтобы остаток CDR или FR на этом участке не соответствовал ни консенсусной, ни импортированной последовательности. Однако такие мутации, как правило, не бывают обширными. Обычно, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% остатков гуманизированного антитела соответствуют остаткам родительских последовательностей.

10 Используемый здесь термин “примерно”, в случае измеряемой величины, такой как количество, временная продолжительность и т.п., охватывает вариации значений указанной величины до $\pm 20\%$, предпочтительно $\pm 10\%$, более предпочтительно $\pm 5\%$, еще более предпочтительно $\pm 2\%$, поскольку такие вариации являются адекватными для реализации раскрытых способов. Если не указано иное, все числа, выражающие

15 количество компонентов, свойства, такие как молекулярная масса, условия проведения реакции и т.д., используемые в описании и формуле изобретения, следует понимать как изменяемые во всех случаях в рамках термина “примерно”. Соответственно, если не указано иное, числовые параметры, приведенные в следующем ниже описании и прилагаемой формуле изобретения, являются приближениями, которые могут изменяться

20 в зависимости от требуемых свойств, подбираемых для получения настоящего изобретения. В самом крайнем случае, но не ограничивая возможности применения доктрины эквивалентов к объему формулы изобретения, каждый числовой параметр следует рассматривать по меньшей мере с точки зрения числа, выраженного значащими цифрами, с применением обычных способов округления.

25 Под “достаточным количеством” или “эффективным количеством” подразумевается количество терапевтического антитела или его фармацевтической композиции, требуемое для лечения или облегчения нарушения, такого как воспалительное нарушение, клинически релевантным способом. Достаточное количество терапевтического анти-ФКН антитела, его ФКН-связывающего фрагмента или фармацевтической композиции,

30 используемое при реализации настоящего изобретения на практике для терапевтического лечения, например, воспалительного нарушения, изменяется в зависимости от способа введения, возраста и общего состояния здоровья пациента.

“Сродство связывания”, как правило, относится к силе общего суммарного количества нековалентных взаимодействий между единичным сайтом связывания молекулы

35 (например, антитела) и его партнером связывания (например, антигеном). Сродство связывания может быть представлено константой диссоциации (K_d). Сродство может быть измерено способами, известными в данной области техники, включая радиоиммунологический анализ ФКН-связывания (РИА) или анализ методом поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE®).

40 “Химерные” или “химеризованные” антитела (т.е., иммуноглобулины) относятся к антителам, у которых часть тяжелой и/или легкой цепи является идентичной или гомологичной соответствующим последовательностям в антителах, полученных от конкретных видов или принадлежащих конкретному классу или подклассу антител, в то время как остальная часть цепи(ей) является идентичной или гомологичной

45 соответствующим последовательностям в антителах, полученных от другой разновидности или принадлежащих другому классу или подклассу антител, а также фрагментам таких антител, при условии, что они проявляют необходимую биологическую активность (Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81:6851-6855,

1984).

“Эпитоп” или “антигенная детерминанта” означает аминокислотную последовательность, которая либо в силу линейной структуры, либо в силу трехмерной конформации, формирует участок, связывающий антитело. Конформационный эпитоп, который может включать прерывающиеся участки аминокислотной последовательности антигена, взаимодействует с антителом благодаря третичной структуре эпитопа. Линейный эпитоп, напротив, представляет собой эпитоп, который распознается антителами по его первичной структуре. В одном из вариантов осуществления эпитоп фракталкина, который формирует минимальную область контакта с Fab, включает, например, E66-Q69, W81-Q87, H70-F73 и H88-D90.

Термины “экспрессировать” и “продуцировать” в данном описании используются синонимично и относятся к биосинтезу генного продукта. Эти термины охватывают транскрипцию гена в РНК. Эти термины также охватывают трансляцию РНК в один или более полипептидов, а также охватывают все пост-транскрипционные и пост-трансляционные модификации естественного происхождения. Экспрессия/продуцирование антитела может происходить в цитоплазме клетки и/или во внеклеточной среде, такой как среда роста для клеточной культуры.

Под термином “фракталкин”, “ФКН”, “ФК” или “нейротактин” подразумевается полипептид, который является гомологичным полипептиду, определенному последовательностью SEQ ID NO:1 (фиг.1) и который обладает биологической активностью ФКН (например, связывается с рецептором CX3CR1; вызывает хемотаксис Т-клеток и моноцитов; или способствует адгезии лейкоцитов к активированным эндотелиальным клеткам). Биологическую активность полипептида ФКН можно оценивать при помощи любого стандартного способа. Согласно используемому здесь определению, ФКН также включает любой член или изоморф семейства ФКН. См., например, патент США 7390490, WO 2006/046739, и публикацию заявки на патент США 2006/0233710, которые включены в настоящее описание в виде ссылки.

“ФКН-связывающий фрагмент” включает часть интактного антитела, содержащего его ФКН-связывающий участок и способный связывать ФКН. ФКН-связывающие фрагменты могут представлять собой Fab, Fab', F(ab')₂ или Fv фрагменты; диатела; триатела; тетратела; мини-антитела; молекулы аффитела; минитела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител; или полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

“Гомологичный” означает любой ген или последовательность белка, которая по меньшей мере на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или более гомологична последовательности известного гена или белка по длине последовательности сравнения. “Гомологичный” белок также может обладать по меньшей мере одной биологической активностью белка сравнения. Для полипептидов длина последовательностей сравнения, как правило, составляет по меньшей мере 15, 20, 25, 35 или более аминокислот. Для нуклеиновых кислот длина последовательностей сравнения, как правило, составляет по меньшей мере 50, 60, 75, 100, 125 или более нуклеотидов. “Гомология” также может относиться к значительному сходству между эпитопом, используемым для генерации антител, и белком или его фрагментом, на который направлены антитела. В этом случае, гомология относится к сходству, достаточному для продуцирования антител, которые могут специфически узнавать представляющий интерес белок.

“Человеческое антитело” означает, что антитело имеет либо исключительно человеческое происхождение, либо является любым антителом, в котором последовательности переменных и константных доменов представляют собой

человеческие последовательности или последовательности человеческих антител. Этот термин охватывает антитела с последовательностями, полученными из (т.е., которые используют) человеческих генов, но которые были изменены, например, для уменьшения возможной иммуногенности, увеличения аффинности, удаления цистеинов, которые могут быть причиной нежелательной конформации, и т.д. Этот термин охватывает такие антитела, продуцированные рекомбинантно в нечеловеских клетках, которые могут вызывать гликозилирование, нетипичное для человеческих клеток.

“Гибридома” относится к продукту слияния клеток между неопластическим лимфоцитом культурального происхождения и примированным В- или Т-лимфоцитом, который экспрессирует специфический иммунный потенциал родительской клетки.

Используемый здесь термин “воспалительное нарушение” относится к любому заболеванию, нарушению или состоянию, при котором иммунная система активирована аномально. Воспалительное нарушение может представлять собой, например, язвенный колит, болезнь Крона, воспалительную болезнь кишечника, ревматоидный артрит, миозит, рассеянный склероз, нейромиелит зрительного нерва, атеросклероз, псориаз, системную красную волчанку (например, волчанку с поражением центральной нервной системы или волчаночный нефрит), нефрит, гломерулонефрит, аутоиммунную болезнь печени и желчных путей (например, аутоиммунный гепатит, первичный желчный цирроз печени или первичный склерозирующий холангит), реакцию трансплантат против хозяина, атопический дерматит, астму, нейродегенеративную болезнь (например, Болезнь Альцгеймера), демиелинизирующую полирадикулонейропатию (например, синдром Гийена-Барре или хроническую воспалительную демиелинизирующую полирадикулонейропатию), нейропатическую боль, висцеральную боль при раке, атеросклероз, возрастную дегенерацию мышц, диабетическую нефропатию, саркоидозный увеит или сахарный диабет.

Альтернативно, заболевание, нарушение или состояние представляет собой заболевание верхних или нижних дыхательных путей, например, лимфоматозный трахеобронхит; аллергическую гиперчувствительность или состояние гиперсекреции, такое как хронический бронхит и кистозный фиброз; легочный фиброз различной этиологии (например, идиопатический легочный фиброз); хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ); саркоидоз; аллергический и неаллергический ринит; аллергическую или неаллергическую крапивницу; связанное с кожей заболевание, характеризующееся нерегулируемым воспалением, перестройку ткани, ангиогенез и неоплазию; заболевание желудочно-кишечного тракта, такое как болезнь Гиршпрунга, диарею, состояние малабсорбции и воспалительные состояния; нарушение центральной и периферической нервной системы, такое как депрессия, состояние тревоги, болезнь Паркинсона, мигрень и другие формы черепной боли, инсульт и рвоту; заболевание иммунной системы, такое как в тканях селезенки и лимфатических узлов, аутоиммунное заболевание или другое заболевание, связанное с иммунной системой; заболевание сердечно-сосудистой системы, такое как отек легких, гипертензию, преэклампсию, тип 2 сложного регионального синдрома боли и инсульт; хроническое воспалительное заболевание, такое как артрит; заболевание, связанное с костями; хроническую боль, такую как фибромиалгия; и другие нарушения, в патогенез, патологию, и этиологию которых вовлечено действие нейролекинов, тахикининов или других родственных веществ (например, хемокининов).

Дополнительные примеры воспалительных нарушений представляют собой обыкновенные прыщи; синдром острой дыхательной недостаточности; болезнь Аддисона; аллергические внутриглазные воспалительные заболевания; ANCA-

ассоциированный гранулематозный ангиит; анкилозный спондилит; аутоиммунную гемолитическую анемию; болезнь Бехчета; паралич Белла; буллезный пемфигоид; церебральную ишемию; цирроз печени; синдром Когана; контактный дерматит; синдром Кушинга; дерматомиозит; атрофическую эритему; эозинофильный фасциит; узловатую эритему; эксфолиативный дерматит; очаговый гломерулосклероз; очаговый и сегментный гломерулосклероз; сегментный гломерулосклероз; гигантских клеток артериит; подагру; подагрический артрит; ручную экзему; пурпуру Шенлейна-Геноха; герпес беременных; гирсутизм; идиопатический цератосклерит; идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру; иммунную тромбоцитопеническую пурпуру, воспалительные нарушения кишечника или желудочно-кишечного тракта; воспалительный дерматоз; красный плоский лишай; лимфоматозный трахеобронхит; отек желтого пятна; миастению гравис; неспецифическое фиброзирующее заболевание легких; остеоартрит; панкреатит; пемфигоид беременных; обыкновенную пузырчатку; периодонтит; узелковый полиартериит; ревматическую полимиалгию; мошоночный зуд; зуд/воспаление; псориаз; саркоидоз; склеродерму; синдром септического шока; плечевой тендинит или бурсит; синдром Шегрена; болезнь Стилла; болезнь Свита; системный склероз; синдром Такаясу; временный артериит; токсический эпидермальный некролиз; отторжение трансплантата и синдромы, связанные с отторжением трансплантата; туберкулез; диабет типа 1; васкулит; синдром Фогта-Коянаги-Харада (ФКХ); и гранулематоз Вегенера.

Термин “изолированный” или “очищенный” означают измененный “с участием человека” по отношению к естественному состоянию. Если молекула или композиция встречается в природе, ее “изолируют” или “очищают”, когда ее изменяют или выделяют из ее естественной окружающей среды, или и то и другое. Например, полинуклеотид или полипептид, естественно присутствующий в живом растении или животном, не является “изолированным” или “очищенным”, но тот же самый полинуклеотид или полипептид, отделенный от материалов, существующих совместно с ним в его естественном состоянии, является “изолированным” или “очищенным”, согласно используемому в настоящем описании термину.

Термин “функционально связанный” или “функционально введенный” означает, что регуляторные последовательности, необходимые для экспрессии кодирующей последовательности, помещены в молекулу нуклеиновой кислоты в соответствующих положениях относительно кодирующей последовательности, обеспечивая таким образом возможность экспрессии кодирующей последовательности. В качестве примера, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, если промотор способен управлять транскрипцией или экспрессией такой кодирующей последовательности. Кодирующие последовательности могут быть функционально связаны с промотором или регуляторными последовательностями в смысловом или антисмысловом направлении. Термин “функционально связанный” иногда применяется к расположению других элементов контроля транскрипции (например, энхансеров) в векторе экспрессии.

“Полинуклеотид”, синонимично называемый “молекулой нуклеиновой кислоты”, означает любой полирибонуклеотид или полидезоксирибонуклеотид, который может представлять собой немодифицированную РНК или ДНК или модифицированную РНК или ДНК. “Полинуклеотиды” включают, без ограничения, одонитевую и двухнитевую ДНК, ДНК, которая представляет собой смесь одонитевых и двухнитевых участков, одонитевую и двухнитевую РНК и РНК, которая представляет собой смесь

однонитевых и двухнитевых участков, гибридные молекулы, содержащие ДНК и РНК, которые могут быть однонитевыми, или чаще двухнитевыми или смесью однонитевых и двухнитевых участков. Кроме того, “полинуклеотид” относится к трехнитевым участкам, содержащим РНК или ДНК, или как РНК, так и ДНК. Термин полинуклеотид также включает ДНК или РНК, содержащие одно или несколько модифицированных оснований, и ДНК или РНК с основной цепью, модифицированной с целью получения стабильности или с другой целью. “Модифицированные” основания включают, например, тритилированные основания и необычные основания, такие как инозин. ДНК и РНК могут содержать множество различных модификаций; таким образом, термин “полинуклеотид” охватывает химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы полинуклеотидов, обычно встречающиеся в природе, а также химические формы ДНК и РНК, характерные для вирусов и клеток. “Полинуклеотид” также охватывает относительно короткие цепи нуклеиновых кислот, часто называемые олигонуклеотидами.

“Полипептид” относится как к коротким цепям, обычно называемым пептидами, олигопептидами или олигомерами, так и к более длинным цепям, как правило, называемым белками. Полипептиды могут содержать другие аминокислоты помимо 20 аминокислот, кодируемых геном. “Полипептиды” включают аминокислотные последовательности, модифицированные либо естественными процессами, такими как пост-трансляционный процессинг, либо методами химической модификации, которые известны в данной области техники. Такие модификации хорошо описаны в учебниках и более специализированных монографиях, а также в многочисленной научной литературе. Модификации могут возникать в любом месте полипептида, включая основную пептидную цепь, боковые цепи аминокислот и карбоксильные или аминные концы. Следует отметить, что заданный полипептид может иметь один и тот же тип модификаций, в той или иной степени, на нескольких участках. Кроме того, заданный полипептид может иметь много типов модификаций. Полипептиды могут ветвиться в результате убиквентилирования и могут быть циклическими с боковыми цепями или без них. Циклические, разветвленные и разветвленные циклические полипептиды могут быть результатом естественных посттрансляционных процессов или могут быть получены синтетическими способами. Модификации включают, например, ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение гем фрагмента, ковалентное присоединение нуклеотида или производного нуклеотида, ковалентное присоединение липида или производного липида, ковалентное присоединение фосфатидилинозитола, поперечную сшивку, циклизацию, образование дисульфидных связей, деметилирование, формирования ковалентных поперечных связей, формирования цистина, формирования пироглутамата, формилирование, гамма-карбоксилирование, гликозилирование, формирование GPI якоря, гидроксилирование, иодинирование, метилирование, миристоилирование, окисление, протеолитическую обработку, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфатацию, опосредуемое транспортной РНК добавление к белкам аминокислот, такое как аргинилирование, и убиквитирилирование (см., например, PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T.E. Creighton, W.H. Freeman and Company, New York, 1993; Wold, F., Post-translational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, 1-12, в POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983; Seifter et al., Meth Enzymol, 182, 626-646; and Rattan, et al, Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging, Ann. NY Acad. Sci, (1992) 663: 48-62).

“Специфически связывает” означает, что антитело или его фрагмент узнает и связывает антиген (например, ФКН или его фрагмент) и при этом по существу не узнает и не связывает другие молекулы в образце (например, биологическом образце).

“Специфически” означает отличать слабую неспецифическую агглютинирующую способность, которая иногда может происходить между случайными белками, например, с обнаженными гидрофильными доменами. Это не подразумевает, что антитело не будет связывать ни с каким другим белком кроме антигена по изобретению. Антитела могут вступать в кросс-реакцию (и “специфически связываться”) с любым белком, который содержит соответствующий эпитоп.

“Субъектом” называется любое животное, например, млекопитающее (например, человек). Субъект, который подвержен лечению, например, воспалительного нарушения, представляет собой субъект, который был диагностирован врачом или ветеринаром в зависимости от обстоятельств, как имеющий такое состояние. Диагноз может быть выполнен любыми подходящими средствами. Для специалиста в данной области очевидно, что объект по изобретению может быть подвергнут стандартным тестам или может быть идентифицирован, без экспертизы, как субъект с высоким риском в силу наличия одного или нескольких факторов риска, таких как возраст, генетика или анамнез.

Клетка “трансформирована” или “трансфицирована” экзогенными или гетерологичными нуклеиновыми кислотами, такими как ДНК, если такая ДНК введена в клетку. Трансформирующая ДНК может или не может быть интегрирована (например, ковалентно связана) в геном клетки. В прокариотических, дрожжевых клетках и клетках млекопитающих, например, трансформирующая ДНК может находиться в эпизомальном элементе, таком как плазмида. Что касается эукариотических клеток, то стабильно трансформированная клетка, или “стабильная клетка”, представляет собой клетку, в которой трансформирующая ДНК интегрирована в хромосому с тем, чтобы она передавалась по наследству дочерним клеткам через репликацию хромосом. Эта стабильность подтверждается способностью эукариотической клетки основывать клеточную линию или клоны, состоящие из популяции дочерних клеток, содержащих трансформирующую ДНК. “Клон” представляет собой популяцию клеток, полученных из одной клетки или общего предка путем митоза. “Клеточная линия” представляет собой клон первичной клетки, которая способна к стабильному росту *in vitro* в течение многих генераций.

Под “лечением” подразумевается введение терапевтического антитела или его фармацевтической композиции для профилактических и/или терапевтических целей. Термины “лечить заболевание или нарушение” или применение для “терапевтического лечения” относятся к применению лечения к пациенту, уже страдающему заболеванием, для улучшения состояния субъекта. Данный субъект может быть диагностирован как имеющий воспалительное нарушение, основываясь на идентификации любого из характерных симптомов или применения диагностических методов, известных специалисту в данной области. “Предупредить заболевание или нарушение” означает профилактическое лечение субъекта, который еще не болен, но восприимчив к развитию конкретного заболевания, или каким-либо иным образом подвержен риску развития конкретного заболевания. Субъекта определяют как подверженного риску развития воспалительного нарушения, используя диагностические методы, известные в данной области.

“Вектор” представляет собой репликон, такой как плазмида, фаг, космид или вирус, в который может быть функционально вставлен другой сегмент нуклеиновой кислоты

с тем, чтобы вызвать репликацию или экспрессию этого сегмента.

Как используется в данном описании и прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если в контексте в явном виде не указано иное. Таким образом, например, указание на “клетку” включает комбинацию двух или более клеток, и т.п.

Другие признаки и преимущества изобретения станут очевидными из подробного описания и формулы изобретения.

Краткое описание чертежей

Фиг.1 иллюстрирует аминокислотную последовательность человеческого ФКН.

Фиг.2 представляет собой таблицу, демонстрирующую характеристики связывания (т.е., нейтрализующую активность, аффинность связывания и видовую кросс-реактивность) анти-ФКН моноклональных антител.

Фиг.3 иллюстрирует выравнивание переменных участков тяжелых цепей гуманизированных анти-ФКН последовательностей mAb (SEQ ID NO:36-37 и 42-43, соответственно, в порядке появления), последовательности m3A5-2 (SEQ ID NO:26), последовательности Ig зародышевой линии (SEQ ID NO:40) и последовательности AAA68427.1 (SEQ ID NO:34).

Фиг.4 иллюстрирует выравнивание переменных участков тяжелых цепей гуманизированных анти-ФКН последовательностей mAb (SEQ ID NO:38 и 44-45, соответственно, в порядке появления), последовательности m3A5-2 (SEQ ID NO:27), последовательности Ig зародышевой линии (SEQ ID NO:41) и последовательности ABU90602.1 (SEQ ID NO:35).

Фиг.5 представляет собой таблицу, суммирующую результаты трех независимых анализов хемотаксиса. Нейтрализующую активность гуманизированных анти-hФКН mAb анализировали при помощи анализа хемотаксиса. Все комбинации H3 и H3-2 с L2 и L4 были успешно гуманизированы, поскольку эти mAb демонстрируют нейтрализующую активность, аналогичную активности химерной mAb. Однако НК2, который был получен путем использования более узкого диапазона ключевых остатков, показал пониженную нейтрализующую активность в комбинации с L2 или L4.

На фиг.6А и фиг.6В изображены серии графиков, демонстрирующих нейтрализующую активность m3A5-2 mAb и химерной mAb. Фиг.6А представляет собой график, демонстрирующий нейтрализующую активность m3A5-2 mAb, определенную анализом хемотаксиса. Фиг.6В представляет собой график, демонстрирующий нейтрализующую активность химерной mAb, определенную анализом хемотаксиса.

На фиг.7А-7D изображены серии графиков, демонстрирующие нейтрализующую активность гуманизированных анти-hФКН антител, определенную анализом хемотаксиса. На фиг.7А показана нейтрализующая активность H3L2-IgG2. На фиг.7В показана нейтрализующая активность H3-L4-IgG2. На Фиг.7С показана нейтрализующая активность НК2L2-IgG2. На фиг.7D показана нейтрализующая активность НК2L4-IgG2.

На фиг.8А-8F изображены серии графиков, демонстрирующие нейтрализующую активность гуманизированных анти-hФКН антител, определенную анализом хемотаксиса. На фиг.8А показана нейтрализующая активность H3-2L2-IgG2. На фиг.8В показана нейтрализующая активность H3-2L4-IgG2. На фиг.8С показана нейтрализующая активность H3-2L5-IgG2. На фиг.8D показана нейтрализующая активность НК3L2-IgG2. На фиг.8Е показана нейтрализующая активность НК3L4-IgG2. На фиг.8F показана нейтрализующая активность НК3L5-IgG2.

Фиг.9 представляет собой таблицу, суммирующую результаты анализа BIACORE®, использованного для измерения аффинности связывания mAb с hФКН и ФКН яванской

макаки (*synomolgus monkey*).

На фиг.10А-10С изображены серии графиков, демонстрирующие аффинность связывания химерных и гуманизированных анти-*h*ФКН антител (H3L2, H3-2L2, H3L4, H3-2L4 и HK2L4) с *h*ФКН-SEAP и ФКН-SEAP яванской макаки, определенную анализом BIACORE®. Фиг.10А представляет собой гистограмму, демонстрирующую значения Ka (1/мс). Фиг.10В представляет собой гистограмму, демонстрирующую значения Kd (1/с). Фиг.10С представляет собой гистограмму, демонстрирующую значения KD (М).

На фиг.11 показаны результаты картирования эпитопа при помощи библиотек перекрывающихся синтетических пептидов (SEQ ID NO:115-135, соответственно, в порядке появления) из домена хемокина ФКН.

На фиг.12 показаны результаты картирования эпитопа *h*ФКН методом ELISA.

На фиг.13 показаны результаты картирования эпитопа *h*ФКН методом BIACORE®.

На фиг.14 показаны результаты эксперимента кросс-насыщения для идентификации Fab-связывающего сайта фракталикина. График показывает, что участки ФКН E66-Q69, W81-Q87, H70-F73 и H88-D90 содержатся в минимальной области контакта с Fab.

Подробное описание изобретения

Были разработаны и выделены химерные анти-ФКН антитела, гуманизированные анти-ФКН антитела и их ФКН-связывающие фрагменты. Описанные здесь гуманизированные анти-ФКН антитела и их ФКН-связывающие фрагменты могут использоваться для лечения воспалительных нарушений. Такие антитела также могут использоваться для ингибирования рекрутинга лейкоцитов в участке воспаления. Воспалительные нарушения, которые можно лечить согласно изобретению, включают язвенный колит, болезнь Крона, воспалительную болезнь кишечника, ревматоидный артрит, миозит, рассеянный склероз, нейромиеелит зрительного нерва, атеросклероз, псориаз, системную красную волчанку (например, волчанку с поражением центральной нервной системы или волчаночный нефрит), нефрит, гломерулонефрит, аутоиммунную болезнь печени и желчных путей (например, аутоиммунный гепатит, первичный желчный цирроз печени или первичный склерозирующий холангит), реакцию «трансплантат против хозяина», атопический дерматит, астму, нейродегенеративную болезнь (например, Болезнь Альцгеймера), демиелинизирующую полирадикулонейропатию (например, синдром Гийена-Барре или хроническую воспалительную демиелинизирующую полирадикулонейропатию), нейропатическую боль, висцеральную боль при раке, атеросклероз, возрастную дегенерацию мышц, диабетическую нефропатию, саркоидозный увеит, сахарный диабет, лимфоматозный трахеобронхит, аллергическую гиперчувствительность или состояние гиперсекреции, такое как хронический бронхит и кистозный фиброз, легочный фиброз различной этиологии (например, идиопатический легочный фиброз), хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ), саркоидоз, аллергический и неаллергический ринит, аллергическую или неаллергическую крапивницу, связанное с кожей заболевание, характеризующееся нерегулируемым воспалением, перестройку ткани, ангиогенез и неоплазию, заболевание желудочно-кишечного тракта, такое как болезнь Гиршпрунга, диарею, состояние малабсорбции и воспалительные состояния, нарушение центральной и периферической нервной системы, такое как депрессия, состояние тревоги, болезнь Паркинсона, мигрень и другие формы черепной боли, инсульт и рвота, заболевание иммунной системы, такое как в тканях селезенки и лимфатических узлов, аутоиммунное заболевание или другое заболевание, связанное с иммунной системой, заболевание сердечно-сосудистой системы, такое как отек легких, гипертензия, преэклампсия, тип 2 сложного регионального синдрома боли и инсульт, хроническое воспалительное заболевание, такое как артрит,

заболевание, связанное с костями, хроническую боль, такую как фибромиалгия, обыкновенные прыщи, синдром острой дыхательной недостаточности, болезнь Аддисона, аллергические внутриглазные воспалительные заболевания, ANCA-ассоциированный гранулематозный ангиит, анкилозный спондилит, аутоиммунную гемолитическую анемию, болезнь Бехчета, паралич Белла, буллезный пемфигоид, церебральную ишемию, цирроз печени, синдром Когана, контактный дерматит, синдром Кушинга, дерматомиозит, атрофическую эритему, эозинофильный фасциит, узловатую эритему, эксфолиативный дерматит, очаговый гломерулосклероз, очаговый и сегментный гломерулосклероз, сегментный гломерулосклероз, гигантских клеток артериит, подагру, подагрический артрит, ручную экзему, пурпуру Шенлейна-Геноха; герпес беременных, гирсутизм, идиопатический цератосклерит, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, иммунную тромбоцитопеническую пурпуру, воспалительные нарушения кишечника или желудочно-кишечного тракта, воспалительный дерматоз, красный плоский лишай, лимфоматозный трахеобронхит, отек желтого пятна, миастению гравис, неспецифическое фиброзирующее заболевание легких, остеоартрит, панкреатит, пемфигоид беременных, обыкновенную пузырчатку, периодонтит, узелковый полиартериит, ревматическую полимиалгию, мошоночный зуд, зуд/воспаление, псориаз, артрит, легочный гистоплазмоз, рецидивирующий полихондрит, розацеа, саркоидоз, склеродерма, синдром септического шока, плечевой тендинит или бурсит, синдром Шегрена, болезнь Стилла, болезнь Свита, системный склероз, синдром Такаясу, временный артериит, токсический эпидермальный некролиз, отторжение трансплантата и синдромы, связанные с отторжением трансплантата, туберкулез, диабет типа 1, васкулит, синдром Фогта-Коянаги-Харада (ФКХ), и гранулематоз Вегенера.

Антитела

Способы получения и очистки антител или их ФКН-связывающих фрагментов известны в данной области. См., например, Kohler et al., Nature 256:495-497 (1975); Hongo et al., Hybridoma 14:253-260 (1995); Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press), 2nd ed. (1988); Hammerling et al., Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas (Elsevier), 563-681 (1981); Ni, Xiandai Mianyixue, 26:265-268 (2006); патенты США №№ 7189826, 7078492 и 7153507; Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology 20:927-937 (2005); Vollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology 27:185-191 (2005); US 2006/258841; US 2006/183887; US 2006/059575; US 2005/287149; US 2005/100546; и US 2005/026229.

Химерные антитела

Химерные антитела и способы их получения известны и используются в данной области техники. Используемый здесь термин “химерное антитело” означает антитело или его ФКН-связывающий фрагмент, имеющий по меньшей мере некоторую часть по меньшей мере одного переменного домена, полученного из аминокислотной последовательности антитела не относящегося к человеку млекопитающего, грызуна или рептилии, в то время как остальные части антитела или его ФКН-связывающего фрагмент получены от человека. Например, химерное антитело может включать антиген-связывающий домен мыши с человеческим Fc или другим таким структурным доменом.

Гуманизированные антитела

Изобретение охватывает гуманизированные анти-ФКН антитела и их ФКН-связывающие фрагменты, которые, например, модулируют взаимодействие между ФКН и CX3CR1. Гуманизацию можно выполнять способом прививки гипервариабельных

участков (CDR) (Kontermann and Dübel, Antibody Engineering, Springer Lab Manual (2001) and Tsurushita et al., Methods 36:69-83 (2005)). Гуманизацию также можно выполнять согласно способам, известным в данной области техники (см., например, Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988); and Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536 (1988)), путем замены последовательностей гипервариабельных участков, соответствующих последовательностям человеческого антитела.

Гуманизированные антитела обычно являются человеческими антителами, в которых некоторые остатки гипервариабельных участков и возможно некоторые остатки FR заменены остатками из аналогичных участков в нечеловеческих антителах.

Выбор человеческих вариабельных доменов, как легкой так и тяжелой цепей, для использования при создании гуманизированных антител может быть важным с точки зрения снижения антигенности. Согласно способу “наилучшего соответствия” последовательность вариабельного домена антитела грызуна подвергают скринингу по всей библиотеке известных человеческих последовательностей вариабельных доменов.

Человеческая последовательность, которая является самой близкой к последовательности грызуна, затем принимается в качестве человеческого каркасного участка для гуманизированного антитела. См., например, Sims et al., J. Immunol. 151: 2296-2308 (1993) and Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987). В другом методе используется конкретный каркасный участок, полученный из консенсусной последовательности всех человеческих антител конкретной подгруппы легких или тяжелых цепей. Один и тот же каркасный участок может использоваться для нескольких различных гуманизированных антител. См., например, Carter et al., Proc. Natl. Acad. Set USA 89:4285-4289 (1992) and Presta et al., J. Immunol. 151:2623-2632 (1993).

Также желательно, чтобы антитела были гуманизированными с сохранением высокой аффинности к антигену и других благоприятных биологических свойств. Для достижения этой цели, согласно одному из методов, гуманизированные антитела получают путем анализа родительских последовательностей и различных концептуальных гуманизированных продуктов, используя трехмерные модели родительских и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулина являются общедоступными и известны специалистам в данной области. Доступны компьютерные программы, которые иллюстрируют и отображают на экране вероятные трехмерные конформационные структуры выбранных последовательностей иммуноглобулина-кандидата. Изучение таких отображений позволяет анализировать вероятную роль остатков в функционировании последовательности иммуноглобулина-кандидата, т.е., анализировать остатки, которые влияют на способность иммуноглобулина-кандидата связаться со своим антигеном. Таким образом, остатки FR, полученные от реципиента, могут быть выбраны и объединены, и последовательности могут быть импортированы таким образом, чтобы получить желаемую характеристику антитела, такую как увеличенную аффинность по отношению к целевому антигену(ам) (например, ФКН или его фрагменту). Как правило, остатки CDR имеют непосредственное и наиболее существенное влияние на связывание антигена.

ФКН-связывающие фрагменты

В некоторых вариантах осуществления изобретения предоставляются ФКН-связывающие фрагменты, которые модулируют взаимодействие между ФКН и CX3CR1. Такие фрагменты могут представлять собой функциональные антиген-связывающие фрагменты интактных, гуманизированных и/или химерных антител, таких как фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или ScFv (см., например, Bird et al., Science 242:423-426 (1998)). Такие фрагменты получают путем протеолитического расщепления интактных

антител, например, расщеплением папаином (см., например, WO 94/29348), но можно получить непосредственно из рекомбинантно трансформированной клетки хозяина. ФКН-связывающие фрагменты могут быть получены при помощи различных инженерных методик, как описано ниже.

Энергия взаимодействия между двумя цепями фрагментов Fv более низкая, чем у фрагментов Fab. Для стабилизации ассоциации VH и VL доменов фрагменты Fv связывали пептидами (см., например, Bird et al., Science 242:423-426 (1998) and Huston et al., PNAS 85:5879-5883 (1998)), дисульфидными мостиками (см., например, Glockshuber et al., Biochemistry 29:1362-1367 (1990)) и мутациями “выступ-во-впадину” (“knob in hole”) (см., например, Zhu et al., Protein Sci. 6:781-788 (1997)). Фрагменты ScFv могут быть получены способами, хорошо известными специалистам в данной области (см., например, Whitlow et al., Methods Enzymol. 2:97-105 (1991) and Huston et al., Int. Rev. Immunol. 10:195-217 (1993)). ScFv можно продуцировать в бактериальных клетках, таких как *E. coli*, но также можно продуцировать в эукариотических клетках. Одним из недостатков ScFv является моновалентность продукта, которая препятствует повышенной avidности вследствие поливалентного связывания; другим недостатком является короткий период полувыведения фрагментов ScFv. Попытки решить эти проблемы включают бивалент (ScFv)₂, полученный из ScFv, содержащего дополнительный C-терминальный цистеин, путем химического связывания (см., например, Adams et al., Cancer Res. 53:4026-4034 (1993) and McCartney et al., Protein Eng. 8:301-314 (1995)) или путем спонтанной сайт-специфической димеризации ScFv, содержащего неспаренный остаток C-терминального цистеина (см., например, Kipriyanov et al., Cell. Biophys. 26:187-204 (1995)). Альтернативно, можно инициировать формирование мультимеров из ScFv путем укорочения пептидных линкеров до 3-12 остатков для образования “диател” (см., например, Holliger et al., PNAS 90:6444-6448 (1993)). Более того, укорочение линкера может дать тримеры ScFv, образуя “триатела” (см., например, Kortt et al., Protein Eng. 10:423-433 (1997)) и тетрамеры, образуя “тетратела” (см., например, Le Gall et al., FEBS Letters 453:164-168 (1999)). Бивалентные молекулы ScFv также можно получить путем генетического слияния с димеризующими мотивами белков для формирования “миниантитела” (см., например, Pack et al., Biochemistry 31:1579-1584 (1992)) и “минител” (см., например, Hu et al., Cancer Res. 56:3055-3061 (1996)). Тандемы ScFv-Sc-Fv ((ScFv)₂) также могут быть получены с помощью соединения двух единиц ScFv третьим пептидным линкером (см. Kurucz et al J.Immunol. 154, 4576-4582 (1995)). Биспецифические диатела могут быть получены с помощью нековалентной ассоциации продуктов слияния двух отдельных цепей, содержащих VH-домен из одного антитела, соединенного с помощью короткого линкера с VL-доменом из другого антитела (см. Kipriyanov et al, Int. J. Can. 77, 763-772 (1998)). Стабильность таких биспецифических диател можно увеличить путем введения дисульфидных мостиков или мутаций “выступ-во-впадину” (“knob in hole”), как описано выше, или путем образования одноцепочечных диател (ScDb), в которых два гибридных ScFv-фрагмента соединены при помощи пептидного линкера (см. Kontermann et al. J.Immunol. Methods 226: 179-188 (1999)). Тетравалентные биспецифические молекулы доступны, например, благодаря слиянию ScFv-фрагмента с CH3-доменом молекулы IgG или с Fab-фрагментом через шарнирную область (см. Coloma et al., Nature Biotechnol. 15: 159-163 (1997)). Альтернативно, тетравалентные биспецифические молекулы получают путем слияния биспецифических одноцепочечных диател (см. Alt et al., FEBS Lett 454: 90-94 (1999)). Меньшие тетравалентные биспецифические молекулы также могут быть образованы путем димеризации либо тандемов ScFv-ScFv с линкером, содержащим мотив спираль-

петля-спираль (DiBi минидиатела, см. Muller et al., FEBS Lett 432: 45-49 (1998)), либо одноцепочечной молекулы, содержащей четыре переменных домена антитела (VH и VL) в ориентации, предотвращающей внутримолекулярное спаривание (тандемное диатело, см. Kipriyanov et al., J.Mol.Biol. 293: 41-56 (1999)). Биспецифические F(ab')₂

фрагменты могут быть созданы путем химического связывания Fab' фрагментов или путем гетеродимеризации посредством лейциновых “молний” (см. Shalaby et al, J.Exp.Med. 175: 217-225 (1992), and Kostelny et al., J.Immunol. 148: 1547-1553 (1992)). Также доступны выделенные VH и VL домены (см. патенты US 6248516; US 6291158; US 6172197).

Фармацевтические лекарственные формы

Терапевтические лекарственные формы, содержащие антитело или его ФКН-связывающий фрагмент по изобретению, могут быть объединены с физиологически приемлемыми носителями, наполнителями или стабилизаторами в виде водных или сухих лекарственных форм. Приемлемые носители, наполнители или стабилизаторы включают, например, физраствор; буферные растворы, такие как фосфатный, цитратный и других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту; низкомолекулярные полипептиды; белки (например, сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины); гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты; монсахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; сахарные спирты, такие как маннит или сорбитол; образующие соль противоионы, такие как натрий; или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как ТВИН™, Плуроники™ или ПЭГ.

Антитела или их ФКН-связывающие фрагменты по изобретению могут быть заключены в микрокапсулы, в коллоидные системы доставки лекарственного вещества (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы или нанокапсулы) или в макроэмульсии. В случае, когда желательно введение антитела с замедленным высвобождением в лекарственной форме с характеристиками высвобождения, подходящими для лечения любого нарушения, требующего введения антитела, можно рассмотреть микроинкапсуляцию антитела. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают сложные полиэфиры, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (см., например, U.S. Patent No. 3,773,919), сополимеры L-глутаминовой-кислоты и γ-этил-L-глутамата, неразлагаемый ацетат этиленвинила, разлагаемые сополимеры молочная кислота-гликолевая кислота, такие как LUPRON DEPOT™ (вводимые инъекцией микросферы, состоящие из сополимера молочная кислота-гликолевая кислота и ацетата леупролида), а также поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту.

Лекарственные формы, предназначенные для использования для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Это легко достигается при помощи фильтрации через стерильные фильтрационные мембраны.

Методы комбинированной терапии

Терапевтические антитела или их ФКН-связывающие фрагменты по изобретению в процессе лечения могут использоваться либо отдельно, либо в комбинации с другими композициями. Например, антитело по изобретению можно вводить совместно с одним или более другими антителами, противовоспалительными агентами, цитостатическими агентами, антиангиогенными агентами, цитокинами, ингибирующими рост агентами или совместно с анти-TNF-α терапией. Такие методы комбинированной терапии включают комбинированное введение (при котором указанные два или более агентов включены одну и ту же или отдельные лекарственные формы) и отдельное введение

(например, одновременно или последовательно). При раздельном введении двух или более агентов введение антитела по изобретению можно осуществлять до или после введения вспомогательной терапии.

Эффективное количество терапевтических агентов, вводимых в комбинации с анти-ФКН антителом или его ФКН-связывающим фрагментом, назначается по усмотрению врача. Дозировка вычисляется таким образом, чтобы достичь максимального контроля состояния, которое следует вылечить. Дозировка также зависит от таких факторов как тип используемого терапевтического агента и конкретный субъект лечения. Подходящие дозировки могут быть занижены вследствие комбинированного действия (синергии) дополнительного терапевтического агента и анти-ФКН антитела или его ФКН-связывающего фрагмента.

Противовоспалительные агенты

Противовоспалительное соединение можно вводить в комбинации с антителами или их ФКН-связывающими фрагментами по изобретению. Иллюстративные противовоспалительные агенты включают стероиды, такие как глюкокортикоид, нестероидные противовоспалительные лекарственные вещества (например, ибупрофен или такролимус), специфические ингибиторы сциклооксигеназы-2, такие как рофекоксиб (Vioxx®) и целекоксиб (Celebrex®), кортикостероиды (например, преднизон или гидрокортизон), специфические цитокины, направленные на функцию Т-лимфоцитов, флубипрофен, диклофенак и кетаролак. См., например, патенты США №№ 7112578 и 7199119, включенные в настоящее описание в виде ссылки.

Другие агенты

Другие терапевтические агенты, которые можно вводить, включают, например, аминосалицилаты (например, 5-аминосалициловую кислоту), сульфасалазин (например, азуфладин), мезаламин (например, Асакол® или Пентаса®), имуран (например, Имуран®), 6-меркаптопурин (например, Пуринетол®), циклоспорин, метотрексат, инфликсимаб (например, Ремикейд®), интерфероны (например, интерферон-β), глатирамера ацетат (например, Копаксон®), натализумаб (Тисабри®), анти-интегрин-α4, урсоеоксиксодевую кислоту, такрина гидрохлорид, ингибитор редуктазы HMG CoA, лидокаин, сульфонилмочевину, циклофосфамид, внутривенный иммуноглобулин, амитриптилин, опиаты (например, морфин), дифеноксилат, атропин, витамин Д, кальций, ламотригин, кветиапин, простагландин E1, нитроглицерин, пегаптаниб, ранибизумаб, изосорбида динитрат, пероспирон, топирамат, оксарбазепин, допамин, микофенолята мофетил, мизорибин, леветирацетам, фентанил, трамадол, дигиталис, капсаицин, натрийуретический пептид, хлоридин, дронаты (например, алендронат), безафибрат, мексилетин, глиниды (например, натеглинид или репаглинид), донепезила гидрохлорид, лефлуномид, прегабалин, ривастигмина тартрат, пентанил, простациклин, прокаинамид, колхицин, ингибиторы α-глюкозидазы, диуретики (например, тиазидные диуретики или антиальдостероновые диуретики), такролимус, мемантина гидрохлорид, пентазоцин, клопидогрель, тканевой активатор плазминогена, талидомид, блокатор рецептора ангиотензина, тиазолидиндион, метронидазол, спиронолактон, дулоксетин, пароксетин, клонидин, тиклопидин, гепарин, блокаторы кальциевых каналов, инсулин, альбумин, буцилламин, карбамазепин, рисперидон, лимапрост, варфарин, вертепорфин, габапентин, галантамин гидробромид, аспирин, урокиназу, хлорамбуцил, ингибитор ангиотензин-превращающего фермента, бигуаниды, ингибиторы или агонисты β-адренергических рецепторов, гидрохлорохин и митоксантрон.

Лечение нарушения, раскрытого в настоящем описании (например, воспалительного нарушения), может дополнительно включать применение других методов терапии.

Например, для лечения, например, синдрома Гийена-Барре, демиелинизирующей полирадикулопатии (например, хронической воспалительной демиелинизирующей полирадикулопатии), тромботической тромбоцитопенической пурпуры (ТТП), болезни Бехчета, или рассеянного склероза можно использовать плазмаферез (например,

Дозировки и введение

Облегчение или лечение воспалительного нарушения обычно включает ослабление одного или более симптомов или осложнений, связанных с нарушением. В случае воспалительных заболеваний терапевтически эффективное количество терапевтического антитела, его ФКН-связывающих фрагментов или его фармацевтической композиции может приводить к одному или комбинации следующих признаков: уменьшению воспаления; уменьшению абдоминальной боли или судорог; уменьшению вздутию живота; уменьшению или устранению диареи; уменьшению изъязвления пищеварительного тракта; уменьшению лихорадки; уменьшению или ослаблению тошноты; уменьшению усталости; минимизации потери веса; облегчению боли в суставах; уменьшению припухлости; уменьшению сыпи на коже или зуда; устранению желтухи; и/или ослаблению одного или более симптомов, связанных с воспалительным нарушением. “Терапевтически эффективное количество” антитела, предназначенное для введения, представляет собой минимальное количество, необходимое для профилактики, облегчения или лечения воспалительного нарушения.

Описанные здесь антитела, ФКН-связывающие фрагменты и фармацевтическую композицию вводят субъекту согласно известным методам, таким как внутривенное введение в виде болюса или непрерывной инфузии в течение некоторого времени, топическое, пероральное, подкожное введение, введение в виде инъекции в бронх, внутричерепное, интраназальное, трансдермальное, интраперитонеальное, внутримышечное, внутрилегочное, вагинальное, ректальное, внутрисуставное, внутриартериальное введение, введение непосредственно в зону очага поражения, парентеральное, интравентрикулярное введение в мозг, или внутриглазное введение. В частности, может быть желательным локальное введение, если с лечением связаны обширные побочные эффекты или токсичность.

Лекарственные составы для перорального применения также могут предоставляться в виде жевательных таблеток или в виде твердых желатиновых капсул, в которых активный ингредиент смешан с инертным твердым разбавителем, или в виде мягких желатиновых капсул, в которых активный ингредиент смешан с водной или масляной средой.

Для терапевтических применений также может использоваться стратегия *ex vivo*. Стратегиями *ex vivo* включает трансфекцию или трансдукцию полученных от субъекта клеток полинуклеотидом, кодирующим антитело или фрагмент антитела. Затем трансфицированные или трансдуцированные клетки возвращают субъекту. Клетки могут быть любого типа в широком диапазоне, включая, без ограничения, гемопоэтические клетки (например, клетки костного мозга, макрофаги, моноциты, дендритные клетки, Т-клетки или В-клетки), фибробласты, эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, кератиноциты или мышечные клетки.

Дозировка и время введения композиций по настоящему изобретению зависят от различных клинических факторов, включая общее состояние здоровья субъекта и тяжесть симптомов воспалительного нарушения. Лечение может продолжаться от 1 дня до 4 лет, 1 дня до 3 лет, 1 дня до 2 лет, 1 дня до года, 1-100 дней, 1-60 дней, 1-20 дней, 1-10 дней или до излечения или облегчения воспалительного нарушения или

симптомов воспалительного нарушения. Композиции по настоящему изобретению можно вводить четыре раза в сутки, три раза в сутки, два раза в сутки, ежедневно, еженедельно, два раза в месяц, ежемесячно, раз в два месяца, раз в три месяца или ежегодно. Дозировки изменяются в зависимости от тяжести состояния и подбираются для достижения устойчивой концентрации в сыворотке крови от примерно 1 нг/мл до 10 мкг/мл или от 1 до 500 нг/мл. Количество вводимого антитела обычно находится в диапазоне от примерно 0,001 до примерно 30 мг/кг массы субъекта (например, от 0,01 до примерно 10 мг/кг массы субъекта).

ПРИМЕРЫ

Настоящее изобретение проиллюстрировано следующими примерами, которые никоим образом не предназначены для ограничения изобретения.

Пример 1. Получение мышинных моноклональных антител против человеческого факталкина (hФКН)

Мышинные анти-hФКН моноклональные антитела (mAbs) получали согласно описанному ранее способу (см., например, патент США 7390490, включенный в настоящее описание в виде ссылки). Получали нейтрализующие mAb клоны 1F3-1, 3A5-2, 1F3, 1G1, 2B2, 3D5, 3H7, 6D1, 7F6 и 5H7-6.

Пример 2. Выбор кандидата mAb для гуманизации

Клоны 1F3-1, 3A5-2 и 5H7-6 анализировали при помощи анализа хемотаксиса для измерения нейтрализующей активности, анализа BIACORE® для измерения hФКН-связывающей аффинности и твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) для измерения видовой кросс-реактивности к ФКН яванской макаки. Данные по нейтрализующей активности, аффинности связывания и видовой кросс-реактивности к ФКН яванской макаки суммированы на Фиг.2. Клон 3A5-2 показал наивысшую нейтрализующую активность и наивысшую hФКН-связывающую аффинность. Клон 3A5-2 показал одинаковую реактивность к ФКН яванской макаки и hФКН. Поэтому в качестве кандидата для гуманизации был выбран клон 3A5-2.

Анализ хемотаксиса выполняли следующим образом. Клетки помещали в верхние ячейки культуральной планшеты Трансвелл (планшета MultiScreen-MIC, 5,0 мкм, Millipore, Catalog No. MAMIC 5S10) с лигандом в нижних ячейках. Сначала рекомбинантный человеческий ФКН (R&D Systems, Catalog No. 362-CX/CF) (конечная концентрация 33 нг/мл) (Фиг.1) предварительно инкубировали с очищенными антителами при различных концентрациях (от 0 до 10 нг/мл) при комнатной температуре.

Композиция содержала следующие компоненты: 15 мкл/ячейка 10х раствор хемокина; 15 мкл/ячейка 10х очищенные mAb; и 120 мкл/лунка 1х буфера для хемотаксиса (0,5% BSA, 0,5% FBS, 20 мМ HEPES (pH 7,4), 50 мкМ 2-меркаптоэтанол в RPMI1640 (Invitrogen)).

Через 30 минут трансфицированные CX3CR1 клетки B300.19 (2×10^5 клеток/75 мкл) вносили в верхние ячейки и инкубировали в 5% CO₂ инкубаторе при 37°C в течение 4 часов. После инкубации отбирали 150 мкл раствора из нижних ячеек фиксировали 50 мкл 4% PFA/PBS, и 30 мкл образцов использовали в клеточном анализаторе FACSCantoII для подсчета мигрированных клеток.

Анализ BIACORE® выполняли следующим образом. Рекомбинантный протеин-A/G (Pierce Chemical) иммобилизовали на сенсорном чипе BIACORE® (CM5), который предварительно инкубировали с амин-связывающими реагентами (GE Healthcare). Очищенные mAb добавляли в сенсорные чипы с концентрацией 0,2 мкг/мл. Растворимые антигены (растворимый ФКН, конъюгированный с секретированной щелочной фосфатазой (SEAP) или контрольными SEAP протеинами) добавляли в сенсорные чипы при различных концентрациях (от 0 до 200 нМ). Непрерывно отслеживали ассоциацию

добавленных антигенов с mAb, иммобилизованных на сенсорных чипах, относительный ответ связывания антигенов определяли, используя систему BIACORE A100 (GE Healthcare).

ELISA выполняли следующим образом. Поликлональное антитело к IgG кролика (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Catalog No. 711-005-152) наносили в лунки 96-луночной планшеты (Nunc, Catalog No. 442402)). После инкубации в течение ночи при 4°C лунки блокировали 1x Block-Ace (DainipponPharma) в течение 1 часа при комнатной температуре. После трехразовой промывки 0,05% Твин 20/PBS в лунки добавляли 10 нМ кроличьих поликлональных анти-PLAP антител (Biomedica) (50 мкл/лунка). После инкубации в течение 1 часа при комнатной температуре и трех разовой промывке, как описано выше, в лунки добавляли культуральный супернатант, содержащий hФКН-SEAP или яванской макаки ФКН-SEAP (конечная концентрация 1 нМ), и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. После трехразовой промывки очищенные анти-hФКН mAb добавляли в лунки при различных концентрациях (от 0 до 10 мкг/мл). После инкубации в течение 1 часа и трехразовой промывки конъюгированные с пероксидазой хрена антимышинные IgG антитела (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Catalog No. 715-036-151) добавляли с концентрацией 0,16 мкг/мл (50 мкл/лунка) и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. После трехразовой промывки в лунки добавляли раствор ТМВ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) и инкубировали в течение 15-30 минут. В лунки добавляли равный объем останавливающегося раствора (2М H₂SO₄), и регистрировали оптическую плотность при 450 нм считывающим устройством для микропланшетов (Arvo, PerkinElmer).

Растворимый hФКН-SEAP получали следующим образом. кДНК, кодирующую внеклеточную область hФКН, амплифицировали, используя праймер 5'-Sall-hФКН (C GCGTCGACGCCACCATGGCTCCGATATCTCTGTGC; SEQ ID NO:2) и праймер 3'-NotI-hФКН (GCGGGCGGCCGCCCTCCGGGTGGCAGCCTGGG; SEQ ID NO:3), и субклонировали в вектор ркДНК3.1(+dSall SEAP, содержащий кДНК SEAP. Вектор экспрессии hФКН-SEAP трансфицировали в клетки HEK293EBNA (HEK293E) (Invitrogen). Клетки HEK293E инкубировали с DMEM (Invitrogen), дополненной 10% эмбриональной бычьей сывороткой, за день до трансфекции. В день трансфекции среду заменяли на OPTI-MEMII, не содержащую сыворотку (Invitrogen). Вектор экспрессии трансфицировали TransIT LT1 (TAKARA) согласно инструкции изготовителя. После 3-х дневной инкубации (5% CO₂ при 37°C) собирали культуральный супернатант. Концентрацию белка SEAP измеряли, используя набор 2.0 для хемолюминисценции Great EscAPe SEAPSEAP (Clontech).

Растворимый яванской макаки ФКН-SEAP получали следующим образом. кДНК, кодирующую внеклеточную область ФКН яванской макаки, амплифицировали, используя праймер 5'-XhoI-ФКН яванской макаки (GCGCTCGAGGCCACCATGGCTCC GATATCTCTGTCTGTGG; SEQ ID NO:4) и праймер 3'-NotI-ФКН яванской макаки (CGC GGCGGCCGCGGTGGCAGCCTGGGAGTCAGGGAC; SEQ ID NO:5), и субклонировали в рENTR1A (Invitrogen), содержащий кДНК SEAP. Фрагмент, кодирующий ФКН яванской макаки и SEAP, трансфицировали в пкДНК3.1, содержащую кассету В, при помощи системы GATEWAY (Invitrogen). Культуральный супернатант, содержащий яванской макаки ФКН-SEAP, получали, как описано выше.

Пример 3. Клонирование кДНК вариабельных областей тяжелых и легких цепей клона 3A5-2 мышинных анти-hФКН mAb

кДНК тяжелых и легких цепей клона 3A5-2 амплифицировали методом ОТ-ПЦР. Полную РНК выделяли из гибридомы клона 3A5-2, используя мининабор РНКазы

(QIAGEN). При помощи полной РНК синтезировали кДНК, используя набор для синтеза кДНК (TAKARA), и амплифицировали при помощи праймера 5'-Mm-HC-Leader1 (GGG ATGGRATGSAGCTGKGT MATSCTCTT; SEQ ID NO:6), праймера 5'-Mm-HC-Leader2 (GGG ATGGRATGSAGCTGKGT MATSCTCTT; SEQ ID NO:7) или праймера 5'-Mm-HC-Leader3 (GGGATGGCTGTCTTGGGGCTGCTCTTCT; SEQ ID NO:8) и праймера 3'-Mm-IgG2a-CH3-R (TCATTTACCCGGAGTCCGGGAGAAGCTCTTAGTC; SEQ ID NO:9) для тяжелой цепи и праймера 5'-Mm-LC-Leader1 (GGGATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT; SEQ ID NO:10), или праймера 5'-Mm-LC-Leader2 (GGGATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAG; SEQ ID NO:11), или праймера 5'-Mm-LC-Leader3 (GGGATGRAGTCACAKACYC AGGTCTTYRTA; SEQ ID NO:12), или праймера 5'-Mm-LC-Leader4 (GGGATGAGGKCC CCWGCTCAGYTYCTKGGR; SEQ ID NO:13) или праймера 5'-Mm-LC-Leader5 (GGGATGAAGTTGGCTGTTAGGCTGTTG; SEQ ID NO:14), и праймера 3'-Mm-Скappa-R (СТААСАСТСАТТССТГТТГААГСТС; SEQ ID NO:15) для легкой цепи, соответственно. Амплифицированные кДНК субклонировали в вектор pCR2.1 (Invitrogen).

Последовательности анализировали, используя ABI3130XL. Получали тяжелую цепь полной длины и 5'-укороченную версию L цепи. Для амплификации укороченной области L цепи и идентификации точных лидерных последовательностей выполняли 5'-быструю амплификацию концов кДНК (5'-RACE). Двухнитевую кДНК получали, используя набор для синтеза кДНК (TAKARA), и добавляли 5' адаптер (ad29S; ACATCACTCCGT (SEQ ID NO:16) и as29AS; ACGGAGTGATGTCCGTCGACGTATCTCTGCGTTGATACTT CAGCGTAGCT (SEQ ID NO:17), отжигали). кДНК амплифицировали, используя праймер 5'-ПЦР1 (GTATCAACGCAGAGATACGTCGACGG; SEQ ID NO:18) для первой ПЦР и праймер 5'-ПЦР4 (AGCTACGCTGAAGTATCAACGCAGAG; SEQ ID NO:19) для второй ПЦР и 3'HC RACE праймер_1 (GTACGGAGTACTCCAAAAATGTTG; SEQ ID NO:20) для первой ПЦР или 3'HC RACE праймер_2 (TCTTCAGGCTGCAGGCTGATGATC; SEQ ID NO:21) для второй ПЦР для H цепи, 3'LC RACE праймер_3 (AAATCTTCAGGCTGCAGGCTGTTG; SEQ ID NO:22) для первой ПЦР или 3'LC RACE праймер_4 (CTGTTGATCTTGAGAGAATATTGTG; SEQ ID NO:23) для второй ПЦР для L цепи, соответственно. Амплифицированные кДНК субклонировали и секвенировали, как описано выше. Идентифицированные последовательности переменных участков были следующими.

Нуклеотидная последовательность переменного участка тяжелой (H) цепи:

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAG
TGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACAACTACTATATACAC
TGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTATC
CTGGAGATGGTAGTCCTAAGTTCAATGAGAGGTTCAAGGGCAAGACCACACT
GACTGCAGACAAGTCCTCAAACACAGCCTACATGTTGCTCAGCAGCCTGACC
TCTGAAGACTCTGCGATCTATTTCTGTGCAACTGGGCCCCACTGATGGCGACTA
CTTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTCTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO:
24)

Нуклеотидная последовательность переменного участка легкой (L) цепи:

GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAAA
 CTGTCACCATCACATGTCGAGCAAGCGGGAATATTCACAATTTTTTAGCATGG
 TATCAGCAGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGTTCCTGGTCTATAATGAAAAAA
 CCTTAGCAGATGGTGTGCCATCAAGGTTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGAACACA
 ATATTCTCTCAAGATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGATTTATTTCT
 GTCAACAGTTTTTGGAGTACTCCGTATACGTTCCGAGGGGGGGACCAAGCTGGA
 AATAAAA (SEQ ID NO: 25)

Аминокислотная последовательность варибельного участка тяжелой (H) цепи:
 QVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYYIHWVKQRPGQGLEWIGWIYP
 GDGSPKFNERFKGKTTLTADKSSNTAYMLLSSLTSEDSAIYFCATGPTDGDYFDY
 WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 26)

Аминокислотная последовательность варибельного участка легкой (L) цепи:
 DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNFLAWYQQKQKSPQFLVYNEKTLA
 DGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSIQPEDFGIYFCQQFWSTPYTFGGGKLEIK (SEQ
 ID NO: 27)

Пример 4. Конструирование гуманизированных анти-ФКН mAb из клона 3A5-2

Мышиные анти-hФКН mAb, клон 3A5-2, гуманизировали методом, в котором используется привитый гиперварибельный участок (CDR) (Kontermann and Dübel, Antibody Engineering, Springer Lab Manual (2001) and Tsurushita et al., Methods 36:69-83 (2005)). Аминокислотные последовательности CDR были следующими.

CDR-H1: NYYIH (SEQ ID NO:28)

CDR-H2: WIYPGDGSPKFNERFKG (SEQ ID NO:29)

CDR-H3: GPTDGDYFDY (SEQ ID NO:30)

CDR-L1: RASGNIHNFLA (SEQ ID NO:31)

CDR-L2: NEKTLAD (SEQ ID NO:32)

CDR-L3: QQFWSTPYT (SEQ ID NO:33)

Человеческие акцепторные каркасные участки выбирали среди сегментов человеческих варибельных доменов. Идентифицированные CDR 3A5-2 прививали в выбранные человеческие акцепторные каркасные участки. Сконструированные гуманизированные последовательности были следующими.

H цепь (обозначенная как H3: SEQ ID NO:36)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYYIHWVKQAPGQGLEWIGWIYP
 GDGSPKFNERFKGRTTLTADKSTNTAYMLLSSLRSDDTAVYFCATGPTDGDYFD
 YWGQGTITVTVSS

H цепь (обозначенная как H3-2: SEQ ID NO:37)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYYIHWVKQAPGQGLEWIGWIYP
 GDGSPKFNERFKGRTTLTADKSTNTAYMLLSSLRSEDTAVYFCATGPTDGDYFD
 YWGQGTITVTVSS

L цепь (обозначенная как L2; SEQ ID NO:38)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASGNIHNFLAWYQQKPGKAPKFLVYNEKTLA
DGVPSRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYFCQQFWSTPYTFGGGTKVEIK

Н цепь (обозначенная как H4; SEQ ID NO:39)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQGLEWIGWIYP
GDGSPKFNERFKGRITLTRDKSTNTAYMELSSLRSDDTAVYFCATGPTDGDYFD
YWGQGTITVTVSS

Последовательности Нцепи зародышевой линии (SEQ ID NO:40)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTXXXXXWVRQAPGQGLEWMGXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXRVMTMTRDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARXXXXX
XXXXXWGQGTITVTVSS

Последовательности L цепи зародышевой линии (SEQ ID NO:41)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCXXXXXXXXXXXXXWYQQKPGKAPKLLIYXXXX
XXXGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCXXXXXXXXXXFGGGTKVEIK

Н цепь (обозначенная как HK2; SEQ ID NO:42)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQGLEWIGWIYP
GDGSPKFNERFKGRITMTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARGPTDGDYFD
YWGQGTITVTVSS

Н цепь (обозначенная как HK3; SEQ ID NO:43)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQGLEWIGWIYP
GDGSPKFNERFKGRITLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARGPTDGDYFD
YWGQGTITVTVSS

L цепь (обозначенная как L4; SEQ ID NO:44)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASGNIHNFLAWYQQKPGKAPKLLIYNEKTLA
DGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQFWSTPYTFGGGTKVEIK

L цепь (обозначенная как L5; SEQ ID NO:45)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASGNIHNFLAWYQQKPGKAPKLLIYNEKTLA
DGVPSRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYFCQQFWSTPYTFGGGTKVEIK

Все гуманизированные последовательности выровнены (фиг.3 и 4).

Пример 5. Конструирование векторов экспрессии гуманизированного анти-hФКН mAbs

Для выбора лидерных последовательностей для экспрессии гуманизированных mAb, проводили поиск сегментов зародышевой линии, основываясь на подобии AAA68427.1 и ABU90602.1. Сегменты VH1-1-18 и VKI-012 были наиболее близкими к AAA68427.1 и ABU90602.1, соответственно. Их лидерные последовательности использовали для экспрессии гуманизированных mAb. Их лидерные последовательности были следующими.

Аминокислотная последовательность Н цепи (SEQ ID NO:46)

MDWTWSILFLVAAPTGAHS

Нуклеотидные последовательности Н цепи

ATGGACTGGACCTGGAGCATCCTTTTCTTGGTGGCAGCACCAACAGGTGCCCACT
CC (для H3 и H3-2; SEQ ID NO:47)

ATGGACTGGACATGGTCCATCCTGTTTCCTGGTGGCCGCTCCAACTGGCGCACACT
СТ (для НК2 и НК3; SEQ ID NO:48)

Аминокислотная последовательность L цепи (SEQ ID NO:49)

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC

5 Нуклеотидные последовательности L цепи (SEQ ID NO: 50)

ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCTGGCTCCGAG
GTGCCAGATGT

Вариабельные домены сконструированных гуманизированных анти-hФКН mAb,
присоединенные к описанным выше лидерным последовательностям, получали методом

10 ПЦР, используя следующие праймеры.

Для H3 тяжелой цепи

праймер h3A5-2_VH3-1 (SEQ ID NO:51):

ATGGACTGGACCTGGAGCATCCTTTTCTTGGTGGCAGCACCAACAGGTGC

праймер h3A5-2_VH3-2R (SEQ ID NO:52):

15 CCAGACTGCACCAGCTGCACCTGGGAGTGGGCACCTGTTGGTGCTGCCAC

праймер h3A5-2_VH3-3 (SEQ ID NO:53):

GTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGT

праймер h3A5-2_VH3-4R (SEQ ID NO:54):

GTGTATCCAGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGCCCCAGGCTTCTT

20 праймер h3A5-2_VH3-5 (SEQ ID NO:55):

TGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCAACTACTATATACACTGGGTGAA

праймер h3A5-2_VH3-6R (SEQ ID NO:56):

ATCCACTCAAGCCCTTGTCCAGGGGCCTGCTTCACCCAGTGTATATAGTA

праймер h3A5-2_VH3-7 (SEQ ID NO:57):

25 GGACAAGGGCTTGAGTGGATAGGATGGATTTATCCTGGAGATGGTAGTCC

праймер h3A5-2_VH3-8R (SEQ ID NO:58):

GTCTGCCCCTTGAACCTCTCATTGAACTTAGGACTACCATCTCCAGGATA

праймер h3A5-2_VH3-9 (SEQ ID NO: 59):

GAGAGGTTCAAGGGCAGGACCACCCTGACCGCAGACAAGTCCACGAACAC

30 праймер h3A5-2_VH3-1 OR (SEQ ID NO:60):

GATCTCAGGCTGCTCAGCAACATGTAGGCTGTGTTTCGTGGACTTGTCTGC

праймер h3A5-2_VH3-11 (SEQ ID NO:61):

TTGCTGAGCAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTTCTGTGCGAC

праймер h3A5-2_VH3-12R (SEQ ID NO:62):

35 TAGTCAAAGTAGTCGCCATCAGTGGGCCCTGTGCGACAGAAATACACGGC

праймер h3A5-2 VH3-13 (SEQ ID NO:63):

GATGGCGACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC

праймер h3A5-2_R (SEQ ID NO:64):

GACCGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAAGAGACGGTGACCGTGGTCCC

40 Для легкой L2 цепи

праймер h3A5-2_VL2-1 (SEQ ID NO:65):

GCCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCTGGC
TCCGAGGTGCCAGAT

праймер h3A5-2_VL2-2R (SEQ ID NO:66):

45 TCCTACAGATGCAGACAGGGAGGATGGAGACTGGGTCATCTGGATGTCACATCT
GGCACCTCGGAGCCAG

праймер h3A5-2_VL2-3 (SEQ ID NO:67):

CCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGAGCAAGCGGGA

АТАТТCACAATTTTTT

праймер h3A5-2_VL2-4R (SEQ ID NO:68):

GAACCTTAGGGGCTTTCCCTGGTTTCTGTTGATACCATGCTAAAAAATTGTGAATA
TCCCCGCTTGCTCGG

5 праймер h3A5-2_VL2-5 (SEQ ID NO:69):

CAGGGAAAGCCCCTAAGTTCCTGGTCTATAATGAAAAAACCTTAGCAGATGGGG
TCCCATCAAGGTTTCAG

праймер h3A5-2_VL2-6R (SEQ ID NO:70):

10 GTTGCAGACTGCTGATGGTGAGAGTATATTGTGTCCCAGATCCACTGCCACTGAA
CCTTGATGGGACCCC

праймер h3A5-2_VL2-7 (SEQ ID NO:71):

CACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCGACCTACTTCTGTCAACAGTTT
TGGAGTACTCCGTAT

праймер h3A5-2_VL2-8R (SEQ ID NO:72):

15 TTTGATCTCCACCTTGGTCCCTCCGCCGAACGTATACGGAGTACTCCAAAACCTGT
TGACAGAA

праймер h3A5-2_VL-R (SEQ ID NO:73):

GACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTGATCTCCACCTTGGTCCCTCC

Полученные H3 и L2 амплифицировали методом ПЦР, используя праймер 5'-Eco-Sal-
20 h3A5-2_VH_F (GCGAATTCGTCGACGCCACCATGGACTGGACCTGGAGCATCCTTTTC
TTG; SEQ ID NO:74) и 3'-NheI-h3A5-2_VH_R (CGCGCTAGCTGAAGAGACGGTGACCGT
GGTCCC; SEQ ID NO:75) для H3 и праймер 5'-h3A5-2_VL_SalI-kozac_F (GCGGTCGACG
CCACCATGGACATGAGGGTCCCC; SEQ ID NO:76) и праймер 3'-h3A5-2_VL-R (GACA
GATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTGATCTCCACCTTGGTCCCTCC; SEQ ID NO: 77) для
25 L2, соответственно.

H4 получали согласно Genscript USA Inc. Последовательности H4 были следующими.
H4 (SEQ ID NO:78):

GAATTCGTCGACGCCACCATGGACTGGACATGGTCCATCCTGTTCCCTGGTGGC
30 CGCTCCAACCTGGCGCACACTCTCAGGTGCAGCTGGTGCAGAGTGGCGCTGAG
GTGAAGAAACCCGGAGCATCAGTGAAGGTGTCCTGCAAAGCCAGCGGATAC
ACCTTCACCAACTACTATATTCATTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGACAGGGAC
TGGAGTGGATCGGATGGATCTACCCAGGGGACGGTTCCTTAAGTTCAACGA
35 AAGGTTTAAAGGCCGGACCACACTGACCAGGGATAAGTCAACCAATACAGCT
TACATGGAACCTGTCCAGCCTGCGCTCTGACGATACAGCAGTGTATTTCTGTGC
CACTGGGCCAACCGACGGCGACTACTTTGATTATTGGGGCCAGGGAACTACC
40 GTGACCGTGTCTAGTGCTAGC

Вариабельные участки HK2 получали из H4 введением точечных мутаций, используя метод ПЦР со следующими праймерами.

праймер h3A5-2_HKG2_sal24F (SEQ ID NO:79):

45 CGCGTCGACGCCACCATGGACTGGACATGGTCCATCCTG

праймер h3A5-2_HKG2_280F (SEQ ID NO:80):

ATGACCGCCGATACCTCAACCTCCACAGCTTACATGGAA

праймер h3A5-2_HKG2_300R (SEQ ID NO:81):

GGTTGAGGTATCGGCGGTCAATTGTGGTCCG

праймер h3A5-2_HKG2_340F (SEQ ID NO:82):
GAGGATACAGCAGTGTATTTCTGTGCCCCGGGGGCAACC

праймер h3A5-2_HKG2_370R (SEQ ID NO:83):
GGCACAGAAATACACTGCTGTATCCTCAGAGCGCAG

5 праймер h3A5-2_HKG2_Nhe24R (SEQ ID NO:84):
CGCGCTAGCACTAGACACGGTCACGGTAGTTCC

Вариабельные участки НК3 получали из НК2 введением точечных мутаций, используя метод ПЦР со следующими праймерами.

праймер h3A5-2_HKG2_sal24F (SEQ ID NO:85):
10 CGCGTCGACGCCACCATGGACTGGACATGGTCCATCCTG
праймер HKG3_R (SEQ ID NO:86):
TTGACTTATCGGCGGTCACTGTGGTCCGGCCTTTAAACCTTTC

праймер HKG3_F (SEQ ID NO:87):
ACACTGACCGCCGATAAGTCAACCTCCACAGCTTACATGGAA

15 праймер h3A5-2_HKG2_Nhe24R (SEQ ID NO:88):
CGCGCTAGCACTAGACACGGTCACGGTAGTTCC

Вариабельные участки L4 получали из L2 введением точечных мутаций, используя метод ПЦР со следующими праймерами.

праймер h3A5-2_VL4_sal24F (SEQ ID NO:89):
20 CGCGTCGACGCCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAG
праймер h3A5-2_VL4_200R (SEQ ID NO:90):
CAGCAGCTTAGGGGCTTCCCTGGTTTCTG

праймер h3A5-2_VL4_190F (SEQ ID NO:91):
GGGAAAGCCCCTAAGCTGCTGATCTATAATGAAAAA

25 праймер h3A5-2_VL4_260R (SEQ ID NO:92):
TGTCCCAGATCCACTGCCACTGAACCTTGA

праймер h3A5-2_VL4_250F (SEQ ID NO:93):
AGTGGCAGTGGATCTGGGACAGACTATACTCTCACC

праймер h3A5-2_VL4_BsiW24R (SEQ ID NO:94):
30 20 CGCCGTACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCCTCC

Вариабельные участки L5 получали из L4 введением точечных мутаций, используя метод ПЦР со следующими праймерами:

праймер h3A5-2_VL4_sal24F (SEQ ID NO:95):
CGCGTCGACGCCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAG
35 праймер VL5_R (SEQ ID NO:96):
GGTGAGAGTATACTGTGTCCCAGATCCACTGCCACTGAAC

праймер VL5_F (SEQ ID NO:97):
GGATCTGGGACACAGTATACTCTCACCATCAGCAGTCTG

5 h3A5-2_VL4_BsiW24R (SEQ ID NO:98):
40 cgcCGTACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCCTCC

Константные участки IgG2 и IgK амплифицировали, используя праймер 5'-NheI-IgG2_F (CGCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC; SEQ ID NO:99) и праймер 3'-EcoRV-IgG2_R (CGCGATATCTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAG; SEQ ID NO:100) для IgG2 и праймер 5'-BsiWI-Igk_F (CGCCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATC; SEQ ID NO:101) и праймер 3'-EcoRV-Igk_R (CGCGATATCCTAACAACCTCTCCCCTGTTGAAGCT; SEQ ID NO:102) для IgK, соответственно. Амплифицированные константные участки субклонировали в pENTR1A dNotI с удаленным NotI.

Полученные вариабельные участки субклонировали в pENTR1A-IgG2 или pENTR1A-

Igк, используя сайты Sall-NheI для тяжелых цепей или сайты Sall-BsiWI для легких цепей, соответственно. В случае L2, константный участок Igк амплифицировали, используя праймер 5'-hIGKF (CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC; SEQ ID NO:103) и праймер 3'-hIGK_NotI-R (CGCGCGGCCCGCCTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTT; SEQ ID NO:104).

- 5 Амплифицированный константный участок Igк и полученную L2 объединяли методом ПЦР и субклонировали в pENTR1A. Субклонированные варибельные участки и константные участки трансфицировали в pEE6.4 или pEE12.4 (Lonza) для тяжелой цепи и легкой цепи, соответственно, используя систему GATEWAY (Invitrogen).

- 10 НЗ-2 получали введением точечной мутации, используя систему для сайт-направленного мутагенеза GeneTailor из pENTR1A-H3-IgG2 с праймером 5'-h3A5-2_H3-2_300F (TTGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCC; SEQ ID NO: 105) и праймером 3'-h3A5-2_H3-2_320R (AGATCTCAGGCTGCTCAGCAACATGTAGGC; SEQ ID NO:106).

- Сайт-направленный мутагенез GeneTailor выполняли согласно инструкциям производителя. Мутированный участок и константный участок трансфицировали в 15 pEE6.4, как описано выше.

Пример 6. Получение гуманизированных анти-hФКН mAb

- Векторы экспрессии тяжелой и легкой цепей гуманизированного анти-hФКН mAb трансфицировали в клетки HEK293E. В день трансфекции клетки HEK293E инокулировали в DMEM (Invitrogen), дополненную 10% фетальной бычьей сывороткой. 20 После инкубирования в течение 5 часов смесь векторов экспрессии тяжелой и легкой цепей трансфицировали, используя липофектамин 2000 (Invitrogen), согласно инструкциям производителя. На 10 день после трансфекции среду заменяли не содержащей сыворотку средой 293 Serum-Free Media (SFM) II (Invitrogen). После инкубации в течение 5 дней при 37°C собирали культуральный супернатант.

- 25 Для анализа BIACORE использовали непосредственно собранный супернатант. Для анализа хемотаксиса супернатант очищали, используя колонку с сефарозой, содержащей рекомбинатный белок А (Pharmacia).

Пример 7. Получение химерных мышиных-человеческих 3A5-2 mAb

- Варибельные участки тяжелой цепи мышиного 3A5-2 амплифицировали, используя 30 праймер 5'-EcoRI-SalI-3A5-2 VH (GCGGAATTCGTCGACGCCACCATGCGATGGAGCTGGA-TC; SEQ ID NO:107) и 3'-IgG перекрывающий 3A5-2 VH праймер (GACCGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGA CTGTGAGAGTGGTGCC; SEQ ID NO:108).

- Человеческий константный участок IgG2 амплифицировали, используя праймер 5'- 35 hIgG2 (GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTG; SEQ ID NO:109) и праймер 3'-NotI-hIgG2 (CGCGCGGCCGCTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAG; SEQ ID NO:110).

- Амплифицированные 3A5-2 VH и человеческий константный участок IgG2 объединяли при помощи метода ПЦР и субклонировали в pCX-IRES-bsr, которая содержала 40 устойчивый к бластицидину ген, для отбора клеток.

- Варибельный участок легкой цепи мышиного 3A5-2 амплифицировали, используя праймер 5'-3A_VL-SalI-kozac_F (GCGGTGACGCCACCATGAGTGTGCTCACTCAG; SEQ ID NO:111) и праймер 3'-3A-IgG1,2_VH-R (GACAGATGGTGCAGCCACAGTTTCGTTT TTTCCAGCTTGGTCCCCCT; SEQ ID NO:112). Человеческий константный участок Igк 45 амплифицировали, используя праймер 5'-hIGK_F (CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC; SEQ ID NO:113) и праймер 3'-hIGK_NotI-R (CGCGCGGCCCGCCTAACACTCTCCCCTGTT GAAGCTCTT; SEQ ID NO:114). Амплифицированные 3A5-2 VH и человеческий константный участок IgG2 объединяли при помощи метода ПЦР и субклонировали в

pMX-IRES-puro, которая содержала ген устойчивости к пуромицину, для отбора клеток.

Вектор экспрессии химерной легкой цепи трансфицировали в клетки HEK293E, используя pE-Eco и pGp (TAKARA) для сборки ретровируса. Клетки HEK293E инокулировали в DMEM (Invitrogen), дополненную 10% FBS, за день до трансфекции.

5 В день трансфекции векторы трансфицировали, используя TranIT LT1 (TAKARA). После инкубации в течение 3 дней собирали культуральный супернатант, содержащий ретровирус, и добавляли к клеткам В300.19. После инкубации в течение 8 дней культуральный супернатант удаляли и добавляли RPMI1640 (Invitrogen), содержащую 10% FBS. После культивирования в течение 2 дней добавляли пуромицин для отбора
10 инфицированных клеток. Затем отобранные клетки инфицировали другим рекомбинантным ретровирусом, несущим химерную тяжелую цепь, которую получали методом, аналогичным описанному для легкой цепи. После отбора по устойчивости к бластицидину дважды отобранные клетки культивировали с SF-O (Sanko Junyaku), содержащей 8 мМ глутамакса, 55 мкМ 2-меркаптоэтанола, 1х холестерина (Invitrogen),
15 в Integra CELLLine (Integra Bioscience).

Культуральный супернатант очищали, используя колонку с сефарозой, содержащей рекомбинантный белок А (Pharmacia) для использования в анализе хемотаксиса и анализе BIACORE.

Пример 8. Анализ гуманизированных анти- $\text{h}\Phi\text{KH}$ mAb

20 Гуманизированные анти- $\text{h}\Phi\text{KH}$ mAb анализировали при помощи анализа хемотаксиса для измерения нейтрализующей активности и анализа BIACORE® для измерения аффинности связывания $\text{h}\Phi\text{KH}$ и ΦKH яванской макаки. Репрезентативные данные и результаты трех независимых анализов хемотаксиса суммированы на Фиг.5 и показаны на Фиг.6А-В, 7А-Д и 8А-Е. Все комбинации НЗ и НЗ-2 для тяжелой цепи с L2 и L4 для
25 легкой цепи были успешно гуманизированы в виде этих mAb, демонстрировали аналогичную нейтрализующую активность с химерным mAb. Однако НК2, который был получен путем использования более узкого диапазона ключевых остатков, продемонстрировал пониженную нейтрализующую активность в комбинации с L2 или L4. Результаты анализа BIACORE® суммированы на фиг.9 и 10А-С. Все комбинации
30 НЗ и НЗ-2 для тяжелой цепи с L2 и L4 для легкой цепи показали аналогичные уровни аффинности по сравнению с химерным mAb. С одной стороны, НК2L4 продемонстрировал более низкую аффинность, чем другие. Эти результаты подтверждают, что 3А5-2 не может быть успешно гуманизирован обычным способом
35 путем использования обычной идентификации ключевых остатков, особенно в случае тяжелой цепи.

Анализ хемотаксиса выполняли следующим образом. Клетки помещали в верхние лунки культуральной планшеты Трансвелл (MultiScreen-MIC Plate, 5,0 мкм, Millipore, Catalog No. 10 MAMIC 5S10) с лигандом в нижних лунках. Сначала в нижние лунки добавляли систему с рекомбинантными человеческими ΦKH (R&D Systems, Catalog No.
40 362-CX/CF) (конечная концентрация 10 нг/мл) очищенными антителами с разными концентрациями (от 0 до 10 нг/мл). Композиции содержали следующие компоненты: 3х раствор хемокина, 50 мкл/лунка; 1,5х очищенные mAb, 100 мкл/лунка; хемокин и очищенные антитела разбавляли 1х буфером для хемотаксиса (описан выше). В верхние
45 лунки вносили трансфицированные CX3CR1 клетки В300.19 (2×10^5 клеток/75 мкл) вместе с очищенными антителами при разных концентрациях (от 0 до 10 мкг/мл). Композиции содержали следующие компоненты: 3х клеточной суспензии, 25 мкл/лунка; 1,5х раствор очищенных mAb, 50 мкл/лунка; клетки и очищенные антитела разбавляли 1х буфером для хемотаксиса. Анализ хемотаксиса выполняли в 5%-CO₂ инкубаторе при 37°C в

течение 4 часов. После инкубации собирали 150 мкл из нижних лунок, фиксировали 50 мкл 4% PFA/PBS и образцы по 30 мкл использовали в клеточном анализаторе FACSCantoII для подсчета мигрированных клеток.

Анализ BIACORE® выполняли описанным выше способом. Однако для гуманизированных и химерных mAb использовали анти-человеческих IgG мышинных mAb (GE Healthcare) в качестве иммобилизованного на сенсорном чипе антитела.

Пример 9. Картирование эпитопа при помощи синтетических пептидов из домена хемокина ФКН

Картирование эпитопа выполняли, используя библиотеки перекрывающихся синтетических пептидов из домена хемокина ФКН. Двадцать один вид пептидов, состоящих из 15 остатков, синтезировали методом Sigma Genosys. Пептиды растворяли до 10 мг/мл, используя ДМСО. Эти пептиды (50 мкг/мл) наносили на планшету ELISA (Nunc) и оставляли на ночь при 4°C. Растворы пептидов удаляли, и в каждую лунку добавляли раствор PBS, содержащий 1% BlockAce (Dainippon Pharma), инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре и промывали забуференным Трис физраствором (pH 7,4), содержащим 0,05% Твин 20 (раствор для промывки). В лунки добавляли раствор антител H3-10 2L4 (50 мкг/мл) и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. Раствор антител удаляли и промывали раствором для промывки. В лунки добавляли раствор античеловеческих IgG антител, меченных пероксидазой (Zymed; 400 нг/мл), и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Раствор антител удаляли и промывали раствором для промывки. В каждую лунку добавляли раствор TMBZ (Sigma) и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре. Реакцию останавливали 1н раствором H₂SO₄ и измеряли абсорбцию при 450-650 нм.

Результаты показаны на фиг.11. Антитела H3-2L4 реагировали с пептидами из N-терминального и среднего участков человеческого ФКН.

Пример 10. Получение мутантов с аланиновой или сериновой заменой

Мутантов hФКН-SEAP с аланиновой или сериновой заменой получали следующим образом.

кДНК, кодирующую внеклеточный участок ФКН, выделяли из вектора экспрессии hФКН-SEAP, pcDNA3.1(+)-hFKN-SEAP, используя ферменты рестрикции Sall/NotI, и субклонировали в вектор pENTR1A_dSEAP-(His)10, содержащий кДНК SEAP (pENTR1A приобрели у компании Invitrogen). Мутантов с аланиновой или сериновой заменой индуцировали, используя систему сайт-направленного мутагенеза GeneTailor (Invitrogen) согласно инструкциям производителя. Фрагменты кДНК hFKN-SEAP с индуцированной мутацией трансфицировали в вектор pcDNA3.1(+)-cassette B (кассету B приобрели у компании Invitrogen), используя систему Gateway (Invitrogen). Векторы экспрессии мутантов hFKN-SEAP с аланиновой или сериновой заменой трансфицировали в клетки HEK293EBNA (HEK293E) (Invitrogen). Клетки HEK293E инокулировали в DMEM (Invitrogen), дополненную 10% фетальной бычьей сывороткой, за день перед трансфекцией. Вектор экспрессии трансфицировали, используя TransIT LT1 (Takara), согласно инструкциям производителя. Через три дня инкубации (5% CO₂ при 37°C) собирали культуральный супернатант. Концентрацию белков SEAP измеряли при помощи набора 2.0 хемилюминесценции Great EscAPe SEAP (Clontech).

Пример 11. ELISA для картирования эпитопа hФКН

Во все лунки планшеты ELISA (Nunc) наносили анти-hФКН поликлональное антитело (eBioscience) и H3-2L4 и оставляли на ночь при 4°C. Из каждой лунки удаляли раствор антитела и добавляли PBS, содержащий 1% бычий сывороточный альбумин и

инкубировали в течение 1 при комнатной температуре, затем промывали забуференным Трис физраствором (pH 7,4), содержащим 0,05% Твин 20 (раствор для промывки). Мутанты с аланиновой или сериновой заменой разбавляли до 0,13 нМ средой PBS, содержащей 1% BSA, и 50 мкл аликвоты добавляли в лунки планшеты ELISA и инкубировали в течение 4 часов при комнатной температуре. Растворы мутантов удаляли, промывали раствором для промывки. Раствор п-нитрофенилфосфата (Thermo Scientific) добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Реакцию останавливали раствором 1н NaOH и измеряли абсорбцию при 405 нм. Результаты показаны на фиг.12. Мутант R68A потерял специфическую реактивность с H3-2L4. Другие мутанты, которые потеряли реактивность с H3-2L4, также потеряли реактивность с поликлональным антителом. Эти результаты демонстрируют, что R68 является критическим эпитопом H3-2L4.

Пример 12. Картирование эпитопа hФКН при помощи BIACORE®

Антитело к гистидину-таг (Bethyl) иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 (GE Healthcare). Чип загружали растворами мутантов с аланиновой или сериновой заменой, разбавленными в 10 раз буфером HBS-EP (GE Healthcare), промывали HBS-EP и измеряли уровень связывания антигена. Раствор H3-2L4 и анти-ФКН поликлональных антител загружали в чип со связанными антигенами, промывали HBS-EP и измеряли уровень связывания антитела. Вычисляли [уровень связывания антитела/уровень связывания антигена] и значения, вычисленные для каждого мутанта, сравнивали со значением, полученным для дикого типа. Результаты показаны на фиг.13.

Пример 13. Реактивность других антител с мутантом R68A

Мышинные античеловеческие ФКН моноклональные антитела (1F3, 1G1, 2B2, 3D5, 6D1, 7F6) и антитело H3-2L4 наносили на планшеты ELISA (Nunc) и оставляли на всю ночь при 4°C. Растворы антител удаляли. В каждую лунку добавляли раствор PBS, содержащий 1% BSA, и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре, лунки промывали забуференным Трис физраствором (pH 7,4), содержащим 0,05% Твин 20. Раствор антител R68A-мутированные FKN-SEAP-His и дикого типа (1, 0,5, 0,25, 0,125 нМ) добавляли в лунки и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. Раствор антигена удаляли и промывали раствором для промывки. В каждую лунку добавляли раствор п-нитрофенилфосфата (Thermo Scientific) и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Реакцию останавливали 1н раствором NaOH и измеряли абсорбцию при 405 нм.

Нейтрализующую активность этих антител тестировали описанным выше анализом хемотаксиса. 10 нМ человеческие ФКН и различные концентрации этих антител добавляли в нижние лунки планшеты Трансвелл. В верхние лунки планшеты добавляли клетки, экспрессирующие CX3CR1. После инкубации в течение 4 часов при 37°C среду из нижних клеток извлекали и клетки фиксировали 4% раствором формальдегида. Количество клеток вычисляли при помощи анализатора FACS. Отношение между нейтрализующей активностью и реактивностью с мутантом R68A показано в таблице 1. Антитела, сильно нейтрализующие активность СТХ, теряли реактивность с мутантом R68A. Эти результаты демонстрируют, что R68 человеческого ФКН является ключевым сайтом узнавания для антител, которые могут эффективно нейтрализовать функцию ФКН.

Таблица 1

Отношение между связыванием мутанта R68A и нейтрализующей активности		
Антитело	R68A/дикий тип (%)	СТХ (IC50, нМ)

1F3	131	12,7
1G1	39	80<
2B2	51	80<
3D5	0	4,09
3H7	0	19,1
6D1	58	80<
7F6	56	80<
H3-2L4	0	0,2

Пример 14. Картирование эпитопа hФКН методом ЯМР

Очистка Fab от антител H3-2L4

100 мг раствора очищенных антител H3-2L4 (20 мг/мл раствор PBS) диализовали против 0,1М фосфатного буфера (pH 7,0), содержащего 2 мМ ЭДТА. Концентрацию антитела довели до 15 мг/мл диализным буфером и добавляли 30 мМ цистеина. К раствору антител добавляли 0,2 мг папаина (Sigma) и инкубировали в течение 14 часов при 37°C. К этому раствору добавляли иодоацетамил для остановки ферментативной реакции. Раствор антитела, расщепленного папаином, диализовали против раствора PBS в течение ночи при 37°C. Раствор наносили на колонку ProSep vA (Millipore) и собирали проточную фракцию. Эту проточную фракцию наносили на колонку с иммобилизованным античеловеческим IgG Fc антителом (Jackson ImmunoResearch Laboratories) и собирали проточную фракцию. Эту проточную фракцию концентрировали и наносили на Superose 12 10/300 GL (GE Healthcare), и собирали фракции, содержащие фрагмент Fab. Чистоту этих фракций анализировали, используя SDS PAGE, и объединяли фракции доминантных Fab.

Идентификация Fab-связывающего сайта на фракталкине

Для идентификации сайта связывания Fab на фракталкине получали фракталкин, меченный стабильными изотопами (^2H , ^{15}N и ^2H , ^{13}C , ^{15}N) (Mizoue, L et al., Biochemistry, 38: 1402-1414 (1999)), и выполняли ЯМР эксперимент по наблюдению ^{15}N гетероядерной одноквантовой когерентности (^{15}N -Heteronuclear Single Quantum Coherence) (HSQC). ЯМР образцы получали в 20 мМ ацетатном буфере (pH 5,0) и 80% D₂O (эксперимент кросс-насыщения) или 5% D₂O (другие эксперименты). Все ЯМР эксперименты выполняли на спектрометре 700 MHz Bruker Avance, оборудованном криогенным зондом, при температуре 45°C.

Добавление немеченного Fab индуцировало спектральное изменение фракталкина, указывая на взаимодействие между меченым фракталкином и Fab. Последующее выделение ^{15}N and $^1\text{H}_\text{N}$ основной цепи фракталкина в комплексе с Fab получали из 3D спектра FFNCA.

Эксперимент кросс-насыщения является одним из наиболее точных ЯМР методов для определения связывающей области контакта взаимодействия белок-белок (Takahashi, H et al., Nat. Struct. Mol. Biol., 7: 220-223 (2000)). В результате этого эксперимента интенсивность сигналов нескольких остатков уменьшилась за счет селективного излучения Fab (фиг.14). Эти остатки были локализованы в двух отдельных смежных участках. Один участок состоит из E66-Q69, а другой участок состоит из W81-Q87. Более того, на химические сдвиги этих остатков сильное влияние оказывает добавление Fab, что подтверждает данные кросс-насыщения (фиг.14). На основании этих результатов было сделано заключение, что эти участки включены в область контакта с Fab.

Другие варианты осуществления

Из вышеприведенного описания очевидно, что в раскрытом здесь изобретении могут

быть сделаны изменения и модификации с целью его адаптации к различным применениям и условиям. Такие варианты осуществления также входят в объем приведенной ниже формулы изобретения.

Все упомянутые в настоящем описании публикации включены здесь путем ссылки, как если бы в отношении каждой из этих публикаций или заявки на патент было специально и особо указано, что она включена в настоящее описание во всей своей полноте путем ссылки.

Формула изобретения

1. Антитело против фракталкина или его фракталкин-связывающий фрагмент, где антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, причем переменный домен тяжелой цепи указанного антитела или фракталкин-связывающего фрагмента содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO: 37, причем переменный домен легкой цепи указанного антитела или фракталкин-связывающего фрагмента содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 44.

2. Антитело против фракталкина или его фракталкин-связывающий фрагмент по п.1, где указанное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, причем переменный домен тяжелой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и причем переменный домен легкой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38.

3. Антитело против фракталкина или его фракталкин-связывающий фрагмент по п.1, где антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, причем переменный домен тяжелой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и причем переменный домен легкой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38.

4. Антитело против фракталкина или его фракталкин-связывающий фрагмент по п.1, где антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, причем переменный домен тяжелой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и причем переменный домен легкой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44.

5. Антитело против фракталкина или его фракталкин-связывающий фрагмент по п.1, где антитело или его фрагмент содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44.

6. Антитело против фракталкина или его фракталкин-связывающий фрагмент по п.1, содержащее человеческий константный участок.

7. Антитело или его фракталкин-связывающий фрагмент по п.6, содержащее константный участок изотипа IgG.

8. Антитело или его фракталкин-связывающий фрагмент по п.7, содержащее константный участок изотипа IgG2.

9. Антитело или его фракталкин-связывающий фрагмент по любому из пп.1-8, содержащее мутированный Fc участок так, что указанное антитело обладает пониженной способностью к активации ADCC и/или комплемента.

10. Антитело или его фракталкин-связывающий фрагмент по п.9, в котором Fc участок является мутированным по одному или более из: V234, G237, C131 или C219.

11. Антитело или его фракталкин-связывающий фрагмент по любому из пп.1-8, где фракталкин-связывающий фрагмент выбирают из группы, состоящей из: Fab, Fab', F

(ab')₂ и Fv, и где указанный фракталкин-связывающий фрагмент сохраняет специфичность связывания с фракталкином.

12. Антитело или его фракталкин-связывающий фрагмент по любому из пп.1-8, где указанное антитело ингибирует связывание между фракталкином и CX3CR1.

5 13. Применение антитела против фракталкина или его фракталкин-связывающего фрагмента по любому из пп.1-12 для лечения воспалительного нарушения, где указанное воспалительное нарушение представляет собой язвенный колит, болезнь Крона или ревматоидный артрит.

10 14. Фармацевтическая композиция для лечения воспалительного нарушения, где указанное воспалительное нарушение представляет собой язвенный колит, болезнь Крона или ревматоидный артрит, содержащая эффективное количество антитела или его фракталкин-связывающий фрагмент по любому из пп.1-12.

15 15. Фармацевтическая композиция по п.14, где указанная композиция дополнительно содержит носитель.

16. Фармацевтическая композиция по п.14 или 15, где указанная композиция также содержит дополнительный терапевтический агент.

17. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело против фракталкина или его фракталкин-связывающий фрагмент по любому одному из пп.1-12.

18. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п.17.

20 19. Клетка-хозяин для продуцирования антитела против фракталкина или его фракталкин-связывающего фрагмента по любому одному из пп.1-12, содержащая вектор по п.18.

20. Клетка-хозяин по п.19, где указанная клетка-хозяин является прокариотической.

21. Клетка-хозяин по п.19, где указанная клетка-хозяин является эукариотической.

25 22. Клетка-хозяин по п.21, где указанная клетка-хозяин является клеткой млекопитающего.

23. Клетка-хозяин по п.22, где указанная клетка-хозяин представляет собой СНО клетку или NS0 клетку.

30 24. Способ получения антитела против фракталкина или его фракталкин-связывающего фрагмента по любому из пп.1-12, содержащий: (а) экспрессию вектора по п.18 в подходящей клетке-хозяине и (b) выделение антитела или его фракталкин-связывающего фрагмента.

25. Способ по п.24, в котором указанное антитело или его фракталкин-связывающий фрагмент секретируется указанной клеткой-хозяином в культуральную среду.

35 26. Способ по п.25, в котором указанное антитело или его фракталкин-связывающий фрагмент очищают до по меньшей мере 95% или более от указанной содержащей антитело культуральной среды.

40 27. Способ лечения воспалительного нарушения, содержащий введение эффективного количества антитела против фракталкина или его фракталкин-связывающего фрагмента по любому из пп.1-12 нуждающемуся в таком лечении субъекту для излечения таким образом воспалительного нарушения, где указанное воспалительное нарушение представляет собой язвенный колит, болезнь Крона или ревматоидный артрит.

45 28. Применение антитела против фракталкина или его фракталкин-связывающего фрагмента по любому из пп.1-12 для получения лекарственного средства для лечения воспалительного нарушения, где указанное воспалительное нарушение представляет собой язвенный колит, болезнь Крона или ревматоидный артрит.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD.
 <120> КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ
 <130> 50549/006001
 <150> 61/256,521
 <151> 2009-10-30
 <160> 135
 <170> PatentIn version 3.5

 <210> 1
 <211> 397
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 1

 Met Ala Pro Ile Ser Leu Ser Trp Leu Leu Arg Leu Ala Thr Phe Cys
 1 5 10 15

 His Leu Thr Val Leu Leu Ala Gly Gln His His Gly Val Thr Lys Cys
 20 25 30

 Asn Ile Thr Cys Ser Lys Met Thr Ser Lys Ile Pro Val Ala Leu Leu
 35 40 45

 Ile His Tyr Gln Gln Asn Gln Ala Ser Cys Gly Lys Arg Ala Ile Ile
 50 55 60

 Leu Glu Thr Arg Gln His Arg Leu Phe Cys Ala Asp Pro Lys Glu Gln
 65 70 75 80

 Trp Val Lys Asp Ala Met Gln His Leu Asp Arg Gln Ala Ala Ala Leu
 85 90 95

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

 Arg Thr Thr Pro Ala Ala Gly Gly Met Asp Glu Ser Val Val Leu Glu
 115 120 125

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

 Gln Glu Ala Gln Arg Ala Leu Gly Thr Ser Pro Glu Leu Pro Thr Gly
 145 150 155 160

RU 2 569 109 C2

Val Thr Gly Ser Ser Gly Thr Arg Leu Pro Pro Thr Pro Lys Ala Gln
165 170 175

Asp Gly Gly Pro Val Gly Thr Glu Leu Phe Arg Val Pro Pro Val Ser
180 185 190

Thr Ala Ala Thr Trp Gln Ser Ser Ala Pro His Gln Pro Gly Pro Ser
195 200 205

Leu Trp Ala Glu Ala Lys Thr Ser Glu Ala Pro Ser Thr Gln Asp Pro
210 215 220

Ser Thr Gln Ala Ser Thr Ala Ser Ser Pro Ala Pro Glu Glu Asn Ala
225 230 235 240

Pro Ser Glu Gly Gln Arg Val Trp Gly Gln Gly Gln Ser Pro Arg Pro
245 250 255

Glu Asn Ser Leu Glu Arg Glu Glu Met Gly Pro Val Pro Ala His Thr
260 265 270

Asp Ala Phe Gln Asp Trp Gly Pro Gly Ser Met Ala His Val Ser Val
275 280 285

Val Pro Val Ser Ser Glu Gly Thr Pro Ser Arg Glu Pro Val Ala Ser
290 295 300

Gly Ser Trp Thr Pro Lys Ala Glu Glu Pro Ile His Ala Thr Met Asp
305 310 315 320

Pro Gln Arg Leu Gly Val Leu Ile Thr Pro Val Pro Asp Ala Gln Ala
325 330 335

Ala Thr Arg Arg Gln Ala Val Gly Leu Leu Ala Phe Leu Gly Leu Leu
340 345 350

Phe Cys Leu Gly Val Ala Met Phe Thr Tyr Gln Ser Leu Gln Gly Cys
355 360 365

Pro Arg Lys Met Ala Gly Glu Met Ala Glu Gly Leu Arg Tyr Ile Pro
370 375 380

Arg Ser Cys Gly Ser Asn Ser Tyr Val Leu Val Pro Val
385 390 395

<210> 2
<211> 35
<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер
 <400> 2
 cgcgtcgacg ccaccatggc tccgatatct ctgtc 35
 <210> 3
 <211> 32
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер
 <400> 3
 gcgggcggcc gccctccggg tggcagcctg gg 32
 <210> 4
 <211> 39
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер
 <400> 4
 gcgctcgagg ccaccatggc tccgatatct ctgtcgtgg 39
 <210> 5
 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер
 <400> 5
 cgcggcggcc gcggtggcag cctgggagtc agggac 36
 <210> 6
 <211> 29
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер
 <400> 6
 gggatggrat gsagctgkgt matsctctt 29
 <210> 7
 <211> 29
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер
 <400> 7
 gggatgract tcgggytgag ctkggtttt 29

<210> 8
 <211> 28
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер
 <400> 8
 gggatggctg tcttggggct gctctttct 28

<210> 9
 <211> 34
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер
 <400> 9
 tcatttaccc ggagtcggg agaagctctt agtc 34

<210> 10
 <211> 28
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер
 <400> 10
 gggatggaga cagacacact cctgctat 28

<210> 11
 <211> 29
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер
 <400> 11
 gggatggatt ttcaggtgca gattttcag 29

<210> 12
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

<400> 12	
gggatgragt cacakacyca ggtcttyrta	30
<210> 13	
<211> 30	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер	
<400> 13	
gggatgaggk ccccgctca gtyctkggr	30
<210> 14	
<211> 27	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер	
<400> 14	
gggatgaagt tggctgtag gctgttg	27
<210> 15	
<211> 25	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер	
<400> 15	
стааастса ттсстгтга агсгс	25
<210> 16	
<211> 12	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид	
<400> 16	
ааааастсс гт	12
<210> 17	
<211> 50	
<212> ДНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид	
<400> 17	

acggagtgat gtccgtcgac gtatctctgc gttgatactt cagcgtagct 50

<210> 18
 <211> 26
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

<400> 18
 gtatcaacgc agagatacgt cgacgg 26

<210> 19
 <211> 26
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

<400> 19
 agctacgctg aagtatcaac gcaag 26

<210> 20
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

<400> 20
 gtacggagta ctccaataat gttg 24

<210> 21
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

<400> 21
 tcttcaggct gcaggctgat gatc 24

<210> 22
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

<400> 22
 aaatcttcag gctgcaggct gttg 24

<210> 23
 <211> 25
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

<400> 23

ctgttgatct tgagagaata ttgtg 25

<210> 24
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

<400> 24

caggtccagc tgcagcagtc tggacctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttctggcta caccttcaca aactactata tacactgggt gaagcagagg 120

cctggacagg gacttgagtg gattggatgg atttattcctg gagatggtag tcctaagttc 180

aatgagaggt tcaagggcaa gaccacactg actgcagaca agtcctcaaa cacagcctac 240

atgttgctca gcagcctgac ctctgaagac tctgcgatct atttctgtgc aactgggccc 300

actgatggcg actactttga ctactggggc cagggcacca ctctcacagt ctctca 357

<210> 25
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

<400> 25

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 60

atcacatgtc gagcaagcgg gaatattcac aatttttttag catgggtatca gcagaaacag 120

ggaaaatctc ctcagttcct ggtctataat gaaaaaacct tagcagatgg tgtgccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc aggaacacaa tattctctca agatcaacag cctgcagcct 240

gaagattttg ggatttattt ctgtcaacag ttttgagta ctccgtatac gttcggaggg 300

gggaccaagc tggaataaaa a 321

<210> 26
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 26

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

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

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

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

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

Met Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Thr Gly Pro Thr Asp Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 27

<211> 107

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 27

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Phe
 20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 28

Asn Tyr Tyr Ile His
1 5

<210> 29

<211> 17

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 29

Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Pro Lys Phe Asn Glu Arg Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 30

Gly Pro Thr Asp Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 31

Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Phe Leu Ala
 1 5 10

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 32

Asn Glu Lys Thr Leu Ala Asp
 1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 33

Gln Gln Phe Trp Ser Thr Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 34

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Gln Val Lys Leu Leu Glu 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 Gly His
 20 25 30

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

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

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

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

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

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 35
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

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 Asn Ile Asp Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 36
<211> 119
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 36

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 Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Thr Gly Pro Thr Asp Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 37

<211> 119

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 37

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 Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Thr Gly Pro Thr Asp Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 38

<211> 107

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 38

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 Gly Asn Ile His Asn Phe
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 39

<211> 119

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 39

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 Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Thr Gly Pro Thr Asp Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 40

<211> 119

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<220>

<221> MOD_RES

<222> (31)..(35)

<223> Любая аминокислота

<220>

<221> MOD_RES

<222> (50)..(66)

<223> Любая аминокислота

<220>

<221> MOD_RES

<222> (99)..(108)

<223> Любая аминокислота

<400> 40

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 Xaa Xaa
20 25 30

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

Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50 55 60

Xaa Xaa Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr 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 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 41

<211> 107

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<220>

<221> MOD_RES

<222> (24)..(34)

<223> Любая аминокислота

<220>

<221> MOD_RES

<222> (50)..(56)

<223> Любая аминокислота

<220>

<221> MOD_RES

<222> (89)..(97)

<223> Любая аминокислота

<400> 41

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 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

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

Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85 90 95

Xaa Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 42

<211> 119

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 42

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 Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 43

<211> 119

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 43

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

RU 2 569 109 C2

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

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

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

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

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

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

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 44

<211> 107

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 44

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 Gly Asn Ile His Asn Phe
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 45

<211> 107

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид

<400> 45

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 Gly Asn Ile His Asn Phe
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 46

<211> 19

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 46

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

Ala His Ser

<210> 47

<211> 57

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид

<400> 47
atggactgga cctggagcat ccttttcttg gtggcagcac caacaggtgc ccactcc 57

<210> 48
<211> 57
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид

<400> 48
atggactgga catggtccat cctgttcctg gtggccgctc caactggcgc acactct 57

<210> 49
<211> 22
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

<400> 49

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys
20

<210> 50
<211> 66
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический олигонуклеотид

<400> 50
atggacatga ggggtcccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60
agatgt 66

<210> 51
<211> 50
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

<400> 51
 atggactgga cctggagcat ccttttcttg gtggcagcac caacaggtgc 50

<210> 52
 <211> 50
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

<400> 52
 ccagactgca ccagctgcac ctgggagtgg gcacctgttg gtgctgccac 50

<210> 53
 <211> 50
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

<400> 53
 gtgcagctgg tgcagtctgg ggctgaggtg aagaagcctg ggcctcagt 50

<210> 54
 <211> 50
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

<400> 54
 gtgtatccag aagccttgca ggagaccttc actgaggccc caggcttctt 50

<210> 55
 <211> 50
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

<400> 55
 tgcaaggctt ctggatacac cttcassaac tactatatac actgggtgaa 50

<210> 56
 <211> 50
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

<400> 56
 atccactcaa gcccttgctc aggggcctgc ttcacccagt gtatatagta 50

<210> 57
 <211> 50
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

 <400> 57
 ggacaagggc ttgagtggat aggatggatt taccctggag atggtagtcc 50

 <210> 58
 <211> 50
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

 <400> 58
 gtccctgcct tgaacctctc attgaactta ggactaccat ctccaggata 50

 <210> 59
 <211> 50
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

 <400> 59
 gagaggttca agggcaggac caccctgacc gcagacaagt ccacgaacac 50

 <210> 60
 <211> 50
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

 <400> 60
 gatctcaggc tgctcagca catgtaggct gtgttcgtgg acttgtctgc 50

 <210> 61
 <211> 50
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

 <400> 61
 ttgctgagca gcctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt tctgtgacac 50

 <210> 62

<211> 50
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

 <400> 62
 tagtcaaagt agtcgscatc agtgggscct gtcgscacaga aatacacggc 50

 <210> 63
 <211> 50
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

 <400> 63
 gatggcgact actttgacta ctggggssaa gggaccacgg tcaccgtctc 50

 <210> 64
 <211> 48
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

 <400> 64
 gaccgatggg cccttggtgg aggctgaaga gacggtgacc gtggtccc 48

 <210> 65
 <211> 70
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

 <400> 65
 gccaccatgg acatgagggt ccccgctcag ctctggggc tctgtctact ctggctccga 60
 ggtgccagat 70

 <210> 66
 <211> 70
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

 <400> 66
 tcctacagat gcagacaggg aggatggaga ctgggtcatc tggatgtcac atctggcacc 60
 tcggagccag 70

<210> 67
 <211> 70
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

 <400> 67
 ccctgtctgc atctgtagga gacagagtca ccatcacttg ccgagcaagc gggaaatattc 60
 acaattttttt 70

 <210> 68
 <211> 70
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

 <400> 68
 gaacttaggg gctttccctg gtttctgttg ataccatgct aaaaaattgt gaatattccc 60
 gcttgctcgg 70

 <210> 69
 <211> 70
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

 <400> 69
 cagggaaagc ccctaagttc ctggtctata atgaaaaaac cttagcagat ggggtcccat 60
 caagggttcag 70

 <210> 70
 <211> 70
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

 <400> 70
 gttgcagact gctgatggtg agagtatatt gtgtcccaga tccactgcca ctgaaccttg 60
 atgggacccc 70

 <210> 71
 <211> 70
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

<400> 71
caccatcagc agtctgcaac ctgaagattt tgcgacctac ttctgtcaac agttttggag 60
tactccgtat 70

<210> 72
<211> 63
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

<400> 72
tttgatctcc accttggtcc ctccgccgaa cgtatacggg gtactccaaa actgttgaca 60
gaa 63

<210> 73
<211> 48
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

<400> 73
gacagatggg gcagccacag ttcgtttgat ctccaccttg gtccctcc 48

<210> 74
<211> 50
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

<400> 74
gcgaattcgt gcagccacc atggactgga cctggagcat ccttttcttg 50

<210> 75
<211> 33
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

<400> 75
cgcgctagct gaagagacgg tgaccgtggg ccc 33

<210> 76
<211> 33
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

<400> 76
gcggtcgcacg ccaccatgga catgagggtc ccc 33

<210> 77
<211> 48
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

<400> 77
gacagatggg gcagccacag ttcgtttgat ctccacctg gtccctcc 48

<210> 78
<211> 438
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический полинуклеотид

<400> 78
gaattcgtcg acgccaccat ggactggaca tggccatcc tgttcctggg gcccgctcca 60
actggcgcac actctcaggt gcagctgggtg cagagtggcg ctgaggtgaa gaaacccgga 120
gcatcagtga aggtgtcctg caaagccagc ggatacacct tcaccaacta ctatattcat 180
tgggtgaggg aggctcctgg acagggactg gagtggatcg gatggatcta cccagggggac 240
ggttcccta agttcaacga aaggtttaaa ggccggacca cactgaccag ggataagtca 300
accaatacag cttacatgga actgtccagc ctgcgctctg acgatacagc agtgtatttc 360
tgtgccactg ggccaaccga cggcgactac ttgattatt ggggccaggg aactaccgtg 420
accgtgtcta gtgctagc 438

<210> 79
<211> 39
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

<400> 79
cgcgtcgacg ccaccatgga ctggacatgg tccatcctg 39

<210> 80
<211> 39
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

<400> 80
 atgaccgcsг atacctcaac ctccacagct tacatggaa 39

<210> 81
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

<400> 81
 ggttgaggta tcggcggtca ttgtggtcсг 30

<210> 82
 <211> 39
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

<400> 82
 gaggatacag cagtgatatt ctgtgсссгг gggссаасс 39

<210> 83
 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

<400> 83
 ggcacagaaa tacastgctg tатсстсага gcgcag 36

<210> 84
 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

<400> 84
 cgcgctagca ctagacacгг tcacggtagt tcc 33

<210> 85
 <211> 39
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

<400> 85
 cgcgtcgacг ccaccatgga ctggacatгг tccatcctг 39

<210> 86
 <211> 43
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

 <400> 86
 ttgacttatc ggcggtcagt gtggtccggc ctttaaacct ttc 43

 <210> 87
 <211> 42
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

 <400> 87
 acactgaccg ccgataagtc aacctccaca gcttacatgg aa 42

 <210> 88
 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

 <400> 88
 cgcgctagca ctagacacgg tcacggtagt tcc 33

 <210> 89
 <211> 39
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

 <400> 89
 cgcgtcgacg ccaccatgga catgaggggc cccgctcag 39

 <210> 90
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

 <400> 90
 cagcagctta ggggctttcc ctggtttctg 30

 <210> 91

<211> 36
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

 <400> 91
 gggaaagccc ctaagctgct gatctataat gaaaaa 36

 <210> 92
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

 <400> 92
 tgtcccagat ccactgccac tgaaccttga 30

 <210> 93
 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

 <400> 93
 agtggcagtg gatctgggac agactatact ctcacc 36

 <210> 94
 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

 <400> 94
 cgccgtacgt ttgatctcca ccttggtccc tcc 33

 <210> 95
 <211> 39
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

 <400> 95
 cgcgtcgacg ccaccatgga catgagggtc cccgctcag 39

 <210> 96
 <211> 40
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

 <400> 96
 ggtgagagta tactgtgtcc cagatccact gccactgaac 40

 <210> 97
 <211> 39
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

 <400> 97
 ggatctggga cacagtatac tctcaccatc agcagtctg 39

 <210> 98
 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

 <400> 98
 cgccgtacgt ttgatctcca ccttggtccc tcc 33

 <210> 99
 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

 <400> 99
 cgcgctagca ccaagggccc atcggctcttc ccc 33

 <210> 100
 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

 <400> 100
 cgcgatatct catttaccsc gagacaggga gag 33

 <210> 101
 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

<400> 101
 cgccgtacgg tggctgcacc atctgtcttc atc 33

<210> 102
 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

<400> 102
 cgcgatatcc taacactctc ccctgttgaa gct 33

<210> 103
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

<400> 103
 cgaactgtgg ctgcaccatc tgtc 24

<210> 104
 <211> 38
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

<400> 104
 cgcgcggccg cctaacactc tccctgttg aagctctt 38

<210> 105
 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

<400> 105
 ttgctgagca gcctgagatc tgaggacacg gcc 33

<210> 106
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

<400> 106
 agatctcagg ctgctcagca acatgtaggc 30

<210> 107
 <211> 39
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

 <400> 107
 gcggaattcg tcgacgssac catgscgatgg agctggatc 39

<210> 108
 <211> 48
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

 <400> 108
 gaccgatggg cccttggtgg aggctgagga gactgtgaga gtggtgcc 48

<210> 109
 <211> 41
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

 <400> 109
 gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct g 41

<210> 110
 <211> 35
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

 <400> 110
 cgcgcggcgg ctcatttacc cggagacagg gagag 35

<210> 111
 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер

 <400> 111
 gcggtcgacg ccaccatgag tgtgctcact cag 33

<210> 112
 <211> 49
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер
 <400> 112
 gacagatggg gcagccacag ttcgttttat ttccagcttg gtcccccct 49

<210> 113
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер
 <400> 113
 cgaactgtgg ctgcaccatc tgtc 24

<210> 114
 <211> 38
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический праймер
 <400> 114
 cgcgcggccg cctaacactc tcccctgttg aagctctt 38

<210> 115
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид
 <400> 115
 Gln His His Gly Val Thr Lys Cys Asn Ile Thr Cys Ser Lys Met
 1 5 10 15

<210> 116
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид
 <400> 116
 Gly Val Thr Lys Cys Asn Ile Thr Cys Ser Lys Met Thr Ser Lys
 1 5 10 15

<210> 117
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

 <400> 117

Lys	Cys	Asn	Ile	Thr	Cys	Ser	Lys	Met	Thr	Ser	Lys	Ile	Pro	Val
1				5				10					15	

<210> 118
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

 <400> 118

Ile	Thr	Cys	Ser	Lys	Met	Thr	Ser	Lys	Ile	Pro	Val	Ala	Leu	Leu
1				5				10					15	

<210> 119
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

 <400> 119

Ser	Lys	Met	Thr	Ser	Lys	Ile	Pro	Val	Ala	Leu	Leu	Ile	His	Tyr
1				5				10					15	

<210> 120
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

 <400> 120

Thr	Ser	Lys	Ile	Pro	Val	Ala	Leu	Leu	Ile	His	Tyr	Gln	Gln	Asn
1				5				10					15	

<210> 121
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид
 <400> 121
 Ile Pro Val Ala Leu Leu Ile His Tyr Gln Gln Asn Gln Ala Ser
 1 5 10 15
 <210> 122
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид
 <400> 122
 Ala Leu Leu Ile His Tyr Gln Gln Asn Gln Ala Ser Cys Gly Lys
 1 5 10 15
 <210> 123
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид
 <400> 123
 Ile His Tyr Gln Gln Asn Gln Ala Ser Cys Gly Lys Arg Ala Ile
 1 5 10 15
 <210> 124
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид
 <400> 124
 Gln Gln Asn Gln Ala Ser Cys Gly Lys Arg Ala Ile Ile Leu Glu
 1 5 10 15
 <210> 125
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид
 <400> 125
 Gln Ala Ser Cys Gly Lys Arg Ala Ile Ile Leu Glu Thr Arg Gln
 1 5 10 15

<210> 126
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид
 <400> 126

Cys Gly Lys Arg Ala Ile Ile Leu Glu Thr Arg Gln His Arg Leu
 1 5 10 15

<210> 127
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид
 <400> 127

Arg Ala Ile Ile Leu Glu Thr Arg Gln His Arg Leu Phe Cys Ala
 1 5 10 15

<210> 128
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид
 <400> 128

Ile Leu Glu Thr Arg Gln His Arg Leu Phe Cys Ala Asp Pro Lys
 1 5 10 15

<210> 129
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид
 <400> 129

Thr Arg Gln His Arg Leu Phe Cys Ala Asp Pro Lys Glu Gln Trp
 1 5 10 15

<210> 130
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид
 <400> 130

His	Arg	Leu	Phe	Cys	Ala	Asp	Pro	Lys	Glu	Gln	Trp	Val	Lys	Asp
1				5					10				15	

<210> 131
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид
 <400> 131

Phe	Cys	Ala	Asp	Pro	Lys	Glu	Gln	Trp	Val	Lys	Asp	Ala	Met	Gln
1				5				10					15	

<210> 132
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид
 <400> 132

Asp	Pro	Lys	Glu	Gln	Trp	Val	Lys	Asp	Ala	Met	Gln	His	Leu	Asp
1				5				10					15	

<210> 133
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид
 <400> 133

Glu	Gln	Trp	Val	Lys	Asp	Ala	Met	Gln	His	Leu	Asp	Arg	Gln	Ala
1				5				10					15	

<210> 134
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид
 <400> 134

Val	Lys	Asp	Ala	Met	Gln	His	Leu	Asp	Arg	Gln	Ala	Ala	Ala	Leu
1				5				10					15	

<210> 135
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: синтетический пептид

 <400> 135

Ala Met Gln His Leu Asp Arg Gln Ala Ala Ala Leu Thr Arg Asn Gly
 1 5 10 15

MAPISLSWLLRLATFCHLTVLLAGQHGHGVTKCNITCSKMTSKIPVALLIHYQQN
 QASCGKRAIILETRQHRLFCADPKEQWVKDAMQHLDRAAALTRNGGTFEKQI
 GEVKPRTTPAAGGMDES SVVLEPEATGESSLEPTPSSQEAQRALGTSPCLPTGVTG
 SSGTRLPPTPKAQDGGPVGTFLRVPPVSTAATWQSSAPHQPGPSLWAEAKTSE
 APSTQDPSTQASTASSPAPEENAPSEGQVRVWGQGGQSPRPENSLEREEMGPVPA
 HTDAFQDWGPGSMAHVSVPVSSEGTPSREPVASGSWTPKAEPIHATMDPQR
 LGVLITPVPDAQAATRRQAVGLLAFLGLLFC LGVAMFTYQSLQGCPMKMAGEMA
 GLRYIPRSCGSNSYVLPVP (SEQ ID NO: 1)

ФИГ. 1

		1F3-1	3A5-2	3H7-6
Анализ хемотаксиса	Мышь	-	-	-
	Человек	12.67 (±5.07)	4.80 (±1.33)	19.07 (±5.13)
IC ₅₀ (нМ)				
Аффинность (BIAcore)	Мышь	-	-	-
	Человек	0.66	0.60	0.83
кДа (нМ)				
Реактивность к ФКН яванской макаки (ELISA)	Не равное человеческому		Равное человеческому	Равное человеческому

- : Активность отсутствует

ФИГ. 2

		CDR1	CDR2
m3A5-2_VH	QVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTF	TNYIHWVKQRPQG	LEWIGWIYPGDGSPK
H3	--Q-VQ--A-VK-----V-----	-----K-A-----I-----	-----
H3-2	--Q-VQ--A-VK-----V-----	-----K-A-----I-----	-----
HK2	--Q-VQ--A-VK-----V-----	-----R-A-----I-----	-----
HK3	--Q-VQ--A-VK-----V-----	-----R-A-----I-----	-----
Ig зародышевой линии	--Q-VQ--A-VK-----V-----	XXXXXX-R-A-----	MGXXXXXXXXXXXX
AAA68427.1	--K-LE--A-VK-----V-----	GHYMH--R-A-----	IGWISPNRGATR

	CDR2	CDR3
m3A5-2_VH	FNERFKGKTTLTADKSSNTAYMLLSSLTSEDSAIYFCAT	GP
H3	-----RT-L-A-K-TN-A--L--S-RSD-T-V-F--T-----	-----V-----
H3-2	-----RT-L-A-K-TN-A--L--S-RSE-T-V-F--T-----	-----V-----
HK2	-----RT-M-A-T-TS-A--E--S-RSE-T-V-F--R-----	-----V-----
HK3	-----RT-L-A-K-TS-A--E--S-RSE-T-V-F--R-----	-----V-----
Ig зародышевой линии	XXXXXXXXRV-M-R-T-TS-A--E--S-RSE-T-V-Y--RXXXXXXXXXX	-----V-----
AAA68427.1	FAQKFQGRV-M-S-T-IN-V--E--G-RFD-T-V-Y--TTRTAYYGMDV	-----V-----

- Более узкий диапазон ключевых остатков

ФИГ. 3

	CDR1	CDR2
m3A5-2_VL	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNFLAWYQ	QKQKSPQFLVYNEKTLADGVPS
L2	-----S-----DR-----	-----KP--A-KF-V-----
L4	-----S-----DR-----	-----KP--A-KL-I-----
L5	-----S-----DR-----	-----KP--A-KL-I-----
Ig зародышевой линии	-----S-----DR-----	XXXXXXXXXX-KP--A-KL-I-XXXXXXX
ABU90602.1	-----S-----DR-----	RASQNIIDNYLN--QP--A-KF-I-EASSLRS

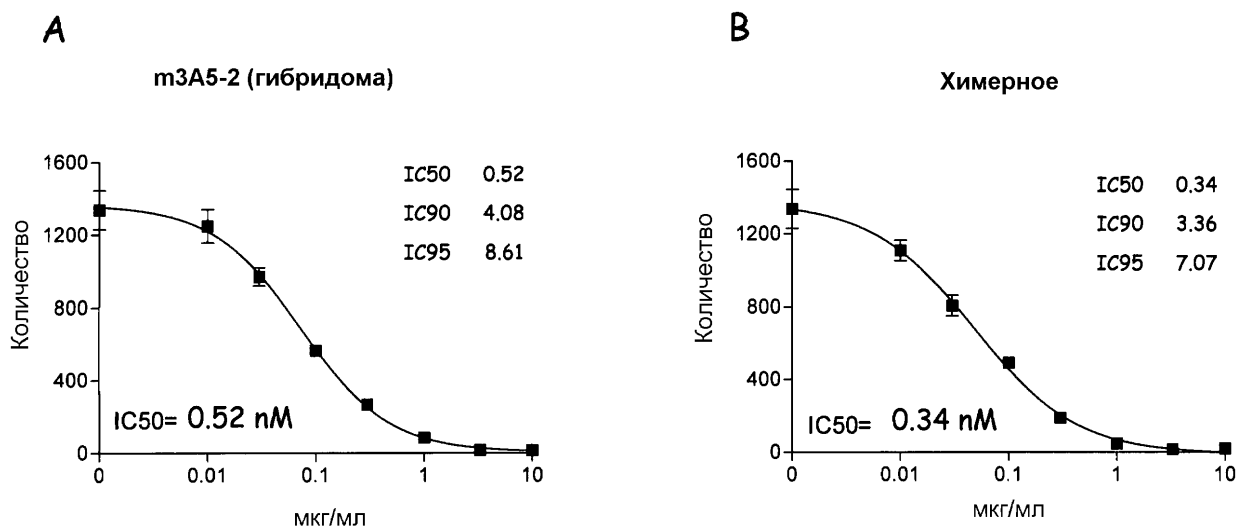
	CDR3
m3A5-2_VL	RFSGSGSGTQYSLKINSLOPEDFGIYFCQQFWSTPYTFGGG
L2	-----QYT-T-S-----AT-F-----V---
L4	-----DYT-T-S-----AT-F-----V---
L5	-----QYT-T-S-----AT-F-----V---
Ig зародышевой линии	-----DFT-T-S-----AT-Y-XXXXXXXXXX-----V---
ABU90602.1	-----EFT-T-S-----AT-Y-QQSYTTTIVIT-----V---

- Более узкий диапазон ключевых остатков

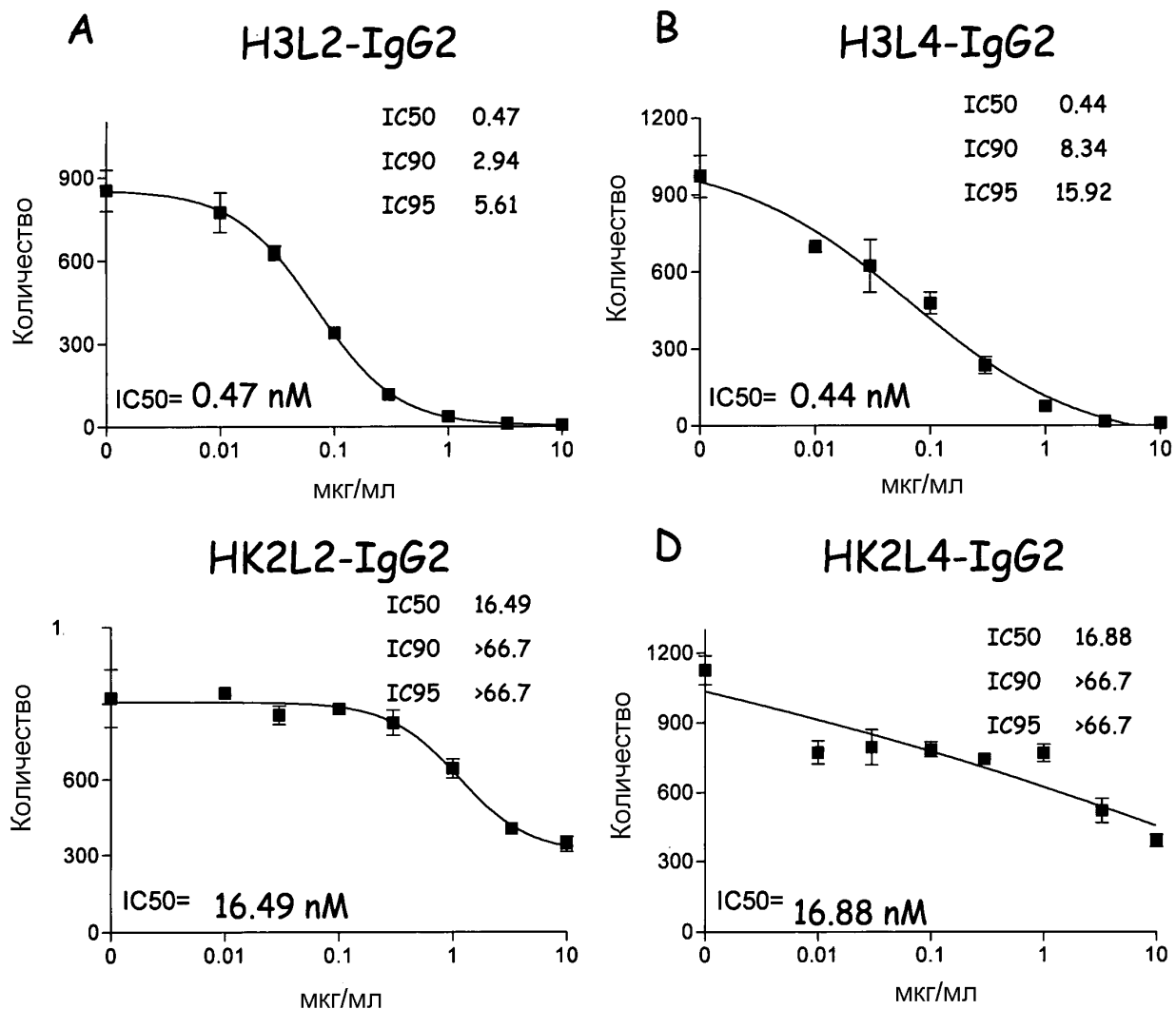
ФИГ. 4

		1st	2nd	3rd	Av.	SD
Мышиное	IC50	0.52	0.61	0.54	0.55	0.05
	IC90	4.08	4.24	3.23	3.85	0.55
	IC95	8.61	10.84	6.66	8.70	2.09
Химерное	IC50	0.34	0.29	0.43	0.35	0.07
	IC90	3.36	2.21	1.66	2.41	0.87
	IC95	7.07	5.24	3.15	5.15	1.96
H3L2	IC50	0.47	0.26	0.29	0.34	0.12
	IC90	2.94	2.25	1.34	2.18	0.80
	IC95	5.61	4.69	2.91	4.40	1.37
H3L4	IC50	0.44	0.91	0.44	0.60	0.27
	IC90	8.34	5.11	4.43	5.96	2.09
	IC95	15.92	50.26	10.46	25.54	21.58
H3-2L2	IC50	0.25	0.23	0.27	0.25	0.02
	IC90	2.23	2.13	2.67	2.34	0.29
	IC95	4.25	5.28	5.59	5.04	0.70
H3-2L4	IC50	0.20	0.65	0.45	0.43	0.23
	IC90	2.71	3.01	2.98	2.90	0.17
	IC95	6.36	7.00	5.92	6.43	0.54
H3-2L5	IC50	0.13	0.46	0.57	0.39	0.23
	IC90	1.97	4.92	3.84	3.58	1.49
	IC95	5.81	17.47	6.68	9.99	6.50
HK2L2	IC50	16.49	27.86	ND		
	IC90	>66.67	>66.67	ND		
	IC95	>66.67	>66.67	ND		
HK2L4	IC50	16.87	19.59	ND		
	IC90	>66.67	>66.67	ND		
	IC95	>66.67	>66.67	ND		
HK3L2	IC50	1.65	8.50	9.63	6.59	4.32
	IC90	>66.67	>66.67	>66.67		
	IC95	>66.67	>66.67	>66.67		
HK3L4	IC50	0.42	25.25	>66.67	12.84	17.56
	IC90	>66.67	>66.67	>66.67		
	IC95	>66.67	>66.67	>66.67		
HK3L5	IC50	1.10	14.17	13.50	9.59	7.36
	IC90	>66.67	>66.67	>66.67		
	IC95	>66.67	>66.67	>66.67		

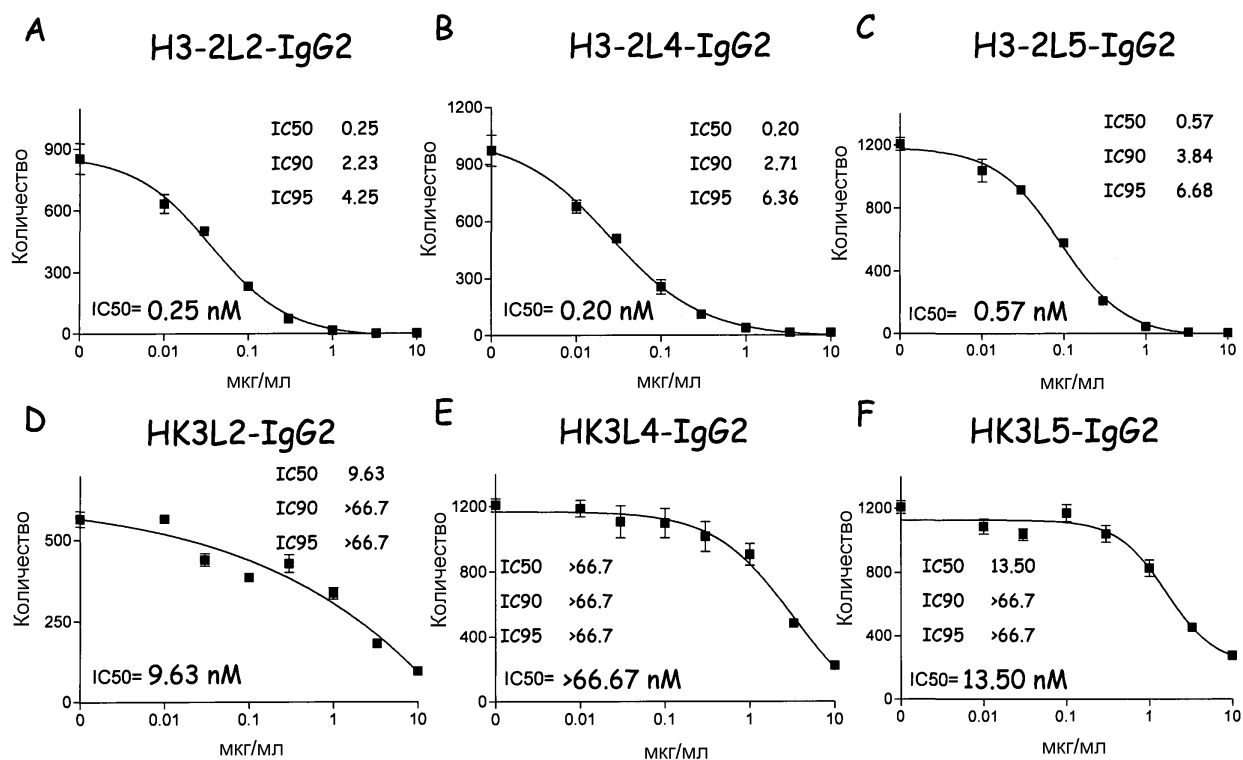
ФИГ. 5



ФИГ. 6



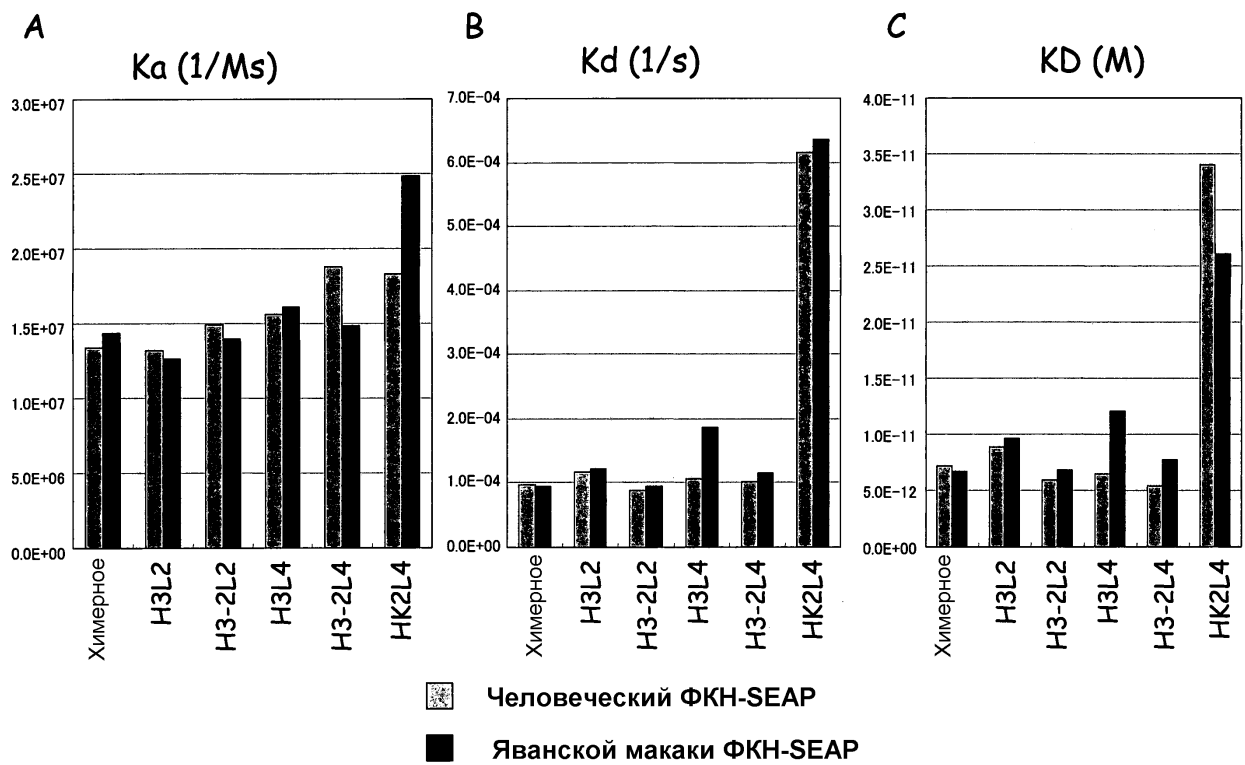
ФИГ. 7



ФИГ. 8

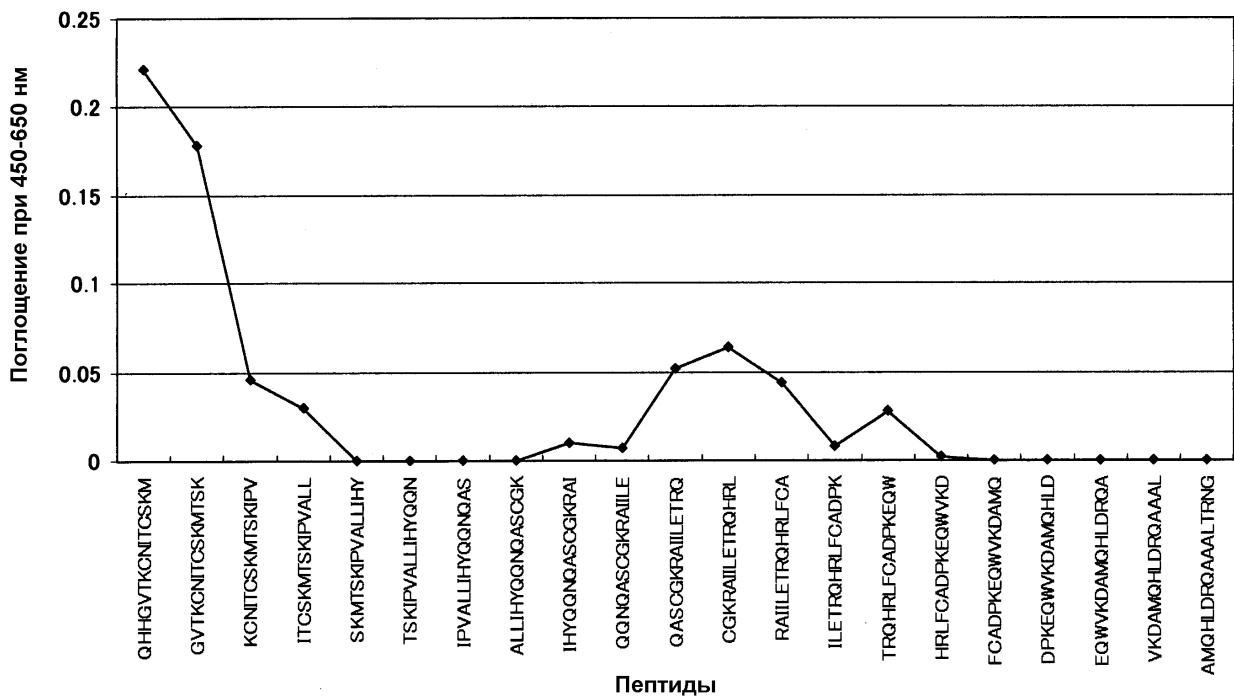
mAbs	Человеческий ФКН-SEAP			Яванской макаки ФКН-SEAP		
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
Химерное	1.34E+07	9.58E-05	7.13E-12	1.43E+07	9.54E-05	6.62E-12
H3L2	1.32E+07	1.16E-04	8.84E-12	1.26E+07	1.22E-04	9.62E-12
H3-2L2	1.50E+07	8.83E-05	5.92E-12	1.39E+07	9.43E-05	6.75E-12
H3L4	1.56E+07	1.05E-04	6.43E-12	1.61E+07	1.87E-04	1.20E-11
H3-2L4	1.88E+07	1.01E-04	5.34E-12	1.49E+07	1.15E-04	7.71E-12
HK2L4	1.83E+07	6.14E-04	3.40E-11	2.49E+07	6.35E-04	2.60E-11

ФИГ. 9



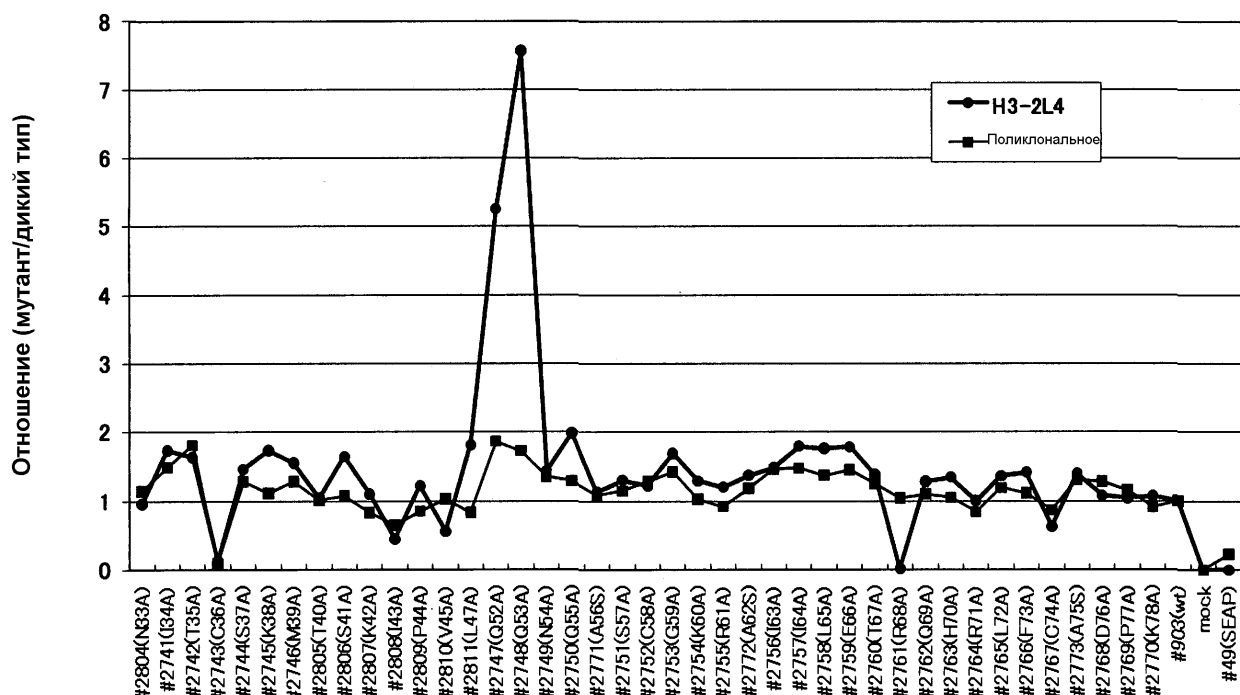
ФИГ. 10

Картирование эпитопа (ELISA для пептидов)



ФИГ. 11

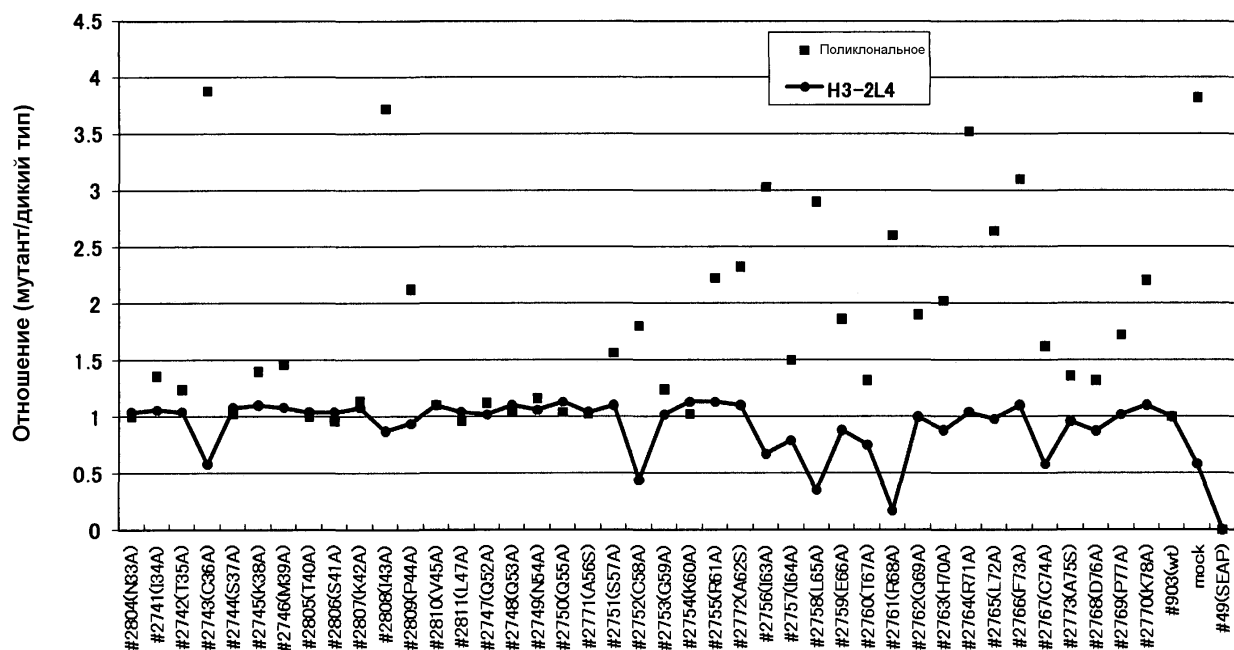
Картирование эпитопа, ELISA



Аланиновые мутанты

ФИГ. 12

Картирование эпитопа, BIACORE

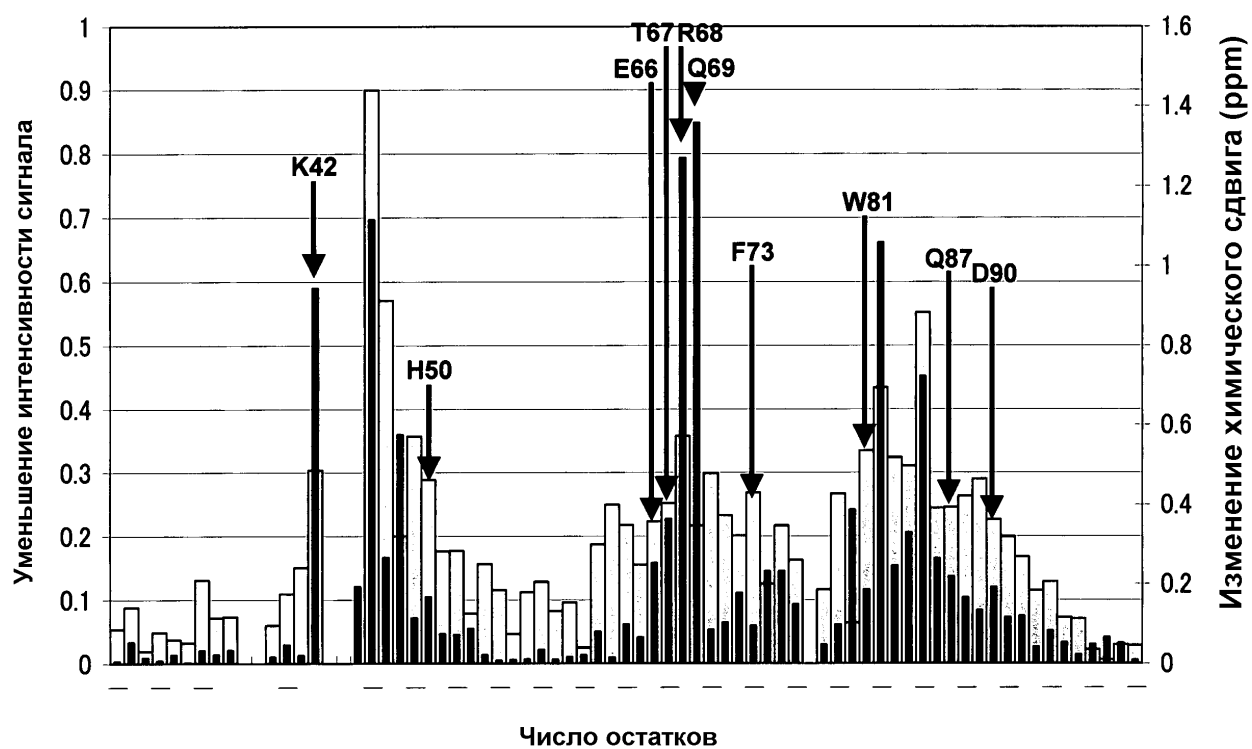


Аланиновые мутанты

ФИГ. 13

Серый: кросс-насыщение

Черный: картирование химического сдвига



ФИГ. 14