



(51) МПК
C07K 16/40 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 16/40 (2019.08); *C12Y 304/24035* (2019.08); *G01N 33/573* (2019.08); *A61K 2039/505* (2019.08);
C07K 2317/33 (2019.08); *C07K 2317/34* (2019.08); *C07K 2317/565* (2019.08); *C07K 2317/76* (2019.08);
C07K 2317/92 (2019.08); *G01N 2333/96494* (2019.08)

(21)(22) Заявка: 2017107773, 13.08.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
13.08.2015Дата регистрации:
11.02.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
13.08.2014 ЕР 14180765.1

(43) Дата публикации заявки: 13.09.2018 Бюл. № 26

(45) Опубликовано: 11.02.2020 Бюл. № 5

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 13.03.2017(86) Заявка РСТ:
ЕР 2015/068645 (13.08.2015)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2016/023979 (18.02.2016)

Адрес для переписки:

ООО "Союзпатент", Россия, 109012, Москва,
ул. Ильинка, 5/2

(72) Автор(ы):

ЧВАТЧКО МИССОТТЕН Иоланд (CH),
ГОФФЭН Лоранс (FR),
ЛЕЖЕР Оливье (FR),
ДАНН Стивен М. (FR),
ПАУЭР Кристин (FR),
МОНДРЕЛ Кинси (CH)

(73) Патентообладатель(и):

ЭА ФАРМА КО., ЛТД. (JP)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 02/066057 A2, 29.08.2002. WO
2009/111450 A2, 11.09.2009. WO 2010/045388 A2,
22.04.2010. WO 2011/028883 A2, 10.03.2011. WO
2012/027721 A2, 01.03.2012. RU 2503682 C2,
10.01.2014. KANG et al. "Antibody redesign by
chain shuffling from random combinatorial
immunoglobulin libraries", Proceedings of the
National Academy of Sciences, 1991, 88 (24),
(см. прод.)C2
C3
C4
C5
C6
C7
C8RU
2714043

(54) АНТИТЕЛА, СПЕЦИФИЧНЫЕ К MMP9

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к области иммунологии и биотехнологии. Предложены новые варианты антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые специфично связываются с MMP9 и содержат вариабельные области тяжелой и легкой цепей, каждая из которых характеризуется наличием по меньшей мере соответствующих CDRs1-3. Описаны: кодирующая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент нуклеиновая кислота, рекомбинантный экспрессирующий

вектор её содержащий, клетка-хозяин, несущая такой вектор, и способ получения антитела, использующий такую клетку. Раскрыты: фармацевтическая композиция на основе антитела, а также применение антитела для профилактики и/или лечения связанных с MMP9 заболеваний. Также предложен способ выявления присутствия и/или концентрации белка MMP9 *ex vivo* в биологическом образце на основе антитела, где интенсивность сигнала коррелирует с концентрацией белка MMP-9 в образце.

R U 2 7 1 4 0 4 3 C 2

Использование изобретения обеспечивает антитела, которые способны нейтрализовать активность MMP9, что может найти применение при профилактике и/или лечении воспалительных,

автоиммунных заболеваний и/или раковых заболеваний, связанных с MMP9. 12 н. и 14 з.п. ф-лы, 16 ил., 8 табл., 12 пр.

(56) (продолжение):

pp.11120-11123. RUDIKOFF et al. "Single amino acid substitution altering antigen-binding specificity" Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v.79, pp.1979-1983. CHIEN et al. "Significant structural and functional change of an antigen-binding site by a distant amino acid substitution: Proposal of a structural mechanism", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, Immunology, v.86, pp.5532-5536.

R U 2 7 1 4 0 4 3 C 2

RU 2714043 C2

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) RU (11) 2 714 043⁽¹³⁾ C2

(51) Int. Cl.
C07K 16/40 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

C07K 16/40 (2019.08); *C12Y 304/24035* (2019.08); *G01N 33/573* (2019.08); *A61K 2039/505* (2019.08);
C07K 2317/33 (2019.08); *C07K 2317/34* (2019.08); *C07K 2317/565* (2019.08); *C07K 2317/76* (2019.08);
C07K 2317/92 (2019.08); *G01N 2333/96494* (2019.08)

(21)(22) Application: 2017107773, 13.08.2015

(24) Effective date for property rights:
13.08.2015

Registration date:
11.02.2020

Priority:

(30) Convention priority:
13.08.2014 EP 14180765.1

(43) Application published: 13.09.2018 Bull. № 26

(45) Date of publication: 11.02.2020 Bull. № 5

(85) Commencement of national phase: 13.03.2017

(86) PCT application:
EP 2015/068645 (13.08.2015)

(87) PCT publication:
WO 2016/023979 (18.02.2016)

Mail address:
OOO "Soyuzpatent", Rossiya, 109012, Moskva, ul.
Ilinka, 5/2

(72) Inventor(s):

CHVATCHKO MISSOTTEN Ioland (CH),
GOFFEN Lorans (FR),
LEZHER Olive (FR),
DANN Stiven M. (FR),
PAUER Kristin (FR),
MONDREL Kinsi (CH)

(73) Proprietor(s):

EA FARMA KO., LTD. (JP)

(54) ANTIBODIES SPECIFIC TO MMP9

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: present invention refers to immunology and biotechnology. Disclosed are novel embodiments of antibodies or antigen-binding fragments thereof, which specifically bind to MMP9 and contain variable regions of heavy and light chains, each of which is characterized by the presence of at least corresponding CDRs1-3. Described are: a coding antibody or its antigen-binding nucleic acid fragment, a recombinant expression vector thereof, a host cell carrying such a vector, and a method for producing an antibody using such a cell. Disclosed are an antibody-

based pharmaceutical composition, as well as use of an antibody for preventing and/or treating MMP9-associated diseases. Also disclosed is a method for detecting the presence and/or concentration of the MMP9 protein ex vivo in a biological antibody-based sample, wherein the signal intensity correlates with the MMP-9 protein concentration in the sample.

EFFECT: use of the invention provides antibodies which are capable of neutralizing MMP9 activity, which can find application in preventing and/or treating inflammatory, autoimmune diseases and/or cancers associated with MMP9.

R U 2 7 1 4 0 4 3 C 2

26 cl, 16 dwg, 8 tbl, 12 ex

R U 2 7 1 4 0 4 3 C 2

R U 2 7 1 4 0 4 3 C 2

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение касается антител и их фрагментов, которые специфически связываются и нейтрализуют активность данного белка, а также их применения в качестве терапевтических или диагностических средств.

5 Уровень техники

Семейство матриксных металлопротеиназ (ММР) состоит по меньшей мере из 23 родственных по структуре, растворимых или мембраносвязанных цинк-зависимых эндопептидаз, которые в широком смысле участвуют в ремоделировании внеклеточного матрикса (ЕСМ) и в функциональной регуляции различных биологически активных

10 молекул.

Все ММРs имеют структуру прототипа, которая включает пропептидный домен, поддерживающий ММР в неактивной форме, и каталитический домен, который действует на целый ряд компонентов внеклеточного матрикса.

Матриксная металлопротеиназа 9 (ММР9), также известная как коллагеназа типа

15 IV в 92 кД или желатиназа B (GELB), является представителем семейства ферментов ММР, ответственных за деградацию денатурированных коллагенов и коллагенов базальной мембраны (Agrawal et al., 2006 J. Exp. Med. 203, 1007-1019), а также за активацию воспаления путем процессинга растворимых белков, в том числе ингибиторов протеаз (Liu et al., 2000, J. Exp. Med. 188, 475-482), хемокинов (Van den Steen et al., 2000, Lancet Neurol. 2, 747-756) и цитокинов (Nelissen et al., 2003, Brain 126, 1371-1381). ММР9 также контролирует миграцию, инвазию и метастазирование раковых клеток путем протеолиза мембраносвязанных молекул типа предшественников и рецепторов факторов роста, рецепторов тирозинкиназы (ТКРs), молекул клеточной адгезии (Bauvois, 2012, Biochim Biophys Acta 1825(1): 29-36). При заболеваниях ММР9 секретируется многими

25 типами клеток, включая лейкоциты, например нейтрофилы, моноциты/макрофаги и лимфоциты, а также фибробластами, миофибробластами, эпителиальными клетками, гладкомышечными клетками, эндотелиальными клетками, остеокластами и раковыми клетками (Vandooren et al., 2013, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 48(3): 222-72).

Общая структура доменов ММР9 включает последовательность лидера секреции,

30 ингибиторный пропептидный домен (pro-domain), необходимый для сдерживания каталитической активности, "расщепленный" каталитический домен, содержащий три подобные фибронектину II типа повторяющиеся петли, которые вместе образуют коллаген-связывающий домен (CBD), гипергликозилированный обогащенный пролином линкер (который также называют доменом OG) и С-концевой гемопексиновый домен (РЕХ).

Матриксная металлопротеиназа 2 (ММР2), также известная как коллагеназа типа IV в 72 кДа или желатиназа A (GELA), это фермент, который принадлежит к тому же семейству, что и ММР9. ММР2 и ММР9 проявляют высокую идентичность аминокислотных последовательностей (45,9% по полноразмерным белкам и 63,2% по

40 каталитическому домену) и имеют очень похожие 3D-структуры, особенно в каталитических доменах. Поэтому очень трудно идентифицировать ингибиторные антитела против ММР9 человека, избирательные в отношении ММР2 человека, вследствие такой высокой гомологичности по структуре и аминокислотной последовательности (Morgunova et al., 1999, Science, 284: 1667-1670).

45 Многие острые воспалительные и аутоиммунные заболевания, фиброзные заболевания и инвазивный рак связаны с наличием избыточного ММР9 (Hu et al, 2007, Nature Reviews Drug Discovery, 6, 480-498; Ram et al, 2006, J. Clin. Immunol, (26)4: 299-307; Ai Zheng, 2003, Chinese Journal of Cancer, 22(2): 178-84; Baugh et al, 1999, Gastroenterology,

117: 814-822; Santos et al, 2013, Biochem Biophys Res Commun., 438(4): 760-4; Herszényi et al, 2012, Int. J. Mol. Sci., 13, 13240-13263; Lijnen, 2001, Thromb Haemost, 86: 324-33; Rosell et al., 2005, Stroke 36: 1415-20; Whatling et al., 2004, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 24: 10-11; Yasmin et al., 2005, Arterioscler Thromb Vasc Biol., 25:372-8; Vassiliadis et al., 2011, BMC Dermatol., 11: 6), поэтому этот фермент удостоился значительного внимания в качестве перспективной мишени для терапевтического вмешательства.

Убедительные клинические и экспериментальные данные свидетельствуют о связи повышенного уровня MMP9 с прогрессированием, метастазированием рака и сокращением продолжительности жизни пациентов, так как он играет ключевую роль в инвазии и метастазировании опухолевых клеток путем расщепления базальной мембранны и компонентов внеклеточного матрикса. Связанный с желатиназой нейтрофилов липокалин (NGAL), который ковалентно связан с MMP9 в нейтрофилах человека (Triebel et al., 1992, FEBS Lett., 314, 386-388), защищает MMP9 от протеолитической деградации и повышает ферментативную активность MMP9, поэтому он усиливает инвазивность и диффузию опухолей (Yan et al., 2001, J. Biol. Chem., 276, 37258-37265). Высокие концентрации комплекса MMP9/NGAL в сыворотке крови связывали с более короткой выживаемостью без прогрессирования и слабой общей выживаемостью при светлоклеточной почечно-клеточной карциноме (Perrin et al., 2011, Prog. en Urol. J. Assoc. Fr. Urol. Société Fr. Urol., 21, 851-858).

В частности, роль MMP-9 связывали с колоректальным раком (Herszényi et al., 2012, Int J Mol Sci., 13(10): 13240-63), раком поджелудочной железы (Gao et al., 2015, Med Oncol. 32(1): 418), раком молочной железы (Gao et al., 2015, Med Oncol. 32(1): 418), раком легких (Ruiz-Morales et al., Tumour Biol. 36(5): 3601-10), раком яичников (Naylor et al., 1994, Int J Cancer, 58: 50-6), раком мочевого пузыря (Szarvas et al., 2011, Nat Rev Urol., 8(5): 241-54) и раком желудка (Chen et al., 2015, Int J Clin Exp Med. 8(1): 546-57).

Была показана роль MMP9 при иммунных патологиях, в частности, при воспалительной болезни кишечника (IBD), где MMP9 отмечается как наиболее сильно экспрессируемая MMP в слизистой кишечника при активном воспалении, а ее экспрессия коррелирует с активностью болезни (Naito and Yoshikawa, 2005, 26: 379-390). При IBD, как полагают, MMP9 играет ключевую роль в неадекватном ремоделировании ткани и активации провоспалительных цитокинов и хемокинов, тем самым способствуя рекрутингу активированных лейкоцитов (Nuala et al., 2014, Inflamm. Bowel 0: 1-15). В частности, отмечалось усиление экспрессии MMP9 вдоль фистульных участков перианальных свищей и повышение активности MMP9 в биоптатах свищей у пациентов с болезнью Крона (CD), что подтверждает гипотезу о том, что MMP9 может способствовать образованию свищей, представляющих тяжелое осложнение при CD (Efsen et al., 2011, Basic Clin Pharmacol Toxicol. 109(3): 208-16). Кроме того, снижение уровня NGAL/MMP9 в сыворотке также коррелирует с заживлением слизистой у пациентов с язвенным колитом при лечении инфликсимабом (de Bruyn et al., 2014, Inflamm. Bowel Dis., 20, 1198-1207).

Роль MMP9 связывали с различными неврологическими заболеваниями, к примеру, с болезнью Альцгеймера (Mroczko et al., 2013, J. Alzheimers Dis., 37(2): 273-278), рассеянным склерозом (Mirshafiey et al., 2014, Sultan Qaboos Univ Med J., 14(1), 13-25), нейровоспалением или церебральной ишемией (Candelario-Jalil et al., 2009, Neuroscience 158(3):983-94). При болезни Альцгеймера потенциальным нейротоксическим побочным эффектом MMP9 может быть проагрегационное влияние на формирование олигомеров тау в стратегических участках мозга (Wang et al., 2014 BioMed Res. Int., 2014, ID 908636: 1-8). Высказывалось предположение, что снижение уровня зрелого фактора роста

нервов (mNGF) вследствие усиления опосредованной MMP9 деградации mNGF во внеклеточном пространстве может частично лежать в основе патогенеза когнитивных нарушений при умеренных когнитивных расстройствах и болезни Альцгеймера (Bruno et al., 2009, J Neuropathol. Exp. Neurol., 68(12): 1309-1318).

- 5 Роль MMP9 связывали с фиброзными заболеваниями, к примеру, системным склерозом, многоочаговым фиброзклерозом, склеродермальной реакцией "трансплантант против хозяина" у реципиентов при пересадке костного мозга, нефрогенным системным фиброзом, а также такими орган-специфичными заболеваниями, как фиброз легких, печени и почек (Piera-Velazquez et al., 2011, Am J Pathol, 179(3): 1074-80; Peng et al, 2012, J. Clin. Immunol, 32(6): 1409-14). Например, недавние исследования показали, что MMPs, в частности MMP-9, участвуют в возникновении и развитии фиброза почек посредством перехода канальцевых эпителиальных клеток в мезенхимальные и активации резидентных фибробластов, перехода эндотелиальных клеток в мезенхимальные и трансдифференцировки перицитов в миофибробласти (Zhao et al, 2013, World J Nephrol, 2(3): 84-9).
- 10

15 С активностью MMP9 связывали патофизиологию различных глазных заболеваний. Некоторые примеры включают: фиброзные патологии хрусталика (Nathu et al, 2009, Ex. Eye Res., 88(2): 323-330), заболевания роговицы, связанные с повышающей регуляцией MMP9 (Sakimoto et al., 2012, Cornea 31, Suppl 1: S50-6), диабетическую ретинопатию, при которой повышается уровень MMP9 в сетчатке и стекловидном теле пациентов (Kowluru et al, 2012, Expert Opin Investig Drugs, 21(6): 797-805), и возрастную дегенерацию желтого пятна, в патогенезе которой, как оказалось, какую-то роль играет MMP9 (Nita et al, 2014, Med Sci Monit, 20: 1003-16).

20 Сердечнососудистые заболевания включают воспаление и ремоделирование измененных тканей, связанное с реорганизацией внеклеточного матрикса и активацией MMP9. Поэтому полагают, что MMP9 связан с патофизиологией таких сердечных заболеваний, как гипертензия, атеросклероз, инфаркт миокарда, сердечная недостаточность и ишемическая болезнь сердца (Yabluchanskiy et al, 2013, Physiology, 28(6): 391-403).

25

25 Кроме того, роль MMP9 связывали с различными группами заболеваний, таких как кожные заболевания (Mezentsev et al, 2014, Gene, 540(1): 1-10), сепсис и синдром острого воспалительного шока (Lorento et al, 2014, PLoS One 9(4): e94318; Qui et al, 2012, Comb Chem High Throughput Screen., 15(7): 555-70), остеоартрит (Bian et al., 2012, Front Biosci (Elite Ed). 4: 74-100), вызванный химиотерапией мукозит (Al-Dasooqi et al., 2009, Cancer Chemother Pharmacol, 64: 1-9), заболевания полости рта (Al-Azri et al., 2013, Oral Diseases, 19: 347-359), остеосклероз (Teti et al., 1999, J Bone Miner Res. 14(12): 2107-17), эндометриоз (Pitsos et al., 2009, Reprod Sci., 16(8): 717-26) или болезнь Чагаса (Geurts et al, 2012, Pharmacol Ther., 133(3): 257-79).

30 В различных нормальных и раковых клетках (Goldberg et al., 1992, J. Biol. Chem., 267, 4583-4591), а также в биологических жидкостях и тканях были идентифицированы и мономерные, и димерные формы MMP9, указывая на то, что обе формы являются физиологически важными. Наряду с протеолизом, димеризация MMP9 через гемопексиновый домен представляется необходимой для усиления MMP9 миграции клеток (Dufour et al., 2010, J. Biol. Chem., 285, 35944-35956), а изучение паттернов секреции 35 мономера и димера MMP9 в различных линиях клеток карциномы, саркомы, аденокарциномы и лейкемии показало, что высокий уровень секреции MMP9 и особенно димера коррелирует с наиболее агрессивными линиями раковых клеток (Roomi et al., 2014, Int. J. Oncol. 44, 986-992). В целом все эти наблюдения подчеркивают важность 40 45

эффективного средства для нейтрализации MMP9 для эффективного ингибиования всех природных форм MMP9, а более конкретно димера MMP9 и комплекса NGAL/MMP9 для лечения очень агрессивных метастазирующих раковых заболеваний.

Исторически стратегии блокирования MMP были сосредоточены на конструировании

5 низкомолекулярных ингибиторов, тесно взаимодействующих с каталитическим сайтом активированного фермента. Пока что этот подход не дал ожидаемых клинических преимуществ частично из-за дозозависимой токсичности и тяжелых побочных эффектов типа костно-мышечного синдрома. Поскольку архитектура каталитического сайта MMP9 сильно консервативна по всему семейству MMP, то это противопоказание может
10 быть связано с отсутствием избирательности к мишени MMP при терапевтических дозах.

Антитела или фрагменты антител могут взаимодействовать с и перекрывать гораздо большую часть структуры MMP9, чем направленные на активный сайт небольшие молекулы, обеспечивая большую избирательность при ингибиовании мишени.

15 Некоторые антитела, специфичные к MMP9, были описаны на предшествующем уровне техники, как-то мышью AB0041 и гуманизованное AB0045 (WO 2013/130078), а также человеческие 539A-M0240-B03 (US 2009/0311245), M0166-F10 (US 2009/0311245 US 2011/0135573), 539A-M0237-D02 (US 2009/0297449 и US 2011/0135573), мышью REGA-3G12 (Martens et al., 2007, *Biochim. Biophys. Acta* 1770, 178-186). Некоторые из
20 антител предшествующего уровня техники были описаны как связывающиеся и с MMP9, и с MMP2.

25 Таким образом, существует потребность в разработке новых терапевтических средств, проявляющих высокое средство и специфичность к MMP9 и проявляющих слабое или ограниченное средство и/или специфичность к другим MMPs типа MMP2, проявляющих лучшую перекрестную реактивность к ортологам MMP9 не от человека, а также обладающих и другими свойствами типа пониженной иммуногенности у людей и/или большей стабильности, что делает их особенно подходящими для терапевтического применения на людях.

Сущность изобретения

30 Настоящее изобретение направлено на белки, которые связываются с MMP9, в частности, с MMP9 человека, и содержат по меньшей мере один фрагмент вариабельной области тяжелой цепи и/или по меньшей мере один фрагмент вариабельной области легкой цепи антител, как описано здесь.

Первый аспект изобретения касается выделенных антител, специфичных к MMP9,
35 либо их антигенсвязывающих фрагментов, причем данные антитела или фрагменты связываются с MMP9 путем взаимодействия с эпитопом, включающим по меньшей мере одну аминокислоту в пределах участка, состоящего из SEQ ID NO: 41, по меньшей мере одну аминокислоту в пределах участка, состоящего из SEQ ID NO: 42, и по меньшей мере одну аминокислоту в пределах участка, состоящего из SEQ ID NO: 43, при этом
40 данные участки находятся в пределах каталитического домена MMP9 человека.

Во втором аспекте изобретения предусмотрены выделенные антитела, специфичные к MMP9, либо их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, включающую:

- (i) CDR1 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 2 или его вариант, у которого 1, 2 или 3 аминокислоты данного CDR1 тяжелой цепи заменены другими аминокислотами;
- (ii) CDR2 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 3 или его вариант, у которого 1, 2 или 3 аминокислоты данного CDR2 тяжелой цепи заменены другими аминокислотами;
- (iii) CDR3 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 4 или его вариант, у которого 1, 2 или 3

аминокислоты данного CDR3 тяжелой цепи заменены другими аминокислотами.

В более предпочтительном аспекте изобретения предусмотрены выделенные антитела, как описано выше, дополнительно содержащие вариабельную область легкой цепи, выбранную из:

- 5 а) вариабельной области легкой цепи, включающей:
 - (i) CDR1 легкой цепи по SEQ ID NO: 21 или его вариант, у которого 1, 2 или 3 аминокислоты данного CDR1 легкой цепи заменены другими аминокислотами;
 - (ii) CDR2 легкой цепи по SEQ ID NO: 22 или его вариант, у которого 1, 2 или 3 аминокислоты данного CDR2 легкой цепи заменены другими аминокислотами;
- 10 (iii) CDR3 легкой цепи по SEQ ID NO: 23 или его вариант, у которого 1, 2 или 3 аминокислоты данного CDR3 легкой цепи заменены другими аминокислотами, или
 - b) вариабельной области легкой цепи, включающей:
 - (i) CDR1 легкой цепи по SEQ ID NO: 26 или его вариант, у которого 1, 2 или 3 аминокислоты данного CDR1 легкой цепи заменены другими аминокислотами;
 - (ii) CDR2 легкой цепи по SEQ ID NO: 27 или его вариант, у которого 1, 2 или 3 аминокислоты данного CDR2 легкой цепи заменены другими аминокислотами;
 - (iii) CDR3 легкой цепи по SEQ ID NO: 28 или его вариант, у которого 1, 2 или 3 аминокислоты данного CDR3 легкой цепи заменены другими аминокислотами.

Третий аспект изобретения касается выделенных молекул нуклеиновых кислот, 20 кодирующих антитела либо их антигенсвязывающие фрагменты, как описано здесь.

Четвертый и пятый аспекты изобретения касаются рекомбинантных экспрессирующих векторов, включающих данные молекулы нуклеиновых кислот, а также клеток хозяина, содержащих данные рекомбинантные векторы, соответственно.

Шестой аспект изобретения касается способа получения антител или их фрагментов, 25 как описано здесь, включающего культивирование клеток хозяина, трансформированных экспрессирующим вектором, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую данные антитела или их фрагменты, в условиях, достаточных для экспрессирования данных антител или их фрагментов.

В седьмом аспекте изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, 30 включающие одно или несколько из следующего: (i) антитело, специфичное для MMP9, или его антигенсвязывающий фрагмент, (ii) последовательность нуклеиновой кислоты, (iii) вектор и/или (iv) клетки хозяина, как описано здесь, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

Восьмой аспект изобретения касается композиций для визуализации или диагностики, 35 включающих одно или несколько антител против MMP9 или их антиген-связывающих фрагментов, как описано здесь.

Девятый аспект изобретения составляет набор, включающий одно или несколько антител против MMP9 или их антиген-связывающих фрагментов, как описано здесь.

Десятый аспект изобретения касается антител или их лекарственных форм по 40 изобретению для применения при профилактике и/или лечении связанных с MMP9 заболеваний, как-то воспалительных и/или аутоиммунных заболеваний либо раковых заболеваний или фиброзных заболеваний.

Одиннадцатый аспект касается способа профилактики и/или лечения связанных с 45 MMP9 заболеваний типа воспалительных и/или аутоиммунных заболеваний либо раковых заболеваний или фиброзных заболеваний, включающего введение нуждающимся в этом лицам терапевтически эффективного количества данных антител или их фрагментов либо данной фармацевтической композиции.

Следующий аспект изобретения касается антител против MMP9 по изобретению

или их лекарственных форм для применения в качестве лекарственных средств.

Другие отличительные признаки и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из нижеследующего подробного описания.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 схематически представлена доменная структура молекул белка MMP9 человека. Цифрами указаны положения аминокислот в аминокислотной последовательности незрелого белка MMP9.

На фиг. 2 представлено выравнивание аминокислотных последовательностей MMP9 человека, макаки-крабоеда (супо), крысы и мыши. Значком (*) указаны положения, в которых находится один полностью консервативный остаток, (:) означает консервативность между группами с очень близкими свойствами - дающими $> 0,5$ по матрице Gonnet PAM 250, (.) означает консервативность между группами с не очень близкими свойствами - дающими $\leq 0,5$ по матрице Gonnet PAM 250.

На фиг. 3 представлено совмещение последовательностей типичных фрагментов тяжелой цепи антител человека, содержащих константную область тяжелой цепи и вариабельную область тяжелой цепи антител человека против MMP9 по изобретению. Последовательности фрагментов тяжелой цепи антител помечены по названиям последовательностей вариабельной области тяжелой цепи значком * перед названием: * F20-VH, * F20-VH-GL1, * F20-VH-GL1-V1-V9, * F20-VH-GL1-V1-V9-V14, * F20-VH-GL1-V4-V9, * F20-VH-GL1-V4-V9-V14. Участки CDR подчеркнуты. Аннотации идентичны приведенным на фиг. 2.

На фиг. 4 представлено совмещение последовательностей типичных фрагментов легкой цепи антител человека, содержащих константную область легкой цепи и вариабельную область легкой цепи антител человека против MMP9 по изобретению. Последовательности фрагментов легкой цепи антител помечены по названиям последовательностей вариабельной области легкой цепи значком * перед названием: * B03-VL, * B03-VL-GL1. Участки CDR подчеркнуты. Аннотации идентичны приведенным на фиг. 2.

На фиг. 5 представлено совмещение последовательностей типичных фрагментов легкой цепи антител человека, содержащих константную область легкой цепи и вариабельную область легкой цепи антител человека против MMP9 по изобретению. Последовательности фрагментов легкой цепи антител помечены по названиям последовательностей вариабельной области легкой цепи значком * перед названием: * B08-VL, * B08-VL-GL6. Участки CDR подчеркнуты. Аннотации идентичны приведенным на фиг. 2.

На фиг. 6 представлено титрование нейтрализующей активности типичных антител против MMP9 по изобретению (вариантов F20-VH/B03-VLc и F20-VH/B08-VLc) в отношении proMMP9 человека (A, B) и зрелого MMP9 человека (C, D). Варианты F20-VH/B03-VLc (A, C), варианты F20-VH/B08-VLc (B, D).

На фиг. 7 представлена нейтрализующая активность типичных антител против MMP9 по изобретению в отношении каталитических доменов различных рекомбинантных матриксных металлопротеиназ человека.

На фиг. 8 представлено титрование нейтрализующей активности типичного антитела против MMP9 по изобретению (варианта F20-VH/B08-VLc, сплошные линии и темные символы) или изотипного контроля (пунктирные линии и светлые символы) в отношении димерного MMP9 из нейтрофилов человека (кружочки), мономерного MMP9 человека (треугольнички) и комплекса NGAL-MMP9 человека (квадратики).

На фиг. 9 представлено титрование нейтрализующей активности типичного антитела

против MMP9 по изобретению (варианта F20-VH/B08-VLc, сплошные линии и закрытые символы) или сравнительного антитела 1 против MMP9 (пунктирные линии и светлые символы) в отношении активированного мономерного MMP9 человека (треугольнички), димерного MMP9 (кружочки) и комплекса NGAL-MMP9 (квадратики) из нейтрофилов

5 человека.

На фиг. 10 представлена кинетика связывания антител против MMP9 с антигеном - рекомбинантным MMP9 человека. MMP3-активированный MMP9 (панели А и В) и про-MMP9 (панели С и D) титровали на сенсорном чипе BIAcore, на котором сначала были фиксированы антитела против MMP9: вариант F20-VH/B08-VLc (панели А и С) и сравнительное антитело 1 (панели В и D). Представлены сенсограммы кинетики связывания. Единицы резонанса (ЕО). По оси у - ответ (ЕО); по оси х - время (сек).

На фиг. 11 представлено прямое и конкурентное связывание антител против MMP9 с MMP9 человека. Способность к прямому связыванию при различных концентрациях биотинилированных антител против MMP9 - варианта F20-VH/B08-VLc (темные

15 кружочки) и сравнительного антитела 1 (светлые кружочки) в отношении про-MMP9 (панель А) или MMP3-активированного MMP9 (панель В) определяли по стандартной методике ELISA. Антигены MMP9 наносили при 2,5 мкг/мл. Контролями служили стрептавидин-HRP сам по себе (темные треугольники) или IgG4 контрольного изотипа человека плюс биотинилированное вторичное Fab-антитело против IgG человека (темные

20 квадратики).

В экспериментах по конкурентному связыванию (панель С) после предварительной инкубации с буфером (без ничего) или очищенным вариантом F20-VH/B08-VLc или сравнительным антителом 1 (оба при 50 мкг/мл) проявляли фиксированный MMP3-активированный MMP9 при оптимальной дозе биотинилированного сравнительного 25 антитела 1 (2,5 мкг/мл) или варианта F20-VH/B08-VLc (50 мкг/мл). Для панелей А, В, С результаты выражали в виде среднего значения \pm SD скорректированного поглощения ($A_{450}-A_{620}$) для каждого условия в двух повторах.

На фиг. 12 представлено действие антител против MMP9 (вариант F20-VH/B08-VLc) на инвазию клеток раковой линии через покрытые матригелем лунки Transwell. Раковые 30 клетки MGC803 желудка человека инкубировали с форбол-12-миристат-13-ацетатом (PMA) и с химическим ингибитором MMP широкого спектра (GM-6001), антителом против MMP9 (F20-VH/B08-VLc), изотипным контролем или только со средой. Инвазивные клетки количественно определяли через 16 часов с помощью кальцеина-АМ. Каждое условие выполняли в двух повторах и выражали в виде среднего и SD в 35 единицах флуоресценции.

На фиг. 13 представлены эндоскопические показатели на модели индуцированного DSS колита у мышей. На 6-й день после DSS-индукции мышей обрабатывали антителом против MMP9 (вариант F20-VH/B08-VLc) или контрольным изотипным антителом.

40 Эффекты варианта F20-VH/B08-VLc представлены в виде черных столбиков, изотипного контроля - заштрихованных столбиков. Представлены среднее и SD эндоскопических показателей для обеих групп получавших обработку мышей (n=5 для F20-VH/B08-VLc; n=6 для изотипного контроля). Статистическое сравнение групповых данных (F20-VH/B08-VLc против изотипного контроля через 14 дней после DSS-индукции) проводили по двустороннему непарному t-критерию с помощью GraphPad Prism. * p=0,005.

45 На фиг. 14 представлены показатели общей гистологии, показатели инфильтрата и эпителиального повреждения на срезах толстой кишки у мышей с индуцированным DSS колитом, получавших обработку антителом против MMP9 (вариант F20-VH/B08-VLc) или контрольным изотипным антителом. Показатели (A) общей гистологии, (B)

инфильтата и (С) эпителиального повреждения. Представлены индивидуальные значения, среднее и SD для каждого критерия по обеим группам получавших обработку мышей (n=5 для F20-VH/B08-VLc, n=5 для изотипного контроля).

На фиг. 15 представлены репрезентативные поперечные срезы привитых

- 5 трансплантов в кишечнике мыши при окрашивании гематоксилином-эозином. (А) День 0: свежевыделенный при резекции участок тонкой кишки с открытым просветом и типичными структурами крипт.(В) Изотипный контроль, день 14: полная закупорка просвета кишечника через 14 дней после трансплантации у получавших изотипный контроль мышей (n=5). (С) Вариант F20-VH/B08-VLc, день 14: частичная закупорка 10 просвета кишечника через 14 дней после трансплантации у мышей, получавших антитело против MMP9 (n=5).

На фиг. 16 представлены репрезентативные поперечные срезы привитых

трансплантов в кишечнике мыши при окрашивании с помощью Sinus red и количественная оценка толщины коллагенового слоя. Свежевыделенные при резекции

- 15 участки тонкой кишки (А и В). День 14 после трансплантации у получавших изотипный контроль мышей (С и D). День 14 после трансплантации у мышей, получавших антитело против MMP9 (вариант F20-VH/B08-VLc) (Е и F). Проходящий свет (А, С и Е), поляризованный свет (В, D и F). (G) Количественная оценка толщины коллагенового слоя в гетеротопических кишечных трансплантатах у мышей, получавших антитело 20 против MMP9 или изотипный контроль. Представлены среднее значение и SD толщины коллагенового слоя из срезов трансплантов для обеих групп получавших обработку мышей (72 среза для F20-VH/B08-VLc; 64 среза для изотипного контроля).

Статистическое сравнение групповых данных (F20-VH/B08-VLc против изотипного контроля) проводили по двустороннему непарному t-критерию с помощью GraphPad

- 25 Prism. *** p<0,0001.

Раскрытие сущности изобретения

Определения

- Термин "матриксная металлопротеиназа 9", сокращенно "ММР9", также известная как коллагеназа типа IV в 92 кДа, желатиназа в 92 кДа или желатиназа B (GELB), 30 означает фермент, который у человека кодируется геном MMP9, последовательность которого приведена в NCBI под номером доступа ENSG00000100985. Форма человеческого MMP9 человека имеет последовательность из 707 аминокислот, которая доступна в NCBI под номером доступа NP_004985.2 (SEQ ID NO: 1). Общая структура доменов MMP9 включает последовательность лидера секреции (остатки 1-19 в SEQ ID 35 NO: 1), ингибиторный пропептидный домен (pro-domain), необходимый для сдерживания каталитической активности (остатки 20-106 в SEQ ID NO: 1), "расщепленный" каталитический домен (остатки 107-441 в SEQ ID NO: 1), содержащий три подобные фибронектину II типа повторяющиеся петли, которые вместе образуют коллаген-связывающий домен (CBD), гипергликозилированный богатый пролином линкер 40 (который также называют доменом OG) (остатки 442-520 в SEQ ID NO: 1) и С-концевой домен с повторами типа гемопексина (PEX) (остатки 521-707 в SEQ ID NO: 1) (Rowse et al., 2002, J Mol Biol 319: 173-81) (фиг. 1). MMP9 секретируется и поддерживается в неактивной, латентной форме под действием про-домена. Протеолитическое удаление про-домена активизирует ферментативную активность MMP9, после чего MMP9 может 45 называться "активной" MMP9. Его каталитический домен содержит желатин-связывающий участок, который обеспечивает специфическое средство к желатину. Наряду с желатином, MMP9 имеет различные субстраты, включая коллагены (например, коллаген IV и коллаген V), эластин, галектин-3, энтактин и ICAM-1 (Ram et al, 2006, J.

Clin. Immunol. 26, 299-307), а также цитокины и хемокины (Opdenakker et al, Trends Immunol. 2001: 22:527-81).

Термин "антитело" в настоящем изобретении обозначает полипептиды, которые связываются с антигеном. Сюда относятся целые антитела и любые антигенсвязывающие фрагменты. Термин "антитело" применяется в самом широком смысле и охватывает моноклональные антитела, поликлональные антитела, человеческие антитела, гуманизованные антитела, химерные антитела и другие генно-инженерные антитела, если только они сохраняют характерные свойства по изобретению, в частности, способность к связыванию с целевым антигеном, более предпочтительно с тем же самым эпитопом MMP9, который распознается антителами по изобретению. Примеры антител и их фрагментов включают фрагмент вариабельного домена ("Fv", состоящий из доменов V_h и V_l одного плеча антитела), Fab-фрагмент (моновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_h , V_l , C_h1 и C_l), Fab₂-фрагмент (бивалентный), Fab₃-фрагмент (тривалентный), Fab'-фрагмент (Fab с шарнирным участком), F(ab')₂-фрагмент (бивалентный фрагмент, включающий два Fab-фрагмента, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирном участке), Fd-фрагмент (состоящий из доменов V_h и C_h1), rIgG (редуцированный IgG или полу-IgG), диатела, триатела, тетратела, минитела, моновалентные антитела, бивалентные или поливалентные антитела, содержащие фрагменты более чем одного антитела, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), бис-scFv (биспецифичные) и такие производные антител, как стабилизированные дисульфидной связью Fv-фрагменты, CDR-содержащие пептиды, а также эпитопосвязывающие фрагменты любых из вышеприведенных (Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotechnology, 23(9): 1126-1136). Антитело означает гликопротеин, содержащий по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, либо их антигенсвязывающие фрагменты. Каждая тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи (V_h) и константную область тяжелой цепи (C_h). Каждая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи (V_l) и константную область легкой цепи (C_l). У млекопитающих тяжелая цепь может быть альфа (α), дельта (δ), эпсилон (ϵ), гамма (γ) или мю (μ), что определяет классы антител IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, соответственно. У млекопитающих легкая цепь может быть лямбда (λ) илиkapпа (κ). У млекопитающих, в зависимости от класса антител, константная область тяжелой цепи содержит три иммуноглобулиновых домена, C_h1 , C_h2 и C_h3 (для IgA, IgD, IgG) или четыре иммуноглобулиновых домена, C_h1 , C_h2 , C_h3 , C_h4 (для IgE и IgM). Константная область легкой цепи содержит один иммуноглобулиновый домен, C_l . Антитело может иметь структуру IgA, IgG, IgE, IgD и IgM, а также любого их подтипа. Антитела могут происходить из любых источников, включая, в частности, приматов (человекообразных и других приматов) и приматизированных источников.

Термин "вариабельный домен" или "вариабельная область" (вариабельный домен легкой цепи (V_l), вариабельный домен тяжелой цепи (V_h)) в настоящем изобретении относится к каждому из пары доменов легких и тяжелых цепей, непосредственно участвующих в связывании антитела с антигеном. Вариабельные домены легких и тяжелых цепей имеют одинаковую общую структуру, и каждый домен содержит четыре каркасных ("FR") участка, последовательности которых очень консервативны, соединенные тремя "гипервариабельными участками", которые называются "определяющими комплементарность участками" или "CDRs". Каркасные участки

принимают конформацию β -слоя, а CDRs могут образовывать петли, соединяющие β -складчатую структуру. CDRs в каждой цепи удерживаются в своей трехмерной структуре каркасными участками и вместе с CDRs из другой цепи образуют антигенсвязывающий сайт. Термин "антигенсвязывающий участок антитела" в настоящем изобретении

- 5 относится к тем аминокислотным остаткам антитела, которые ответственны за связывание антигена. Антигенсвязывающий участок антитела включает аминокислотные остатки из "гипервариабельных участков" или "CDRs". "Каркасные" или "FR-участки" это такие участки вариабельного домена, которые отличны от гипервариабельных участков, как определено здесь. Таким образом, вариабельные домены легкой и тяжелой
- 10 цепи антител содержат, от N- к C-концу: участки FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Остатки в участках CDR и FR обычно нумеруются в соответствии со стандартным определением Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), Publication No. 91-3242). Эта система нумерации применяется и в настоящем описании, если не указано иначе.
- 15 Обозначения остатков по Kabat не всегда прямо соответствуют линейной нумерации аминокислотных остатков. Фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньше или больше аминокислот, чем при строгой нумерации по Kabat, что соответствует укорочению или вставке структурного компонента в основную структуру вариабельного домена, будь то в каркасный или определяющий
- 20 комплементарность участок (CDR). Правильная нумерация остатков по Кабат может быть установлена для данного антитела путем совмещения гомологичных остатков в последовательности антитела со "стандартной" пронумерованной по Кабат последовательностью. Участки CDR вариабельного домена тяжелой цепи располагаются по остаткам 31-35 (CDR-H1), остаткам 50-65 (CDR-H2) и остаткам 95-102 (CDR-H3) по
- 25 системе нумерации Кабат. Участки CDR вариабельного домена легкой цепи располагаются по остаткам 24-34 (CDR-L1), остаткам 50-56 (CDR-L2) и остаткам 89-97 (CDR-L3) по системе нумерации Кабат.

В настоящей заявке, если не указано иначе, нумерация для всех вариабельных доменов тяжелых и легких цепей иммуноглобулина человека соответствует "системе нумерации

- 30 Кабат" (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), Publication No. 91-3242).

В настоящей заявке, если не указано иначе, нумерация для всех константных доменов тяжелой цепи иммуноглобулина человека соответствует "системе нумерации EU" (Edelman et al, 1969, Proc Natl Acad Sci., 63(1): 78-85).

- 35 Термин "моноклональное антитело" в настоящем изобретении означает антитело, полученное из популяции практически однородных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными за исключением возможных естественных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела очень специфичны, они направлены против единственного
- 40 антигенного сайта. Определение "моноклональное" указывает на то, что антитело получено из практически однородной популяции антител и не должно восприниматься как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом.

- 45 Термин "химерное антитело" в общем означает антитело, содержащее вариабельную область из одного источника или вида и по меньшей мере часть константной области, происходящую из другого источника или вида, которое обычно получают методами рекомбинантной ДНК. Типичные примеры химерных антител включает такие, которые содержат вариабельную область мыши и константную область человека. В настоящем изобретении этот термин также охватывает антитела, содержащие по меньшей мере

один участок CDR из первого антитела человека и по меньшей мере часть константной области из второго антитела человека. Он также охватывает антитела, содержащие CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи из первого антитела человека и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи из второго антитела человека.

5 Термин "гуманизированное антитело" обозначает антитела из других видов, чем человек, которые содержат один или несколько определяющих комплементарность участков (CDR) из другого вида, чем человек, и каркасную область из молекулы иммуноглобулина человека. Гуманизированные антитела необязательно могут дополнительно содержать один или несколько каркасных остатков, происходящих из того другого вида, из 10 которого происходят CDRs.

15 Термин "человеческое антитело" или "полностью человеческое антитело" относится к таким антителам, у которых вариабельные области и константные области как тяжелых, так и легких цепей имеют человеческое происхождение или практически идентичны последовательностям человеческого происхождения, но не обязательно из 20 одного и того же антитела.

Термин "выделенное антитело" означает такое антитело, которое было отделено от компонентов своего естественного окружения. Например, выделенное антитело было очищено до чистоты более чем 95% или 99% при определении принятыми в данной области методами (например, см. Flatman et al, 2007, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci., 848: 79-87), включая электрофоретические (например, SDS-PAGE, изоэлектрофокусирование, капиллярный электрофорез) или хроматографические (например, ионнообменной или обратнофазовой HPLC (высокоэффективной жидкостной хроматографии) методы.

25 Термины "полинуклеотид" или "молекула нуклеиновой кислоты" относятся к полимерам, содержащим нуклеотиды. Примеры молекул нуклеиновой кислоты включают ДНК, РНК, закрытую нуклеиновую кислоту (LNA), комплементарную ДНК (кДНК).

30 "Полипептид" понимается как пептид, олигопептид, олигомер или белок, содержащий по меньшей мере две аминокислоты, соединенные друг с другом нормальной или модифицированной пептидной связью, как-то в случае изостерических пептидов, к примеру. Полипептид может состоять и из других аминокислот, чем те 20 аминокислот, которые определяются генетическим кодом. Полипептид в равной степени может состоять из аминокислот, модифицированных под действием естественных процессов, таких как процессы посттрансляционного созревания, или под действием химических 35 процессов, хорошо известных специалистам. Такие модификации полностью описаны в литературе. Эти модификации могут находиться в любом месте полипептида: в пептидном остове, в боковой цепи или даже на C- или N-терминальных концах.

Например, полипептидные модификации охватывают ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение flavina, 40 ковалентное присоединение гема, ковалентное присоединение нуклеотида или нуклеотидного производного, ковалентное присоединение липида или липидного производного, ковалентное присоединение фосфатидилинозитола, ковалентное или нековалентное перекрестное сшивание, циклизацию, образование дисульфидной связи, деметилирование, образование цистеина, образование пироглутамата, формилирование, 45 гамма-карбоксилирование, гликозилирование, в том числе ПЭГилирование, образование GPI-якоря, гидроксилирование, йодирование, метилирование, миристоилирование, окисление, протеолитические процессы, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфатирование, добавление аминокислот типа

аргинилирования или убиквитинизации. Такие модификации полностью описаны в литературе (Proteins Structure and Molecular Properties (1993) 2nd Ed., T.E. Creighton, New York; Post-translational Covalent Modifications of Proteins (1983) B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York; Seifter et al. (1990) Analysis for protein modifications and non-protein cofactors.

5 Meth. Enzymol. 182: 626-646; и Rattan et al. (1992) Protein Synthesis: Post-translational modifications and aging. Ann NY Acad Sci. 663: 48-62).

"Выделенный полинуклеотид" или "выделенный полипептид" понимается как полинуклеотид или полипептид, как определено выше, который выделен из организма человека или иным образом получен при помощи технического процесса.

10 Термин "вариант" может применяться к полинуклеотидам и/или полипептидам. Например, вариант пептида или полипептида в настоящем изобретении означает такой пептид или полипептид, который существенно гомологичен указанной пептидной последовательности, но отличается от нее по аминокислотной последовательности из-за одной или нескольких делеций, вставок и/или замен аминокислот. Существенно 15 гомологичный означает, что аминокислотная последовательность данного варианта идентична указанной пептидной последовательности за исключением делеций, вставки и/или замены нескольких аминокислот, например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислот. Существенно гомологичный означает, что аминокислотная последовательность данного варианта по меньшей мере на 85%, на 90%, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или по 20 меньшей мере на 99% идентична указанной аминокислотной последовательности. Последовательность варианта нукleinовой кислоты может быть по меньшей мере на 80%, на 85%, на 90%, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или по меньшей мере на 99% идентична указанной последовательности нукleinовой кислоты. Идентичность двух аминокислотных последовательностей или двух нуклеотидных последовательностей 25 может быть установлена путем визуального осмотра и/или математических вычислений или же более просто путем сравнения информации о последовательности с помощью известной компьютерной программы, используемой для сравнения последовательностей, типа пакета Clustal версии 1.83. Вариант может иметь последовательность, содержащую по меньшей мере одну консервативную замену аминокислоты, то есть данный 30 аминокислотный остаток заменен остатком, имеющим сходные физико-химические характеристики. Как правило, замены по одной или нескольким аминокислотам в исходном полипептиде должны производиться консервативно. Примеры консервативных замен включают замены одного алифатического остатка на другой типа Ile, Val, Leu или Ala друг на друга или замены одного полярного остатка на другой типа между Lys 35 и Arg; Glu и Asp; или Gln и Asn. Хорошо известны и другие такие консервативные замены, к примеру, замены целых участков, имеющих аналогичные характеристики гидрофобности (Kyte et al., 1982, J. Mol. Biol., 157: 105-131). Например, "консервативная аминокислотная замена" может означать замену остатка исходной аминокислоты на такой другой остаток, который почти или совсем не влияет на полярность или заряд 40 аминокислотного остатка в этом положении. Желательные замены аминокислот (консервативные или неконсервативные) могут быть установлены специалистами на тот момент, когда такие замены желательны. Типичные замены аминокислот представлены ниже в таблице 1. Термин "вариант" также охватывает такие пептиды или полипептиды, которые существенно гомологичны указанной пептидной 45 последовательности, но отличаются нее по аминокислотной последовательности тем, что одна или несколько аминокислот подвергались химической модификации или были заменены аналогами аминокислот. Этот термин также охватывает гликозилированные полипептиды.

Таблица 1

Исходный остаток	Примеры замен
Ala (A)	Val, Leu, Ile
Arg (R)	Lys, Gln, Asn
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser, Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Pro, Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe
Leu (L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys (K)	Arg, Gln, Asn
Met (M)	Leu, Ile, Phe
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr
Pro (P)	Ala, Gly
Ser (S)	Thr, Ala, Cys
Trp (W)	Phe, Tyr
Thr (T)	Ser
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser
Val (V)	Ile, Met, Leu, Phe, Ala

Термин "эпитоп" охватывает любые антигенные детерминанты, способные специфически связываться с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых воплощениях детерминанта эпитопа охватывает химически активные 25 поверхностные группировки таких молекул, как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорила или сульфонила, а в некоторых воплощениях может иметь специфические трехмерные структурные характеристики и/или специфические характеристики заряда. Эпитоп является тем участком антигена, который связывается с антителом. Некоторые эпитопы содержат прерывистые отрезки аминокислотной последовательности антигена, 30 в которых несмежные аминокислоты располагаются близко друг к другу по пространственной конфигурации антигена ("конформационные эпитопы"), или содержат отрезки смежных аминокислот в аминокислотной последовательности антигена ("линейные эпитопы").

В настоящем изобретении термин "связывается" или "связывание" антитела с целевым 35 антигеном означает по крайней мере временное взаимодействие или ассоциацию данного антитела с данным целевым антигеном (типа MMP9) или же с фрагментами данного целевого антигена, содержащего эпитоп, распознаваемый данным антителом.

Термины "избирательно связывается", "специфически связывается", "специфиче 40 к" в применении к антителу означают, что антитело предпочтительно распознает и/или связывается с целевым полипептидом или эпитопом, то есть с более высоким сродством, чем с каким-либо другим антигеном или эпитопом, то есть связывание с целевым полипептидом можно отличить от неспецифического связывания с другими антигенами. Сродство связывания антитела может быть легко определено рядовым специалистом в данной области, например, по методу Скэтчарда (Scatchard et al., 1949, Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660-672).

В настоящем изобретении термин "сродство связывания" обычно относится к кажущейся константе ассоциации или " K_a ". Значение K_a - обратная величина константы диссоциации " K_d ". Сродство связывания можно определить различными методами,

включая равновесный диализ, равновесное связывание, гель-фильтрацию, ELISA, поверхностный плазмонный резонанс или спектроскопию (например, флуоресцентным методом). Типичные условия для оценки сродства связывания: трис-буфер (50 мМ трис-HCl, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl₂ при pH 7,5). Эти методы можно использовать для

измерения концентрации связанного и свободного связывающего белка в зависимости от концентрации связывающего белка (или мишени). Концентрация связанного связывающего белка ([Bound]) связана с концентрацией свободного связывающего белка ([Free]) и с концентрацией сайтов связывания для связывающего белка на мишени, где (N) означает количество сайтов связывания на молекуле мишени, по следующему уравнению: [Bound] = N × ([Free])/((1/K_a) + [Free]). Сравнение сродства между двумя антителами можно установить и без фактического определения значения K_a для каждого антитела, а на основе количественного измерения сродства (например, методом ELISA или FACS), которое пропорционально K_a, или качественного измерения сродства или выведения сродства (например, при функциональном определении или анализе *in vitro* или *in vivo*).

Термин "блокирующая" или "нейтрализующая" активность антитела относится к его способности ингибировать активность своей мишени. Применительно к антителам, связывающимся с MMP9, этот термин обозначает способность антитела вообще нейтрализовать активность MMP9 путем ингибирования активации proMMP9 и/или путем ингибирования каталитической активности активированного MMP9 на одном из его субстратов типа желатина, например, как описано в разделе «Примеры». Нейтрализующая активность антитела против MMP9 может быть определена бесклеточными методами *in vitro* или методами *in vivo* или функциональными методами *in vitro* типа анализа инвазии клеток раковой линии человека. При анализе инвазии клеток раковой линии человека методом Transwell раковые клетки спускаются и мигрируют через матрикс типа базальной мембранны (Matrigel[®]), тем самым имитируя процесс интравазации опухолевых клеток *in vivo* в близлежащие кровеносные сосуды и экстравазации и инвазии в отдаленные ткани.

"Действенность (potency)" антитела может выражаться в виде концентрации антитела или антигенсвязывающего фрагмента, дающей полумаксимальный эффект при данной концентрации антигена. Например, "эффектом" антитела может быть ингибирование или нейтрализация активности своей мишени. В этом случае концентрация антитела, дающая полумаксимальное ингибирование, обозначается как IC₅₀ и приводится в моль/л или М. На действенность обычно влияет аффинность до тех пор, пока при данной концентрации антигена не достигается такая аффинность, при дальнейшем повышении которой связывание антигена больше не будет улучшаться (так называемый потолок действенности). Применительно к антителам против MMP9 силу действия можно определить, к примеру, путем измерения значений IC₅₀ зависимого от MMP9 расщепления желатинового субстрата в присутствии антитела.

Термин "эффективность ингибирования" или "эффективность нейтрализации" в применении к нейтрализующим антителам означает степень эффективности данного антитела при ингибировании определенной биологической или биохимической функции, выраженной в процентах от возможного общего ингибирования биологической или биохимической активности, которое принимается за 100%. Применительно к антителам, связывающимся с MMP9, 100%-ная эффективность может означать, к примеру, опосредованное антителом полное ингибирование MMP9-зависимого расщепления желатинового субстрата.

В настоящем изобретении термин "эффекторная функция антитела" означает такое биохимическое событие, которое возникает при взаимодействии Fc-области антитела с Fc-рецептором или лигандом. Эффекторные функции включают такие опосредованные FcγR эффекторные функции, как ADCC (опосредованная антителами клеточная

5 цитотоксичность) и ADCP (опосредованный антителами клеточный фагоцитоз), и такие опосредованные комплементом эффекторные функции, как CDC (опосредованная комплементом цитотоксичность). Эффекторная функция антитела может быть изменена путем изменения, т.е. усиления или уменьшения, предпочтительно усиления, средства антитела к эффекторной молекуле типа Fc-рецептора или компонента комплемента.

10 Средство связывания Fc-области антитела с Fc-рецептором или лигандом можно изменить путем модификации сайта связывания эффекторной молекулы. К тому же изменение сайта связывания эффекторной молекулы на антителе может изменить геометрию взаимодействия без существенного изменения общего средства связывания, делая эффекторный механизм неэффективным, как при непродуктивном связывании.

15 Эффекторную функцию также можно изменить путем модификации сайта, не участвующего непосредственно в связывании эффекторной молекулы, но участвующего в выполнении эффекторной функции иным образом. Изменение эффекторной функции антитела дает возможность контролировать различные аспекты иммунного ответа, например, усиливать или подавлять различные реакции иммунной системы, с

20 возможными положительными эффектами при диагностике и терапии.

Термин "фармацевтически приемлемый" означает, что носитель состоит из такого материала, который не является нежелательным в биологическом или ином смысле.

25 Термин "носитель" относится к любым компонентам, присутствующим в фармацевтической композиции и отличным от активного средства, куда входят разбавители, связующие, смазывающие вещества, разрыхлители, наполнители, красители, смачивающие или эмульгирующие средства, рН-буферные вещества, консерванты и т.п.

30 В настоящем изобретении "лечение", "лечить" и т.п. обычно означает получение требуемого фармакологического и физиологического эффекта. Эффект может быть профилактическим в смысле предотвращения или частичного предотвращения заболевания, симптома или состояния и/или он может быть терапевтическим в смысле частичного или полного излечения заболевания, состояния, симптома или неблагоприятного эффекта, обусловленного заболеванием. Термин "лечение" в настоящем изобретении охватывает любое лечение заболеваний у млекопитающих, в

35 частности, у человека, и включает: (а) предотвращение возникновения заболевания у субъекта, который может быть предрасположенным к нему, но еще не диагностирован как страдающий им, к примеру, на основании семейной истории; (б) торможение заболевания, то есть прекращение его развития; или (с) облегчение заболевания, то есть вызывая регрессию заболевания и/или его симптомов или состояния типа

40 исправления или излечения повреждений. Например, лечение воспалительной болезни кишечника включает предотвращение, уменьшение или даже устранение симптомов заболевания, к примеру, частичное или полное купирование диареи, болей в животе и колик, крови в стуле, абсцесса, язвы и свищей.

45 "Заболевания, связанные с MMP9", как они определяются здесь, обозначают заболевания, опосредованные или вызванные, по крайней мере частично, экспрессией и/или активностью MMP9. Примеры связанных с MMP9 заболеваний включают воспалительные и аутоиммунные заболевания, раковые заболевания, легочные заболевания, фиброзные заболевания типа фиброзных заболеваний легких, септициемию,

мышечную дистрофию, аллергию, фиброз почек, склеродермию, дилатационную кардиомиопатию, болезнь Чагаса, сердечнососудистые заболевания, нервно-психиатрические заболевания, диабет и глазные заболевания.

Термины "воспалительные и аутоиммунные заболевания" в общем определяются

5 здесь как воспалительные аномалии, которые могут и не затрагивать иммунную систему, а также заболевания, возникающие при аномальной иммунной реакции организма субъекта на вещества и ткани, которые в норме присутствуют в организме, соответственно. Неограничительные примеры воспалительных и аутоиммунных заболеваний включают прежде всего воспалительные заболевания кишечника (IBD),
10 включая болезнь Крона (CD) (в частности, проникающую и стриктурирующую болезнь Крона), язвенный колит (UC), неопределенный колит, коллагеновый колит, ревматоидный артрит (RA), рассеянный склероз (MS), системную красную волчанку (SLE), синдром **Шёгрена**, системный склероз, полимиозит, атеросклероз.

15 Термин "воспалительное заболевание кишечника" (IBD) определяется здесь как заболевание, связанное с хроническим воспалением всего пищеварительного тракта или его части. Неограничительные примеры IBD включают болезнь Крона, в частности, непроникающую и стриктурирующую болезнь Крона, проникающую и стриктурирующую болезнь Крона и фистулирующую болезнь Крона, язвенный колит (UC), неопределенный колит, коллагеновый колит, лимфоцитарный колит и фиброз кишечника. Болезнь Крона (CD) определяется как болезнь типа трансмурального воспаления с язвочками, которые могут поражать любую часть GI-тракта от полости рта до анального отверстия. Язвенный колит - заболевание типа воспаления слизистой, ограниченного толстой кишкой.

20 25 Термин "раковые заболевания" определяется здесь как заболевания, связанные с аномальным ростом клеток с возможностью инвазии или распространения в другие части организма. Термин "раковые заболевания" обозначает такие заболевания, к примеру, но без ограничения, как гематопоэтический рак, рак головного мозга, рак молочной железы, колоректальный рак, рак головы и шеи, рак поджелудочной железы, рак яичников, рак мочевого пузыря, рак легких, рак печени, меланома, рак простаты, мышечный рак, мезенхимальный рак, пищеводно-желудочная аденокарцинома, немелкоклеточный рак легких, плоскоклеточный рак легких, аденокарцинома легких, аденокарцинома желудка, аденокарцинома поджелудочной железы, гепатоцеллюлярный рак и колоректальный рак.

30 35 Термин "легочные заболевания" обозначает такие заболевания, к примеру, но без ограничения, как астма, фиброзные заболевания легких типа идиопатического фиброза легких, хроническая обструктивная болезнь легких (COPD) и ринит.

40 45 Термин "фиброзные заболевания" определяется здесь как заболевания, при которых пораженные ткани проявляют чрезмерное скопление волокнистой соединительной ткани (компонентов внеклеточного матрикса типа коллагена и фибронектина) внутри и вокруг воспаленной или поврежденной ткани, что может привести к образованию постоянных рубцов, нарушению функционирования органов и в конечном счете к смерти, что наблюдается на конечной стадии заболеваний печени, почечных заболеваний, идиопатического фиброза легких (IPF) и сердечной недостаточности. Неограничительные примеры фиброзных заболеваний включают системный склероз, многоочаговый фиброзклероз, склеродермические реакции типа трансплантат против хозяина у реципиентов при пересадке костного мозга, нефрогенный системный фиброз, фиброз легких, фиброз печени, фиброз почек, ревматоидный артрит, болезнь Крона, язвенный колит, миелофиброз и системную красную волчанку.

Термины "глазные заболевания" или "заболевания глаз" определяются здесь как заболевания глаз, связанные с прогрессирующей дегенерацией пигментного эпителия сетчатки и фоторецепторов, ведущей к потере зрения и/или заболеваниям глаз, связанным с повреждением кровеносных сосудов сетчатки. Неограничительные примеры

5 глазных заболеваний включают фиброзные патологии хрусталика, заболевания роговицы, диабетическую ретинопатию, "сухую" или "влажную" возрастную дегенерацию желтого пятна, пролиферативную витреоретинопатию, образование катаракты, птеригию, кератоконус, возрастную дегенерацию желтого пятна и диабетическую ретинопатию.

10 Термин "сердечнососудистые заболевания" определяется здесь как заболевания сердечнососудистой системы, которые включают воспаление, перемоделирование измененных тканей с возрастанием коллагена и нарастание фиброзного рубца при инфаркте миокарда. Неограничительные примеры сердечнососудистых заболеваний включают гипертензию, легочную гипертензию, порок легочного или трехстворчатого 15 клапана, порок клапанов аорты и митрального клапана, коарктацию аорты, атеросклероз, инфаркт миокарда, сердечную недостаточность, ишемическую кардиомиопатию, дилатационную кардиомиопатию, хроническую аритмию, фиброз сердца и коронарную недостаточность.

15 Термины "неврологические заболевания" или "нервно-психиатрические заболевания" определяются здесь как заболевания, характеризующиеся дисфункцией нейронов и гибелью нервных клеток, что приводит к неизлечимым и зачастую фатальным функциональным дефектам. Неограничительные примеры неврологических заболеваний включают боковой амиотрофический склероз, болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз, нейровоспаление, церебральную ишемию и невропатические боли.

20 25 В настоящем изобретении термин "субъект" относится к млекопитающим. Например, млекопитающие, предусмотренные настоящим изобретением, включают человека, приматов, таких домашних животных, как крупный рогатый скот, овцы, свиньи, лошади, лабораторных грызунов и пр.

25 30 "Эффективность" лечения или способа по изобретению может быть измерена на основании изменений течения заболевания в ответ на применение способа по изобретению. Например, эффективность лечения или способа по изобретению может быть измерена по его воздействию на признаки или симптомы заболевания. Ответ достигается, если пациент испытывает частичное или полное облегчение или уменьшение нежелательных симптомов заболевания.

35 40 В настоящем изобретении термин "эффективное количество" означает такое количество по меньшей мере одного антитела по изобретению или его фармацевтической композиции, которое вызывает заметное ослабление симптомов заболевания у субъекта, которому вводится данное антитело, причем эти симптомы могут включать, к примеру: а) понос, боли в животе и колики, кровь в кале, абсцессы, язвы и свищи при воспалительной болезни кишечника либо б) запор или понос, ярко-красную или темно-красную кровь в кале, потерю веса, усталость, тошноту и анемию при колоректальном раке.

ММР9-связывающие белки

Общая характеристика ММР9-связывающих белков

45 В первом аспекте настоящего изобретения предусмотрены белки, которые связываются с ММР9, в частности, с ММР9 человека или его фрагментами, и содержат по меньшей мере один фрагмент вариабельной области тяжелой цепи и/или по меньшей мере один фрагмент вариабельной области легкой цепи антител, как описано здесь.

В одном воплощении изобретения предусмотрены выделенные антитела, специфичные к MMP9, в частности MMP9 человека, либо их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие по меньшей мере один фрагмент вариабельной области тяжелой цепи и по меньшей мере один фрагмент вариабельной области легкой цепи, а также

5 необязательно хотя бы один фрагмент константной области, как описано здесь.

В альтернативном воплощении изобретения предусмотрены выделенные антитела, специфичные к MMP9, в частности MMP9 человека, либо их антигенсвязывающие фрагменты, характеризующиеся их связыванием с эпитопом на MMP9, как описано здесь.

10 Белок, с которым связываются антитела по изобретению или их фрагменты, может представлять собой белок MMP9 из любого вида.

Антитела по настоящему изобретению обычно проявляют высокую специфичность к MMP9 человека. Однако, в зависимости от степени идентичности последовательностей между гомологами MMP9 из разных видов (см. фиг. 2), данное антитело или

15 антигенсвязывающий фрагмент может проявлять перекрестную реактивность с MMP9 из по меньшей мере еще одного другого вида, например, мыши, крысы, мартышки, макаки (например, макаки-крабоеда), собаки и/или кролика. Для антител, направленных на MMP9 человека, может быть желательным некоторый уровень перекрестной реактивности с другими формами MMP9 млекопитающих при определенных 20 обстоятельствах, например, при тестировании антител на животных моделях определенных заболеваний или при проведении исследований по токсикологии, безопасности и дозировке.

В одном конкретном воплощении антитела по изобретению либо их фрагменты преимущественно связываются с MMP9 человека.

25 В другом воплощении антитела по изобретению либо их фрагменты проявляют перекрестную реактивность с MMP9 человека, MMP9 макаки-крабоеда, MMP9 крысы и необязательно MMP9 мыши.

В некоторых воплощениях средство связывания (которое обратно пропорционально 30 значению K_d) антител и их фрагментов по изобретению для MMP9 человека по меньшей мере в 2 раза, в 5 раз, в 10 раз, в 50 раз, в 100 раз, в 500 раз или по меньшей мере в 1000 раз выше, чем средство связывания для других MMP9, а не человека.

В одном воплощении антитела по изобретению либо их фрагменты преимущественно связываются с MMP9 и необязательно также проявляют слабое связывание или практически не связываются (т.е. незначительное связывание или оно не обнаруживается) 35 с другими матриксными металлопротеиназами (MMPs), такими как MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9, MMP10, MMP12, MMP13, MMP14, MMP16, MMP17, MMP19.

В предпочтительном воплощении антитела по изобретению либо их фрагменты преимущественно связываются с MMP9 и проявляют слабое связывание или практически не связываются (т.е. незначительное связывание или оно не обнаруживается) с MMP2.

40 Для терапевтического применения может быть выгодным, чтобы антитела по изобретению либо их фрагменты не связывались и тем самым не нейтрализовали MMP2 с тем, чтобы они существенно не влияли на активность MMP2. Действительно, MMP2 необходима для нормального гомеостаза тканей и также может иметь защитную 45 роль против заболеваний, о чем свидетельствуют наблюдения, согласно которым мыши с нокаутом MMP2 проявляют худший фенотип, чем мыши дикого типа, на нескольких моделях заболеваний (Grag et al., 2006, J. Immunol., 177(6): 4103-12).

В некоторых воплощениях средство связывания антител (которое обратно

пропорционально значению равновесной константы диссоциации K_d) и их фрагментов по изобретению для MMP9 человека по меньшей мере в 2 раза, в 5 раз, в 10 раз, в 50 раз, в 100 раз, в 500 раз или по меньшей мере в 1000 раз выше, чем средство связывания для MMP2.

5 Средство связывания может быть измерено любым методом, известным в данной области, включая равновесный диализ, равновесное связывание, гель-фильтрацию, ELISA, поверхностный плазмонный резонанс или спектроскопию (например, флуоресцентным методом) (Jiang et al., BMC Pharmacology 2010, 10: 10) и может быть выражено, к примеру, в виде константы диссоциации (K_d), константы равновесия (K_{eq})
10 или любого другого термина, используемого в данной области.

В некоторых воплощениях антитела и их фрагменты по изобретению специфически связываются с MMP9 человека с константой диссоциации (K_d), равной или меньше 100 нМ, в частности, менее 10 нМ, более предпочтительно менее 1 нМ или менее 0,5 нМ
15 или менее 0,1 нМ или менее 0,01 нМ или менее 0,005 нМ.

Белок, с которым связываются антитела по изобретению либо их фрагменты, представляет собой любую форму MMP9: незрелый белок, содержащий последовательность лидера секреции ("препрофермент") (соответствующий остаткам 1-707 в SEQ ID NO: 1 в случае MMP9 человека), зрелый латентный MMP9, лишенный 20 последовательности лидера секреции ("профермент") (соответствующий остаткам 20-707 в SEQ ID NO: 1 в случае MMP9 человека), "активированный фермент" (соответствующий остаткам 107-707 в SEQ ID NO: 1 в случае MMP9 человека) или любой фрагмент MMP9.

25 Антитела по изобретению либо их фрагменты могут связываться с MMP9 путем взаимодействия с эпитопом, включающим аминокислоты, расположенные в любом месте белка, например, в про-домене, каталитическом домене, в частности, в Fn-повторах или домене OG линкера, причем распознаваемые аминокислоты располагаются в одном или нескольких местах внутри белка.

30 В предпочтительном воплощении антитела по изобретению либо их антигенсвязывающие фрагменты связываются с MMP9 путем взаимодействия с эпитопом, включающим аминокислоты, расположенные в каталитическом домене MMP9, в частности, MMP9 человека.

35 В более предпочтительном воплощении антитела по изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с MMP9 путем взаимодействия с эпитопом, включающим по меньшей мере одну аминокислоту из участка, состоящего из SEQ ID NO: 41, по меньшей мере одну аминокислоту из участка, состоящего из SEQ ID NO: 42, и по меньшей мере одну аминокислоту из участка, состоящего из SEQ ID NO: 43, который располагается в каталитическом домене MMP9 человека.

40 В еще более предпочтительном воплощении антитела по изобретению либо их антигенсвязывающие фрагменты связываются с MMP9 путем взаимодействия с эпитопом, включающим аминокислоты из участка, состоящего из SEQ ID NO: 41, аминокислоты из участка, состоящего из SEQ ID NO: 42, и аминокислоты из участка, состоящего из SEQ ID NO: 43, который располагается в каталитическом домене MMP9 человека.

45 В следующем предпочтительном воплощении антитела по изобретению либо их антигенсвязывающие фрагменты связываются с MMP9 путем взаимодействия с эпитопом, включающим по меньшей мере одну, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или по меньшей мере пять аминокислот из участка,

состоящего из SEQ ID NO: 41, по меньшей мере одну, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или по меньшей мере пять аминокислот из участка, состоящего из SEQ ID NO: 42, и по меньшей мере одну, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или по меньшей мере пять аминокислот из участка, состоящего из SEQ ID NO: 43, который располагается в каталитическом домене MMP9 человека.

Так, в одном воплощении антитела по изобретению или их фрагменты не только связываются с MMP9, но также нейтрализируют или ингибируют активность MMP9 (например, каталитическую активность MMP9) путем ингибирования процессинга препрофермента и/или профермента в каталитически активный фермент и/или путем ингибирования протеолитической активности активированного фермента.

В одном предпочтительном воплощении антитела по изобретению либо их фрагменты не только связываются с MMP9, но также нейтрализируют или ингибируют активность MMP9 (например, каталитическую активность MMP9) путем ингибирования протеолитической активности активированного фермента MMP9.

В одном предпочтительном воплощении антитела по настоящему изобретению проявляют высокую специфичность и ингибирующую активность в отношении MMP9 человека и могут проявлять перекрестную реактивность с MMP9 макаки-крабоеда (*Macaca fascicularis*), MMP9 крысы и/или MMP9 мыши.

В одном предпочтительном воплощении антитела по изобретению либо их фрагменты ингибируют активность MMP9 и необязательно также проявляют слабую ингибирующую активность или практически не проявляют ингибирующей активности (т.е. активность незначительна или не обнаруживается) в отношении других матриксных металлопротеиназ (MMP), таких как MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9, MMP10, MMP12, MMP13, MMP14, MMP16, MMP17, MMP19.

В одном предпочтительном воплощении антитела по изобретению либо их фрагменты проявляют нейтрализующую активность в отношении MMP9 и слабую или практически не проявляют нейтрализующей активности в отношении MMP2 (т.е. активность незначительна или не обнаруживается).

Способность антитела блокировать или нейтрализовать активность целевого белка можно оценить по его действенности, как определено здесь, которая сама выражается, к примеру, величиной IC₅₀. Как правило, нейтрализующая активность антитела против MMP9 определяется бесклеточными методами *in vitro* или методами *in vivo* или функциональными методами *in vitro* типа анализа инвазии клеток раковой линии человека. При анализе инвазии клеток раковой линии человека методом Transwell раковые клетки спускаются и мигрируют через матрикс типа базальной мембранны (Matrigel[®]), тем самым имитируя процесс интравазации опухолевых клеток *in vivo* в близлежащие кровеносные сосуды и экстравазации и инвазии в отдаленные ткани.

В некоторых воплощениях ингибирующая или нейтрализующая способность (которая обратно пропорциональна значению IC₅₀) антител и их фрагментов по изобретению для MMP9 человека по меньшей мере в 2 раза, в 5 раз, в 10 раз, в 50 раз, в 100 раз, в 500 раз или по меньшей мере в 1000 раз выше, чем нейтрализующая способность для других MMP9, а не человека.

В некоторых воплощениях ингибирующая или нейтрализующая способность, которая обратно пропорциональна значению IC₅₀, антител и их фрагментов по изобретению для MMP9 человека по меньшей мере в 10 раз, в 50 раз, в 100 раз, в 500 раз или по меньшей мере в 1000 раз выше, чем ингибирующая или нейтрализующая способность

для MMP2.

В некоторых воплощениях антитела и их фрагменты по изобретению проявляют значение IC₅₀, равное или меньше 100 нМ, в частности, менее 50 нМ, более 5 нМ, менее 20 нМ, менее 10 нМ, менее 8 нМ, менее 7 нМ, менее 6 нМ, менее 5 нМ, менее 4 нМ, менее 3 нМ, менее 2 нМ, менее 1 нМ, менее 0,5 нМ, менее 0,3 нМ, менее 0,2 нМ или менее 0,1 нМ; при ингибировании каталитической активности MMP9 на желатине.

Способность антитела блокировать или нейтрализовать активность целевого белка также можно оценить по его эффективности ингибирования, как определено 10 здесь, которая сама выражается, к примеру, величиной процента (%) ингибирования.

В некоторых воплощениях антитела и их фрагменты по изобретению проявляют эффективность, равную или больше 50%, в частности, равную или больше 60%, в частности, равную или больше 70%, в частности, равную или больше 80%, в частности, равную или больше 90%, в частности, равную или больше 95%, в частности, равную 15 100%, при ингибировании процессинга препрофермента и/или профермента и/или при ингибировании протеолитической активности активированного MMP9, которая определяется, к примеру, методом измерения каталитической активности MMP9 в отношении желатина, как описано в разделе «Примеры».

В предпочтительном воплощении антитела и их фрагменты по изобретению 20 проявляют эффективность, равную или больше 50%, в частности, равную или больше 60%, в частности, равную или больше 70%, в частности, равную или больше 80%, в частности, равную или больше 90%, в частности, равную или больше 95%, в частности, равную 25 100%, при ингибировании протеолитической активности активированного MMP9, которая определяется, к примеру, методом измерения каталитической активности MMP9 в отношении желатина, как описано в разделе «Примеры».

Предполагается, что любой вариант антитела по изобретению или его фрагмента, который описан здесь, способен связываться с MMP9 и необязательно нейтрализовать активность MMP9. В предпочтительном воплощении такой вариант может проявлять такое же или еще более высокое средство связывания для MMP9 и/или такую же или еще большую действенность и/или такую же или большую видоспецифичность и/или такую же или большую избирательность для MMP9 и/или такую же или большую нейтрализующую эффективность по сравнению с тем исходным антителом или фрагментом, из которого происходит данный вариант.

Антитела по изобретению могут представлять собой моноклональные антитела, 35 поликлональные антитела, человеческие антитела, гуманизованные антитела, химерные антитела и другие генно-инженерные антитела, если только они сохраняют характерные свойства по изобретению, в частности, способность к связыванию с целевым антигеном, более предпочтительно с тем же самым эпитопом MMP9, который распознается антителами по изобретению, а также необязательно способность к нейтрализации 40 активности MMP9.

В одном предпочтительном воплощении изобретения антитела, специфичные к MMP9 по изобретению, либо их фрагменты, которые специфически связываются с MMP9, являются моноклональными антителами.

В другом предпочтительном воплощении изобретения антитела, специфичные к 45 MMP9 по изобретению, либо их фрагменты, которые специфически связываются с MMP9, являются человеческими антителами.

Антитела, специфичные к MMP9 по изобретению, либо их фрагменты, которые специфически связываются с MMP9, могут характеризоваться той частью, которая

взаимодействует с целевым белком, в частности, их вариабельной областью, которая обычно включает вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи.

Характеристики MMP9-связывающих белков в отношении вариабельной области

5 тяжелой цепи

В одном воплощении изобретение касается выделенных антител, специфичных к MMP9, либо их антиген-связывающих фрагментов, содержащих вариабельную область тяжелой цепи, включающую:

(i) CDR1 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 2 или его вариант, у которого 1, 2 или 3

10 аминокислоты данного CDR1 тяжелой цепи заменены другими аминокислотами;

(ii) CDR2 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 3 или его вариант, у которого 1, 2 или 3 аминокислоты данного CDR2 тяжелой цепи заменены другими аминокислотами;

(iii) CDR3 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 4 или его вариант, у которого 1, 2 или 3 аминокислоты данного CDR3 тяжелой цепи заменены другими аминокислотами.

15 В одном конкретном воплощении изобретения по меньшей мере одна аминокислота в положениях 53 и 61 данного CDR2 тяжелой цепи и/или одна аминокислота в положении 100J данного CDR3 тяжелой цепи заменена другой аминокислотой, в частности, по меньшей мере по одной из следующих замен: N53Q или N53R, D61E, M100J.

20 В одном конкретном воплощении изобретения по меньшей мере одна аминокислота в положениях 53, 61 и 62 данного CDR2 тяжелой цепи и/или одна аминокислота в положении 100L данного CDR3 тяжелой цепи заменена другой аминокислотой, в частности, по меньшей мере по одной из следующих замен: N53Q, N53R, N53K, N53H, D61E, S62T, M100LI или M100LL.

25 В другом конкретном воплощении изобретения данный вариант CDR2 тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, выбранную из: SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9.

В другом конкретном воплощении изобретения данный вариант CDR2 тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, выбранную из: SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 51.

30 В другом конкретном воплощении изобретения данный вариант CDR3 тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

В другом конкретном воплощении изобретения данный вариант CDR3 тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52.

35 В другом конкретном воплощении изобретения антитела, специфичные к MMP9, или их антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12 либо ее вариант, у которого 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 и вплоть до 25 аминокислот в SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12 заменены другими аминокислотами, либо ее вариант, который по меньшей мере на 80%, на 85%, на 90%, на 95%, на 98% или по меньшей мере на 99% идентичен SEQ ID NO: 11 или SEQ 40 ID NO: 12, соответственно.

45 В другом конкретном воплощении изобретения антитела, специфичные к MMP9, или их антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 11 либо ее вариант, у которого 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 и вплоть до 25 аминокислот заменены другими аминокислотами, причем данные аминокислоты содержатся в каркасных участках данной вариабельной области тяжелой цепи.

В другом конкретном воплощении изобретения антитела, специфичные к MMP9, или их антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 11 либо ее вариант, у которого 1, 2, 3, 4 аминокислоты заменены другими

аминокислотами, причем данные аминокислоты содержатся в каркасных участках данной вариабельной области тяжелой цепи.

В другом конкретном воплощении изобретения антитела, специфичные к MMP9, или их антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 11 либо ее вариант, у которого 2 аминокислоты заменены другими аминокислотами, причем данные аминокислоты содержатся в каркасных участках данной вариабельной области тяжелой цепи.

В другом конкретном воплощении изобретения антитела, специфичные к MMP9, или их антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 11 либо ее вариант, у которого 2 аминокислоты заменены другими аминокислотами, причем данная вариабельная область тяжелой цепи представлена SEQ ID NO: 12.

В другом конкретном воплощении изобретения антитела, специфичные к MMP9, или их антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 11 либо ее вариант, у которого 3 аминокислоты заменены другими аминокислотами, причем данные аминокислоты содержатся в каркасных участках данной вариабельной области тяжелой цепи.

В другом конкретном воплощении изобретения антитела, специфичные к MMP9, или их антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 11 либо ее вариант, у которого 3 аминокислоты заменены другими аминокислотами, причем данная вариабельная область тяжелой цепи представлена SEQ ID NO: 48.

В следующем воплощении антитела, специфичные к MMP9, либо их антигенсвязывающие фрагменты включают вариант SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12, у которого 1, 2 или 3 аминокислоты по меньшей мере одного из CDR1, CDR2 и/или CDR3 тяжелой цепи и/или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот каркасных участков вариабельной области тяжелой цепи заменены другими аминокислотами.

В следующем воплощении антитела, специфичные к MMP9, либо их антигенсвязывающие фрагменты включают вариант SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12, у которого 1, 2 или 3 аминокислоты по меньшей мере одного из CDR1, CDR2 и/или CDR3 тяжелой цепи и/или 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот каркасных участков вариабельной области тяжелой цепи заменены другими аминокислотами.

В частности, специфичные к MMP9 антитела либо их фрагменты по изобретению включают вариант SEQ ID NO: 11, у которого по меньшей мере одна аминокислота в положениях 53 и 61 CDR2 тяжелой цепи, по меньшей мере одна аминокислота в положении 100J CDR3 тяжелой цепи и в положениях 84 и 89 каркасных участков вариабельной области тяжелой цепи заменена другой аминокислотой, в частности, по меньшей мере по одной из следующих замен: N53Q, N53R, D61E, M100L, D84A и V89L.

В частности, специфичные к MMP9 антитела либо их фрагменты по изобретению включают вариант SEQ ID NO: 11, у которого по меньшей мере одна аминокислота в положениях 53, 61 и 62 CDR2 тяжелой цепи, по меньшей мере одна аминокислота в положении 100L CDR3 тяжелой цепи и в положениях 84 и 89 каркасных участков вариабельной области тяжелой цепи заменена другой аминокислотой, в частности, по меньшей мере по одной из следующих замен: N53Q, N53R, N53K, N53H, D61E, S62T, D84A, V89L, M100LL и M100LI.

Более предпочтительно специфичные к MMP9 антитела либо их фрагменты по изобретению включают вариант SEQ ID NO: 11, у которого аминокислоты в положениях 84 и 89 каркасных участков вариабельной области тяжелой цепи и по меньшей мере

одна аминокислота в положениях 53 и 61 CDR2 тяжелой цепи и в положении 100J CDR3 тяжелой цепи заменена другой аминокислотой, в частности, при заменах D84A и V89L и по меньшей мере одной из следующих замен: N53Q, N53R, D61E и M100L.

В частности, специфичные к MMP9 антитела либо их фрагменты по изобретению

- 5 включают вариант SEQ ID NO: 11, у которого по меньшей мере одна аминокислота в положениях 53, 61 и 62 CDR2 тяжелой цепи, по меньшей мере одна аминокислота в положении 100L CDR3 тяжелой цепи и в положениях 30, 84 и 89 каркасных участков вариабельной области тяжелой цепи заменена другой аминокислотой, в частности, по меньшей мере по одной из следующих замен: N53Q, N53R, N53K, N53H, D61E, S62T,
10 M100LL, M100LI, N30D, D84A и V89L.

Конкретные примеры вариабельной области тяжелой цепи, содержащейся в антителах либо их фрагментах по изобретению, включают:

- (i) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11,
- (ii) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12,
- 15 (iii) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13,
- (iv) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14,
- (v) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15,
- (vi) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

Альтернативные конкретные примеры вариабельной области тяжелой цепи,

- 20 содержащейся в антителах либо их фрагментах по изобретению, включают:

- (i) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17,
- (ii) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,
- (iii) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19,
- (iv) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

25 Альтернативные конкретные примеры вариабельной области тяжелой цепи, содержащейся в антителах либо их фрагментах по изобретению, включают:

- (i) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48,
- (ii) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53,
- (iii) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54,
- 30 (iv) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55,
- (v) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56.

Характеристики MMP9-связывающих белков в отношении вариабельной области легкой цепи

В одном воплощении изобретение касается выделенных антител, специфичных к

- 35 MMP9, либо их антиген-связывающих фрагментов, содержащих вариабельную область тяжелой цепи, как описано выше, а также содержащих вариабельную область легкой цепи, включающую:

- (i) CDR1 легкой цепи по SEQ ID NO: 21 или его вариант, у которого 1, 2 или 3 аминокислоты данного CDR1 легкой цепи заменены другими аминокислотами;
- 40 (ii) CDR2 легкой цепи по SEQ ID NO: 22 или его вариант, у которого 1, 2 или 3 аминокислоты данного CDR2 легкой цепи заменены другими аминокислотами;
- (iii) CDR3 легкой цепи по SEQ ID NO: 23 или его вариант, у которого 1, 2 или 3 аминокислоты данного CDR3 легкой цепи заменены другими аминокислотами.

В одном конкретном воплощении изобретения антитела, специфичные к MMP9,

- 45 либо их антигена-связывающие фрагменты содержат вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 25 либо ее вариант, у которого 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, до 22 или вплоть до 25 аминокислот в SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 25 заменены другими аминокислотами, либо ее вариант, который по меньшей мере на 80%, на 85%,

на 90%, на 95%, на 98% или по меньшей мере на 99% идентичен SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 25, соответственно.

В одном конкретном воплощении изобретения антитела, специфичные к MMP9, либо их антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 67 либо ее вариант, у которого 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, до 22 или вплоть до 25 аминокислот в SEQ ID NO: 67 заменены другими аминокислотами, либо ее вариант, который по меньшей мере на 80%, на 85%, на 90%, на 95%, на 98% или по меньшей мере на 99% идентичен SEQ ID NO: 67.

В следующем воплощении антитела, специфичные к MMP9, либо их

10 антигенсвязывающие фрагменты включают вариант SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 25, у которого 1, 2 или 3 аминокислоты по меньшей мере одного из CDR1, CDR2 и/или CDR3 легкой цепи и/или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот каркасных участков вариабельной области легкой цепи заменены другими аминокислотами.

В следующем воплощении антитела, специфичные к MMP9, либо их

15 антигенсвязывающие фрагменты включают вариант SEQ ID NO: 67, у которого 1, 2 или 3 аминокислоты по меньшей мере одного из CDR1, CDR2 и/или CDR3 легкой цепи и/или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот каркасных участков вариабельной области легкой цепи заменены другими аминокислотами.

В другом конкретном воплощении изобретения антитела, специфичные к MMP9,

20 либо их антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 67 либо ее вариант, у которого 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 и вплоть до 25 аминокислот заменены другими аминокислотами, причем данные аминокислоты содержатся в каркасных участках данной вариабельной области легкой цепи.

В другом конкретном воплощении изобретения антитела, специфичные к MMP9,

25 либо их антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 67 либо ее вариант, у которого 1, 2, 3, 4 аминокислоты заменены другими аминокислотами, причем данные аминокислоты содержатся в каркасных участках данной вариабельной области легкой цепи.

В другом конкретном воплощении изобретения антитела, специфичные к MMP9,

30 либо их антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 67 либо ее вариант, у которого 1 аминокислота заменена другой аминокислотой, причем данная аминокислота содержится в каркасном участке данной вариабельной области легкой цепи.

В другом конкретном воплощении изобретения антитела, специфичные к MMP9,

35 либо их антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 67 либо ее вариант, у которого 1 аминокислота заменена другой аминокислотой, причем данная вариабельная область легкой цепи представлена SEQ ID NO: 68.

В другом конкретном воплощении изобретения антитела, специфичные к MMP9,

40 либо их антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 67 либо ее вариант, у которого 3 аминокислоты заменены другими аминокислотами, причем данные аминокислоты содержатся в каркасных участках данной вариабельной области легкой цепи.

В другом конкретном воплощении изобретения антитела, специфичные к MMP9,

45 либо их антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 67 либо ее вариант, у которого 3 аминокислоты заменены другими аминокислотами, причем данная вариабельная область легкой цепи представлена SEQ ID NO: 57.

В следующем воплощении антитела, специфичные к MMP9, либо их антигенсвязывающие фрагменты включают вариант SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 25, у которого 1, 2 или 3 аминокислоты по меньшей мере одного из CDR1, CDR2 и/или CDR3 легкой цепи и/или 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот каркасных участков

5 вариабельной области легкой цепи заменены другими аминокислотами.

В частности, специфичные к MMP9 антитела либо их фрагменты по изобретению включают вариант SEQ ID NO: 24, у которого по меньшей мере одна аминокислота в положении 104 каркасного участка вариабельной области легкой цепи заменена другой аминокислотой, в частности, по меньшей мере по следующей замене: V104L.

10 Один конкретный пример вариабельной области, содержащейся в антителах либо их фрагментах по изобретению, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25.

15 В частности, специфичные к MMP9 антитела либо их фрагменты по изобретению включают вариант SEQ ID NO: 67, у которого аминокислота в положении 104 каркасного участка легкой цепи заменена другой аминокислотой, в частности, по меньшей мере по следующей замене: V104L.

Один конкретный пример вариабельной области, содержащейся в антителах либо их фрагментах по изобретению, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

20 В частности, специфичные к MMP9 антитела либо их фрагменты по изобретению включают вариант SEQ ID NO: 67, у которого по меньшей мере три аминокислоты в положениях 46, 71 и 104 каркасных участков легкой цепи заменены другими аминокислотами, в частности, по меньшей мере по следующей замене: V46L, V71A и V104L.

25 Один конкретный пример вариабельной области, содержащейся в антителах либо их фрагментах по изобретению, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57.

30 В альтернативном воплощении изобретение касается выделенных антител, специфичных к MMP9, либо их антиген-связывающих фрагментов, содержащих вариабельную область тяжелой цепи, как описано выше, а также содержащих вариабельную область легкой цепи, включающую:

35 (i) CDR1 легкой цепи по SEQ ID NO: 26 или его вариант, у которого 1, 2 или 3 аминокислоты данного CDR1 легкой цепи заменены другими аминокислотами;

(ii) CDR2 легкой цепи по SEQ ID NO: 27 или его вариант, у которого 1, 2 или 3

40 аминокислоты данного CDR2 легкой цепи заменены другими аминокислотами;

(iii) CDR3 легкой цепи по SEQ ID NO: 28 или его вариант, у которого 1, 2 или 3 аминокислоты данного CDR3 легкой цепи заменены другими аминокислотами.

45 В одном конкретном воплощении изобретения антитела, специфичные к MMP9, либо их антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30 либо ее вариант, у которого 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, до 22 или вплоть до 25 аминокислот в SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30 заменены другими аминокислотами, либо ее вариант, который по меньшей мере на 80%, на 85%, на 90%, на 95%, на 98% или по меньшей мере на 99% идентичен SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30, соответственно.

50 В одном конкретном воплощении изобретения антитела, специфичные к MMP9, либо их антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 69 либо ее вариант, у которого 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, до 22 или вплоть до 25 аминокислот в SEQ ID NO: 69 заменены другими аминокислотами, либо

ее вариант, который по меньшей мере на 80%, на 85%, на 90%, на 95%, на 98% или по меньшей мере на 99% идентичен SEQ ID NO: 69.

В следующем воплощении антитела, специфичные к MMP9, либо их антигенсвязывающие фрагменты включают вариант SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30, 5 у которого 1, 2 или 3 аминокислоты по меньшей мере одного из CDR1, CDR2 и/или CDR3 легкой цепи и/или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот каркасных участков вариабельной области легкой цепи заменены другими аминокислотами.

В следующем воплощении антитела, специфичные к MMP9, либо их антигенсвязывающие фрагменты включают вариант SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 30, 10 у которого 1, 2 или 3 аминокислоты по меньшей мере одного из CDR1, CDR2 и/или CDR3 легкой цепи и/или 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот каркасных участков вариабельной области легкой цепи заменены другими аминокислотами.

В другом конкретном воплощении изобретения антитела, специфичные к MMP9, либо их антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельную область легкой цепи 15 по SEQ ID NO: 69 либо ее вариант, у которого 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 и вплоть до 25 аминокислот заменены другими аминокислотами, причем данные аминокислоты содержатся в каркасных участках данной вариабельной области легкой цепи.

В другом конкретном воплощении изобретения антитела, специфичные к MMP9, либо их антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельную область легкой цепи 20 по SEQ ID NO: 69 либо ее вариант, у которого 3, 4, 5, 6, 7, 8 аминокислот заменены другими аминокислотами, причем данные аминокислоты содержатся в каркасных участках данной вариабельной области легкой цепи.

В другом конкретном воплощении изобретения антитела, специфичные к MMP9, либо их антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельную область легкой цепи 25 по SEQ ID NO: 69 либо ее вариант, у которого 4 аминокислоты заменены другими аминокислотами, причем данные аминокислоты содержатся в каркасных участках данной вариабельной области легкой цепи.

В другом конкретном воплощении изобретения антитела, специфичные к MMP9, либо их антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельную область легкой цепи 30 по SEQ ID NO: 69, у которой 4 аминокислоты заменены другими аминокислотами, причем данная вариабельная область легкой цепи представлена SEQ ID NO: 58.

В другом конкретном воплощении изобретения антитела, специфичные к MMP9, либо их антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 69 либо ее вариант, у которого 5 аминокислот заменены другими 35 аминокислотами, причем данные аминокислоты содержатся в каркасных участках данной вариабельной области легкой цепи.

В другом конкретном воплощении изобретения антитела, специфичные к MMP9, либо их антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 69, у которой 5 аминокислот заменены другими аминокислотами, причем 40 данная вариабельная область легкой цепи выбрана из SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60 и SEQ ID NO: 61.

В другом конкретном воплощении изобретения антитела, специфичные к MMP9, либо их антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 29 либо ее вариант, у которого 6 аминокислот заменены другими 45 аминокислотами, причем данные аминокислоты содержатся в каркасных участках данной вариабельной области легкой цепи.

В другом конкретном воплощении изобретения антитела, специфичные к MMP9, либо их антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельную область легкой цепи

по SEQ ID NO: 29, у которой 6 аминокислот заменены другими аминокислотами, причем данная вариабельная область легкой цепи представлена SEQ ID NO: 30.

В другом конкретном воплощении изобретения антитела, специфичные к MMP9, либо их антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 69 либо ее вариант, у которого 6 аминокислот заменены другими аминокислотами, причем данные аминокислоты содержатся в каркасных участках данной вариабельной области легкой цепи.

В другом конкретном воплощении изобретения антитела, специфичные к MMP9, либо их антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 69, у которой 6 аминокислот заменены другими аминокислотами, причем данная вариабельная область легкой цепи выбрана из SEQ ID NO: 62 и SEQ ID NO: 70.

В другом конкретном воплощении изобретения антитела, специфичные к MMP9, либо их антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 69 либо ее вариант, у которого 7 аминокислот заменены другими аминокислотами, причем данные аминокислоты содержатся в каркасных участках данной вариабельной области легкой цепи.

В другом конкретном воплощении изобретения антитела, специфичные к MMP9, либо их антигенсвязывающие фрагменты содержат вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 69, у которой 7 аминокислот заменены другими аминокислотами, причем данная вариабельная область легкой цепи представлена SEQ ID NO: 63.

В частности, специфичные к MMP9 антитела либо их фрагменты по изобретению включают вариант SEQ ID NO: 29, у которого по меньшей мере одна аминокислота в положениях 8, 19, 47, 60, 79 и 81 каркасных участков легкой цепи заменена другой аминокислотой, в частности, по меньшей мере по одной из следующих замен: R8A, V19I, L47M, T60N, L79Q и A81E.

Один конкретный пример вариабельной области, содержащейся в антителах либо их фрагментах по изобретению, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

В частности, специфичные к MMP9 антитела либо их фрагменты по изобретению включают вариант SEQ ID NO: 69, у которого по меньшей мере одна аминокислота в положениях 8, 19, 47, 60, 79, 81, 86 каркасных участков легкой цепи заменена другой аминокислотой, в частности, по меньшей мере по одной из следующих замен: R8A, V19I, L47M, T60N, L79Q, A81E и F86Y.

Один конкретный пример вариабельной области, содержащейся в антителах либо их фрагментах по изобретению, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

Конкретные примеры вариабельной области легкой цепи, содержащейся в антителах либо их фрагментах по изобретению, включают:

- (i) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24,
- (ii) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25,
- (iii) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29,
- (iv) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30,
- (v) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57,
- (vi) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58,
- (vii) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59,
- (viii) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60,
- (ix) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61,
- (x) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62,

- (xi) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63,
- (xii) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67,
- (xiii) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68,
- (xiv) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69,
- 5 (xv) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

Характеристики MMP9-связывающих белков в отношении константной области

В выделенных антителах, специфичных к MMP9, либо их антиген-связывающих фрагментах по изобретению необязательно содержится часть, соответствующая константной области антител.

10 В зависимости от предполагаемой функции антител, в частности, эффекторных функций, которые могут потребоваться, константная область антител может и не присутствовать в антителах по изобретению.

Как правило, если она присутствует в антителах либо их антиген-связывающих фрагментах по изобретению, то константная область тяжелой цепи или ее часть может 15 происходить из антител любого изотипа. Например, константная область тяжелой цепи или ее часть может происходить из антитела, выбранного из IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgA (например, IgA1, IgA2), IgD, IgE, IgM (например, IgM1, IgM2). В частности, это может быть константная область или ее часть из IgG, более 25 предпочтительно IgG4.

20 В частности, когда молекула антитела предназначается для терапевтического применения и требуются эффекторные функции антитела, можно использовать домены константной области IgG человека, особенно изотипов IgG1 и IgG3. С другой стороны, когда молекула антитела предназначается для терапевтического применения, но его 25 эффекторные функции не нужны, например, для простого блокирования активности MMP9, то можно использовать изотипы IgG2 и IgG4.

Понятно, что также можно использовать и варианты последовательностей этих 30 доменов константной области. Например, константная область тяжелой цепи или ее часть может представлять собой искусственный вариант IgG4 типа варианта IgG4, содержащего S228P, R409K и делению концевого лизина, что соответствует

35 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 40.

Когда она присутствует в антителах или антиген-связывающих фрагментах по изобретению, константная область легкой цепи или ее часть может происходить из константной области любой легкой цепи. Например, константная область легкой цепи или ее часть может происходить из легкой цепи каппа или лямбда.

35 В предпочтительном аспекте изобретения антитела, специфичные к MMP9, либо их антигенсвязывающие фрагменты включают: (i) по меньшей мере одну тяжелую цепь, содержащую вариабельную область, как описано здесь, и константную область или ее часть из антитела типа IgG, и (ii) по меньшей мере одну легкую цепь, содержащую 40 вариабельную область, как описано здесь, и константную область или ее часть из легкой цепи лямбда (в частности, лямбда-2).

В предпочтительном воплощении константная область или ее часть из тяжелой цепи и/или легкой цепи, которая содержится в антителах по изобретению, имеет 45 аминокислотную последовательность, которая подвергалась модификации по сравнению с исходной аминокислотной последовательностью известными в данной области способами с тем, чтобы увеличить химическую стабильность антител, уменьшить их агрегацию, повысить их выработку, в частности, в вырабатывающих антитела клетках (например, в клетках HEK293, клетках CHO), и/или устраниТЬ способность к обмену полумолекул, что эффективно приводит к моновалентным антителам.

Примеры аминокислот в аминокислотной последовательности константной области антител, которые влияют на стабильность антител, включают аминокислотную мутацию S228P (нумерация по EU) в тяжелой цепи IgG4 человека, которая стабилизирует шарнирный домен антител (Angal et al, 1993, Molec. Immunol. 30: 105-108) и устраниет взаимодействия Fc-Fc (Rispens et al., 2013, Mol. Immunol. 53: 35-42), замену Lys (K) на Arg (R) в аллотипическом положении 409 (нумерация по EU), которая усиливает взаимодействия $\text{CH}_3\text{-CH}_3$ в IgG4 (Allberse et al, 2002, Immunology 105: 9-19), причем эти примеры включены сюда путем ссылки. Кроме того, для упрощения мониторинга гетерогенности заряда моноклональных антител можно удалить C-концевой лизин тяжелой цепи IgG4 человека.

В следующем воплощении антитела, специфичные к MMP9, либо их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению включают по меньшей мере одну тяжелую цепь, содержащую вариабельную область, как описано здесь, и константную область или ее часть из антитела типа IgG4, причем аминокислотная последовательность константной области IgG4 включает следующие модификации аминокислот: S228P (нумерация по EU), R409K (нумерация по EU), делецию концевого Lys (K), при этом данная модифицированная константная область представлена SEQ ID NO: 40.

В следующем воплощении антитела, специфичные к MMP9, либо их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению включают по меньшей мере одну легкую цепь, содержащую вариабельную область, как описано здесь, и константную область или ее часть из антитела типа IgG4, причем данная константная область представлена SEQ ID NO: 66.

Из вышеизложенного следует, что настоящим изобретением предусмотрены, в частности, выделенные антитела, специфичные к MMP9, либо их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие:

(1) вариабельную область тяжелой цепи, включающую:

(i) CDR1 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 2 или его вариант, у которого 1, 2 или 3 аминокислоты данного CDR1 тяжелой цепи заменены другими аминокислотами;
 (ii) CDR2 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 3 или его вариант, у которого 1, 2 или 3 аминокислоты данного CDR2 тяжелой цепи заменены другими аминокислотами;
 (iii) CDR3 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 4 или его вариант, у которого 1, 2 или 3 аминокислоты данного CDR3 тяжелой цепи заменены другими аминокислотами; и

(2) вариабельную область легкой цепи, включающую:

(i) CDR1 легкой цепи по SEQ ID NO: 21 или его вариант, у которого 1, 2 или 3 аминокислоты данного CDR1 легкой цепи заменены другими аминокислотами;
 (ii) CDR2 легкой цепи по SEQ ID NO: 22 или его вариант, у которого 1, 2 или 3 аминокислоты данного CDR2 легкой цепи заменены другими аминокислотами;
 (iii) CDR3 легкой цепи по SEQ ID NO: 23 или его вариант, у которого 1, 2 или 3 аминокислоты данного CDR3 легкой цепи заменены другими аминокислотами.

В другом воплощении настоящим изобретением предусмотрены выделенные антитела, специфичные к MMP9, либо их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие: (1) вариабельную область тяжелой цепи, включающую:

(1) CDR1 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 2 или его вариант, у которого 1, 2 или 3 аминокислоты данного CDR1 тяжелой цепи заменены другими аминокислотами;
 (ii) CDR2 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 3 или его вариант, у которого 1, 2 или 3 аминокислоты данного CDR2 тяжелой цепи заменены другими аминокислотами;
 (iii) CDR3 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 4 или его вариант, у которого 1, 2 или 3 аминокислоты данного CDR3 тяжелой цепи заменены другими аминокислотами; и

(2) вариабельную область легкой цепи, включающую:

- (i) CDR1 легкой цепи по SEQ ID NO: 26 или его вариант, у которого 1, 2 или 3 аминокислоты данного CDR1 легкой цепи заменены другими аминокислотами;
- (ii) CDR2 легкой цепи по SEQ ID NO: 27 или его вариант, у которого 1, 2 или 3 аминокислоты данного CDR2 легкой цепи заменены другими аминокислотами;
- (iii) CDR3 легкой цепи по SEQ ID NO: 28 или его вариант, у которого 1, 2 или 3 аминокислоты данного CDR3 легкой цепи заменены другими аминокислотами.

В другом конкретном воплощении изобретения данный вариант CDR2 тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, выбранную из: SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9.

В другом конкретном воплощении изобретения данный вариант CDR2 тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, выбранную из: SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 51.

В другом конкретном воплощении изобретения данный вариант CDR3 тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

В другом конкретном воплощении изобретения данный вариант CDR3 тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52.

Антитела по изобретению содержат по меньшей мере один антиген-связывающий сайт, например, один или два антиген-связывающих сайта. В некоторых воплощениях, к примеру, для содержащих CDR пептидов, вариабельный домен может содержать только участки CDR, соединенные короткими пептидными линкерами, вместо полных каркасных участков.

В некоторых воплощениях выделенные антитела и их антиген-связывающие фрагменты по изобретению являются гликозилированными. Как правило, такие моносахариды, как N-ацетилглюкозамин, манноза, глюкоза, галактоза, фукоза, сиаловая кислота и др., составляют олигосахариды в отдельных сайтах гликозилирования на антителах.

Специалисты должны понимать, что один из аспектов настоящего изобретения относится к таким выделенным антителам, специфичным к MMP9, либо их антигенсвязывающим фрагментам, которые характеризуются некоторыми из описанных здесь признаков, но не обязательно включают все указанные признаки.

Например, в одном аспекте предусмотрены выделенные антитела, специфичные к MMP9, либо их антиген-связывающие фрагменты, которые характеризуются любыми из описанных здесь признаков в отношении последовательностей их вариабельных областей и/или константных областей.

В предпочтительном воплощении данного аспекта указанные антитела либо их фрагменты дополнительно характеризуются связыванием с MMP9 путем взаимодействия с эпитопом на MMP9, как описано здесь, в частности, эпитопом, включающим по меньшей мере одну аминокислоту из участка, состоящего из SEQ ID NO: 41, по меньшей мере одну аминокислоту из участка, состоящего из SEQ ID NO: 42, и по меньшей мере одну аминокислоту из участка, состоящего из SEQ ID NO: 43, который располагается в катализическом домене MMP9 человека.

В альтернативном аспекте предусмотрены выделенные антитела, специфичные к MMP9, либо их антиген-связывающие фрагменты, которые характеризуются связыванием с MMP9 путем взаимодействия с эпитопом на MMP9, как описано здесь, в частности, эпитопом, включающим по меньшей мере одну аминокислоту из участка, состоящего из SEQ ID NO: 41, по меньшей мере одну аминокислоту из участка, состоящего из SEQ ID NO: 42, и по меньшей мере одну аминокислоту из участка,

состоящего из SEQ ID NO: 43, который располагается в каталитическом домене MMP9 человека.

В предпочтительном воплощении данного альтернативного аспекта указанные антитела либо их фрагменты дополнительно характеризуются любыми из описанных 5 здесь признаков в отношении последовательностей их вариабельных областей и/или константных областей.

Примеры антител, специфичных к MMP9, либо их антиген-связывающих фрагментов

Примеры антител и их фрагментов по изобретению включают те, которые содержат вариабельные домены, указанные в таблице 2 (также см. фиг. 3, 4, 5).

10

Таблица 2

Наименование	Последовательность вариабельной области тяжелой цепи	Последовательность вариабельной области легкой цепи
F20-VH/ B03-VL	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 24
F20-VH-GL1/ B03-VL	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 24
F20-VH-GL1-V1/ B03-VL	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 24
F20-VH-GL1-V4/ B03-VL	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 24
F20-VH-GL1-V9/ B03-VL	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 24
F20-VH-GL1-V14/ B03-VL	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 24
F20-VH-GL1-V1-V9/ B03-VL	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 24
F20-VH-GL1-V1-V9-V14/ B03-VL	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 24
F20-VH-GL1-V4 -V9/ B03-VL	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 24
F20-VH-GL1-V4-V9-V14/ B03-VL	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 24
F20-VH/ B03-VL-GL1	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 25
F20-VH-GL1/ B03-VL-GL1	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 25
F20-VH-GL1-V1/ B03-VL-GL1	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 25
F20-VH-GL1-V4/ B03-VL-GL1	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 25
F20-VH-GL1-V9/ B03-VL-GL1	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 25
F20-VH-GL1-V14/ B03-VL-GL1	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 25
F20-VH-GL1-V1-V9/ B03-VL-GL1	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 25
F20-VH-GL1-V1-V9-V14/ B03-VL-GL1	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 25
F20-VH-GL1-V4-V9/ B03-VL-GL1	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 25
F20-VH-GL1-V4-V9-V14/ B03-VL-GL1	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 25
F20-VH/ B08-VL	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 29

	F20-VH-GL1/ B08-VL	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 29
5	F20-VH-GL1-V1/ B08-VL	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 29
	F20-VH-GL1-V4/ B08-VL	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 29
	F20-VH-GL1-V9/ B08-VL	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 29
10	F20-VH-GL1-V14/ B08-VL	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 29
	F20-VH-GL1-V1-V9/ B08-VL	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 29
	F20-VH-GL1-V1-V9-V14/ B08-VL	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 29
	F20-VH-GL1-V4 -V9/ B08-VL	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 29
15	F20-VH-GL1-V4-V9-V14/ B08-VL	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 29
	F20-VH/ B08-VL-GL6	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 30
	F20-VH-GL1/ B08-VL-GL6	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 30
20	F20-VH-GL1-V1/ B08-VL-GL6	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 30
	F20-VH-GL1-V4/ B08-VL-GL6	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 30
	F20-VH-GL1-V9/ B08-VL-GL6	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 30
25	F20-VH-GL1-V14/ B08-VL-GL6	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 30
	F20-VH-GL1-V1-V9/ B08-VL-GL6	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 30
	F20-VH-GL1-V1-V9-V14/ B08-VL-GL6	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 30
30	F20-VH-GL1-V4-V9/ B08-VL-GL6	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 30
	F20-VH-GL1-V4-V9-V14/ B08-VL-GL6	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 30
	F20-VH-GL2/ B03-VL	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 24
35	F20-VH-GL1-V2/ B03-VL	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 24
	F20-VH-GL1-V3/ B03-VL	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 24
	F20-VH-GL1-V11/ B03-VL	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 24
40	F20-VH-GL1-V13/ B03-VL	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 24
	F20-VH-GL2/ B03-VL-GL1	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 25
	F20-VH-GL1-V2/ B03-VL-GL1	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 25
45	F20-VH-GL1-V3/ B03-VL-GL1	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 25
	F20-VH-GL1-V11/ B03-VL-GL1	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 25

	F20-VH-GL1-V13/ B03-VL-GL1	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 25
5	F20-VH-GL2/ B08-VL	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 29
	F20-VH-GL1-V2/ B08-VL	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 29
	F20-VH-GL1-V3/ B08-VL	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 29
10	F20-VH-GL1-V11/ B08-VL	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 29
	F20-VH-GL1-V13/ B08-VL	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 29
	F20-VH-GL2/ B08-VL-GL6	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 30
15	F20-VH-GL1-V2/ B08-VL-GL6	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 30
	F20-VH-GL1-V3/ B08-VL-GL6	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 30
	F20-VH-GL1-V11/ B08-VL-GL6	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 30
20	F20-VH-GL1-V13/ B08-VL-GL6	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 30
	F20-VH/ B03-VL-GL2	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 57
	F20-VH-GL1/ B03-VL-GL2	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 57
25	F20-VH-GL1-V1/ B03-VL-GL2	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 57
	F20-VH-GL1-V4/ B03-VL-GL2	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 57
	F20-VH-GL1-V9/ B03-VL-GL2	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 57
30	F20-VH-GL1-V14/ B03-VL-GL2	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 57
	F20-VH-GL1-V1-V9/ B03-VL-GL2	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 57
	F20-VH-GL1-V1-V9-V14/ B03-VL-GL2	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 57
35	F20-VH-GL1-V4-V9/ B03-VL-GL2	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 57
	F20-VH-GL1-V4-V9-V14/ B03-VL-GL2	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 57
	F20-VH-GL2/ B03-VL-GL2	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 57
40	F20-VH-GL1-V2/ B03-VL-GL2	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 57
	F20-VH-GL1-V3/ B03-VL-GL2	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 57
	F20-VH-GL1-V11/ B03-VL-GL2	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 57
45	F20-VH-GL1-V13/ B03-VL-GL2	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 57
	F20-VH/ B08-VL-GL1	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 58
	F20-VH-GL1/ B08-VL-GL1	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 58

	F20-VH-GL1-V1/ B08-VL-GL1	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 58
5	F20-VH-GL1-V4/ B08-VL-GL1	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 58
	F20-VH-GL1-V9/ B08-VL-GL1	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 58
	F20-VH-GL1-V14/ B08-VL-GL1	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 58
10	F20-VH-GL1-V1-V9/ B08-VL-GL1	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 58
	F20-VH-GL1-V1-V9-V14/ B08-VL-GL1	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 58
	F20-VH-GL1-V4-V9/ B08-VL-GL1	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 58
	F20-VH-GL1-V4-V9-V14/ B08-VL-GL1	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 58
15	F20-VH-GL2/ B08-VL-GL1	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 58
	F20-VH-GL1-V2/ B08-VL-GL1	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 58
	F20-VH-GL1-V3/ B08-VL-GL1	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 58
20	F20-VH-GL1-V11/ B08-VL-GL1	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 58
	F20-VH-GL1-V13/ B08-VL-GL1	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 58
	F20-VH/ B08-VL-GL2	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 59
25	F20-VH-GL1/ B08-VL-GL2	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 59
	F20-VH-GL1-V1/ B08-VL-GL2	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 59
	F20-VH-GL1-V4/ B08-VL-GL2	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 59
30	F20-VH-GL1-V9/ B08-VL-GL2	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 59
	F20-VH-GL1-V14/ B08-VL-GL2	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 59
	F20-VH-GL1-V1-V9/ B08-VL-GL2	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 59
35	F20-VH-GL1-V1-V9-V14/ B08-VL-GL2	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 59
	F20-VH-GL1-V4-V9/ B08-VL-GL2	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 59
	F20-VH-GL1-V4-V9-V14/ B08-VL-GL2	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 59
40	F20-VH-GL2/ B08-VL-GL2	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 59
	F20-VH-GL1-V2/ B08-VL-GL2	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 59
	F20-VH-GL1-V3/ B08-VL-GL2	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 59
45	F20-VH-GL1-V11/ B08-VL-GL2	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 59
	F20-VH-GL1-V13/ B08-VL-GL2	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 59

	F20-VH/ B08-VL-GL3	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 60
5	F20-VH-GL1/ B08-VL-GL3	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 60
	F20-VH-GL1-V1/ B08-VL-GL3	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 60
	F20-VH-GL1-V4/ B08-VL-GL3	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 60
10	F20-VH-GL1-V9/ B08-VL-GL3	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 60
	F20-VH-GL1-V14/ B08-VL-GL3	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 60
	F20-VH-GL1-V1-V9/ B08-VL-GL3	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 60
	F20-VH-GL1-V1-V9-V14/ B08-VL-GL3	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 60
15	F20-VH-GL1-V4-V9/ B08-VL-GL3	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 60
	F20-VH-GL1-V4-V9-V14/ B08-VL-GL3	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 60
	F20-VH-GL2/ B08-VL-GL3	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 60
20	F20-VH-GL1-V2/ B08-VL-GL3	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 60
	F20-VH-GL1-V3/ B08-VL-GL3	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 60
	F20-VH-GL1-V11/ B08-VL-GL3	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 60
25	F20-VH-GL1-V13/ B08-VL-GL3	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 60
	F20-VH/ B08-VL-GL4	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 61
	F20-VH-GL1/ B08-VL-GL4	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 61
30	F20-VH-GL1-V1/ B08-VL-GL4	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 61
	F20-VH-GL1-V4/ B08-VL-GL4	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 61
	F20-VH-GL1-V9/ B08-VL-GL4	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 61
35	F20-VH-GL1-V14/ B08-VL-GL4	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 61
	F20-VH-GL1-V1-V9/ B08-VL-GL4	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 61
	F20-VH-GL1-V1-V9-V14/ B08-VL-GL4	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 61
40	F20-VH-GL1-V4-V9/ B08-VL-GL4	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 61
	F20-VH-GL1-V4-V9-V14/ B08-VL-GL4	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 61
	F20-VH-GL2/ B08-VL-GL4	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 61
45	F20-VH-GL1-V2/ B08-VL-GL4	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 61
	F20-VH-GL1-V3/ B08-VL-GL4	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 61

	F20-VH-GL1-V11/ B08-VL-GL4	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 61
5	F20-VH-GL1-V13/ B08-VL-GL4	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 61
	F20-VH/ B08-VL-GL5	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 62
	F20-VH-GL1/ B08-VL-GL5	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 62
	F20-VH-GL1-V1/ B08-VL-GL5	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 62
10	F20-VH-GL1-V4/ B08-VL-GL5	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 62
	F20-VH-GL1-V9/ B08-VL-GL5	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 62
	F20-VH-GL1-V14/ B08-VL-GL5	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 62
15	F20-VH-GL1-V1-V9/ B08-VL-GL5	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 62
	F20-VH-GL1-V1-V9-V14/ B08-VL-GL5	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 62
	F20-VH-GL1-V4-V9/ B08-VL-GL5	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 62
20	F20-VH-GL1-V4-V9-V14/ B08-VL-GL5	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 62
	F20-VH-GL2/ B08-VL-GL5	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 62
	F20-VH-GL1-V2/ B08-VL-GL4	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 62
25	F20-VH-GL1-V3/ B08-VL-GL5	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 62
	F20-VH-GL1-V11/ B08-VL-GL5	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 62
	F20-VH-GL1-V13/ B08-VL-GL5	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 62
30	F20-VH/ B08-VL-GL7	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 63
	F20-VH-GL1/ B08-VL-GL7	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 63
	F20-VH-GL1-V1/ B08-VL-GL7	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 63
35	F20-VH-GL1-V4/ B08-VL-GL7	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 63
	F20-VH-GL1-V9/ B08-VL-GL7	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 63
	F20-VH-GL1-V14/ B08-VL-GL7	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 63
40	F20-VH-GL1-V1-V9/ B08-VL-GL7	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 63
	F20-VH-GL1-V1-V9-V14/ B08-VL-GL7	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 63
	F20-VH-GL1-V4-V9/ B08-VL-GL7	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 63
45	F20-VH-GL1-V4-V9-V14/ B08-VL-GL7	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 63
	F20-VH-GL2/ B08-VL-GL7	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 63

	F20-VH-GL1-V2/ B08-VL-GL7	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 63
5	F20-VH-GL1-V3/ B08-VL-GL7	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 63
	F20-VH-GL1-V11/ B08-VL-GL7	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 63
	F20-VH-GL1-V13/ B08-VL-GL7	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 63
10	F20-VH/ B03-VLc	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 67
	F20-VH-GL1/ B03-VLc	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 67
	F20-VH-GL1-V1/ B03-VLc	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 67
15	F20-VH-GL1-V4/ B03-VLc	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 67
	F20-VH-GL1-V9/ B03-VLc	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 67
	F20-VH-GL1-V14/ B03-VLc	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 67
	F20-VH-GL1-V1-V9/ B03-VLc	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 67
20	F20-VH-GL1-V1-V9-V14/ B03-VLc	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 67
	F20-VH-GL1-V4 -V9/ B03-VLc	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 67
	F20-VH-GL1-V4-V9-V14/ B03-VLc	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 67
25	F20-VH/ B03-VL-GL1c	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 68
	F20-VH-GL1/ B03-VL-GL1c	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 68
	F20-VH-GL1-V1/ B03-VL-GL1c	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 68
30	F20-VH-GL1-V4/ B03-VL-GL1c	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 68
	F20-VH-GL1-V9/ B03-VL-GL1c	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 68
	F20-VH-GL1-V14/ B03-VL-GL1c	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 68
35	F20-VH-GL1-V1-V9/ B03-VL-GL1c	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 68
	F20-VH-GL1-V1-V9-V14/ B03-VL-GL1c	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 68
	F20-VH-GL1-V4-V9/ B03-VL-GL1c	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 68
40	F20-VH-GL1-V4-V9-V14/ B03-VL-GL1c	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 68
	F20-VH/ B08-VLc	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 69
	F20-VH-GL1/ B08-VLc	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 69
45	F20-VH-GL1-V1/ B08-VLc	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 69
	F20-VH-GL1-V4/ B08-VLc	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 69

	F20-VH-GL1-V9/ B08-VLc	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 69
5	F20-VH-GL1-V14/ B08-VLc	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 69
	F20-VH-GL1-V1-V9/ B08-VLc	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 69
	F20-VH-GL1-V1-V9-V14/ B08-VLc	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 69
10	F20-VH-GL1-V4 -V9/ B08-VLc	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 69
	F20-VH-GL1-V4-V9-V14/ B08-VLc	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 69
	F20-VH/ B08-VL-GL6c	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 70
15	F20-VH-GL1/ B08-VL-GL6c	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 70
	F20-VH-GL1-V1/ B08-VL-GL6c	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 70
	F20-VH-GL1-V4/ B08-VL-GL6c	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 70
	F20-VH-GL1-V9/ B08-VL-GL6c	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 70
20	F20-VH-GL1-V14/ B08-VL-GL6c	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 70
	F20-VH-GL1-V1-V9/ B08-VL-GL6c	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 70
	F20-VH-GL1-V1-V9-V14/ B08-VL-GL6c	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 70
25	F20-VH-GL1-V4-V9/ B08-VL-GL6c	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 70
	F20-VH-GL1-V4-V9-V14/ B08-VL-GL6c	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 70
	F20-VH-GL2/ B03-VLc	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 67
30	F20-VH-GL1-V2/ B03-VLc	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 67
	F20-VH-GL1-V3/ B03-VLc	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 67
	F20-VH-GL1-V11/ B03-VLc	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 67
35	F20-VH-GL1-V13/ B03-VLc	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 67
	F20-VH-GL2/ B03-VL-GL1c	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 68
	F20-VH-GL1-V2/ B03-VL-GL1c	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 68
40	F20-VH-GL1-V3/ B03-VL-GL1c	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 68
	F20-VH-GL1-V11/ B03-VL-GL1c	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 68
	F20-VH-GL1-V13/ B03-VL-GL1c	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 68
45	F20-VH-GL2/ B08-VLc	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 69
	F20-VH-GL1-V2/ B08-VLc	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 69

	F20-VH-GL1-V3/ B08-VLc	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 69
5	F20-VH-GL1-V11/ B08-VLc	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 69
	F20-VH-GL1-V13/ B08-VLc	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 69
	F20-VH-GL2/ B08-VL-GL6c	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 70
10	F20-VH-GL1-V2/ B08-VL-GL6c	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 70
	F20-VH-GL1-V3/ B08-VL-GL6c	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 70
	F20-VH-GL1-V11/ B08-VL-GL6c	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 70
	F20-VH-GL1-V13/ B08-VL-GL6c	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 70

15 Так, в одном конкретном воплощении MMP9-связывающие белки по изобретению включают выделенные антитела, специфичные к MMP9, либо их антиген-связывающие фрагменты, содержащие:

- (1) вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из:
 - (i) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11,
 - (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12,
 - (iii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13,
 - (iv) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14,
 - (v) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15,
 - (vi) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16,
 - (vii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17,
 - (viii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18,
 - (ix) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19,
 - (x) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20,
 - (xi) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 48,
 - (xii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53,
 - (xiii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 54,
 - (xiv) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 55,
 - (xv) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 56, и
- (2) вариабельную область легкой цепи, выбранную из:
 - (i) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24,
 - (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25,
 - (iii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29,
 - (iv) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30,
 - (v) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 57,
 - (vi) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 58,
 - (vii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 59,
 - (viii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 60,
 - (ix) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 61,
 - (x) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 62,
 - (xi) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 63,
 - (xii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 67,
 - (xiii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 68,
 - (xiv) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 69,

(xv) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 70.

Так, в одном конкретном воплощении MMP9-связывающие белки по изобретению включают выделенные антитела, специфичные к MMP9, либо их антиген-связывающие фрагменты, содержащие:

- 5 (1) вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из:
 - (i) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11,
 - (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12,
 - (iii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13,
 - (iv) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14,
- 10 (v) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15,
- (vi) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16,
- (vii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17,
- (viii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18,
- (ix) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19,
- 15 (x) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20,
- (xi) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 48,
- (xii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53,
- (xiii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 54,
- (xiv) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 55,
- 20 (xv) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 56, и
- (2) вариабельную область легкой цепи, выбранную из:
 - (i) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 57,
 - (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 58,
 - (iii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 59,
- 25 (iv) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 60,
- (v) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 61,
- (vi) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 62,
- (vii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 63,
- (viii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 67,
- 30 (ix) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 68,
- (x) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 69,
- (xi) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 70.

Так, в одном конкретном воплощении MMP9-связывающие белки по изобретению включают выделенные антитела, специфичные к MMP9, либо их антиген-связывающие фрагменты, содержащие:

- (1) вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из:
 - (i) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12,
 - (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17,
 - (iii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18,
- 40 (iv) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19,
- (v) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20, и
- (2) вариабельную область легкой цепи, выбранную из:
 - (i) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 68,
 - (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 70.

Так, в одном конкретном воплощении MMP9-связывающие белки по изобретению включают выделенные антитела, специфичные к MMP9, либо их антиген-связывающие фрагменты, содержащие:

- (1) вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из:

- (i) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12,
- (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18,
- (iii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20, и
- (2) вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 68.

Так, в одном конкретном воплощении MMP9-связывающие белки по изобретению включают выделенные антитела, специфичные к MMP9, либо их антиген-связывающие фрагменты, содержащие:

- (1) вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из:
 - (i) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12,
 - (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17,
 - (iii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18,
 - (iv) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19,
 - (v) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20, и
- (2) вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 70.

Так, в одном конкретном воплощении MMP9-связывающие белки по изобретению включают выделенные антитела, специфичные к MMP9, либо их антиген-связывающие фрагменты, содержащие:

- (1) вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из:
 - (i) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11,
 - (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12,
 - (iii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13,
 - (iv) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14,
 - (v) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15,
 - (vi) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16, и
- (2) вариабельную область легкой цепи, выбранную из:
 - (i) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24,
 - (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25.

В другом конкретном воплощении MMP9-связывающие белки по изобретению включают выделенные антитела, специфичные к MMP9, либо их антиген-связывающие фрагменты, содержащие:

- (1) вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из:
 - (i) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12,
 - (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17,
 - (iii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18,
 - (iv) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19,
 - (v) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20, и
- (2) вариабельную область легкой цепи, выбранную из:
 - (i) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24,
 - (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25.

Более предпочтительно выделенные антитела, специфичные к MMP9, либо их антиген-связывающие фрагменты по изобретению могут содержать:

- (1) вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из:
 - (i) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18,
 - (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20, и
- (2) вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 25.

В другом конкретном воплощении MMP9-связывающие белки по изобретению включают выделенные антитела, специфичные к MMP9, либо их антиген-связывающие фрагменты, содержащие:

- (1) вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из:
 - (i) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11,
 - (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12,
 - (iii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13,
 - (iv) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14,
 - (v) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15,
 - (vi) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16, и
- (2) вариабельную область легкой цепи, выбранную из:
 - (i) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29,
 - (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30.

В другом конкретном воплощении MMP9-связывающие белки по изобретению

включают выделенные антитела, специфичные к MMP9, либо их антиген-связывающие фрагменты, содержащие:

- (1) вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из:
 - (i) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12,
 - (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17,
 - (iii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18,
 - (iv) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19,
 - (v) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20, и
- (2) вариабельную область легкой цепи, выбранную из:
 - (i) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29,
 - (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30.

Более предпочтительно выделенные антитела, специфичные к MMP9, либо их антиген-связывающие фрагменты по изобретению могут содержать:

- (1) вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из:
 - (i) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17,
 - (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18,
 - (iii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19,
 - (iv) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20, и
- (2) вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30.

Более предпочтительно выделенные антитела, специфичные к MMP9, либо их антиген-связывающие фрагменты по изобретению могут содержать вариабельную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 19 и вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 70.

Конъюгаты, содержащие вспомогательные молекулы

В другом аспекте изобретения выделенные антитела либо их антиген-связывающие

фрагменты по изобретению необязательно конъюгированы со вспомогательными молекулами, при этом они также именуются здесь как "конъюгированные антитела" или "конъюгированные фрагменты антител".

Вспомогательная молекула может быть конъюгирована с антителом или фрагментом антитела непосредственно или через спейсер подходящей длины, например, как описано в Kellogg et al., 2011, Bioconjug Chem., 22: 717-27).

В одном воплощении, особенно подходящем для терапевтических целей, вспомогательная молекула может представлять собой лечебную эффекторную группировку типа цитотоксического (например, энзиматически активного токсина

бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения либо его фрагмента), цитостатического или иммуномодулирующего средства, включая радиоактивные группы (т.е. группы, содержащие радионуклиды или радиоизотопы) или небольшие молекулы.

5 В другом воплощении вспомогательная молекула включает антиген-связывающий фрагмент антител, который при конъюгировании с антителом или фрагментом антитела по изобретению образует биспецифичное антитело. В частности, такое биспецифичное антитело может быть направлено на два разных MMPs или на два разных эпитопа одного MMP типа двух разных эпитопов MMP9.

10 В одном конкретном воплощении вспомогательная молекула может представлять собой, к примеру, активное средство для лечения заболевания, как-то для лечения болезни Крона: вариабельная область антитела против TNF α , которая при конъюгировании с антителом или антигенсвязывающим фрагментом по изобретению может образовывать биспецифичное антитело против TNF α /MMP9 для лечения лиц, 15 страдающих умеренной или тяжелой формой болезни Крона.

Конъюгированные антитела и конъюгированные фрагменты антител по изобретению могут направлять препарат *in vivo* к участку заболевания (например, участку воспаления или опухоли) с тем, чтобы конъюгированная вспомогательная молекула могла оказывать терапевтическое действие на пораженном заболеванием участке.

20 В альтернативном воплощении, особенно подходящем для целей диагностики, вспомогательная молекула может представлять собой, к примеру, маркирующую группировку, включая радиоизотопы (например, ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{125}I), хромогенные метки, например, ферменты, которые можно использовать для превращения субстрата в детектируемое окрашенное (например, пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, β -галактозидаза) или флуоресцентное соединение (например, зеленый флуоресцентный белок, красный флуоресцентный белок), спектроскопические метки (например, такие флуоресцентные метки, как флуоресцеин и его производные типа FITC, Texas red, цианиновые красители, фотоциан, родамин, или же метки, дающие видимую окраску), люминесцентные метки, включая люциферины, аффинные метки, которые могут 25 проявляться под действием другого соединения, специфичного для этой метки и позволяющего легкое детектирование и количественное определение, или любые другие 30 метки, используемые в стандартном методе ELISA.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды по изобретению

35 В соответствии с другим воплощением предусмотрены выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела либо их антиген-связывающие фрагменты по изобретению.

Выделенная нуклеиновая кислота по изобретению может представлять собой, к примеру, природную ДНК или РНК либо рекомбинантную или синтетическую ДНК, РНК или ЗНК (LNA) или же рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты, 40 включающую любые молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению сами по себе или в сочетании. В предпочтительном воплощении молекулы нуклеиновой кислоты представляют собой κ ДНК.

В одном конкретном воплощении предусмотрены выделенные нуклеиновые кислоты, включающие одно или несколько из следующего:

45 (1) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CDR1 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 2, CDR2 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 3, CDR3 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 4 или их варианты, у которых 1, 2 или 3 аминокислоты данного CDR тяжелой цепи заменены другими аминокислотами; и

(2) (i) нуклеиновую кислоту, кодирующую CDR1 легкой цепи по SEQ ID NO: 21, CDR2 легкой цепи по SEQ ID NO: 22, CDR3 легкой цепи по SEQ ID NO: 23 или их варианты, у которых 1, 2 или 3 аминокислоты данного CDR легкой цепи заменены другими аминокислотами; или

5 (2) (ii) нуклеиновую кислоту, кодирующую CDR1 легкой цепи по SEQ ID NO: 26, CDR2 легкой цепи по SEQ ID NO: 27, CDR3 легкой цепи по SEQ ID NO: 28 или их варианты, у которых 1, 2 или 3 аминокислоты данного CDR легкой цепи заменены другими аминокислотами.

В одном конкретном воплощении предусмотрены выделенные нуклеиновые кислоты, 10 включающие одно или несколько из следующего:

(1) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из:

- (i) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11,
- (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12,
- 15 (iii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13,
- (iv) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14,
- (v) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15,
- (vi) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16,
- (vii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17,
- 20 (viii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18,
- (ix) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19,
- (x) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20,
- (xi) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 48,
- (xii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53,
- 25 (xiii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 54,
- (xiv) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 55,
- (xv) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 56,

(2) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельную область легкой цепи, выбранную из:

- 30 (i) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24,
- (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25,
- (iii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29,
- (iv) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30,
- (v) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 57,
- 35 (vi) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 58,
- (vii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 59,
- (viii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 60,
- (ix) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 61,
- (x) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 62,
- 40 (xi) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 63,
- (xii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 67,
- (xiii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 68,
- (xiv) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 69,
- (xv) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 70.

45 В одном конкретном воплощении предусмотрены выделенные нуклеиновые кислоты, включающие одно или несколько из следующего:

(1) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из:

- (i) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11,
- (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12,
- (iii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13,
- (iv) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14,
- 5 (v) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15,
- (vi) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16, и

(2) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельную область легкой цепи, выбранную из:

- (i) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24,
- 10 (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25.

В альтернативном воплощении изобретения предусмотрены выделенные нуклеиновые кислоты, включающие одно или несколько из следующего:

(1) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из:

- 15 (i) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12,
- (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17,
- (iii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18,
- (iv) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19,
- (v) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20, и

20 (2) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 25.

В другом конкретном воплощении предусмотрены выделенные нуклеиновые кислоты, включающие одно или несколько из следующего:

(1) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельную область

25 тяжелой цепи, выбранную из:

- (i) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11,
- (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12,
- (iii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13,
- (iv) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14,

30 (v) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15,

- (vi) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16, и

(2) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельную область легкой цепи, выбранную из:

- (i) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29,

35 (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30.

В альтернативном воплощении изобретения предусмотрены выделенные нуклеиновые кислоты, включающие одно или несколько из следующего:

(1) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из:

- 40 (i) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12,
- (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17,
- (iii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18,
- (iv) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19,
- (v) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20, и

45 (2) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30.

В другом конкретном воплощении предусмотрены выделенные нуклеиновые кислоты, включающие одно или несколько из следующего:

(1) последовательность нуклеиновой кислоты, включающую SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 33 или их варианты, идентичные по меньшей мере на 80%, на 90%, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или по меньшей мере на 99% одной из данных последовательностей, и/или

- 5 (2) последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из:
- а) последовательности нуклеиновой кислоты, включающей SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 36 или их варианты, идентичные по меньшей мере на 80%, на 90%, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или по меньшей мере на 99% одной из данных последовательностей,
- 10 б) последовательности нуклеиновой кислоты, включающей SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 39 или их варианты, идентичные по меньшей мере на 80%, на 90%, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или по меньшей мере на 99% одной из данных последовательностей.

Векторы и клетки хозяина для получения и очистки полипептидов по изобретению

15 В одном воплощении изобретения предусмотрены рекомбинантные экспрессирующие векторы, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению, причем вектор необязательно содержит контролирующую экспрессию последовательность, которая способствует экспрессии кодируемого полипептида в прокариотических или эукариотических клетках хозяина и функционально связана с данной молекулой

20 нуклеиновой кислоты.

Можно использовать различные системы экспрессии, включая, без ограничения, хромосомы, эписомы и производные вирусов. В частности, можно использовать рекомбинантные векторы, происходящие из бактериальных плазмид, транспозонов, дрожжевых эписом, вставочных элементов, элементов дрожжевых хромосом, таких 25 вирусов, как бакуловирусы, вирусы папилломы типа SV40, вирусы коровьей оспы, аденовирусы, лисьи поксивирусы, вирусы псевдобешенства, ретровирусы. Эти рекомбинантные векторы могут в равной степени быть производными космид или фагемид.

30 Последовательности нуклеиновой кислоты можно вставить в рекомбинантный экспрессирующий вектор способами, хорошо известными специалистам в данной области, такими, к примеру, как описанные в Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al., 4th Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001.

35 Рекомбинантный вектор может включать последовательности нуклеотидов, которые способствуют, контролируют или регулируют экспрессию и транскрипцию полинуклеотида по изобретению, а также трансляцию полипептида по изобретению, причем эти последовательности выбирают в соответствии с используемыми клетками хозяина.

40 Так, например, в рекомбинантный вектор можно встроить подходящий сигнал секреции с тем, чтобы полипептид, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты по изобретению, направлялся в просвет эндоплазматического ретикулума, в периплазматическое пространство, на мембрану или во внеклеточную среду. Выбор надлежащего сигнала секреции может способствовать последующей очистке белка.

45 В другом воплощении предусмотрены клетки хозяина, содержащие рекомбинантный вектор по изобретению.

Введение рекомбинантного вектора в клетки хозяина может проводиться методами, хорошо известными специалистам в данной области, типа описанных в Basic Methods in Molecular Biology, Davis et al., 2nd ed., McGraw-Hill Professional Publishing, 1995; и Molecular Cloning: A Laboratory Manual, supra, как-то трансфекции с помощью фосфата

кальция, трансфекции с помощью DEAE-декстрана, трансфекции, микроинъекции, трансфекции с помощью катионных липидов, электропорации, трансдукции или инфекции.

Клетками хозяина могут быть, к примеру, такие бактериальные клетки, как *E. coli* или *Streptomyces*, клетки грибков типа *Aspergillus* и дрожжей типа *Saccharomyces*, клетки насекомых, клетки яичников китайского хомячка (CHO), клетки линии C127 мыши, клетки линии BHK сирийского хомячка, клетки 293 эмбриональных почек человека (HEK 293). В предпочтительном воплощении клетками хозяина служат клетки CHO или клетки HEK 293.

Клетки хозяина могут применяться, к примеру, для экспрессии полипептида по изобретению. После очистки стандартными методами полипептид по изобретению можно использовать в способе, описанном ниже.

Например, при использовании систем экспрессии, секретирующих рекомбинантный белок, можно сначала сконцентрировать культуральную среду с помощью коммерчески доступного фильтра для концентрирования белка, например, установки для ультрафильтрации типа Amicon или Millipore Pellicon. После стадии концентрирования можно нанести концентрат на матрикс для очистки типа матрикса для гель-фильтрации. С другой стороны, можно использовать анионообменную и/или аффинную смолу. Матриксом может служить акриламид, агароза, декстран, целлюлоза или матриксы других типов, которые обычно применяются для очистки белков. С другой стороны, можно использовать стадию катионного обмена. Наконец, для дополнительной очистки антител либо их фрагментов можно использовать одну или несколько стадий обратнофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (RP-HPLC) с использованием гидрофобной среды для RP-HPLC. Некоторые или все вышеописанные стадии очистки хорошо известны в различных комбинациях и могут применяться для получения практически однородного рекомбинантного белка.

Рекомбинантный белок, получаемый в бактериальной культуре, можно выделить путем первоначального разрушения клеток хозяина, центрифугирования, экстракции из клеточных осадков, если это нерастворимый полипептид, или из надосадочной жидкости, если это растворимый полипептид, с последующей одной или несколькими стадиями концентрирования, высаливания, ионного обмена, аффинной очистки или эксклюзионной хроматографии. Микробные клетки могут быть разрушены любым удобным методом, включая циклическое замораживание-оттаивание, обработку ультразвуком, механическое разрушение или использование реагентов, вызывающих лизис клеток.

В другом воплощении изобретения предусмотрен способ получения клеток, способных экспрессировать полипептид по изобретению, который включает генетическую инженерию клеток с помощью вектора или нуклеиновой кислоты по изобретению.

В другом воплощении изобретения предусмотрен способ получения антител либо их фрагментов по изобретению, который включает культивирование клеток хозяина, трансформированных экспрессирующим вектором, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует данные антитела либо их фрагменты в условиях, достаточных для экспрессирования данных полипептидов. Затем антитело или его фрагмент по изобретению извлекают из культуральной среды или клеточных экстрактов, в зависимости от используемой системы экспрессии. Как это известно специалистам, процедуры для очистки рекомбинантных белков будут варьироваться в зависимости от таких факторов, как тип используемых клеток хозяина и то, будет ли секретироваться

рекомбинантный белок в культуральную среду, как описано выше.

Композиции

Изобретением предусмотрены фармацевтические или терапевтические средства в виде композиций и способы лечения пациента, предпочтительно млекопитающего и наиболее предпочтительно человека, страдающего медицинскими заболеваниями, в частности, воспалительными и/или аутоиммунными заболеваниями или раком. С другой стороны, изобретением предусмотрены способы профилактики медицинских заболеваний, в частности, воспалительных и/или аутоиммунных заболеваний или рака.

В одном воплощении предусмотрены фармацевтические композиции, включающие

- 10 одно или несколько из следующего: (i) антитело, специфичное к ММР9, либо его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, (ii) нуклеиновую кислоту по изобретению, (iii) вектор по изобретению и/или (iv) клетку хозяина по изобретению, а также по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

Фармацевтические композиции по изобретению могут содержать одно или несколько

- 15 антител, специфичных к MMP9, либо их антиген-связывающих фрагментов в любой из описанных здесь форм.

Композиции настоящего изобретения также могут содержать один или несколько фармацевтически приемлемых дополнительных ингредиентов, как-то квасцы, стабилизаторы, противомикробные средства, буферы, красители, ароматизаторы,

- 20 адьюванты и т.п.

Соединения по изобретению вместе со стандартными адьювантами, носителями, разбавителями или эксципиентами, могут входить в состав фармацевтических композиций и их дозовых форм и в таком виде могут применяться в твердом виде типа таблеток или наполненных капсул, в лиофилизированном виде или в жидким виде типа

- 25 растворов, суспензий, эмульсий, эликсиров или наполненных ими капсул, все для перорального применения, или же в виде стерильных растворов для инъекций для парентерального (в том числе подкожного) применения. Такие фармацевтические композиции и их дозовые формы могут содержать ингредиенты в обычных пропорциях, с добавлением других активных соединений или составляющих или без них, причем 30 такие стандартные дозовые формы могут содержать любое подходящее эффективное количество активного ингредиента, соизмеримое с предполагаемым диапазоном суточной дозировки.

Композиции настоящего изобретения могут представлять собой жидкые формы,

- включая, без ограничения, водные или масляные сусpenзии, растворы, эмульсии, сиропы и эликсиры. Жидкие формы, подходящие для перорального введения, могут включать подходящий водный или неводный носитель с буферами, сусpenдирующими и диспергирующими средствами, красителями, ароматизаторами и т.п. Композиции также могут быть составлены в виде сухих препаратов для восстановления с водой или другим подходящим носителем перед применением. Такие жидкие препараты могут содержать 35 и добавки, включая, без ограничения, сусpenдирующие вещества, эмульгаторы, неводные носители и консерванты. Сусpenдирующие вещества включают, без ограничения, сироп 40 из сорбитола, метилцеллюлозу, глюкозный/сахарный сироп, желатин, гидроксиэтилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу, гель стеарата алюминия и гидрогенизированные пищевые жиры. Эмульгирующие вещества включают, без 45 ограничения, лецитин, моноолеат сорбитана и гуммиарабик. Неводные носители включают, без ограничения, пищевые масла, миндальное масло, фракционированное кокосовое масло, масляные сложные эфиры, пропиленгликоль и этиловый спирт. Консерванты включают, без ограничения, метил- или пропил-*n*-гидроксибензоат и

сорбиновую кислоту. Другие материалы, а также методы обработки и пр. изложены в 5-й части Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 22nd Edition, 2012, Pharmaceutical Press and the University of the Sciences, Philadelphia College of Pharmacy, которая включена сюда в качестве ссылки.

- 5 Твердые композиции по изобретению могут иметь вид таблеток или пастилок, составленных обычным способом. Например, таблетки и капсулы для перорального введения могут содержать стандартные эксципиенты, включая, без ограничения, связующие вещества, наполнители, смазывающие вещества, разрыхляющие и смачивающие вещества. Связующие вещества включают, без ограничения, сироп,
- 10 гуммиарабик, желатин, сорбит, трагакант, разжиженный крахмал и поливинилпирролидон. Наполнители включают, без ограничения, лактозу, сахар, микрокристаллическую целлюлозу, кукурузный крахмал, фосфат кальция и сорбит. Смазывающие вещества включают, без ограничения, стеарат магния, стеариновую кислоту, тальк, полиэтиленгликоль и диоксид кремния. Разрыхлители включают, без
- 15 ограничения, картофельный крахмал и натриевый гликолят крахмала. Смачивающие вещества включают, без ограничения, лаурилсульфат натрия. Таблетки могут иметь покрытие в соответствии с хорошо известными способами.

Композиции для инъекций обычно готовят на основе стерильных инъекционных солевых растворов или солевых растворов с фосфатным буфером или других носителей

20 для инъекций, известных в данной области.

Композиции настоящего изобретения также могут быть составлены в виде трансдермальных форм, содержащих водные или неводные носители, включая, без ограничения, кремы, мази, лосьоны, пасты, лекарственные пластиры, пластиры или мембранны.

25 Композиции настоящего изобретения также могут быть составлены для парентерального введения, включая, без ограничения, посредством инъекций или непрерывного вливания. Формы для инъекций могут иметь вид суспензий, растворов или эмульсий в масляных или водных носителях и могут содержать рецептурные средства, включая, без ограничения, супендирующие, стабилизирующие и диспергирующие вещества. Композиции также могут быть представлены в виде порошка для восстановления с подходящим носителем, включая, без ограничения, стерильную апирогенную воду.

30 Композиции настоящего изобретения также могут быть составлены в виде депо-препаратов, которые можно вводить путем имплантации или внутримышечной инъекции.

35 Композиции могут быть составлены с подходящими полимерными или гидрофобными материалами (к примеру, в виде эмульсии в приемлемом масле), ионообменными смолами или в виде слабо растворимых производных (к примеру, в виде слабо растворимой соли).

40 Композиции настоящего изобретения также можно вводить в виде форм с замедленным высвобождением или из систем доставки лекарств с замедленным высвобождением. Описание типичных материалов для замедленного высвобождения также можно найти во включенных материалах, в Remington's Pharmaceutical Sciences.

Для введения композиций по изобретению особенно подходят формы для инъекций.

45 В другом воплощении изобретения предусмотрены композиции для визуализации или диагностические композиции, содержащие специфичные к MMP9 антитела либо их антиген-связывающие фрагменты, как описано здесь.

В другом воплощении изобретения предусмотрены диагностические композиции, содержащие специфичные к MMP9 антитела либо их антиген-связывающие фрагменты,

как описано здесь, для выявления активной MMP9 у субъектов.

В другом воплощении изобретения предусмотрены диагностические композиции, содержащие специфичные к MMP9 антитела либо их антиген-связывающие фрагменты, как описано здесь, для выявления активной MMP9 у субъектов, причем данные антитела 5 содержат вариабельную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 19 и вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 70.

В одном воплощении диагностические композиции по изобретению содержат специфичные к MMP9 антитела либо их антиген-связывающие фрагменты, как описано здесь, конъюгированные с группировкой, выбранной из группы, состоящей из 10 радиоизотопов, биотина, avidina, стрептавидина, хромофоров, флуорофоров, хемилюминесцентных группировок, гаптенов и ферментов.

Композиции для визуализации или диагностические композиции по изобретению применимы для выявления повышенного уровня MMP9 в связи с воспалительными и/или аутоиммунными заболеваниями или раковыми заболеваниями.

15 Комбинации

В соответствии с изобретением, специфичные к MMP9 антитела либо их антиген-связывающие фрагменты по изобретению можно вводить по отдельности или в сочетании с другим средством, применимым при профилактике и/или лечении воспалительных и/или аутоиммунных заболеваний, например, с иммуномодулирующими 20 препаратами, включая биопрепараты, небольшие молекулы и вакцины.

С другой стороны, специфичные к MMP9 антитела либо их антиген-связывающие фрагменты по изобретению можно вводить в сочетании с другим средством, применимым при лечении рака, например, с такими противораковыми препаратами, как цитотоксические средства (Folfox, Xelox, Folfirinox, Folfox6, капецитабин, доцетаксель 25 (Taxotere), паклитаксель (Taxol), Nab/паклитаксель, 5-фторурацил (5-FU), 6-меркаптопурин (6-MP), капецитабин (Xeloda), цитарабин (Ara-C), флоксуридин, флударабин, гемцитабин (Gemzar), гемцитабин-цисплатин, гидроксимочевина, метотрексат, пеметрексед (Alimta), иксабепилон (Ixempra), винбластин (Velban), винкристин (Oncovin), винорелбин (Navelbine) и эстрамустин (Emcyt)), ингибиторы 30 тирозинкиназ (иматиниб (Gleevec/Glivec), гефитиниб (Iressa), эрлотиниб (Tarceva), афатиниб (Giotrif), акситиниб (Inlyta), босутиниб (Bosulif), кризотиниб (Xalkori), дасатиниб (Sprycel), лапатиниб (Tyverb), нилотиниб (Tasigna), пазопаниб (Votrient), сорафениб (Nexavar), сунитиниб (Sutent)) и такие терапевтические антитела, как трастузумаб (Herceptin), бевацизумаб (Avastin), цетуксимаб (Erbitux), панитумумаб (Vectibix), 35 пертузумаб (Perjeta), ипилимумаб (Yervoy), ниволумаб (Opdivo) и пембролизумаб (Keytruda) или антитело ритуксимаб против CD20 (Rituxan).

Изобретение охватывает введение специфичных к MMP9 антител либо их антиген-связывающих фрагментов, причем антитело или его фрагмент вводится индивидууму до, одновременно или последовательно с другими, схемами лечения или с другими 40 средствами, применимыми при профилактике и/или лечении связанных с MMP9 заболеваний, входящих в группу, состоящую из воспалительных и аутоиммунных заболеваний, воспалительных заболеваний кишечника, раковых заболеваний, фиброзных заболеваний, сердечнососудистых заболеваний, неврологических заболеваний, глазных заболеваний или любых других связанных с MMP9 заболеваний, в терапевтически 45 эффективном количестве. Специфичные к MMP9 антитела либо их антиген-связывающие фрагменты по изобретению, которые вводятся одновременно с такими другими средствами, можно вводить в одних и тех же или разных композициях и такими же или разными способами введения.

В предпочтительном воплощении специфичные к MMP9 антитела либо их антиген-связывающие фрагменты по изобретению вводятся в комбинации с антителом против TNF для лечения лиц, страдающих умеренной или тяжелой формой болезни Крона.

Способы введения

- 5 Композиции настоящего изобретения можно вводить любым способом, включая, без ограничения, перорально, парентерально, под язык, трансдермально, ректально, через слизистую, наружно, посредством ингаляции, путем буккального или интраназального введения или в мочевой пузырь либо их комбинации.
- 10 Парентеральное введение включает, без ограничения, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное, подкожное, внутримышечное, интракраниальное и внутрисуставное введение. Композиции настоящего изобретения также можно вводить в виде имплантатов, обеспечивающих медленное высвобождение композиций, а также в виде медленного контролируемого внутривенного вливания.

15 В одном предпочтительном воплощении специфичные к MMP9 антитела либо их антиген-связывающие фрагменты по изобретению вводятся системно или локально.

В другом предпочтительном воплощении специфичные к MMP9 антитела либо их антиген-связывающие фрагменты по изобретению вводятся подкожно или внутривенно.

20 Дозировка при введении индивиду в виде однократной или многократной дозы будет варьироваться в зависимости от целого ряда факторов, включая фармакокинетические свойства, состояние и характеристики пациента (пол, возраст, вес тела, состояние здоровья, размер), выраженность симптомов, сопутствующее лечение, частота лечения и требуемый эффект.

25 Как правило, терапевтически эффективное количество фармацевтически активного антитела составляет дозу от 1 мг до 150 мг/кг массы тела. Если схема лечения заключается в непрерывном вливании, то оно может составлять от 0,250 мг до 20 мг на кг массы тела.

30 В частности, терапевтически эффективное количество фармацевтически активного антитела составляет дозу от 1 мг до 150 мг/кг массы тела. Если схема лечения заключается в непрерывном вливании, то оно может составлять от 0,250 мг до 13 мг на кг массы тела.

Пациенты

35 Как правило, пациентами согласно изобретению являются больные, страдающие заболеваниями, связанными с MMP9, в частности, заболеваниями, связанными с MMP9, входящими в группу, состоящую из воспалительных и аутоиммунных заболеваний, раковых заболеваний, легочных заболеваний, фиброзных легочных заболеваний, септицемии, мышечной дистрофии, аллергии, фиброза почек, склеродермии, дилатационной кардиомиопатии, болезни Чагаса, сердечнососудистых заболеваний, нервно-психиатрических заболеваний, диабета и глазных болезней или любых других заболеваний или расстройств, связанных с MMP9.

40 В одном воплощении пациентами согласно изобретению являются больные, страдающие воспалительными и/или аутоиммунными заболеваниями, включая, к примеру, воспалительные заболевания кишечника (IBD), в том числе болезнь Крона (CD), язвенный колит (UC), неопределенный колит, коллагенозный колит, ревматоидный артрит (RA), рассеянный склероз (MS), системную красную волчанку (SLE), синдром Шегрена, системный склероз, полимиозит, атеросклероз.

45 В предпочтительном воплощении пациентами согласно изобретению являются больные, страдающие воспалительными заболеваниями кишечника, более предпочтительно проникающей и структурирующей болезнью Крона и язвенным

колитом.

В другом воплощении пациентами согласно изобретению являются больные, страдающие легочными заболеваниями, включая астму, фиброзные заболевания легких типа идиопатического фиброза легких, хроническую обструктивную болезнь легких (COPD), или же заболеваниями из числа септицемии, мышечной дистрофии, аллергии, фиброза почек, склеродермии, дилатационной кардиомиопатии, болезни Чагаса, сердечнососудистых заболеваний, нервно-психиатрических заболеваний, диабета и глазных заболеваний.

В другом воплощении пациентами согласно изобретению являются больные,

10 страдающие раковыми заболеваниями, включая, к примеру, гематопоэтический рак, рак головного мозга, рак молочной железы, колоректальный рак, рак головы и шеи, рак поджелудочной железы, рак легких, рак яичников, рак мочевого пузыря, рак печени, меланому, рак простаты, мышечный рак, мезенхимальный рак, пищеводно-желудочную аденокарциному, немелкоклеточный рак легких, плоскоклеточную карциному легких, 15 аденокарциному легких, аденокарциному желудка, аденокарциному поджелудочной железы и гепатоцеллюлярную карциному.

В предпочтительном воплощении пациентами согласно изобретению являются больные, страдающие колоректальным раком или аденокарциномой.

В другом воплощении пациентами согласно изобретению являются больные,

20 страдающие заболеваниями, входящими в группу, состоящую из воспалительных и аутоиммунных заболеваний, воспалительных заболеваний кишечника, раковых заболеваний, фиброзных заболеваний, сердечнососудистых заболеваний, нервно-психиатрических заболеваний или глазных заболеваний.

В другом воплощении пациентами согласно изобретению являются больные,

25 страдающие фиброзными заболеваниями, к примеру, системным склерозом, многоочаговым фибросклерозом, склеродермальной реакцией "трансплантант против хозяина" у реципиентов при пересадке костного мозга, нефрогенным системным фиброзом, фиброзом легких, фиброзом печени, фиброзом почек, ревматоидным артритом, болезнью Крона, язвенным колитом, миелофиброзом и системной красной 30 волчанкой.

В другом воплощении пациентами согласно изобретению являются больные, страдающие глазными заболеваниями, к примеру, фиброзной патологией хрусталика, заболеваниями роговицы, диабетической ретинопатией, "сухой" или "влажной" 35 возрастной дегенерацией желтого пятна, пролиферативной витреоретинопатией, образованием катаракты, птеригией, кератоконусом, возрастной макулодистрофией и диабетической ретинопатией.

В другом воплощении пациентами согласно изобретению являются больные, страдающие сердечнососудистыми заболеваниями, к примеру, гипертонией, атеросклерозом, инфарктом миокарда, сердечной недостаточностью или

40 гипертонической болезнью коронарных артерий, легочной гипертензией, пороком легочного или трехстворчатого клапана, пороком клапанов аорты и митрального клапана, коаркцией аорты, атеросклерозом, инфарктом миокарда, сердечной недостаточностью, ишемической кардиомиопатией, дилатационной кардиомиопатией, хронической аритмии, фиброзом сердца и коронарной недостаточностью.

45 В другом воплощении пациентами согласно изобретению являются больные, страдающие неврологическими заболеваниями, к примеру, боковым амиотрофическим склерозом, болезнью Альцгеймера, рассеянным склерозом, нейровоспалением, церебральной ишемией и невропатическими болями.

Применение и способы по изобретению

Антитела, специфичные к MMP9, либо их антиген-связывающие фрагменты, нуклеиновые кислоты, векторы, клетки хозяина, композиции по изобретению предназначаются для применения при диагностике, профилактике или лечении 5 заболеваний, связанных с, вызванных или сопровождающихся повышением уровня MMP9 и/или повышением активности MMP9.

В одном воплощении предусмотрены антитела, специфичные к MMP9, либо их антиген-связывающие фрагменты по изобретению для применения в качестве лекарственных средств.

- 10 В другом воплощении предусмотрены антитела либо их фрагменты по изобретению для применения при профилактике и/или лечении связанных с MMP9 заболеваний, входящих в группу, состоящую из воспалительных и аутоиммунных заболеваний, раковых заболеваний, легочных заболеваний, фиброзных заболеваний легких, септицемии, мышечной дистрофии, аллергии, фиброза почек, склеродермии, 15 дилатационной кардиомиопатии, болезни Чагаса, сердечнососудистых заболеваний, нервно-психиатрических заболеваний, диабета и глазных заболеваний или любых других связанных с MMP9 заболеваний или расстройств.

- 16 В другом воплощении предусмотрены антитела либо их фрагменты по изобретению для применения при профилактике и/или лечении связанных с MMP9 заболеваний, 20 входящих в группу, состоящую из воспалительных и аутоиммунных заболеваний, воспалительных заболеваний кишечника, раковых заболеваний, фиброзных заболеваний, сердечнососудистых заболеваний, нервно-психиатрических заболеваний или глазных заболеваний.

- 25 В другом конкретном воплощении предусмотрены антитела либо их фрагменты по изобретению для применения при профилактике и/или лечении воспалительных и аутоиммунных заболеваний, в частности воспалительных заболеваний кишечника, включая болезнь Крона (CD), язвенный колит (UC), неопределенный колит, коллагенозный колит, ревматоидного артрита (RA), рассеянного склероза (MS), 30 системной красной волчанки (SLE), синдрома **Шёгрена**, системного склероза, полимиозита, атеросклероза.

- 35 В другом конкретном воплощении предусмотрены антитела либо их фрагменты по изобретению для применения при профилактике и/или лечении легочных заболеваний, включая астму, фиброзные заболевания легких типа идиопатического фиброза легких, хроническую обструктивную болезнь легких (COPD), или же заболеваний из числа септицемии, мышечной дистрофии, аллергии, фиброза почек, склеродермии, дилатационной кардиомиопатии, болезни Чагаса, сердечнососудистых заболеваний, 40 нервно-психиатрических заболеваний, диабета и глазных заболеваний.

- 45 В следующем конкретном воплощении предусмотрены антитела либо их фрагменты по изобретению для применения при профилактике и/или лечении раковых заболеваний, в частности, входящих в группу, состоящую из гематопоэтического рака, рака головного мозга, рака молочной железы, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, рака яичников, рака мочевого пузыря, рака легких, рака печени, меланомы, рака простаты, мышечного рака, мезенхимального рака, пищеводно-желудочной adenокарциномы, немелкоклеточного рака легких, плоскоклеточной карциномы легких, adenокарциномы легких, adenокарциномы желудка, adenокарциномы поджелудочной железы, гепатоцеллюлярной карциномы, более предпочтительно колоректального рака или adenокарциномы.

В следующем конкретном воплощении предусмотрены антитела либо их фрагменты

по изобретению для применения при профилактике и/или лечении фиброзных заболеваний, в частности, системного склероза, многоочагового фиброзклероза, склеродермальной реакции "трансплантант против хозяина" у реципиентов при пересадке костного мозга, нефрогенного системного фиброза, фиброза легких, фиброза печени, 5 фиброза почек, ревматоидного артрита, болезни Крона, язвенного колита, миелофиброза и системной красной волчанки.

В следующем конкретном воплощении предусмотрены антитела либо их фрагменты по изобретению для применения при профилактике и/или лечении глазных заболеваний, в частности, фиброзной патологии хрусталика, заболеваний роговицы, диабетической 10 ретинопатии, "сухой" или "влажной" возрастной дегенерации желтого пятна, пролиферативной витреоретинопатии, образования катаракты, птеригии, кератоконуса, возрастной макулодистрофии и диабетической ретинопатии.

В следующем конкретном воплощении предусмотрены антитела либо их фрагменты по изобретению для применения при профилактике и/или лечении сердечнососудистых 15 заболеваний, в частности, гипертонии, легочной гипертензии, порока легочного или трехстворчатого клапана, порока клапанов аорты и митрального клапана, коарктации аорты, атеросклероза, инфаркта миокарда, сердечной недостаточности, ишемической кардиомиопатии, дилатационной кардиомиопатии, хронической аритмии, фиброза сердца и коронарной недостаточности.

20 В следующем конкретном воплощении предусмотрены антитела либо их фрагменты по изобретению для применения при профилактике и/или лечении неврологических заболеваний, в частности, бокового амиотрофического склероза, болезни Альцгеймера, рассеянного склероза, нейровоспаления, церебральной ишемии и невропатических болей.

25 В другом воплощении предусмотрено применение специфичных к MMP9 антител либо их антиген-связывающих фрагментов по изобретению для получения фармацевтических композиций для профилактики и/или лечения связанных с MMP9 заболеваний, входящих в группу, состоящую из воспалительных и аутоиммунных заболеваний, раковых заболеваний, легочных заболеваний, фиброзных заболеваний 30 легких, септицемии, мышечной дистрофии, аллергии, фиброза почек, склеродермии, дилатационной кардиомиопатии, болезни Чагаса, сердечнососудистых заболеваний, нервно-психиатрических заболеваний, диабета и глазных заболеваний или любых других связанных с MMP9 заболеваний или расстройств.

35 В одном конкретном воплощении предусмотрено применение специфичных к MMP9 антител либо их антиген-связывающих фрагментов по изобретению для получения фармацевтических композиций для профилактики и/или лечения воспалительных и аутоиммунных заболеваний, воспалительных заболеваний кишечника, раковых заболеваний, фиброзных заболеваний, сердечнососудистых заболеваний, нервно-психиатрических заболеваний или глазных заболеваний.

40 В одном конкретном воплощении предусмотрено применение специфичных к MMP9 антител либо их антиген-связывающих фрагментов по изобретению для получения фармацевтических композиций для профилактики и/или лечения воспалительных и/или аутоиммунных заболеваний у больных, в частности, для профилактики или лечения воспалительных заболеваний кишечника, включая болезнь Крона (CD), язвенный колит 45 (UC), неопределенный колит, коллагенозный колит, ревматоидного артрита (RA), рассеянного склероза (MS), системной красной волчанки (SLE), синдрома Шёгрена, системного склероза, полимиозита, атеросклероза.

В одном конкретном воплощении предусмотрено применение специфичных к MMP9

антител либо их антиген-связывающих фрагментов по изобретению для получения фармацевтических композиций для профилактики и/или лечения воспалительных заболеваний кишечника, в частности, проникающей и стриктурирующей болезни Крона и язвенного колита.

- 5 В одном конкретном воплощении предусмотрено применение специфичных к MMP9 антител либо их антиген-связывающих фрагментов по изобретению для получения фармацевтических композиций для профилактики и/или лечения легочных заболеваний, включая астму, фиброзные заболевания легких типа идиопатического фиброза легких, хроническую обструктивную болезнь легких (COPD), или же заболеваний из числа 10 септицемии, мышечной дистрофии, аллергии, фиброза почек, склеродермии, дилатационной кардиомиопатии, болезни Чагаса, сердечнососудистых заболеваний, нервно-психиатрических заболеваний, диабета и глазных заболеваний.

- В альтернативном воплощении предусмотрено применение специфичных к MMP9 антител либо их антиген-связывающих фрагментов по изобретению для получения 15 фармацевтических композиций для профилактики и/или лечения раковых заболеваний, в частности, для профилактики и/или лечения рака, входящего в группу, состоящую из гематопоietического рака, рака головного мозга, рака молочной железы, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, рака яичников, рака мочевого пузыря, рака легких, рака печени, меланомы, рака простаты, мышечного рака, мезенхимального рака, 20 пищеводно-желудочной adenокарциномы, немелкоклеточного рака легких, плоскоклеточной карциномы легких, adenокарциномы легких, adenокарциномы желудка, adenокарциномы поджелудочной железы, гепатоцеллюлярной карциномы, более предпочтительно колоректального рака или adenокарциномы.

- В одном конкретном воплощении предусмотрено применение специфичных к MMP9 25 антител либо их антиген-связывающих фрагментов по изобретению для получения фармацевтических композиций для профилактики и/или лечения колоректального рака или adenокарциномы.

- В одном конкретном воплощении предусмотрено применение специфичных к MMP9 антител либо их антиген-связывающих фрагментов по изобретению для получения 30 фармацевтических композиций для профилактики и/или лечения фиброзных заболеваний, в частности, системного склероза, многоочагового фиброзклероза, склеродермальной реакции "трансплантант против хозяина" у реципиентов при пересадке костного мозга, нефрогенного системного фиброза, фиброза легких, фиброза печени, фиброза почек, ревматоидного артрита, болезни Крона, язвенного колита, миелофиброза и системной 35 красной волчанки.

- В одном конкретном воплощении предусмотрено применение специфичных к MMP9 антител либо их антиген-связывающих фрагментов по изобретению для получения фармацевтических композиций для профилактики и/или лечения глазных заболеваний, в частности, фиброзной патологии хрусталика, заболеваний роговицы, диабетической 40 ретинопатии, "сухой" или "влажной" возрастной дегенерации желтого пятна, пролиферативной витреоретинопатии, образования катаракты, птеригии, кератоконуса, возрастной макулодистрофии и диабетической ретинопатии.

- В одном конкретном воплощении предусмотрено применение специфичных к MMP9 антител либо их антиген-связывающих фрагментов по изобретению для получения 45 фармацевтических композиций для профилактики и/или лечения сердечнососудистых заболеваний, в частности, гипертонии, легочной гипертензии, порока легочного или трехстворчатого клапана, порока клапанов аорты и митрального клапана, коарктации аорты, атеросклероза, инфаркта миокарда, сердечной недостаточности, ишемической

кардиомиопатии, дилатационной кардиомиопатии, хронической аритмии, фиброза сердца и коронарной недостаточности.

В одном конкретном воплощении предусмотрено применение специфичных к MMP9 антител либо их антиген-связывающих фрагментов по изобретению для получения

5 фармацевтической композиции для профилактики и/или лечения неврологических заболеваний, в частности, бокового амиотрофического склероза, болезни Альцгеймера, рассеянного склероза, нейровоспаления, церебральной ишемии и невропатических болей.

В другом воплощении предусмотрен способ профилактики и/или лечения связанных 10 с MMP9 заболеваний, входящих в группу, состоящую из воспалительных и

автоиммунных заболеваний, раковых заболеваний, легочных заболеваний, фиброзных заболеваний легких, септицемии, мышечной дистрофии, аллергии, фиброза почек, склеродермии, дилатационной кардиомиопатии, болезни Чагаса, сердечнососудистых заболеваний, нервно-психиатрических заболеваний, диабета и глазных заболеваний

15 или любых других связанных с MMP9 заболеваний или расстройств, который включает введение терапевтически эффективного количества специфичного к MMP9 антитела либо его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению нуждающемуся в этом лицу.

В одном конкретном воплощении предусмотрен способ профилактики и/или лечения воспалительных и автоиммунных заболеваний, воспалительных заболеваний кишечника,

20 раковых заболеваний, фиброзных заболеваний, сердечнососудистых заболеваний, нервно-психиатрических заболеваний или глазных заболеваний, который включает введение терапевтически эффективного количества специфичного к MMP9 антитела либо его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению нуждающемуся в этом лицу.

В одном конкретном воплощении предусмотрен способ профилактики и/или лечения 25 воспалительных и автоиммунных заболеваний, в частности, профилактики или лечения воспалительных заболеваний кишечника (IBD), включая болезнь Крона (CD), язвенный колит (UC), неопределенный колит, коллагенозный колит, ревматоидного артрита (RA), рассеянного склероза (MS), системной красной волчанки (SLE), синдрома

30 **Шёгрена**, системного склероза, полимиозита, атеросклероза, который включает введение терапевтически эффективного количества специфичного к MMP9 антитела либо его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению нуждающемуся в этом лицу.

В одном конкретном воплощении предусмотрен способ профилактики и/или лечения воспалительных заболеваний кишечника, в частности, профилактики или лечения 35 проникающей и структурирующей болезни Крона и язвенного колита, который включает введение терапевтически эффективного количества специфичного к MMP9 антитела либо его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению нуждающемуся в этом лицу.

В другом конкретном воплощении предусмотрен способ профилактики и/или лечения 40 легочных заболеваний, включая астму, фиброзные заболевания легких типа идиопатического фиброза легких, хроническую обструктивную болезнь легких (COPD), или же заболеваний из числа септицемии, мышечной дистрофии, аллергии, фиброза почек, склеродермии, дилатационной кардиомиопатии, болезни Чагаса, сердечнососудистых заболеваний, нервно-психиатрических заболеваний, диабета и глазных заболеваний, который включает введение терапевтически эффективного 45 количества специфичного к MMP9 антитела либо его антиген-связывающего фрагмента по изобретению нуждающемуся в этом лицу.

В альтернативном воплощении предусмотрен способ профилактики и/или лечения раковых заболеваний, в частности, профилактики и/или лечения рака, входящего в группу, состоящую из гематопоэтического рака, рака головного мозга, рака молочной

железы, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, рака яичников, рака мочевого пузыря, рака легких, рака печени, меланомы, рака простаты, мышечного рака, мезенхимального рака, пищеводно-желудочной аденокарциномы, немелкоклеточного рака легких, плоскоклеточной карциномы легких, аденокарциномы легких,

- 5 аденокарциномы желудка, аденокарциномы поджелудочной железы, колоректального рака и гепатоцеллюлярной карциномы, который включает введение терапевтически эффективного количества специфичного к ММР9 антитела либо его антиген-связывающего фрагмента по изобретению нуждающемуся в этом лицу.

В одном конкретном воплощении предусмотрен способ профилактики и/или лечения

- 10 колоректального рака или аденокарциномы, который включает введение терапевтически эффективного количества специфичного к ММР9 антитела либо его антиген-связывающего фрагмента по изобретению нуждающемуся в этом лицу.

В одном конкретном воплощении предусмотрен способ профилактики и/или лечения фиброзных заболеваний, в частности, системного склероза, многоочагового

- 15 фибросклероза, склеродермальной реакции "трансплантант против хозяина" у реципиентов при пересадке костного мозга, нефрогенного системного фиброза, фиброза легких, фиброза печени, фиброза почек, ревматоидного артрита, болезни Крона, язвенного колита, миелофиброза и системной красной волчанки, который включает введение терапевтически эффективного количества специфичного к ММР9 антитела
- 20 либо его антиген-связывающего фрагмента по изобретению нуждающемуся в этом лицу.

В одном конкретном воплощении предусмотрен способ профилактики и/или лечения глазных заболеваний, в частности, фиброзной патологии хрусталика, заболеваний роговицы, диабетической ретинопатии, "сухой" или "влажной" возрастной дегенерации

- 25 желтого пятна, пролиферативной витреоретинопатии, образования катаракты, птеригии, кератоконуса, возрастной макулодистрофии и диабетической ретинопатии, который включает введение терапевтически эффективного количества специфичного к ММР9 антитела либо его антиген-связывающего фрагмента по изобретению нуждающемуся в этом лицу.

- 30 В одном конкретном воплощении предусмотрен способ профилактики и/или лечения сердечнососудистых заболеваний, в частности, гипертонии, легочной гипертензии, порока легочного или трехстворчатого клапана, порока клапанов аорты и митрального клапана, коаркции аорты, атеросклероза, инфаркта миокарда, сердечной недостаточности, ишемической кардиомиопатии, дилатационной кардиомиопатии,

- 35 хронической аритмии, фиброза сердца и коронарной недостаточности, который включает введение терапевтически эффективного количества специфичного к ММР9 антитела либо его антиген-связывающего фрагмента по изобретению нуждающемуся в этом лицу.

В одном конкретном воплощении предусмотрен способ профилактики и/или лечения

- 40 неврологических заболеваний, в частности, бокового амиотрофического склероза, болезни Альцгеймера, рассеянного склероза, нейровоспаления, церебральной ишемии и невропатических болей, который включает введение терапевтически эффективного количества специфичного к ММР9 антитела либо его антиген-связывающего фрагмента по изобретению нуждающемуся в этом лицу.

- 45 В альтернативном воплощении предусмотрен способ обнаружения ММР9 в биологических образцах, включающий контактирование биологического образца от субъекта со специфичным к ММР9 антителом либо его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению.

В настоящем изобретении "биологический образец" означает клетки, образцы тканей или клеточные компоненты (как-то клеточные мембранные или другие клеточные компоненты), полученные от субъекта, в частности, от субъекта с подозрением на или страдающего воспалительным или аутоиммунным заболеванием и/или раковым заболеванием или же с высоким риском возникновения такого заболевания.

Примеры биологических образцов включают кровь, сыворотку, плазму, цереброспинальную жидкость, синовиальную жидкость, мочу, кал и образцы тканей, включая клетки, выделенные из данной ткани. Образцы тканей включают фиксированные формалином или замороженные срезы тканей.

Для выявления и анализа MMP9 может применяться любой подходящий метод, включая методы диагностического анализа, известные в данной области, как-то методы конкурентного связывания, методы прямого или непрямого "сэндвич"-анализа и методы иммунопреципитации, которые проводятся в неоднородной либо однородной фазе.

В одном конкретном воплощении изобретения предусмотрен способ выявления присутствия и/или концентрации белка MMP9 *ex vivo* в биологическом образце, включающий стадии:

(i) получение биологического образца от субъекта;

(ii) проведение реакции данного биологического образца по меньшей мере с одним антителом либо его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению в условиях, достаточных для связывания белка MMP9, присутствующего в данном биологическом образце, с данным по меньшей мере одним антителом или его фрагментом посредством взаимодействия антиген-антитело; и

(iii) детектирование сигнала, пропорционального уровню комплекса антиген-антитело, образовавшегося на стадии (ii),

причем интенсивность сигнала коррелирует с концентрацией белка MMP9 в биологическом образце.

В одном конкретном воплощении изобретения предусмотрен способ выявления присутствия и/или концентрации активного белка MMP9 *ex vivo* в биологическом образце, включающий стадии:

(i) получение биологического образца от субъекта;

(ii) проведение реакции данного биологического образца по меньшей мере с одним антителом либо его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению в условиях, достаточных для связывания активного белка MMP9, присутствующего в данном биологическом образце, с данным по меньшей мере одним антителом или его

фрагментом посредством взаимодействия антиген-антитело; и

(iii) детектирование сигнала, пропорционального уровню комплекса антиген-антитело, образовавшегося на стадии (ii),

причем интенсивность сигнала коррелирует с концентрацией активного белка MMP9 в биологическом образце.

В одном конкретном воплощении изобретения предусмотрен способ выявления присутствия и/или концентрации активного белка MMP9 *ex vivo* в биологическом образце, при этом по меньшей мере одно антитело либо его антиген-связывающий фрагмент по изобретению содержит вариабельную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 19 и вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 70.

Более предпочтительно предусмотрен способ прогнозирования или диагностики *ex vivo* воспалительного и/или аутоиммунного или ракового заболевания, связанного с повышенным уровнем MMP9, по биологическому образцу от субъекта, включающий стадии:

- (a) получение биологического образца от субъекта;
- (b) приведение данного биологического образца в контакт с твердым матриксом, с которым связано по меньшей мере одно антитело либо его фрагмент по изобретению, причем контактирование проводится в условиях, достаточных для связывания белка
- 5 MMP9, присутствующего в данном образце биологической жидкости, с данным по меньшей мере одним антителом или его фрагментом посредством взаимодействия антиген-антитело;
- (c) удаление любого несвязавшегося белка MMP9 с поверхности данного твердого матрикса;
- 10 (d) детектирование сигнала, пропорционального уровню комплекса антиген-антитело, связанного с данным твердым матриксом;
- (e) сравнение уровня сигнала, обнаруженного на стадии (d), с уровнем сигнала, обнаруженного при таких же условиях с отрицательным контролем,
- 15 при этом более высокий уровень сигнала, обнаруженного в образце субъекта, чем уровень сигнала, обнаруженного в отрицательном контроле, указывает на повышенный уровень MMP9, связанный с воспалительным и/или аутоиммунным или раковым заболеванием.

Наборы

- Один аспект изобретения касается набора, содержащего по меньшей мере одно
- 20 антитело либо его антиген-связывающий фрагмент по изобретению и/или по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, кодирующую данное антитело или его фрагмент, и/или по меньшей мере один вектор, содержащий данную нуклеиновую кислоту, и/или по меньшей мере одну клетку хозяина по изобретению, а также необязательно инструкцию.
 - 25 В предпочтительном воплощении набор по изобретению содержит по меньшей мере одно антитело либо его антиген-связывающий фрагмент по изобретению, которые подлежат связыванию или уже связаны с твердым матриксом.

Примеры твердого матрикса, подходящего для изобретения, включают любые твердофазные подложки, подходящие для проведения иммунологического анализа или

- 30 способа по изобретению, как-то шарики, микрочастицы, наночастицы, трубочки, ткани или пластины, пленки, предметные стекла, лунки, сформированные из стекла или покрытые им, полистиролом, полипропиленом, нитроцеллюлозой, кварцем, керамикой, декстраном или другими материалами. Например, твердый матрикс имеет вид микролунок типа 96-луночного микропланшета.

35 Фиксация антител либо их фрагментов по изобретению к твердому матриксу в наборе по изобретению может осуществляться посредством адсорбции или химического присоединения к твердофазной подложке. Для иммобилизации белка или пептида на твердом носителе можно использовать любые известные средства. Антитела либо их фрагменты по изобретению можно ковалентно или нековалентно связывать с твердым

- 40 матриксом такими методами, как образование ковалентной связи через амидную или сложноэфирную связь или посредством адсорбции. Пептиды можно связывать с помощью таких связывающих пар, как биотин и avidin либо антитело и антиген. После прикрепления пептидов к твердому матриксу этот твердый матрикс можно инкубировать с блокирующим раствором (содержащим блокирующий белок типа бычьего
- 45 сывороточного альбумина), чтобы уменьшить неспецифическую адсорбцию антител в исследуемом образце на поверхности подложки. В соответствии с одним аспектом, антитела либо их фрагменты по изобретению можно синтезировать непосредственно на твердом матриксе из набора по изобретению.

В соответствии с одним воплощением, когда набор содержит по меньшей мере одно антитело или его фрагмент по изобретению либо их комбинацию для связывания с твердым матриксом в виде твердофазной подложки, набор необязательно дополнительно содержит сшивающие реагенты и/или твердый матрикс для проведения иммуноанализа.

В соответствии с другим воплощением набор по изобретению дополнительно содержит по меньшей мере один промывочный реагент для отмыки несвязавшегося материала перед детектированием, чтобы избежать попадания фонового шума. Обычно промывочные реагенты включают стандартные буферы, известные в данной области.

10 Приведенные здесь ссылки включены сюда в качестве ссылки во всей полноте. Настоящее изобретение не ограничивается в объеме конкретными описанными здесь воплощениями, которые служат как отдельные иллюстрации индивидуальных аспектов изобретения, а функционально эквивалентные способы и компоненты входят в рамки изобретения. Так, специалистам в данной области должны стать очевидными различные 15 модификации изобретения, в дополнение к представленным и описанным здесь, из вышеуказанного описания и сопровождающих рисунков. Такие модификации должны входить в рамки прилагаемой формулы изобретения.

После описания изобретения приводятся ниже следующие примеры в качестве иллюстрации, а не для ограничения.

20 Примеры

Пример 1. Создание и выделение антител против MMP9 по изобретению

Антитела против MMP9 по изобретению получали путем выполнения следующих стадий.

1) Выявление "попаданий" (HD) при фаговом дисплее

25 В качестве источника фрагментов scFv использовали библиотеку scFv. Эта библиотека является наивной по происхождению (т.е. она построена с использованием PBMCs неиммунизированных здоровых доноров), имеет небольшой размер (около $2,5 \times 10^9$ комбинаций V_h/V_l) и содержит домены V_h , полученные из репертуара IgM, не проходившего клональную селекцию и переключение изотипа. Используя эту 30 библиотеку, сначала проводили отбор кандидатов scFv на основании их связывания с MMP9 человека или мыши (полноразмерные, про- и активированные формы) методом фагового дисплея, затем эти scFvs переводили в формат IgG1 и проверяли на функциональную нейтрализацию активности MMP9 (в частности, путем определения IC_{50} , видоспецифичности, типа нейтрализации (проMMP9 или MMP9)).

35 Эта стадия позволила идентифицировать 10 антител-кандидатов, которые подразделялись на два класса по механизму: те, которые блокируют активность MMP9 путем препятствия активации латентной proMMP9 (свидетельствуя, что про-домен является частью эпитопа, распознаваемого этими антителами), и те, которые непосредственно препятствуют каталитической активности активированной MMP9 40 (свидетельствуя, что домен CAT_fn является частью эпитопа, распознаваемого этими антителами).

45 2) Оптимизация "попаданий" (HO) путем перетасовки цепи V_L для созревания средства

Четыре из HD-кандидатов, полученных на предыдущем этапе, подвергали

45 оптимизации "попаданий" посредством перетасовки легкой цепи лямбда, чтобы улучшить их действенность. В принципе, цепи V_h исходного HD-клона подвергали пермутации по всему содержимому исходной библиотеки V_l лямбда, получая несколько новых клоноспецифичных библиотек.

3) Оптимизация "лидеров"

Были отобраны два НО-кандидата (F20-VH/B03-VLc и F20-VH/B08-VLc) на основе их механизма действия, т.е. ингибиования ферментативной активности MMP9, для оптимизации и характеристики в качестве "лидеров", в частности, путем (i) оптимизации по гаметным каркасным остаткам (согласно определению Кабат), чтобы минимизировать отклонение последовательности от ближайшей гаметной последовательности человека и потенциально улучшить биофизические свойства и уменьшить риск иммуногенности, и (ii) путем изменения некоторых аминокислот или аминокислотных мотивов в CDRs, которые могли бы привести к химической нестабильности или агрегации антител. Эта стратегия позволила генерировать антитела, содержащие области V_h/V_l , приведенные выше в таблице 2.

В дальнейшем определенные области V_h/V_l , приведенные ниже в таблице 3, были переведены в формат IgG4 человека для дальнейшего изучения. Для этого нуклеиновые кислоты, кодирующие представлявшие интерес цепи V_h и V_l , клонировали в векторы рРТТ (созданные для совместимости с исходными цепями при клонировании) для краткосрочной совместной экспрессии IgG4 в клетках HEK293.

Таблица 3

Наименование	Последовательность вариабельной области тяжелой цепи	Последовательность вариабельной области легкой цепи
F20-VH-GL1/ B03-VL-GL1c	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 68
F20-VH-GL1-V1-V9-V14/ B03-VL-GL1c	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 68
F20-VH-GL1-V4-V9-V14/ B03-VL-GL1c	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 68
F20-VH-GL1/ B08-VL-GL6c	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 70
F20-VH-GL1-V1-V9/ B08-VL-GL6c	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 70
F20-VH-GL1-V1-V9-V14/ B08-VL-GL6c	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 70
F20-VH-GL1-V4-V9/ B08-VL-GL6c	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 70
F20-VH-GL1-V4-V9-V14/ B08-VL-GL6c	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 70

Пример 2. Действенность и эффективность некоторых антител против MMP9 по изобретению при анализе активности MMP3/MMP9 человека и MMP9 человека

Оценивали функциональную нейтрализацию каталитической активности MMP9 в отношении флуорогенного полимерного субстрата DQ-желатина некоторыми антителами по изобретению.

Характерная активность MMP9 (и MMP2) - разложение желатина. Желатин представляет собой практически необратимо денатурированную форму, происходящую из различных коллагенов, из которых некоторые считаются ключевыми

физиологическими субстратами для MMP9. В отличие от мелких пептидных субстратов, связывание и распознавание желатина (подобно коллагену) у MMP9 является сложным

и известно, что оно опосредовано другими участками молекулы, чем активный сайт, включая домены фибронектина и РЕХ. Для того, чтобы сохранить эти физиологически важные взаимодействия "экзосайтов" и облегчить выделение потенциальных "неклассических" классов аллостерических нейтрализаторов, в качестве главного

субстрата для скрининга на пластинах и в целях ранжирования был выбран флуорогенно заглушенный растворимый желатиновый полимер (DQ-желатин). Гидролиз субстрата опосредовался укороченным фрагментом MMP9 (с отщепленным про-доменом). Анализ проводили в двух режимах.

- 5 В первом режиме, названном "анализ MMP9", использовалась предварительно активированная MMP9 (из переделанной MMP9, содержащей мотив распознавания каспазы 8 LETD в природном участке расщепления), в которой сначала удаляли про-домен путем направленного расщепления каспазой 8. Второй режим, названный "анализом MMP3/MMP9", был разработан так, чтобы он включал удаление про-домена 10 (то есть стадию активации) в качестве дополнительного связанного процесса при анализе. Это достигалось путем объединения каталитического домена MMP3 человека (Calbiochem, 444217-5) и полноразмерной (латентной формы) proMMP9 в среде определения вместе с субстратом DQ-желатином (Lubio Science, D12054) и исследуемыми 15 антителами. Показано, что MMP3, которая считается физиологически значимым активатором MMP9, удаляет про-домен по двухстадийному последовательному механизму (Ogata et al., 1992, J. Biol. Chem., 267 (6): 3581-4) и часто экспрессируется совместно с MMP9 в пораженных тканях. Важно то, что активированная MMP3 сама по себе не проявляет существенного расщепления субстрата - DQ-желатина. Поэтому гидролиз DQ-желатина (испускание флуоресценции) в этом методе зависит от 20 опосредованной MMP3 активации MMP9 и собственной каталитической активности MMP9, что дает возможность характеризовать нейтрализаторы, которые препятствуют любому из этих процессов.

Итак, "метод MMP3/MMP9" использовали для определения способности антител против MMP9 нейтрализовать активацию proMMP9 и ее последующую каталитическую 25 активность. Вкратце, аликвоты рекомбинантной proMMP9 человека преинкубировали с различными разведениями тест-антител в течение одного часа. Расщепление запускали добавлением рекомбинантного каталитического домена MMP3 человека вместе со специфичным к MMP9 флуоресцентным субстратом DQ-желатином. Испускаемый 30 сигнал флуоресценции (возбуждение при 485 нм, излучение при 520 нм) пропорционален расщеплению желатинового субстрата, а тем самым и каталитической активности зрелого фермента MMP9. Сигналы флуоресценции наносили на график относительно концентрации антител и выводили значения полумаксимального ингибиования (значения IC₅₀) из кривых нелинейной регрессии.

Метод "MMP9" использовали для определения способности антител против MMP9 35 напрямую нейтрализовать каталитическую активность зрелой MMP9. Вкратце, анализ подобен анализу "MMP3/MMP9", но используется каталитически активная расщепляемая каспазой рекомбинантная MMP9 вместо proMMP9, поэтому добавление рекомбинантного каталитического домена MMP3 человека не требуется.

Все антитела по изобретению, которые исследовали, были способны эффективно 40 уменьшать расщепление DQ-желатина в обоих методах ферментативного анализа. Этот результат означает, что все антитела по изобретению блокируют активацию proMMP9 в каталитически активный фермент и/или блокируют каталитическую активность MMP9 (таблица 4, фиг. 6).

Таблица 4. Действенность и эффективность антител против MMP9 по нейтрализации процессинга про-MMP9 человека и/или её последующей катализической активности на желатине

5	Вариабельные области тяжелой /легкой цепи, входящие в состав антитела	MMP9 человека (активирован. MMP9)		Про-MMP9 человека	
		IC ₅₀ (нМ)	Эффективность	IC ₅₀ (нМ)	Эффективность
F20-VH-GL1/B03-VL-GL1c	1,92	100%	9,05	100%	
F20-VH-GL1-V1-V9-V14/B03-VL-GL1c	3,16	100%	15,24	100%	
F20-VH-GL1-V4-V9-V14/B03-VL-GL1c	1,30	100%	5,48	100%	
F20-VH-GL1/B08-VL-GL6c	3,92	100%	43,99	100%	
F20-VH-GL1-V1-V9/B08-VL-GL6c	2,64	100%	23,74	100%	
F20-VH-GL1-V1-V9-V14/B08-VL-GL6c	3,86	100%	38,07	100%	
F20-VH-GL1-V4-V9/B08-VL-GL6c	0,97	100%	9,52	100%	
F20-VH-GL1-V4-V9-V14/B08-VL-GL6c	2,92	100%	20,44	100%	

Антитело F20-VH-GL1-V4-V9/B08-VL-GL6c по изобретению сравнивали со 20 сравнильным антителом 1 (которое известно как AB0041 и имеет аминокислотную последовательность тяжелой цепи по SEQ ID NO: 44 и легкой цепи по SEQ ID NO: 45), используя "метод MMP9" с высокоочищенной активированной MMP9. Только антитело F20-VH-GL1-V4-V9/B08-VL-GL6c по изобретению эффективно снижало расщепление DQ-желатина с IC₅₀ 2,6 нМ, тогда как сравнильное антитело 1 было неактивным. 25 Этот результат означает, что антитело F20-VH-GL1-V4-V9/B08-VL-GL6c по изобретению является ингибитором ферментативной активности MMP9, тогда как сравнильное антитело 1 - нет.

При анализе "методом MMP3/MMP9" антитело F20-VH-GL1-V4-V9/B08-VL-GL6c по изобретению и сравнильное антитело 1 эффективно снижали расщепление DQ-желатина с IC₅₀ 9,52 нМ и 0,20 нМ, соответственно. В целом результаты этих двух 30 ферментативных анализов показывают, что сравнильное антитело 1 является ингибитором активации MMP9, тогда как антитело F20-VH-GL1-V4-V9/B08-VL-GL6c является ингибитором катализической активности MMP9, а возможно и ингибитором активации MMP9.

Пример 3. Видоспецифичность некоторых антител против MMP9 по изобретению 35 при анализе MMP3/MMP9

Видоспецифичность ингибирования ферментативной активности у антител против MMP9 оценивали "методом MMP3/MMP9", описанным в примере 2. В качестве фермента использовали про-MMP9 макаки-крабоеда (суро), крысы или мыши.

Некоторые антитела по изобретению, которые тестировали, оказались способными 40 эффективно блокировать активацию и/или последующую катализическую активность про-MMP9 макаки-крабоеда (суро), крысы и мыши (таблицы 5, 6 и 7, соответственно).

5 Таблица 5. Действенность и эффективность антител против MMP9 по
10 нейтрализации про-MMP9 макаки-крабоеда при анализе методом MMP3/MMP9 на
15 желатине

Вариабельные области тяжелой/ легкой цепи, входящие в состав антитела	Про-MMP9 макаки	
	IC ₅₀ (нМ)	Эффективность
F20-VH-GL1/B03-VL-GL1c	1,92	100%
F20-VH-GL1-V1-V9-V14/B03-VL-GL1c	3,16	100%
F20-VH-GL1-V4-V9-V14/B03-VL-GL1c	1,30	100%
F20-VH-GL1/B08-VL-GL6c	3,92	100%
F20-VH-GL1-V1-V9/B08-VL-GL6c	2,64	100%
F20-VH-GL1-V1-V9-V14/B08-VL-GL6c	3,86	100%
F20-VH-GL1-V4-V9/B08-VL-GL6c	0,97	100%
F20-VH-GL1-V4-V9-V14/B08-VL-GL6c	2,92	100%

15 Таблица 6. Действенность и эффективность антител против MMP9 по
20 нейтрализации про-MMP9 крысы при анализе методом MMP3/MMP9 на желатине

Вариабельные области тяжелой/ легкой цепи, входящие в состав антитела	Про-MMP9 крысы	
	IC ₅₀ (нМ)	Эффективность
F20-VH-GL1/B03-VL-GL1c	4,99	100%
F20-VH-GL1-V1-V9-V14/B03-VL-GL1c	8,82	100%
F20-VH-GL1-V4-V9-V14/B03-VL-GL1c	2,83	100%
F20-VH-GL1/B08-VL-GL6c	17,41	100%
F20-VH-GL1-V1-V9/B08-VL-GL6c	7,77	100%
F20-VH-GL1-V1-V9-V14/B08-VL-GL6c	12,28	100%
F20-VH-GL1-V4-V9/B08-VL-GL6c	3,16	100%
F20-VH-GL1-V4-V9-V14/B08-VL-GL6c	6,19	100%

25 Таблица 7. Действенность и эффективность антител против MMP9 по
30 нейтрализации про-MMP9 крысы или активной MMP9 крысы при анализе методами
35 MMP3/MMP9 и MMP9 на желатине, соответственно

Вариабельные области тяжелой/ легкой цепи, входящие в состав антитела	MMP9 мыши		Про-MMP9 мыши	
	IC ₅₀ (нМ)	Эффективность	IC ₅₀ (нМ)	Эффективность
F20-VH-GL1/B03-VL-GL1c	333	100%	38,77	100%
F20-VH-GL1-V1-V9-V14/B03-VL-GL1c	>500	н/о	>500	н/о
F20-VH-GL1-V4-V9-V14/B03-VL-GL1c	164	100%	462	100%
F20-VH-GL1/B08-VL-GL6c	0,86	100%	7,91	100%
F20-VH-GL1-V1-V9/B08-VL-GL6c	1,20	100%	7,69	100%
F20-VH-GL1-V1-V9-V14/B08-VL-GL6c	1,91	100%	11,11	100%
F20-VH-GL1-V4-V9/B08-VL-GL6c	1,27	100%	7,80	100%
F20-VH-GL1-V4-V9-V14/B08-VL-GL6c	2,37	100%	12,67	100%

Н/о: не определяли

45 Пример 4. Избирательность по MMP у некоторых антител против MMP9 по
изобретению при анализе каталитической активности MMP человека

Избирательность антител против MMP9 оценивали методом оценки опосредованного
MMPs расщепления флуорогенного пептидного субстрата OmniMMP™ Red (Enzo, BML-

P277-9090), используя набор MMP Inhibitor Profiling Kit (Enzo, BML-AK308). Вкратце, аликовоты рекомбинантного каталитического домена различных MMP человека (MMP1, MMP2, MMP3, MMP8, MMP9, MMP12, MMP13, MMP14 и MMP19) преинкубировали при фиксированной концентрации (100 нМ) исследуемых антител в течение 1 часа. При

- 5 тестировании в качестве положительного и отрицательного контроля включали ингибитор MMP NNGH (Enzo, BML-PI115-9090) и антитело против MMP2/9 (539A-M0237-D02, сравнительное антитело 3, которое имеет аминокислотную последовательность тяжелой цепи по SEQ ID NO: 64 и легкой цепи по SEQ ID NO: 65), антитело против MMP9 (539A-M0240-B03, сравнительное антитело 2, которое имеет 10 аминокислотную последовательность тяжелой цепи по SEQ ID NO: 46 и легкой цепи по SEQ ID NO: 47) и контрольное изотипное антитело (IgG1 против HEL). Затем добавляли флуорогенный пептидный субстрат и измеряли флуоресценцию. Испускаемый сигнал флуоресценции пропорционален расщеплению пептидного субстрата, а тем самым и активности каталитических доменов MMP. Сигнал флуоресценции в отсутствие 15 ингибитора принимали за 100% активности. Сигнал, полученный в присутствии каждого ингибитора, приводили к этой величине и выражали в процентах остающейся активности.

- Все антитела по изобретению, которые тестировали, оказались способными эффективно блокировать каталитическую активность MMP9 человека и в то же время не оказывали существенного влияния на каталитическую активность восьми других 20 MMP человека (фиг. 7). Все антитела по изобретению также не оказывали существенного влияния на каталитическую активность MMP7, MMP10, MMP16 и MMP17 человека (данные не приводятся).

- Пример 5. Действенность антител против MMP9 по изобретению при анализе 25 активности с использованием секретируемых нейтрофилами природных форм MMP9 человека

Было описано несколько природных форм MMP9 человека (мономерная MMP9, димерная MMP9 и форма MMP9, связанная с липокалином NGAL (его также называют липокалин-2), который связывается с желатиназой В нейтрофилов, причем эта последняя форма также именуется NGAL/MMP9 (Rudd et al, 1999, *Biochemistry*, 38, 13937-13950)) и 30 показано, что они связаны с заболеваниями.

Дальнейшая характеристика антител против MMP9 по изобретению включала 35 нейтрализацию природных форм MMP9, происходящих из нейтрофилов. Для этого оценивали функциональную нейтрализацию каталитической активности MMP9 из нейтрофилов в отношении флуорогенного субстрата OmniMMP™ Red (фирмы Enzo) антителами по изобретению.

Активацию фракции proMMP9 в препаратах MMP9 из нейтрофилов проводили путем 40 предобработки APMA (ацетатом *n*-аминофенилртути), которая делает доступным каталитический сайт MMP9, перед функциональным анализом нейтрализации с вариантом антитела F20-VH/B08-VLc против MMP9 по изобретению (F20-VH-GL1-V4- V9/B08-VL-GL6c). Вкратце, аликовоты различных активированных APMA форм про- 45 MMP9 человека из нейтрофилов (мономерной, димерной и NGAL/MMP9) инкубировали с исследуемым антителом в течение 1 часа. В качестве отрицательного контроля при тестировании включали контрольное изотипное антитело (IgG4 против HEL). Затем добавляли флуорогенный пептидный субстрат и измеряли флуоресценцию. Испускаемый сигнал флуоресценции (возбуждение при 540 нм, излучение при 590 нм) пропорционален расщеплению пептидного субстрата, а тем самым и активности каталитических доменов MMP.

Как видно из фиг. 8, вариант антитела F20-VH/B08-VLc по изобретению (F20-VH-

GL1-V4-V9/B08-VL-GL6c) нейтрализует активность нескольких физиологических форм MMP9 человека: мономерной MMP9, димерной MMP9 и NGAL/MMP9 со 100%-й эффективностью.

Антитело по изобретению сравнивали со сравнительным антителом 1, используя

- 5 "метод MMP3/MMP9", описанный в примере 2. Вариант антитела F20-VH/B08-VLc по изобретению (F20-VH-GL1-V4-V9/B08-VL-GL6c) ингибитирует ферментативную активность MMP9 из нейтрофилов человека со 100%-й эффективностью, будь это мономерная или димерная форма или связанная с NGAL (фиг. 9), тогда как сравнительное антитело 1 проявляет лишь частичное ингибиование (25% эффективность) при всех формах MMP9
10 из нейтрофилов (фиг. 9). Полная нейтрализация всех природных активных форм MMP9 вариантом антитела F20-VH/B08-VLc по изобретению (F20-VH-GL1-V4-V9/B08-VL-GL6c) должна трансформироваться в превосходную эффективность у пациентов с высокими уровнями мономерной, димерной MMP9 и/или комплекса NGAL/MMP9 в сыворотке.

- 15 Пример 6. Кинетика связывания и сродство к про- и активированной формам MMP9 человека у антител против MMP9 по изобретению

Связывание антител против MMP9 с рекомбинантным антигеном MMP9 человека характеризовали стандартным методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR). На первой стадии антитела против MMP9 захватывались антителом против Fc человека, 20 иммобилизованным на сенсорном чипе BIACore. На второй стадии титровали про-MMP9 или MMP3-активированную MMP9 от 4,7 до 150 нМ в 2-кратных разведениях. Сенсограммы показывают, что и вариант F20-VH/B08-VLc (F20-VH-GL1-V4-V9/B08-VL-GL6c), и сравнительное антитело 1 хорошо связываются с MMP3-активированной MMP9 (фиг. 10). Сравнительное антитело 1 хорошо связывается и с про-MMP9, но у 25 варианта F20-VH/B08-VLc (F20-VH-GL1-V4-V9/B08-VL-GL6c) (фиг. 10) наблюдался лишь минимальный сигнал. В таблице 8 представлено сродство связывания (K_D) варианта антитела F20-VH/B08-VLc по изобретению (F20-VH-GL1-V4-V9/B08-VL-GL6c) и 30 сравнительного антитела 1 в отношении рекомбинантной про-MMP9 человека и MMP3-активированной MMP9. Поскольку при концентрации антитела в 150 нМ связывание составляло менее 1%, то оценка K_D у варианта антитела F20-VH/B08-VLc (F20-VH-GL1-V4-V9/B08-VL-GL6c) для про-MMP9 составила более 15 мкМ.

Таблица 8

Антитело	Антиген	K_D (нМ)
F20-VH/ B08-VLc	про-MMP9	>15,000
	MMP9	11,7
Сравнительное антитело 1	про-MMP9	0,9
	MMP9	5,0

K_D - равновесная константа диссоциации, рассчитанная из графика

- 40 Пример 7. Картрирование эпитопов у антител против MMP9 по изобретению

Дальнейшая характеристика антител против MMP9 по изобретению включала идентификацию тех участков MMP9 человека, которые важны для связывания антител и которые в этой связи определяют эпитопы. Эта характеристика проводилась на одном из представителей каждого из антител F20/B08 и F20/B03, а именно F20-VH-GL1-V1-V9-V14/B03-VL-GL1C и F20-VH-GL1-V4-V9/B08-VL-GL6c.

Для определения эпитопов MMP9, способных специфически связываться с антителами против MMP9 по изобретению, применяли методы химического сшивания и масс-спектрометрии (Peter and Tomer, 2001, Anal. Chem., 73, 4012-4019; Pimenova et al, 2008, J.

Mass Spectrom. JMS, 43, 185-195; Herzog et al., 2012, Science 337, 1348-1352). Сначала смешивали антитела по изобретению и про-MMP9 в растворе и подвергали химической сшивке, используя специально разработанные дейтерированные сшивающие реагенты. Затем MMP9 и ковалентно связанный комплекс MMP9-антитело подвергали протеолизу с помощью 3 различных протеолитических ферментов с тем, чтобы генерировать большое количество перекрывающихся пептидов, покрывающих всю последовательность MMP9. Пептиды из самой MMP9 и из сшитого комплекса MMP9-антитело подвергали анализу методом масс-спектрометрии с высоким разрешением (nLC-Orbitrap MS) и сравнивали с тем, чтобы определить взаимодействующие пептиды иммунокомплекса.

Этот анализ показал, что интерфейс взаимодействия между MMP9 человека (SEQ ID NO 1) и антителами по изобретению располагается в пределах 3 прерывистых эпитопов MMP9, которые включают следующие аминокислотные последовательности MMP9:

15 SEQ ID NO: 41: ¹⁵⁰AVTPLTFTRVYSRDA DIVIQF¹⁷⁰ (соответствует положениям аминокислот 150-170 в MMP9 человека) (далее именуется участком 1),

SEQ ID NO: 42: ¹⁹⁸IQGDAHFDDDELWSLGKGVVVPTRFG²²³ (соответствует положениям аминокислот 198-223 в MMP9 человека) (далее именуется участком 2) и

20 SEQ ID NO: 43: ⁴¹⁹MYPMYRFTEGPPLHKDDVNGIR⁴⁴⁰ (соответствует положениям аминокислот 419-440 в MMP9 человека) (далее именуется участком 3).

Для определения аминокислот, важных для связывания сравнительного антитела 1 с MMP9 (моноклональное AB0041 мыши, WO 2013/130078), использовали различные рекомбинантные мутанты MMP9 человека. При анализе были идентифицированы 25 остатки E111, D113, R162 и I198 как важные для связывания сравнительного антитела 1 с MMP9 человека. Две из этих аминокислот, R162 и I198, присутствуют в участках эпитопов, распознаваемых антителами против MMP9 по изобретению (участок 1 и участок 2). Однако участок 3 определяет новый эпитопный участок, особенно важный для антител против MMP9 по изобретению. Участок 3 находится в пределах 30 каталитического домена MMP9. Поскольку антитела против MMP9 по изобретению, в отличие от сравнительного антитела 1, способны ингибировать ферментативную активность полностью зрелой MMP9, тогда как сравнительное антитело 1 только связывается с полностью зрелой MMP9, возможно, что связывание с участком 3 придает антителам против MMP9 по изобретению способность к нейтрализации ферментативной 35 активности полностью зрелой MMP9.

Кроме того, при анализе связывания и конкуренции было показано, что моноклональное антитело REGA-3G12 мыши (Martens et al., supra) связывается с пептидом G171-L187 из MMP9 человека. Участок MMP9 (G171-L187), с которым связывается 40 антитело REGA-3G12, находится за пределами 3 участков MMP9, распознаваемых антителами против MMP9 по изобретению.

Пример 8. Прямое связывание и конкурентное связывание антител против MMP9 с про- и активированной формами MMP9 человека

Способность антител против MMP9 к прямому связыванию с про-MMP9 человека и MMP3-активированной MMP9 человека, соответственно, оценивали по стандартной 45 методике ELISA. Вкратце, 96-луночные планшеты покрывали (2,5 мкг/мл) одной из форм MMP9 в течение 16 ч при комнатной температуре. После 2-часовой инкубации с блокирующим буфером (2% козьей сыворотки в PBS/Tween) и 4 отмывок промывочным буфером (PBS/Tween 0,05% об./об.) добавляли различные концентрации

биотинилированных антител против MMP9 (сравнительное антитело 1 или вариант F20-VH/B08-VLc (F20-VH-GL1-V4-V9/B08-VL-GL6c) в двух повторах и инкубировали в течение 1 ч. Затем лунки отмывали четыре раза и проявляли связавшиеся биотинилированные антитела с помощью конъюгированного с HRP стрептавидина и субстрата ТМВ. Считывали поглощение при 450 нм и 620 нм по каждой из двойных проб и выражали данные в виде скорректированного поглощения ($A_{450}-A_{620}$).

Представленные на фиг. 11 результаты показывают, что и сравнительное антитело 1, и вариант антитела F20-VH/B08-VLc (F20-VH-GL1-V4-V9/B08-VL-GL6c) против MMP9 сильно связываются с MMP3-активированной MMP9 (фиг. 11B) дозозависимым образом.

Напротив, хотя сравнительное антитело 1 хорошо связывается с про-MMP9 дозозависимым образом (фиг. 11A), вариант антитела F20-VH/B08-VLc (F20-VH-GL1-V4-V9/B08-VL-GL6c) против MMP9 проявляет заметное связывание с про-MMP9 только при самой высокой концентрации (5 мкг/мл) (фиг. 11A).

Чтобы проверить, будет ли вариант антитела F20-VH/B08-VLc (F20-VH-GL1-V4-V9/B08-VL-GL6c) конкурировать со сравнительным антителом 1 за связывание с MMP9, использовали тот же метод ELISA с фиксацией MMP3-активированной MMP9, только очищенный вариант антитела F20-VH/B08-VLc или сравнительное антитело 1 добавляли за 2 часа до добавления биотинилированных антител против MMP9. После 4 отмывок промывочным буфером добавляли заранее определенную оптимальную дозу биотинилированного сравнительного антитела 1 или F20-VH/B08-VLc и инкубировали в течение 1 часа. Представленные на фиг. 11 результаты на панели С показывают, что добавление варианта антитела F20-VH/B08-VLc (F20-VH-GL1-V4-V9/B08-VL-GL6c) против MMP9 не препятствует связыванию сравнительного антитела 1 с MMP9, тогда как такая же концентрация очищенного сравнительного антитела 1 полностью предотвращает дальнейшее связывание биотинилированного сравнительного антитела 1 с MMP9.

В совокупности эти эксперименты по связыванию показывают, что, в отличие от сравнительного антитела 1, вариант антитела F20-VH/B08-VLc (F20-VH-GL1-V4-V9/B08-VL-GL6c) против MMP9 предпочтительно связывается с активной формой MMP9, чем с про-MMP9, и что он не конкурирует со сравнительным антителом 1 за связывание с MMP9.

Пример 9. Эффект антитела против MMP9 по изобретению при анализе инвазии раковых клеток

Инвазию клеток раковой линии оценивали на покрытых матригелем планшетах типа Transwell. Вставные мембранны транслунок (входящие в набор фирмы Cultrex - 3455-024) покрывали экстрактом базальных мембран (BME \times 0,5, входит в набор фирмы Cultrex) и инкубировали 24 часа при 37°C. В то же время клетки MGC803 (раковой линии клеток желудка человека - Easy-Bio, Китай) подвергали голоданию в культуральной среде RPMI (Gibco - 52400025), лишенной сыворотки (среда голодания). Затем клетки извлекали и ресуспенсировали при $0,5\times 10^6$ клеток/мл в среде голодания, содержащей 100 нг/мл PMA (форбол-12-миристат-13-ацетат фирмы Sigma - P8139) и либо 25 мкМ ингибитора MMP (GM-6001 фирмы Millipore - CC1000), 10 мкг/мл антитела против MMP9 (варианта F20-VH/B08-VLc - F20-VH-GL1-V4-V9/B08-VL-GL6c), 10 мкг/мл антитела против IgG4 (изотипный контроль) или ничего (среда). В покрытые матригелем транслунки вносили 100 мкл обработанных клеток и добавляли 500 мкл среды RPMI, содержащей 10% FCS, в нижнюю часть транслунки. Планшеты инкубировали 16 часов при 37°C. Инвазию клеток определяли путем инкубации нижней части мембраны транслунок с кальцеин-АМ, расщепление которого на флуоресцентный кальцеин

пропорционально количеству клеток. Испускаемый сигнал флуоресценции (возбуждение при 485 нм, излучение при 520 нм) отражает эффективность инвазии клеток через матригель.

Результаты показывают, что вариант антитела F20-VH/B08-VLc (F20-VH-GL1-V4-5 V9/B08-VL-GL6c) против MMP-9 эффективно ингибитирует миграцию раковых клеток MGC803 через матригель с такой же эффективностью, как и ингибитор MMP GM-6001 (фиг. 12). Поскольку метастатические клетки выходят из своего места происхождения путем инвазии окружающих тканей, включая базальные мембранны, то этот результат означает, что антитела против MMP9 по изобретению могли бы стать эффективным 10 антимиграционным и антиинвазивным средством при метастазирующем раке.

Пример 10. Действие антитела против MMP9 по изобретению на модели колита у мышей

Модель вызванного декстран-сульфатом натрия (DSS) колита широко применяется в доклинических исследованиях в качестве модели воспалительной болезни кишечника 15 (IBD). Препараты, которые одобрены для лечения язвенного колита, как-то стероиды, метронидазол, 5'-аминосалицилаты, циклоспорин и иммунотерапия антителами против TNF α , оказались эффективными в уменьшении тяжести заболевания на модели DSS, свидетельствуя, что эта модель является релевантной моделью для переноса данных 20 по мышам на заболевание человека (Perse et al., 2012, J. Biomed. Biotechnol., 2012: 718-617). Колит у мышей вызывают добавлением DSS в питьевую воду, что приводит к повреждению слизистой оболочки толстой кишки. Клинические проявления DSS-колита в острой фазе могут включать потерю веса и диарею. Типичные гистологические 25 изменения при остром DSS-колите аналогичны тем, что наблюдаются при IBD человека, и включают истощение муцина, дегенерацию и некроз эпителия, что ведет к исчезновению эпителиальных клеток. Последнее сопровождается инфильтрацией 30 нейтрофилов в базальную мембрану и подслизистую оболочку, криптитом, абсцессом кишечных крипт и воспалением слизистой и подслизистой оболочки толстой кишки.

Терапевтическую эффективность антитела против MMP9 по изобретению оценивали на модели индуцированного DSS колита у мышей BALB/c. Колит индуцировали 35 добавлением 4% (мас./об.) DSS в питьевую воду на протяжении 5 дней. Группам из 10 мышей вводили внутрибрюшинно антитело F20-VH/B08-VLc (вариант F20-VH-GL1-V4-V9/B08-VL-GL6c) или контрольные изотипные антитела (IgG4) в дозе 30 мг/кг на 6, 9 и 12-й день и забивали животных на 14-й день.

Течение болезни оценивали слепым методом по видеоэндоскопии нижней части 40 толстой кишки на 6, 10 и 14-й день. Колит оценивали визуально по шкале от 0 до 14 на основании степени изъязвления, васкуляризации и гранулярности, отмеченной в ткани, и длины пораженных участков толстой кишки следующим образом: изъязвление (0, 1, 2 или 3), гранулярность (0, 1, 2 или 3), эритема (0, 1, 2 или 3), длина пораженного участка (0, 1: локализованный, 2: диффузный). Каждой мыши присваивали баллы 45 эндоскопического показателя, соответствующие повреждению, наблюдавшемуся по всей длине толстой кишки. Животных, у которых эндоскопический показатель составлял <5 баллов на 6-й день, до начала лечения антителом, считали недостаточно серьезно заболевшими и исключали из дальнейшего анализа. Как видно из фиг. 13, на 6-й день обе группы имели близкие средние эндоскопические показатели, тогда как под конец исследования на 14-й день у животных, получавших F20-VH/B08-VLc, наблюдалось значительное улучшение ($p=0,005$) по среднему эндоскопическому показателю в сравнении с группой, получавшей контрольное изотипное антитело.

Под конец исследования (на 14-й день) у каждой мыши отсекали дистальную часть

толстой кишки, фиксировали формалином, заключали в парафин и делали срезы для гистологии. Все срезы окрашивали гематоксилином и эозином и исследовали слепым методом в отношении опытных групп. Ткани оценивали на повреждение эпителия и инфильтрацию воспалительных клеток по шкале от 1 до 4 баллов по каждому параметру.

5 Гистологический показатель представляет собой сумму баллов по повреждению эпителия и инфильтрации воспалительных клеток и поэтому составляет от 0 до 8. Результаты представлены на фиг. 14.

У обработанных DSS мышей развивался колит, характеризующийся гиперплазией эпителия и истощением бокаловидных клеток, инфильтрацией воспалительных клеток 10 в слизистую и подслизистую оболочку. На некоторых поперечных срезах толстой кишки также наблюдались абсцессы кишечных крипт, эрозия и изъязвление слизистых оболочек. Как видно из фиг. 13, анализ гистологических показателей показал, что обработка антителом против MMP9 была связана со снижением среднего показателя тяжести колита у получавшей F20-VH/B08-VLc группы по сравнению с контрольной группой, 15 получавшей изотипное антитело. Аналогичным образом средние баллы по инфильтрации воспалительных клеток и повреждении эпителия также снижались при обработке антителом против MMP9 по сравнению с контрольной группой, получавшей изотипное антитело.

Пример 11. Действие антитела против MMP9 по изобретению на модели кишечного 20 фиброза у мышей с гетеротипическими трансплантатами

Главным признаком воспалительной болезни кишечника (IBD) является тяжелое повреждение ткани слизистой оболочки. Повреждение ткани запускает репарационные 25 действия окружающих клеток. Быстрое закрытие раны важно для сокращения времени, в течение которого нарушается барьерная функция стенки кишечника, но чрезмерная репарация ткани способствует фиброзу, обычному явлению при болезни Крона (CD). Фиброз приводит к образованию структур у 10-40% пациентов (Cosnes et al., 2002, Inflamm. Bowel Dis., 8(4): 244-50; Freeman, 2003, J. Clin. Gastroenterol., 37(3): 216-9), показанию к операции примерно у 80% пораженных структурами пациентов (Cosnes et al., 2002, supra).

30 Гетеротипическая трансплантация взятых при резекции участков кишечника у мышей ведет к исчезновению кишечного эпителия и завершается фиброзной окклюзией просвета кишечника, воспроизводя гистологические и молекулярные признаки фиброза кишечника у человека, как-то утолщение люминальной стенки, чрезмерное отложение коллагена и экспрессия профибротических медиаторов.

35 Донорские (помеченные зеленым флуоресцентным белком мыши C57BL/6-Tg UBC-GFP) участки резекции тонкой кишки трансплантировали подкожно в затылки мышей-реципиентов C57BL/6. Через 5, 8 и 10 дней мышам вводили внутрибрюшинно 30 мг/кг антитела против MMP9 по изобретению (F20-VH/B08-VLc, вариант F20-VH-GL1-V4-V9/B08-VL-GL6c) или контрольного изотипного антитела (IgG4), по 5 мышей на группу.

40 Через 14 дней после трансплантации небольшие привитые участки кишечника подвергали эксплантации. После этого каждый эксплантат делили на три равных сегмента. Центральный сегмент фиксировали в 4%-ном формалине и готовили для гистопатологической оценки. Два внешних сегмента быстро замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C до выделения РНК или белка.

45 Гистологические поперечные срезы окрашивали с помощью Sirius red, чтобы подкрасить коллаген (красным цветом). Толщину коллагенового слоя определяли независимые исследователи, не знаяшие о типе эксперимента. Микроскопическую оценку проводили с помощью AxioCam MRc5 на микроскопе Zeiss Axiphot. Толщину

коллагенового слоя измеряли с помощью программы AxioVision версии 4.7.2 (Zeiss). Толщину рассчитывали из восьми мест в репрезентативных зонах (по 8 образцов для каждой временной точки) при 100-кратном увеличении. Статистический анализ проводили с помощью программы Prism 6. Для сравнения между группами использовали 5 непарный t-критерий.

По сравнению с изотипным контролем, обработка антителом F20-VH/B08-VLc против MMP9 дает существенную защиту от потери эпителиальной структуры у гетеротопических трансплантатов кишечника, как видно из фиг. 15, и значительно (p<0,0001) уменьшает толщину коллагенового слоя в гетеротопических трансплантатах 10 кишечника, как видно из фиг. 16. Этот результат означает, что антитела против MMP9 по изобретению могли бы быть эффективными при фиброзных заболеваниях и фистулизирующей болезни Крона.

Пример 12. Влияние антител против MMP9 на мышей Swiss nude, несущих подкожно раковые клетки HCT-116 толстой кишки человека

15 Клетки раковой линии HCT-116 толстой кишки человека (1×10^7 клеток) вводили подкожно в правый бок мышей nude и давали им вырасти до ≈ 100 мм^3 перед началом обработки. Внутрибрюшинно вводили антитело против MMP9 по изобретению F20-VH/B08-VLC, вариант F20-VH-GL1-V4-V9/B08-VL-GL6c, или контрольное изотипное 20 антитело типа IgG4 в течение 3 недель. Мышам давали ударную дозу антител по 50 мг/кг в первый день обработки, а после этого вводили два раза в неделю по 30 мг/кг. Через 21 день после начала обработки мышей забивали и извлекали первичные опухоли и органы с метастазами для анализа. Измеряли вес и размеры первичных опухолей и 25 подсчитывали количество видимых метастатических очагов в лимфатических узлах, печени, легких и брюшине.

Список последовательностей

Аминокислотная последовательность MMP9 человека (номер последовательности в NCBI: NP_004985.2)

SEQ ID NO: 1

30 mslwqplvlv llvlgccfaa prqrqstlvl fpgdlrtnlt drqlaeeyly rygytrvaem
rgesksgpa llllqkqlsl petgeldsat lkamrtprcg vpdlgfqtfe gdlkwhhhn
itywiqnyse dlpravidda farafalwsa vtpltftrvy srdadiviqf gvaehgdgyp
fdgkdgllah afppgpgiqg dahfdddelw slkgvvvpt rfgnadgaac hfpfifegr
35 ysacttdgrs dglpwcssta nydtddrfgf cpserlytqd gnadgkpcqf pfifqgqsys
acttdgrsrdg yrwcattany drdklfgfc tradstvmgg nsagelcvfp ftflgkeyst
ctsegrgdgr lwcattsnfd sdkkwgfcpd qgyslflvaa hefghalglid hssvpealmy
40 pmyrftegpp lhkddvngir hlygprpepe prppttppq ptapptvcpt gpptvhps
ptagptgpps agptgpptag pstatvpls pvddacnvni fdaiaeignq lylfkdgkyw
rfsegrgsrp qgpfliadkw palprkldsv feerlskklf ffsgrqvwwy tgasvlgprr
45 ldklglgadv aqvtgalrsg rgkmllfsgr rlwrfdvkaq mvdprsasev drmfpvgvpld
thdvfqyrek ayfcqdryw rvssrselnq vdqvgvtyd ilqcped

Аминокислотная последовательность F20-VH-CDR1 тяжелой цепи

SEQ ID NO: 2: DYPMH

Аминокислотная последовательность F20-VH-CDR2 тяжелой цепи

SEQ ID NO: 3: GISSNSGSVGYADSVKG

Аминокислотная последовательность F20-VH-CDR3 тяжелой цепи

SEQ ID NO: 4: DKIYYGSGSYDFYYYYGMDV

Аминокислотная последовательность F20-VH-CDR2-V1 тяжелой цепи

SEQ ID NO: 5: GISSQSGSVGYADSVKG

Аминокислотная последовательность F20-VH-CDR2-V4 тяжелой цепи

SEQ ID NO: 6: GISSRSGSVGYADSVKG

Аминокислотная последовательность F20-VH-CDR2-V9 тяжелой цепи

SEQ ID NO: 7: GISSNSGSVGYAESVKG

Аминокислотная последовательность F20-VH-CDR2-V1-V9 тяжелой цепи

SEQ ID NO: 8: GISSQSGSVGYAESVKG

Аминокислотная последовательность F20-VH-CDR2-V4-V9 тяжелой цепи

SEQ ID NO: 9: GISSRSGSVGYAESVKG

Аминокислотная последовательность F20-VH-CDR3-V14 тяжелой цепи

SEQ ID NO: 10: DKIYYGSGSYDFYYYYGIDV

Аминокислотная последовательность F20-VH тяжелой цепи

SEQ ID NO: 11:

EVQLVESGGGLVQPGRLRLSCAASGFTFNDDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISSN
SGSVGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARDKIYYGSGSYDFYY
YYGMDVWGQQGTTVTVSS

Аминокислотная последовательность F20-VH-GL1 тяжелой цепи

SEQ ID NO: 12:

EVQLVESGGGLVQPGRLRLSCAASGFTFNDDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISSN
SGSVGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDKIYYGSGSYDFYY
YYGMDVWGQQGTTVTVSS

Аминокислотная последовательность F20-VH-GL1-V1 тяжелой цепи

SEQ ID NO: 13:

EVQLVESGGGLVQPGRLRLSCAASGFTFNDDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISS
QSGSVGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDKIYYGSGSYDFY
YYYGMDVWGQQGTTVTVSS

Аминокислотная последовательность F20-VH-GL1-V4 тяжелой цепи

SEQ ID NO: 14:

EVQLVESGGGLVQPGRLRLSCAASGFTFNDDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISSR
SGSVGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDKIYYGSGSYDFYY
YYGMDVWGQQGTTVTVSS

Аминокислотная последовательность F20-VH-GL1-V9 тяжелой цепи

SEQ ID NO: 15:

EVQLVESGGGLVQPGRLRLSCAASGFTFNDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISSN
SGSVGYAESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDKIYYGSGSYDFY
YYGMDVWGQGTTVTVS

5 Аминокислотная последовательность F20-VH-GL1-V14 тяжелой цепи
SEQ ID NO: 16:

EVQLVESGGGLVQPGRLRLSCAASGFTFNDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISSN
SGSVGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDKIYYGSGSYDFY
YYGIDVWGQGTTVTVS

10 Аминокислотная последовательность F20-VH-GL1-V1-V9 тяжелой цепи
SEQ ID NO: 17:

EVQLVESGGGLVQPGRLRLSCAASGFTFNDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISS
QSGVGYAESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDKIYYGSGSYDFY
YYGMDVWGQGTTVTVS

15 Аминокислотная последовательность F20-VH-GL1-V1-V9-V14 тяжелой цепи
SEQ ID NO: 18:

EVQLVESGGGLVQPGRLRLSCAASGFTFNDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISS
QSGVGYAESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDKIYYGSGSYDFY
YYGIDVWGQGTTVTVS

20 Аминокислотная последовательность F20-VH-GL1-V4-V9 тяжелой цепи
SEQ ID NO: 19:

EVQLVESGGGLVQPGRLRLSCAASGFTFNDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISSR
SGSVGYAESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDKIYYGSGSYDFY
YYGMDVWGQGTTVTVS

25 Аминокислотная последовательность F20-VH-GL1-V4-V9-V14 тяжелой цепи
SEQ ID NO: 20:

EVQLVESGGGLVQPGRLRLSCAASGFTFNDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISSR
SGSVGYAESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDKIYYGSGSYDFY
YYGIDVWGQGTTVTVS

30 Аминокислотная последовательность B03-VL-CDR1 легкой цепи
SEQ ID NO: 21: QGDSLRSYYAS

35 Аминокислотная последовательность B03-VL-CDR2 легкой цепи
SEQ ID NO: 22: GKNNRPS

40 Аминокислотная последовательность B03-VL-CDR3 легкой цепи
SEQ ID NO: 23: QSRDNIGNHRVVL

45 Аминокислотная последовательность B03-VL легкой цепи
SEQ ID NO: 24:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVVVIYGKNNRP
SGIPDRFSGSSGNTVSLTITGAQAEDAYYCQSRDNIGNHRVVLFGGTKVTVL
Аминокислотная последовательность B03-VL-GL1 легкой цепи
SEQ ID NO: 25:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVVVIYGKNRP
SGIPDRFSGSSSGNTVSLTITGAQAEDEADYYCQSRDNIGNHRVVLFGGGTKLTVLG

Аминокислотная последовательность B08-VL-CDR1 легкой цепи

SEQ ID NO: 26: TGTSNDVGAYNRVS

Аминокислотная последовательность B08-VL-CDR2 легкой цепи

SEQ ID NO: 27: GVSNRPS

Аминокислотная последовательность B08-VL-CDR3 легкой цепи

SEQ ID NO: 28: TSYSSSTTSYVV

Аминокислотная последовательность B08-VL легкой цепи

SEQ ID NO: 29:

QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSDVGAYNRVSWYQQHPGKAPKLLIYGVS
NRPSGVSTRFSGSKSGNTASLTISGLAADEADFYCTSYSSSTTSYVVFGGGTKVTVLG

Аминокислотная последовательность B08-VL-GL6 легкой цепи

SEQ ID NO: 30:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSDVGAYNRVSWYQQHPGKAPKLMIYGVS
NRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADFYCTSYSSSTTSYVVFGGGTKVTVLG

Нуклеотидная последовательность F20-VH-CDR1 тяжелой цепи

SEQ ID NO: 31: *gactacccatgcac*

Нуклеотидная последовательность F20-VH-CDR2 тяжелой цепи

SEQ ID NO: 32: *ggcatctcccaactccggctccgtgggctacggccactccgtgaaggc*

Нуклеотидная последовательность F20-VH-CDR3 тяжелой цепи

SEQ ID NO: 33: *gacaagatctactacggctccggctcacgactctactactacggcatggacgt*

Нуклеотидная последовательность B03-VL-CDR1 легкой цепи

SEQ ID NO: 34: *caaggcgattctctgcgctcatattatgc*

Нуклеотидная последовательность B03-VL-CDR2 легкой цепи

SEQ ID NO: 35: *ggaaaaacaaccgaccatct*

Нуклеотидная последовательность B03-VL-CDR3 легкой цепи

SEQ ID NO: 36: *caatctcgagacaatagggAACCATAGAGTTGTTCTG*

Нуклеотидная последовательность B08-VL-CDR1 легкой цепи

SEQ ID NO: 37: *acaggaacgtctaattgtgtggggcttacaatcgcgtagt*

Нуклеотидная последовательность B08-VL-CDR2 легкой цепи

SEQ ID NO: 38: *ggcgtgtctaacaggcctagc*

Нуклеотидная последовательность B08-VL-CDR3 легкой цепи

SEQ ID NO: 39: *acaagctacagttagcagtaccacatcatatgtcg*

40 Аминокислотная последовательность генноинженерной константной области тяжелой цепи IgG4 человека

SEQ ID NO: 40:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVTVPSQLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFL
 GGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTPREE
 5 QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPVYTLPP
 SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSG

Аминокислотная последовательность 1-го участка, входящего в состав эпитопа

10 MMP9

SEQ ID NO: 41: AVTPLTFTRVYSRDADIVIQF

Аминокислотная последовательность 2-го участка, входящего в состав эпитопа
 MMP9

SEQ ID NO: 42: IQGDAHFDDDELWSLGKGVVV PTRFG

15 Аминокислотная последовательность 3-го участка, входящего в состав эпитопа
 MMP9

SEQ ID NO: 43: MYPMYRFTEGPPLHKDDVNGIR

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи сравнительного антитела 1

20 (известного как AB0041)

SEQ ID NO: 44:

QVQLKESGPGLVAPSQSLISITCTVSGFSLLSYGVHWVRQPPGKGLEWLGVIWTG
 GTTNYNSALMSRLSISKDDSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCARYYYGMDYWGQGTSV
 25 TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAV
 LQSSGLYSLSSVTVPSQLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFLG
 GPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTPREEQ
 FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPVYTLPPS
 30 QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTV
 KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSG

Аминокислотная последовательность легкой цепи сравнительного антитела 1
 (известного как AB0041)

SEQ ID NO: 45:

35 DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVRNTVAWYQQKTGQSPKLLIYSSSYR
 NTGVPDRFTGSGSGTDFFTISSLVQAEDLAVYFCQQHYITPYTFGGTKLEIKRTVAAPS
 VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
 SLSSTLTLKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

40 Аминокислотная последовательность тяжелой цепи сравнительного антитела 2
 (известного как 539A-M0240-B03)

SEQ ID NO: 46:

EVQLLESGGGLVQPGGLSLRLSCAASGFTFSTYQMVWVRQAPGKGLEWVSVIYPS
 GGPTVYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDYYDSSGPGAFD
 IWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDVFPEPVTVWSN
 SGALT
 5 SGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNPKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH
 TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
 QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD
 10 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Аминокислотная последовательность легкой цепи сравнительного антитела 2
 (известного как 539A-M0240-B03)

SEQ ID NO: 47:

15 QYELTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNVSWYQQHPGKAPKLMYDVS
 KRPSGVPDFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCCSYAGSYTLVFGGGTKLTVLGQP
 KANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQS
 NNKYAASSYSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

20 Аминокислотная последовательность F20-VH-GL2 тяжелой цепи
 SEQ ID NO: 48:

EVQLVESGGGLVQPGRLRLSCAASGFTDDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISSN
SGSGVGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDKIYYGSGSYDFYY
 25 YYGMDVWGQGTTVTVSS

Аминокислотная последовательность F20-VH-CDR2-V2 тяжелой цепи
 SEQ ID NO: 49: **GISSHSGSGVGYADSVKG**

Аминокислотная последовательность F20-VH-CDR2-V3 тяжелой цепи
 SEQ ID NO: 50: **GISSKSGSGVGYADSVKG**

Аминокислотная последовательность F20-VH-CDR2-V11 тяжелой цепи
 SEQ ID NO: 51: **GISSNSGSGVGYADTVKG**

Аминокислотная последовательность F20-VH-CDR3-V13 тяжелой цепи
 SEQ ID NO: 52: **DKIYYGSGSYDFYYYYGLDV**

35 Аминокислотная последовательность F20-VH-GL1-V2 тяжелой цепи
 SEQ ID NO: 53:

EVQLVESGGGLVQPGRLRLSCAASGFTNDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISS
HSGSGVGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDKIYYGSGSYDFY
 40 YYYGMDVWGQGTTVTVSS

Аминокислотная последовательность F20-VH-GL1-V3 тяжелой цепи
 SEQ ID NO: 54:

EVQLVESGGGLVQPGRLRLSCAASGFTNDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISS
KSGSGVGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDKIYYGSGSYDFY
YYYGMDVWGQGTTVTVSS

Аминокислотная последовательность F20-VH-GL1-V11 тяжелой цепи
 SEQ ID NO: 55:

EVQLVESGGGLVQPGRLRLSCAASGFTFNDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISSN
SGSGYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDKIYYGSGSYDFYY
YYGMDVWGQGTTVTVSS

5 Аминокислотная последовательность F20-VH-GL1-V13 тяжелой цепи
SEQ ID NO: 56:

EVQLVESGGGLVQPGRLRLSCAASGFTFNDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISSN
SGSGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDKIYYGSGSYDFYY
YYGLDVWGQGTTVTVSS

10 Аминокислотная последовательность B03-VL-GL2 легкой цепи
SEQ ID NO: 57:

SSELTQDPAVSGVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRP
SGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCQSSRDNIGNHRVVLFGGGTKLTVL

15 Аминокислотная последовательность B08-VL-GL1 легкой цепи
SEQ ID NO: 58:

QSALTQPRSVSGSPGQSITISCTGTSNDVGAYNRVSWYQQHPGKAPKLLIYGVSN
RPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADFYCTSYSSSTTSYVVFGGGTKVTVL

20 Аминокислотная последовательность B08-VL-GL2 легкой цепи
SEQ ID NO: 59:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSNDVGAYNRVSWYQQHPGKAPKLLIYGVSN
RPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADFYCTSYSSSTTSYVVFGGGTKVTVL

25 Аминокислотная последовательность B08-VL-GL3 легкой цепи
SEQ ID NO: 60:

QSALTQPRSVSGSPGQSITISCTGTSNDVGAYNRVSWYQQHPGKAPKLLIYGVSN
RPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCTSYSSSTTSYVVFGGGTKVTVL

30 Аминокислотная последовательность B08-VL-GL4 легкой цепи
SEQ ID NO: 61:

QSALTQPRSVSGSPGQSITISCTGTSNDVGAYNRVSWYQQHPGKAPKLMYGVSN
NRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADFYCTSYSSSTTSYVVFGGGTKVTVL

35 Аминокислотная последовательность B08-VL-GL5 легкой цепи
SEQ ID NO: 62:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSNDVGAYNRVSWYQQHPGKAPKLLIYGVSN
RPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCTSYSSSTTSYVVFGGGTKVTVL

40 Аминокислотная последовательность B08-VL-GL7 легкой цепи
SEQ ID NO: 63:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSNDVGAYNRVSWYQQHPGKAPKLMYGVSN
NRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCTSYSSSTTSYVVFGGGTKVTVL

45 Аминокислотная последовательность тяжелой цепи сравнительного антитела 3
(известного как 539A-M0237-D02)

SEQ ID NO: 64:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYPMWWVRQAPGKGLEWVSYIVP
 SGGRTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRAYGDYVGWNG
 FDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFLPAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
 5 LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTK
 10 KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVL
 DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPGK

Аминокислотная последовательность легкой цепи сравнительного антитела 3
 (известного как 539A-M0237-D02)

SEQ ID NO: 65:

15 DIQMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSFLAWYQQKPGQAPRLLIYDASYRAT
 GIPARFSGSGSGTDFLTISLEPEDFAVYYCQQQRGNWPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIF
 PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS
 TLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20 Аминокислотная последовательность генноинженерной константной области легкой
 цепи IgG4 человека

SEQ ID NO: 66:

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET
 25 TTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Аминокислотная последовательность B03-VLc легкой цепи

SEQ ID NO: 67:

30 SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDLSRSYYASWYQQKPGQAPVVVIYGKNNRP
SGIPDRFSGSSSGNTVSLTITGAQAEDEADYYCQSSRDNIGNHRVVLFGGGTKVTVL

Аминокислотная последовательность B03-VL-GL1c легкой цепи

SEQ ID NO: 68:

35 SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDLSRSYYASWYQQKPGQAPVVVIYGKNNRP
SGIPDRFSGSSSGNTVSLTITGAQAEDEADYYCQSRDNIGNHRVVLFGGGTKLTVL

Аминокислотная последовательность B08-VLc легкой цепи

SEQ ID NO: 69:

40 QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSNDVGAYNRVSWYQQHPGKAPKLLIYGVS
NRPSGVSTRFSGSKSGNTASLTISGLAADEADFYCTSYSSSTTSYVVFGGGTKVTVL

Аминокислотная последовательность B08-VL-GL6c легкой цепи

SEQ ID NO: 70:

45 QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSNDVGAYNRVSWYQQHPGKAPKLMIYGVS
NRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADFYCTSYSSSTTSYVVFGGGTKVTVL

Аминокислотная последовательность, объединяющая вариабельную область тяжелой
 цепи F20-VH-GL1-V1-V9 (SEQ ID NO: 17) и константную область тяжелой цепи IgG4
 (SEQ ID NO: 40)

SEQ ID NO: 71:

EVQLVESGGGLVQPGRLRLSCAASGFTFNDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISSQSGSV
GYAESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDKIYYGSGSYDFYYYYG
MDVWGQGTTVSSASTKGPSVPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
5 LTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPP
CPPCPAPEFLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDG
10 SFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSG

Аминокислотная последовательность, объединяющая вариабельную область тяжелой цепи F20-VH-GL1-V1-V9-V14 (SEQ ID NO: 18) и константную область тяжелой цепи IgG4 (SEQ ID NO: 40)

SEQ ID NO: 72:

EVQLVESGGGLVQPGRLRLSCAASGFTFNDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISSQSGSV
GYAESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDKIYYGSGSYDFYYYYG
MDVWGQGTTVSSASTKGPSVPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
20 LTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPP
CPPCPAPEFLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDG
25 SFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSG

Аминокислотная последовательность, объединяющая вариабельную область тяжелой цепи F20-VH-GL1-V4-V9 (SEQ ID NO: 19) и константную область тяжелой цепи IgG4 (SEQ ID NO: 40)

SEQ ID NO: 73:

EVQLVESGGGLVQPGRLRLSCAASGFTFNDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISSRSGSV
GYAESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDKIYYGSGSYDFYYYYG
MDVWGQGTTVSSASTKGPSVPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
35 LTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPP
CPPCPAPEFLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDG
40 SFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSG

Аминокислотная последовательность, объединяющая вариабельную область тяжелой цепи F20-VH-GL1-V4-V9-V14 (SEQ ID NO: 20) и константную область тяжелой цепи IgG4 (SEQ ID NO: 40)

SEQ ID NO: 74:

EVQLVESGGGLVQPGRLRLSCAASGFTFNDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISSL
SGSVGYAESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDKIYYGSGSYDFY
YYGIDVWGQGTTVVSASTKGPSVFPACSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
5 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVVDHKPSNTKVDKRVESK
YGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK
GQPREPVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD
10 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSG

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> CALYPSO BIOTECH SA

MERCK PATENT GMBH

<120> ANTIBODIES SPECIFIC FOR MMP9

<130> P1750PC00

<150> EP14180765

<151> 2014-08-13

<160> 70

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 707

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

25 Met Ser Leu Trp Gln Pro Leu Val Leu Val Leu Leu Val Leu Gly Cys

1 5 10 15

Cys Phe Ala Ala Pro Arg Gln Arg Gln Ser Thr Leu Val Leu Phe Pro

20 25 30

30 Gly Asp Leu Arg Thr Asn Leu Thr Asp Arg Gln Leu Ala Glu Glu Tyr

35 40 45

Leu Tyr Arg Tyr Gly Tyr Thr Arg Val Ala Glu Met Arg Gly Glu Ser

50 55 60

Lys Ser Leu Gly Pro Ala Leu Leu Leu Gln Lys Gln Leu Ser Leu

65 70 75 80

35 Pro Glu Thr Gly Glu Leu Asp Ser Ala Thr Leu Lys Ala Met Arg Thr

85 90 95

Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp Leu Gly Arg Phe Gln Thr Phe Glu Gly

100 105 110

40 Asp Leu Lys Trp His His Asn Ile Thr Tyr Trp Ile Gln Asn Tyr

115 120 125

Ser Glu Asp Leu Pro Arg Ala Val Ile Asp Asp Ala Phe Ala Arg Ala

130 135 140

Phe Ala Leu Trp Ser Ala Val Thr Pro Leu Thr Phe Thr Arg Val Tyr

145 150 155 160

45 Ser Arg Asp Ala Asp Ile Val Ile Gln Phe Gly Val Ala Glu His Gly

165 170 175

Asp Gly Tyr Pro Phe Asp Gly Lys Asp Gly Leu Leu Ala His Ala Phe

180 185 190

RU 2714043 C2

	Pro	Pro	Gly	Pro	Gly	Ile	Gln	Gly	Asp	Ala	His	Phe	Asp	Asp	Asp	Glu
	195						200					205				
	Leu	Trp	Ser	Leu	Gly	Lys	Gly	Val	Val	Val	Pro	Thr	Arg	Phe	Gly	Asn
5	210						215					220				
	Ala	Asp	Gly	Ala	Ala	Cys	His	Phe	Pro	Phe	Ile	Phe	Glu	Gly	Arg	Ser
	225						230					235				240
	Tyr	Ser	Ala	Cys	Thr	Thr	Asp	Gly	Arg	Ser	Asp	Gly	Leu	Pro	Trp	Cys
10	245						250					255				
	Ser	Thr	Thr	Ala	Asn	Tyr	Asp	Thr	Asp	Asp	Arg	Phe	Gly	Phe	Cys	Pro
15	260						265					270				
	Ser	Glu	Arg	Leu	Tyr	Thr	Gln	Asp	Gly	Asn	Ala	Asp	Gly	Lys	Pro	Cys
	275						280					285				
	Gln	Phe	Pro	Phe	Ile	Phe	Gln	Gly	Gln	Ser	Tyr	Ser	Ala	Cys	Thr	Thr
20	290						295					300				
25	Asp	Gly	Arg	Ser	Asp	Gly	Tyr	Arg	Trp	Cys	Ala	Thr	Thr	Ala	Asn	Tyr
	305						310					315				320
	Asp	Arg	Asp	Lys	Leu	Phe	Gly	Phe	Cys	Pro	Thr	Arg	Ala	Asp	Ser	Thr
	325						330					335				
	Val	Met	Gly	Gly	Asn	Ser	Ala	Gly	Glu	Leu	Cys	Val	Phe	Pro	Phe	Thr
30	340						345					350				
	Phe	Leu	Gly	Lys	Glu	Tyr	Ser	Thr	Cys	Thr	Ser	Glu	Gly	Arg	Gly	Asp
	355						360					365				
	Gly	Arg	Leu	Trp	Cys	Ala	Thr	Thr	Ser	Asn	Phe	Asp	Ser	Asp	Lys	Lys
35	370						375					380				
	Trp	Gly	Phe	Cys	Pro	Asp	Gln	Gly	Tyr	Ser	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Ala
	385						390					395				400
	His	Glu	Phe	Gly	His	Ala	Leu	Gly	Leu	Asp	His	Ser	Ser	Val	Pro	Glu
	405						410					415				
	Ala	Leu	Met	Tyr	Pro	Met	Tyr	Arg	Phe	Thr	Glu	Gly	Pro	Pro	Leu	His
40	420						425					430				
	Lys	Asp	Asp	Val	Asn	Gly	Ile	Arg	His	Leu	Tyr	Gly	Pro	Arg	Pro	Glu
	435						440					445				
	Pro	Glu	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Thr	Thr	Pro	Gln	Pro	Thr	Ala	Pro	
45	450						455					460				
	Pro	Thr	Val	Cys	Pro	Thr	Gly	Pro	Pro	Thr	Val	His	Pro	Ser	Glu	Arg
	465						470					475				480
	Pro	Thr	Ala	Gly	Pro	Thr	Gly	Pro	Pro	Ser	Ala	Gly	Pro	Thr	Gly	Pro
	485						490					495				
	Pro	Thr	Ala	Gly	Pro	Ser	Thr	Ala	Thr	Thr	Val	Pro	Leu	Ser	Pro	Val
50	500						505					510				
	Asp	Asp	Ala	Cys	Asn	Val	Asn	Ile	Phe	Asp	Ala	Ile	Ala	Glu	Ile	Gly
	515						520					525				
	Asn	Gln	Leu	Tyr	Leu	Phe	Lys	Asp	Gly	Lys	Tyr	Trp	Arg	Phe	Ser	Glu
	530						535					540				
	Gly	Arg	Gly	Ser	Arg	Pro	Gln	Gly	Pro	Phe	Leu	Ile	Ala	Asp	Lys	Trp
55	545						550					555				560
	Pro	Ala	Leu	Pro	Arg	Lys	Leu	Asp	Ser	Val	Phe	Glu	Glu	Arg	Leu	Ser
	565						570					575				

RU 2714043 C2

Lys Lys Leu Phe Phe Ser Gly Arg Gln Val Trp Val Tyr Thr Gly
 580 585 590
 Ala Ser Val Leu Gly Pro Arg Arg Leu Asp Lys Leu Gly Leu Gly Ala
 595 600 605
 5 Asp Val Ala Gln Val Thr Gly Ala Leu Arg Ser Gly Arg Gly Lys Met
 610 615 620
 Leu Leu Phe Ser Gly Arg Arg Leu Trp Arg Phe Asp Val Lys Ala Gln
 625 630 635 640
 Met Val Asp Pro Arg Ser Ala Ser Glu Val Asp Arg Met Phe Pro Gly
 10 645 650 655
 Val Pro Leu Asp Thr His Asp Val Phe Gln Tyr Arg Glu Lys Ala Tyr
 660 665 670
 Phe Cys Gln Asp Arg Phe Tyr Trp Arg Val Ser Ser Arg Ser Glu Leu
 675 680 685
 15 Asn Gln Val Asp Gln Val Gly Tyr Val Thr Tyr Asp Ile Leu Gln Cys
 690 695 700
 Pro Glu Asp
 705
 <210> 2
 20 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> heavy chain F20-VH-CDR1
 25 <400> 2
 Asp Tyr Pro Met His
 1 5
 <210> 3
 <211> 17
 30 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> heavy chain F20-VH-CDR2
 <400> 3
 35 Gly Ile Ser Ser Asn Ser Gly Ser Val Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 4
 <211> 20
 40 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> heavy chain F20-VH-CDR3
 <400> 4
 45 Asp Lys Ile Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Asp Phe Tyr Tyr Tyr
 1 5 10 15
 Gly Met Asp Val

<210> 5
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 5 <220>
 <223> heavy chain F20-VH-CDR2-V1
 <400> 5
 Gly Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ser Val Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 10 Gly
 <210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 15 <220>
 <223> heavy chain F20-VH-CDR2-V4
 <400> 6
 Gly Ile Ser Ser Arg Ser Gly Ser Val Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 20 Gly
 <210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 25 <220>
 <223> heavy chain F20-VH-CDR2-V9
 <400> 7
 Gly Ile Ser Ser Asn Ser Gly Ser Val Gly Tyr Ala Glu Ser Val Lys
 1 5 10 15
 30 Gly
 <210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 35 <220>
 <223> heavy chain F20-VH-CDR2-V1-V9
 <400> 8
 Gly Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ser Val Gly Tyr Ala Glu Ser Val Lys
 1 5 10 15
 40 Gly
 <210> 9
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 45 <220>
 <223> heavy chain F20-VH-CDR2-V4-V9
 <400> 9
 Gly Ile Ser Ser Arg Ser Gly Ser Val Gly Tyr Ala Glu Ser Val Lys

1	5	10	15
Gly			
<210>	10		
<211>	20		
5	<212> PRT		
	<213> Artificial Sequence		
	<220>		
	<223> heavy chain F20-VH-CDR3-V14		
	<400> 10		
10	Asp Lys Ile Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Asp Phe Tyr Tyr Tyr Tyr		
	1 5 10 15		
	Gly Ile Asp Val		
	20		
	<210> 11		
15	<211> 129		
	<212> PRT		
	<213> Artificial Sequence		
	<220>		
	<223> heavy chain F20-VH		
20	<400> 11		
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg		
	1 5 10 15		
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr		
	20 25 30		
25	Pro Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
	35 40 45		
	Ser Gly Ile Ser Ser Asn Ser Gly Ser Val Gly Tyr Ala Asp Ser Val		
	50 55 60		
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr		
30	65 70 75 80		
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85 90 95		
	Ala Arg Asp Lys Ile Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Asp Phe Tyr Tyr		
	100 105 110		
35	Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser		
	115 120 125		
	Ser		
	<210> 12		
	<211> 129		
40	<212> PRT		
	<213> Artificial Sequence		
	<220>		
	<223> F20-VH-GL1		
	<400> 12		
45	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg		
	1 5 10 15		
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr		
	20 25 30		

Pro Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Ser Asn Ser Gly Ser Val Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 5 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Lys Ile Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Asp Phe Tyr Tyr
 10 100 105 110
 Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser
 <210> 13
 15 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> heavy chain F20-VH-GL1-V1
 20 <400> 13
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
 20 25 30
 25 Pro Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ser Val Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 30 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Lys Ile Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Asp Phe Tyr Tyr
 100 105 110
 35 Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser
 <210> 14
 <211> 129
 40 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> heavy chain F20-VH-GL1-V4
 <400> 14
 45 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
 20 25 30

Pro Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Ser Arg Ser Gly Ser Val Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 5 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Lys Ile Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Asp Phe Tyr Tyr
 10 100 105 110
 Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser
 <210> 15
 15 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> heavy chain F20-VH-GL1-V9
 20 <400> 15
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
 20 25 30
 25 Pro Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Ser Asn Ser Gly Ser Val Gly Tyr Ala Glu Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 30 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Lys Ile Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Asp Phe Tyr Tyr
 100 105 110
 35 Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser
 <210> 16
 <211> 129
 40 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> heavy chain F20-VH-GL1-V14
 <400> 16
 45 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
 20 25 30

Pro Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Ser Asn Ser Gly Ser Val Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 5 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Lys Ile Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Asp Phe Tyr Tyr
 10 100 105 110
 Tyr Tyr Gly Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser
 <210> 17
 15 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> heavy chain F20-VH-GL1-V1-V9
 20 <400> 17
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
 20 25 30
 25 Pro Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ser Val Gly Tyr Ala Glu Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 30 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Lys Ile Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Asp Phe Tyr Tyr
 100 105 110
 35 Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser
 <210> 18
 <211> 129
 40 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> heavy chain F20-VH-GL1-V1-V9-V14
 <400> 18
 45 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
 20 25 30

Pro Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ser Val Gly Tyr Ala Glu Ser Val
 50 55 60
 5 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Lys Ile Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Asp Phe Tyr Tyr
 10 100 105 110
 Tyr Tyr Gly Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser
 <210> 19
 15 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> heavy chain F20-VH-GL1-V4-V9
 20 <400> 19
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
 20 25 30
 25 Pro Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Ser Arg Ser Gly Ser Val Gly Tyr Ala Glu Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 30 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Lys Ile Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Asp Phe Tyr Tyr
 100 105 110
 35 Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser
 <210> 20
 <211> 129
 40 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> heavy chain F20-VH-GL1-V4-V9-V14
 <400> 20
 45 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
 20 25 30

Pro Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Ser Arg Ser Gly Ser Val Gly Tyr Ala Glu Ser Val
 50 55 60
 5 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Lys Ile Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Asp Phe Tyr Tyr
 10 100 105 110
 Tyr Tyr Gly Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser
 <210> 21
 15 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> light chain B03-VL-CDR1
 20 <400> 21
 Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser
 1 5 10
 <210> 22
 <211> 7
 25 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> light chain B03-VL-CDR2
 <400> 22
 30 Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 23
 <211> 13
 <212> PRT
 35 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> light chain B03-VL-CDR3
 <400> 23
 Gln Ser Arg Asp Asn Ile Gly Asn His Arg Val Val Leu
 40 1 5 10
 <210> 24
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 45 <220>
 <223> light chain B03-VL
 <400> 24
 Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln

1 5 10 15
 Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Val Val Ile Tyr
 5 35 40 45
 Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Ser Ser Gly Asn Thr Val Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 10 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Arg Asp Asn Ile Gly Asn His
 85 90 95
 Arg Val Val Leu Phe Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 100 105 110
 <210> 25
 15 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> light chain B03-VL-GL1
 20 <400> 25
 Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
 20 25 30
 25 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Val Val Ile Tyr
 35 40 45
 Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Ser Ser Gly Asn Thr Val Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
 30 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Arg Asp Asn Ile Gly Asn His
 85 90 95
 Arg Val Val Leu Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110
 35 <210> 26
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 40 <223> light chain B08-VL-CDR1
 <400> 26
 Thr Gly Thr Ser Asn Asp Val Gly Ala Tyr Asn Arg Val Ser
 1 5 10
 <210> 27
 45 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> light chain B08-VL-CDR2
 <400> 27
 Gly Val Ser Asn Arg Pro Ser
 1 5
 5 <210> 28
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 10 <223> light chain B08-VL-CDR3
 <400> 28
 Thr Ser Tyr Ser Ser Ser Thr Thr Ser Tyr Val Val
 1 5 10
 <210> 29
 15 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> light chain B08-VL
 20 <400> 29
 Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Arg Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Asn Asp Val Gly Ala Tyr
 20 25 30
 25 Asn Arg Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Thr Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 30 65 70 75 80
 Leu Ala Ala Asp Glu Ala Asp Phe Tyr Cys Thr Ser Tyr Ser Ser Ser
 85 90 95
 Thr Thr Ser Tyr Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110
 35 Gly
 <210> 30
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 40 <220>
 <223> light chain B08-VL-GL6
 <400> 30
 Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 45 Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Asn Asp Val Gly Ala Tyr
 20 25 30
 Asn Arg Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 5 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Phe Tyr Cys Thr Ser Tyr Ser Ser Ser
 85 90 95
 Thr Thr Ser Tyr Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110
 Gly
 10 <210> 31
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 15 <223> heavy chain F20-VH-CDR1
 <400> 31
 gactacccca tgcac 15
 <210> 32
 <211> 51
 20 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> heavy chain F20-VH-CDR2
 <400> 32
 25 ggcatctcct ccaactccgg ctccgtggc tacgcccact ccgtgaaggg c 51
 <210> 33
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 30 <220>
 <223> heavy chain F20-VH-CDR3
 <400> 33
 gacaagatct actacggctc cggctcctac gacttctact actactacgg catggacgtg 60
 <210> 34
 35 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> light chain B03-VL-CDR1
 40 <400> 34
 caaggcgatt ctctgcgctc atattatgct tct 33
 <210> 35
 <211> 21
 <212> DNA
 45 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> light chain B03-VL-CDR2
 <400> 35

ggaaaaaaaca accgaccatc t	21
<210> 36	
<211> 39	
<212> DNA	
5 <213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> light chain B03-VL-CDR3	
<400> 36	
caatctcgag acaatatagg gaaccataga gttgttctg	39
10 <210> 37	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
15 <223> light chain B08-VL-CDR1	
<400> 37	
acaggaacgt ctaatgatgt gggggcttac aatcgctca gt	42
<210> 38	
<211> 21	
20 <212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> light chain B08-VL-CDR2	
<400> 38	
25 ggcgtgtcta acaggcctag c	21
<210> 39	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
30 <220>	
<223> light chain B08-VL-CDR3	
<400> 39	
acaagctaca gtagcagtac cacatcatat gtcgtc	36
<210> 40	
35 <211> 326	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Engineered human IgG4 heavy chain constant region	
40 <400> 40	
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg	
1 5 10 15	
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr	
20 25 30	
45 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser	
35 40 45	
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser	
50 55 60	

RU 2714043 C2

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

5 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 10 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

15 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 20 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255

25 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 30 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 325

35 <210> 41
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>

40 <223> region 1 comprised in MMP9 epitope
 <400> 41
 Ala Val Thr Pro Leu Thr Phe Thr Arg Val Tyr Ser Arg Asp Ala Asp
 1 5 10 15

Ile Val Ile Gln Phe
 45 20

<210> 42
 <211> 26
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> region 2 comprised in MMP9 epitope
 <400> 42

5 Ile Gln Gly Asp Ala His Phe Asp Asp Asp Glu Leu Trp Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Lys Gly Val Val Val Pro Thr Arg Phe Gly
 20 25

<210> 43

10 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> region 3 comprised in MMP9 epitope

15 <400> 43
 Met Tyr Pro Met Tyr Arg Phe Thr Glu Gly Pro Pro Leu His Lys Asp
 1 5 10 15
 Asp Val Asn Gly Ile Arg
 20

20 <210> 44
 <211> 441
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>

25 <223> heavy chain of comparative antibody 1
 <400> 44
 Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Leu Ser Tyr
 30 20 25 30
 Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Thr Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met
 50 55 60

35 Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asp Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr

40 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

45 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

RU 2714043 C2

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190
 Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 5 Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys
 210 215 220
 Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 225 230 235 240
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 10 245 250 255
 Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
 260 265 270
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 275 280 285
 15 Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 290 295 300
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 305 310 315 320
 Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 20 325 330 335
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
 340 345 350
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 355 360 365
 25 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 370 375 380
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 385 390 395 400
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
 30 405 410 415
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 420 425 430
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440
 35 <210> 45
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 40 <223> light chain of comparative antibody 1
 <400> 45
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Arg Asn Thr
 45 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ser Ser Tyr Arg Asn Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

RU 2714043 C2

	50	55	60
5	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala		
	65	70	75
	Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Tyr		80
	85	90	95
5	Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala		
	100	105	110
	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
	115	120	125
10	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
	130	135	140
	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
	145	150	155
	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
15	165	170	175
	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
	180	185	190
	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
	195	200	205
20	Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
	210		
	<210> 46		
	<211> 454		
	<212> PRT		
25	<213> Artificial Sequence		
	<220>		
	<223> heavy chain of comparative antibody 2		
	<400> 46		
	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
30	1	5	10
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr		
	20	25	30
	Gln Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
	35	40	45
35	Ser Val Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Pro Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val		
	50	55	60
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
	65	70	75
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
40	85	90	95
	Ala Arg Gly Glu Asp Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Pro Gly Ala Phe Asp		
	100	105	110
	Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys		
	115	120	125
45	Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly		
	130	135	140
	Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro		
	145	150	155
			160

RU 2714043 C2

	20	25	30	
	Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu			
	35	40	45	
	Met Ile Tyr Asp Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe			
5	50	55	60	
	Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu			
	65	70	75	80
	Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Cys Ser Tyr Ala Gly Ser			
	85	90	95	
10	Tyr Thr Leu Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln			
	100	105	110	
	Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu			
	115	120	125	
	Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr			
15	130	135	140	
	Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys			
	145	150	155	160
	Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr			
	165	170	175	
20	Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His			
	180	185	190	
	Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys			
	195	200	205	
	Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser			
25	210	215		
	<210> 48			
	<211> 129			
	<212> PRT			
	<213> Artificial Sequence			
30	<220>			
	<223> heavy chain F20-VH-GL2			
	<400> 48			
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg			
	1	5	10	15
35	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr			
	20	25	30	
	Pro Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45	
	Ser Gly Ile Ser Ser Asn Ser Gly Ser Val Gly Tyr Ala Asp Ser Val			
40	50	55	60	
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr			
	65	70	75	80
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys			
	85	90	95	
45	Ala Arg Asp Lys Ile Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Asp Phe Tyr Tyr			
	100	105	110	
	Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser			
	115	120	125	

Ser
 <210> 49
 <211> 17
 <212> PRT
 5 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> heavy chain F20-VH-CDR2-V2
 <400> 49
 Gly Ile Ser Ser His Ser Gly Ser Val Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 10 1 5 10 15
 Gly
 <210> 50
 <211> 17
 <212> PRT
 15 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> heavy chain F20-VH-CDR2-V3
 <400> 50
 Gly Ile Ser Ser Lys Ser Gly Ser Val Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 20 1 5 10 15
 Gly
 <210> 51
 <211> 17
 <212> PRT
 25 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> heavy chain F20-VH-CDR2-V11
 <400> 51
 Gly Ile Ser Ser Asn Ser Gly Ser Val Gly Tyr Ala Asp Thr Val Lys
 30 1 5 10 15
 Gly
 <210> 52
 <211> 20
 <212> PRT
 35 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> heavy chain F20-VH-CDR3-V13
 <400> 52
 Asp Lys Ile Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Asp Phe Tyr Tyr Tyr
 40 1 5 10 15
 Gly Leu Asp Val
 20
 <210> 53
 <211> 129
 45 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> heavy chain F20-VH-GL1-V2

<400> 53
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
 5 20 25 30
 Pro Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Ser His Ser Gly Ser Val Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 10 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Lys Ile Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Asp Phe Tyr Tyr
 15 100 105 110
 Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser
 <210> 54
 20 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> heavy chain F20-VH-GL1-V3
 25 <400> 54
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
 20 25 30
 30 Pro Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Ser Lys Ser Gly Ser Val Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 35 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Lys Ile Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Asp Phe Tyr Tyr
 100 105 110
 40 Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser
 <210> 55
 <211> 129
 45 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> heavy chain F20-VH-GL1-V11

<400> 55
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
 5 20 25 30
 Pro Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Ser Asn Ser Gly Ser Val Gly Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60
 10 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Lys Ile Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Asp Phe Tyr Tyr
 15 100 105 110
 Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser
 <210> 56
 20 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> heavy chain F20-VH-GL1-V13
 25 <400> 56
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
 20 25 30
 30 Pro Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Ser Asn Ser Gly Ser Val Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 35 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Lys Ile Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Asp Phe Tyr Tyr
 100 105 110
 40 Tyr Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser
 <210> 57
 <211> 110
 45 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> light chain B03-VL-GL2

<400> 57
 Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
 5 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 10 Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Arg Asp Asn Ile Gly Asn His
 85 90 95
 Arg Val Val Leu Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 15 100 105 110
 <210> 58
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 20 <220>
 <223> light chain B08-VL-GL1
 <400> 58
 Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Arg Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 25 Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Asn Asp Val Gly Ala Tyr
 20 25 30
 Asn Arg Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60
 30 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Phe Tyr Cys Thr Ser Tyr Ser Ser Ser
 85 90 95
 35 Thr Thr Ser Tyr Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110
 <210> 59
 <211> 112
 <212> PRT
 40 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> light chain B08-VL-GL2
 <400> 59
 Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 45 1 5 10 15
 Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Asn Asp Val Gly Ala Tyr
 20 25 30
 Asn Arg Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

	35	40	45
	Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe		
	50	55	60
	Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu		
5	65	70	75
	Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Phe Tyr Cys Thr Ser Tyr Ser Ser Ser		
	85	90	95
	Thr Thr Ser Tyr Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu		
	100	105	110
10	<210> 60		
	<211> 112		
	<212> PRT		
	<213> Artificial Sequence		
	<220>		
15	<223> light chain B08-VL-GL3		
	<400> 60		
	Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Arg Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln		
	1	5	10
	Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Asn Asp Val Gly Ala Tyr		
20	20	25	30
	Asn Arg Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu		
	35	40	45
	Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe		
	50	55	60
25	Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu		
	65	70	75
	Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Thr Ser Tyr Ser Ser Ser		
	85	90	95
	Thr Thr Ser Tyr Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu		
30	100	105	110
	<210> 61		
	<211> 112		
	<212> PRT		
	<213> Artificial Sequence		
35	<220>		
	<223> light chain B08-VL-GL4		
	<400> 61		
	Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Arg Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln		
	1	5	10
40	Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Asn Asp Val Gly Ala Tyr		
	20	25	30
	Asn Arg Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu		
	35	40	45
	Met Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe		
45	50	55	60
	Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu		
	65	70	75
	Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Phe Tyr Cys Thr Ser Tyr Ser Ser Ser		

	85	90	95
	Thr Thr Ser Tyr Val Val Phe Gly Gly	Gly Thr Lys Val Thr Val Leu	
	100	105	110
5	<210> 62		
	<211> 112		
	<212> PRT		
	<213> Artificial Sequence		
	<220>		
	<223> light chain B08-VL-GL5		
10	<400> 62		
	Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln		
	1	5	10
			15
	Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Asn Asp Val Gly Ala Tyr		
	20	25	30
15	Asn Arg Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu		
	35	40	45
	Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe		
	50	55	60
	Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu		
20	65	70	75
	Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Thr Ser Tyr Ser Ser Ser		
	85	90	95
	Thr Thr Ser Tyr Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu		
	100	105	110
25	<210> 63		
	<211> 112		
	<212> PRT		
	<213> Artificial Sequence		
	<220>		
30	<223> light chain B08-VL-GL7		
	<400> 63		
	Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln		
	1	5	10
			15
	Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Asn Asp Val Gly Ala Tyr		
35	20	25	30
	Asn Arg Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu		
	35	40	45
	Met Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe		
	50	55	60
40	Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu		
	65	70	75
	Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Thr Ser Tyr Ser Ser Ser		
	85	90	95
	Thr Thr Ser Tyr Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu		
45	100	105	110
	<210> 64		
	<211> 454		
	<212> PRT		

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> heavy chain of comparative antibody 3
 <400> 64

5 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gln Tyr
 20 25 30
 Pro Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 10 35 40 45
 Ser Tyr Ile Val Pro Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 15 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Arg Ala Tyr Gly Asp Tyr Val Gly Trp Asn Gly Phe Asp
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 20 115 120 125
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 130 135 140
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160
 25 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190
 Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 30 195 200 205
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
 210 215 220
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240
 35 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 40 275 280 285
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320
 45 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 325 330 335
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350

RU 2714043 C2

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 355 360 365
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380
 5 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385 390 395 400
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 405 410 415
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 10 420 425 430
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450
 15 <210> 65
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 20 <223> light chain of comparative antibody 3
 <400> 65
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Phe
 25 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Tyr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 30 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Gly Asn Trp Pro Ile
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 35 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 40 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 45 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210
 <210> 66
 <211> 106
 <212> PRT
 5 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> engineered human IgG4 light chain constant region
 <400> 66
 Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
 10 1 5 10 15
 Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
 20 25 30
 Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
 35 40 45
 15 Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
 50 55 60
 Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
 65 70 75 80
 Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
 20 85 90 95
 Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105
 <210> 67
 <211> 110
 25 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> light chain B03-VLC
 <400> 67
 30 Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Val Val Ile Tyr
 35 35 40 45
 Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Ser Ser Gly Asn Thr Val Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 40 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Arg Asp Asn Ile Gly Asn His
 85 90 95
 Arg Val Val Leu Phe Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110
 <210> 68
 45 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> light chain B03-VL-GL1c
 <400> 68
 Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 5 Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Val Val Ile Tyr
 35 40 45
 Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 10 50 55 60
 Ser Ser Gly Asn Thr Val Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Arg Asp Asn Ile Gly Asn His
 85 90 95
 15 Arg Val Val Leu Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110
 <210> 69
 <211> 112
 <212> PRT
 20 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> light chain B08-VLc
 <400> 69
 Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Arg Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 25 1 5 10 15
 Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Asn Asp Val Gly Ala Tyr
 20 25 30
 Asn Arg Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 35 40 45
 30 Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Thr Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 65 70 75 80
 Leu Ala Ala Asp Glu Ala Asp Phe Tyr Cys Thr Ser Tyr Ser Ser Ser
 35 85 90 95
 Thr Thr Ser Tyr Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110
 <210> 70
 <211> 112
 40 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> light chain B08-VL-GL6c
 <400> 70
 45 Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Asn Asp Val Gly Ala Tyr
 20 25 30

RU 2714043 C2

Asn Arg Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Met Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60
 5 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Phe Tyr Cys Thr Ser Tyr Ser Ser Ser
 85 90 95
 Thr Thr Ser Tyr Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 10 100 105 110
 <210> 71
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 15 <220>
 <223> Amino acid sequence combining heavy chain variable region
 F20-VH-GL1-V1-V9 (SEQ ID NO: 17) and an IgG4 heavy chain constant
 region (SEQ ID NO: 40)
 <400> 71
 20 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
 20 25 30
 Pro Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 25 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ser Val Gly Tyr Ala Glu Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 30 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Lys Ile Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Asp Phe Tyr Tyr
 100 105 110
 Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 35 115 120 125
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
 130 135 140
 Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 145 150 155 160
 40 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 165 170 175
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
 45 195 200 205
 Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 210 215 220
 Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala

RU 2714043 C2

225	230	235	240													
Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	
245									250						255	
5	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val
260									265						270	
10	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val
275									280						285	
15	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln
									290						295	
305	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln
325	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly
									325						330	
340	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro
355	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr
370	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser
385	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr
405	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr
420	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe
435	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys
450	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly									
30	<210>	72														
	<211>	455														
	<212>	PRT														
	<213>	Artificial Sequence														
	<220>															
35	<223>	Amino acid sequence combining heavy chain variable region F20-VH-GL1-V1-V9-V14 (SEQ ID NO: 18) and an IgG4 heavy chain constant region (SEQ ID NO: 40)														
	<400>	72														
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
40	1		5							10					15	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asn	Asp	Tyr
	20								25						30	
	Pro	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
	35								40						45	
45	Ser	Gly	Ile	Ser	Ser	Gln	Ser	Gly	Ser	Val	Gly	Tyr	Ala	Glu	Ser	Val
	50								55						60	
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr
65									70						75	
															80	

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Asp Lys Ile Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Asp Phe Tyr Tyr			
100	105	110	
5 Tyr Tyr Gly Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser			
115	120	125	
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser			
130	135	140	
Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp			
10 145	150	155	160
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr			
165	170	175	
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr			
180	185	190	
15 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys			
195	200	205	
Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp			
210	215	220	
Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala			
20 225	230	235	240
Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro			
245	250	255	
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val			
260	265	270	
25 Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val			
275	280	285	
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln			
290	295	300	
Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln			
30 305	310	315	320
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly			
325	330	335	
Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro			
340	345	350	
35 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr			
355	360	365	
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser			
370	375	380	
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr			
40 385	390	395	400
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr			
405	410	415	
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe			
420	425	430	
45 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys			
435	440	445	
Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly			
450	455		

<210> 73
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 5 <220>
 <223> Amino acid sequence combining heavy chain variable region
 F20-VH-GL1-V4-V9 (SEQ ID NO: 19) and an IgG4 heavy chain constant
 region (SEQ ID NO: 40)
 <400> 73
 10 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
 20 25 30
 Pro Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 15 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Ser Arg Ser Gly Ser Val Gly Tyr Ala Glu Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 20 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Lys Ile Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Asp Phe Tyr Tyr
 100 105 110
 Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 25 115 120 125
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
 130 135 140
 Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 145 150 155 160
 30 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 165 170 175
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
 35 195 200 205
 Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 210 215 220
 Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 225 230 235 240
 40 Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 245 250 255
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 260 265 270
 Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 45 275 280 285
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300
 Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

305	310	315	320
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly			
325	330	335	
Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro			
5 340	345	350	
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr			
355	360	365	
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser			
370	375	380	
10 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr			
385	390	395	400
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr			
405	410	415	
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe			
15 420	425	430	
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys			
435	440	445	
Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly			
450	455		
20 <210> 74			
<211> 455			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
25 <223> Amino acid sequence combining heavy chain variable region			
F20-VH-GL1-V4-V9-V14 (SEQ ID NO: 20) and an IgG4 heavy chain			
constant region (SEQ ID NO: 40)			
<400> 74			
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg			
30 1 5 10 15			
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr			
20 25 30			
Pro Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35 35 40 45			
Ser Gly Ile Ser Ser Arg Ser Gly Ser Val Gly Tyr Ala Glu Ser Val			
35 50 55 60			
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr			
65 70 75 80			
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys			
40 85 90 95			
Ala Arg Asp Lys Ile Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Asp Phe Tyr Tyr			
100 105 110			
Tyr Tyr Gly Ile Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser			
115 120 125			
45 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser			
130 135 140			
Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp			
145 150 155 160			

	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr
							165				170					175
	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr
							180				185					190
5	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys
							195			200					205	
	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp
							210			215					220	
10	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala
	225					230					235					240
	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro
						245				250					255	
	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val
						260				265					270	
15	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val
						275			280					285		
	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln
						290			295				300			
	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln
20	305					310					315					320
	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly
						325				330					335	
	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro
						340				345					350	
25	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr
						355			360					365		
	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser
						370			375				380			
	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr
30	385					390					395					400
	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr
						405				410					415	
	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe
						420				425					430	
35	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys
						435			440				445			
	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly									
						450			455							

(57) Формула изобретения

1. Выделенное антитело, специфичное к MMP9, либо его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, включающую:

- (i) CDR1 тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 2;
- (ii) CDR2 тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 3 или его вариант, у которого 45 1, 2 или 3 аминокислоты данного CDR2 тяжелой цепи заменены другими аминокислотами;
- (iii) CDR3 тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 4 или его вариант, у которого 1, 2 или 3 аминокислоты данного CDR3 тяжелой цепи заменены другими

аминокислотами, и

далее содержащие вариабельную область легкой цепи, выбранную из:

а) вариабельной области легкой цепи, включающей:

(i) CDR1 легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 21;

(ii) CDR2 легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 22;

(iii) CDR3 легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 23, или

б) вариабельной области легкой цепи, включающей:

(i) CDR1 легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 26;

(ii) CDR2 легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 27;

(iii) CDR3 легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 28.

2. Выделенное антитело или его фрагмент по п. 1, при этом вариабельная область тяжелой цепи включает SEQ ID NO: 11 или её вариант, у которого 1, 2 или 3

аминокислоты по меньшей мере одного из CDR2 и/или CDR3 тяжелой цепи и/или 1 или 2 аминокислоты каркасных участков вариабельной области тяжелой цепи заменены

другими аминокислотами.

3. Выделенное антитело или его фрагмент по любому из пп. 1 или 2, при этом вариабельная область тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, выбранную из:

(i) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12,

(ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13,

(iii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14,

(iv) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15,

(v) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16,

(vi) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17,

(vii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18,

(viii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19,

(ix) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20,

(x) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11.

4. Выделенное антитело или его фрагмент по п. 3, при этом вариабельная область

легкой цепи включает аминокислотную последовательность, выбранную из:

(1) SEQ ID NO: 24 или её варианта, у которого 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот каркасных участков вариабельной области легкой цепи заменены

другими аминокислотами, и

(2) SEQ ID NO: 29 или её варианта, у которого 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14

или 15 аминокислот каркасных участков вариабельной области легкой цепи заменены

другими аминокислотами.

5. Выделенное антитело или его фрагмент по п. 1, при этом вариабельная область легкой цепи включает аминокислотную последовательность, выбранную из:

(i) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 67,

(ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 68,

(iii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 69,

(iv) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 70.

6. Выделенное антитело или его фрагмент по п. 1, которое ингибирует каталитическую

активность MMP9.

45 7. Выделенное антитело по п. 1, которое представляет собой моноклональное

антитело человека.

8. Выделенное антитело по п. 1, при этом данное антитело включает вариабельную

область тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 19 и вариабельную область

легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 70.

9. Выделенное антитело, специфичное к MMP9, или его антигенсвязывающий фрагмент, где вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

- 5 (i) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12,
- (ii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13,
- (iii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14,
- (iv) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15,
- (v) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16,
- 10 (vi) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17,
- (vii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18,
- (viii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19,
- (ix) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20,
- (x) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11, и
- 15 где вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:
- (xi) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24,
- (xii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25,
- (xiii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29,
- 20 (xiv) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30,
- (xv) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 57,
- (xvi) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 58,
- (xvii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 59,
- (xviii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 60,
- 25 (xix) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 61,
- (xx) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 62,
- (xxi) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 63,
- (xxii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 67,
- (xxiii) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 68,
- 30 (xxiv) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 69,
- (xxv) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 70.

10. Выделенное антитело, специфичное к MMP9, или его антигенсвязывающий фрагмент, где вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность согласно (a) и вариабельная область легкой цепи содержит

35 аминокислотную последовательность согласно (b) в комбинации, выбранной из (1) по (225):

- 1) (a): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 11, (b): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 24,
- 2) (a): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 12, (b): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 24,
- 40 3) (a): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 13, (b): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 24,
- 4) (a): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 14, (b): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 24,
- 45 5) (a): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 15, (b): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 24,
- 6) (a): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 16, (b): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 24,

223) (a): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 54, (b): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 70,

224) (a): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 55, (b): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 70,

5 225) (a): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 56, (b): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 70.

11. Выделенное антитело, специфичное к MMP9, или его антигенсвязывающий фрагмент, где вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность согласно (a) и вариабельная область легкой цепи содержит 10 аминокислотную последовательность согласно (b) в комбинации, выбранной из (1) по (10):

1) (a): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 12, (b): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 68,

15 2) (a): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 17, (b): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 68,

3) (a): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 18, (b): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 68,

4) (a): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 19, (b): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 68,

20 5) (a): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 20, (b): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 68,

6) (a): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 12, (b): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 70,

25 7) (a): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 17, (b): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 70,

8) (a): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 18, (b): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 70,

9) (a): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 19, (b): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 70,

30 10) (a): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 20, (b): аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 70.

12. Выделенное антитело или его фрагмент по п. 11, содержащие константную область человека.

13. Выделенное антитело или его фрагмент по п. 12, содержащие константную область изотипа IgG человека.

14. Выделенное антитело или его фрагмент по п. 13, содержащие константную область изотипа IgG4 человека.

15. Выделенное антитело или его фрагмент по п. 1, где указанное антитело содержит константную область тяжелой цепи человека последовательности SEQ ID NO: 40 и 40 константную область легкой цепи человека последовательности SEQ ID NO: 66.

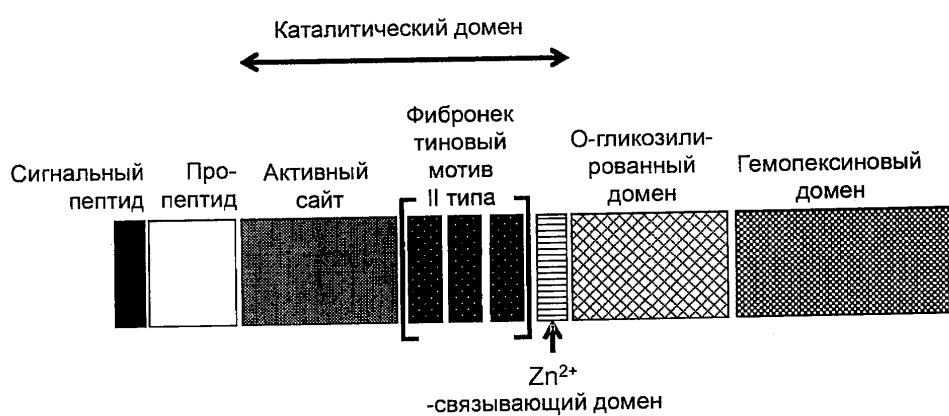
16. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело либо его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-15.

17. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 16, включающая одно или несколько из следующего:

45 (1) последовательность нуклеиновой кислоты, включающую SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 33 или их варианты, идентичные по меньшей мере на 80%, на 90%, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или по меньшей мере на 99% одной из данных последовательностей, и/или

- (2) последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из:
- а) последовательности нуклеиновой кислоты, включающей SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 и SEQ ID NO: 36 или их варианты, идентичные по меньшей мере на 80%, на 90%, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или по меньшей мере на 99% одной из данных
 - 5 последовательностей,
 - б) последовательности нуклеиновой кислоты, включающей SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 39 или их варианты, идентичные по меньшей мере на 80%, на 90%, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или по меньшей мере на 99% одной из данных
 - последовательностей.
- 10 18. Рекомбинантный экспрессирующий вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 16 или 17.
19. Клетка-хозяин, содержащая рекомбинантный вектор по п. 19 для экспрессии антитела по любому из пп. 1-15.
20. Способ получения антител или их фрагментов по любому из пп. 1-15, включающий
- 15 культивирование клеток-хозяев, трансформированных экспрессирующим вектором, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую данные антитела или их фрагменты, в условиях, достаточных для экспрессирования данных антител или их фрагментов.
21. Фармацевтическая композиция для использования в целях профилактики или
- 20 лечения связанного с MMP9 заболевания, включающая одно или несколько из эффективного количества антитела, специфичного к MMP9, либо его
- антитела, связывающего фрагмента по любому из пп. 1-15, а также по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.
22. Применение антитела или его фрагмента по любому из пп. 1-15 для получения
- 25 фармацевтической композиции для применения при профилактике и/или лечении связанного с MMP9 заболевания.
23. Применение по п. 22, при этом связанное с MMP9 заболевание выбрано из группы, состоящей из воспалительных и аутоиммунных заболеваний, воспалительных заболеваний кишечника, раковых заболеваний, фиброзных заболеваний, сердечно-
- 30 сосудистых заболеваний, неврологических заболеваний, глазных заболеваний или любых других связанных с MMP9 заболеваний.
24. Способ выявления присутствия и/или концентрации белка MMP9 ex vivo в биологическом образце, включающий стадии:
- (i) получение биологического образца от субъекта;
 - 35 (ii) проведение реакции данного биологического образца по меньшей мере с одним антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-15 в условиях, достаточных для связывания белка MMP9, присутствующего в данном биологическом образце, с данным по меньшей мере одним антителом или его фрагментом посредством взаимодействия антиген-антитело; и
 - 40 (iii) детектирование сигнала, пропорционального уровню комплекса антиген-антитело, образовавшегося на стадии (ii),
- причем интенсивность сигнала коррелирует с концентрацией белка MMP9 в биологическом образце.
25. Способ ex vivo по п. 24 для выявления присутствия и/или концентрации активного
- 45 белка MMP9 в биологическом образце.
26. Способ ex vivo по п. 25, при этом по меньшей мере одно антитело либо его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 19 и вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 70.

1/20



Фиг. 1

2/20

Человек	MSIMQ
Makaka	MIGLPHTHHTHTHTHTPCPLSQHLPVKEGWHRSAASLKPQQQIQSDDAALTMSIWO
Крыса	MSENQ
Мышь	MSFMO
Человек	PLVLLVLLGCCFAAPROROSTLVLEPGDLRTN-LTDROLAEEYLRYGYTRVAEMGES
Makaka	PLVLLVLLGCCCAAPROROSTLVLEPGDLKTN-LTDROLAEDYLRYGYTRVAEMHGD
Крыса	PLLIVVLLALGYSFAAPHQRQPTIVVPRDLKTSNLTDQLAEDYLRYGYTRAAQMIGER
Мышь	PLLLALLAFAFGCSSAAFPYQRQPTEVVPRDLKTSNLTDQLAEEYLRYGYTRAAQMIGER
Человек	KSLGPALLIQQKOLSLPQTGELDSATLKAMRTPRCGVPDLGRFQTFFGDLKWHHHNITYW
Makaka	KSLGPALLIQQKOLSLPQTGELDSATLKAMRTPRCGVPDLGRFQTFFGDLKWHHHNITYW
Крыса	QSLRPALLIMLQQKOLSLPQTGELDSETLKAIRSPRCGVPDVKGKQTFEDGDLKWHHHNITYW
Мышь	QSLRPALEMLOQQKOLSLPQTGELDSDQTLKAIRTPRCGVPDVGRFQTFFKG-LKWDHHNITYW
Человек	IQNYSEDLPRAVIDDAFAFAIAWSAVTPLTFTRVISRDADIIVIOfGVAEHGDGYPFDGK
Makaka	IQNYSEDLPRAVIEDDAFAFAIAWSAVTPLTFTRVISRDADIIVIOfGVAEHGDGYPFDGK
Крыса	IQSXTEDLPRVIDDSEFAFAIAWSAVTPLTFTRVIGLEADIVIOfGVAEHGDGYPFDGK
Мышь	IQNYSEDLPRDMDAFAFAIAWGEAVPLTFTRVIGEADIVIOfGVAEHGDGYPFDGK
Человек	DGLLAHAFFPPGPGIQQDAHFDDELMISLGKGVVPTREGNADGAAIACHFPEFGRSY SAC
Makaka	DGLLAHAFFPPGPGIQQDAHFDDELMISLGKGVVPTREGNADGAAIACHEPFTEGRSY SAC
Крыса	DGLLAHAFFPPGPGIQQDAHFDDELMISLGKGVVPTREGNANGAFCHEPFTEGRSY SAC
Мышь	DGLLAHAFFPPGAGVQGDAHFDDELMISLGKGVVPTYYGNSGAPCHEPFTEGRSY SAC

ФИГ. 2

3/20

Человек	TTDGRSDELFWCSTTANYDDDRFGFCPSERLYTQDGNADGKPCQFFIFQGQSYGACTT
Макака	TTDGRSDELFWCSTTANYDDDRFGFCPSERLYTQDGNADGKPCQFFIFQGQSYGACTT
Крыса	TTDGRRNDGKFWCGTTADYDIDRKYGFCCPSERLYTEHGNGDGKPCVFFIFTEGHSHSYGACTT
Мышь	TTDGRRNDGKFWCSTTADYDIDRKDGFCCPSERLYTEHGNGDGKPCVFFIFTEGRHSYGACTT
Человек	DGRSDGYRWCAATTANYDRDKLFGFCPTRADSTVWGENSAGELCVPFTFLGKEYSTCTSE
Макака	DGRSDGYRWCAATTANYDQDKLYGFCCPTRADSTVWGENSAGELCVPFTFLGKEYSTCTSE
Крыса	KGRSDGYRWCAATTANYDQDKADGFCCPTRADVTVGENSAGEMCVFPEFVFLGQYSTCISE
Мышь	KGRSDGYRWCAATTANYDQDKLYGFCCPTRADVTVGENSAGEMCVFPEFVFLGQYSSCTSD
Человек	GRGDGRILWCATTSNFDSDKWGFCPDQGYSILFLIVAAHEFGHALGLDHSSVPEALMYPMYR
Макака	GRGDGRILWCATTSNFDRDKWGFCPDQGYSILFLIVAAHEFGHALGLDHHTSVEALMYPMYR
Крыса	GRSDGRILWCATTSNFDRDKWGFCPDQGYSILFLIVAAHEFGHALGLDHSSVPEALMYPMYR
Мышь	GRDGRILWCATTSNFDTDKWGFCPDQGYSILFLIVAAHEFGHALGLDHSSVPEALMYPLYS
Человек	FTEGPPPLHKKDDVNGIRHLYGPRPEPRPRPTTIP--OPTAAPPVCPTGPPTVHPSERPT
Макака	FTEEPBLHKKDDVNGIQLYGSRPEPEPRPTTIP--OPTAAPPVCPTGPPTVHPSERPT
Крыса	YHEDSPPLHEDDIKGIIHLYGRGSKPDPRPATTALEQOPTAAPPVCPTGPPTVHPSERPT
Мышь	YLEGFFPLNKDDIDGIOQIYGRGSKPDPRPATTIIEQOPTAAPPVCPTGPPTVHPSERPT
Человек	AGPTGPPSAGPTG-----PPTAGPSTATIVPLSPVDDACNVNIFDATAE
Макака	AGPTGPPSAGPTG-----PPTAGPSTTIVPLNPVDDACNVNIFDATAE
Крыса	VAPTAGPSEAPTESSTPDDNPNCVVDVFLAID
Мышь	VGPTGAPSPGPTSSSPGPTGABSPGPTAAPPAGSSEASTESTSISPADNPNCVVDVFLAID

Фиг. 2 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

IGNQLYLFKDGKYWRFSEGRGSRSPQGPFLIADKWPALPRKLDSEFEERLSKKLFFFGRO
IGNQLYLFKDGRYWRFSERRGSRLOQGPFLIADTWPALPRKLDSAFEELSSKKLFFFGRO
IQGALHFFKDGRYWKESNHGGNOLQGPFLIARTWPAFPSKLMSAFEDQPKKIFFELWAQ
IQGALHFFKDGRYWKESNHGGSPLOQGPFLIARTWPAFPATLDSAFEDQTRKVFEEFGRO

DILQCPED
DILQCPED
DILQCP—
DILQCP—
* * * *

Человек
Макака
Крыса
Мышь

Человек
Макака
Крыса
Мышь

Человек
Макака
Крыса
Мышь

Человек
Макака
Крыса
Мышь

4/20

Фиг. 2 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

Фиг. 3

6/20

* E20-VH
 * F20-VH-GL1
 * F20-VH-GL1-V1-V9
 * F20-VH-GL1-V1-V9-V14
 * F20-VH-GL1-V4-V9
 * F20-VH-GL1-V4-V9-V14

* F20-VH
 * F20-VH-GL1
 * F20-VH-GL1-V1-V9
 * F20-VH-GL1-V1-V9-V14
 * F20-VH-GL1-V4-V9
 * F20-VH-GL1-V4-V9-V14

REQENSTYFVSVLTVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTIL
REQENSTYFVSVLTVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTIL
REQENSTYFVSVLTVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTIL
REQENSTYFVSVLTVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTIL
REQENSTYFVSVLTVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTIL
REQENSTYFVSVLTVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTIL
* F20 - VH
* F20 - VH - GL1
* F20 - VH - GL1 - V1 - V9
* F20 - VH - GL1 - V1 - V9 - V14
* F20 - VH - GL1 - V4 - V9
* F20 - VH - GL1 - V4 - V9 - V14

ФИГ. 3 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

7/20

Фиг. 3 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

8/20

<p>*B03-VL *B03-VL-GL1</p>	<p>*B03-VL *B03-VL-GL1</p>	<p>*B03-VL *B03-VL-GL1</p>
<p>CDR1</p> <p>SSELTQDAVSVALGQTFRITCGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVVVIYGNKNRPSGI PDR</p> <p>SSELTQDAVSVALGQTFRITCGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVVVIYGNKNRPSGI PDR</p> <p>*****</p>	<p>CDR2</p> <p>FSGSSSGNTVSLITIGAQEADYYCOSRDNIGNHRRVVLFGGGTKVTVLGOPKAAPSVT</p> <p>FSGSSSGNTVSLITIGAQEADYYCOSRDNIGNHRRVVLFGGGTKLTVLGOPKAAPSVT</p> <p>*****</p>	<p>CDR3</p> <p>LFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYASS</p> <p>LFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYASS</p> <p>*****</p>
<p>*****</p>	<p>*****</p>	<p>*****</p>
<p>YLSLTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPECS</p> <p>YLSLTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPECS</p> <p>*****</p>	<p>*****</p>	<p>*****</p>
<p>*****</p>	<p>*****</p>	<p>*****</p>

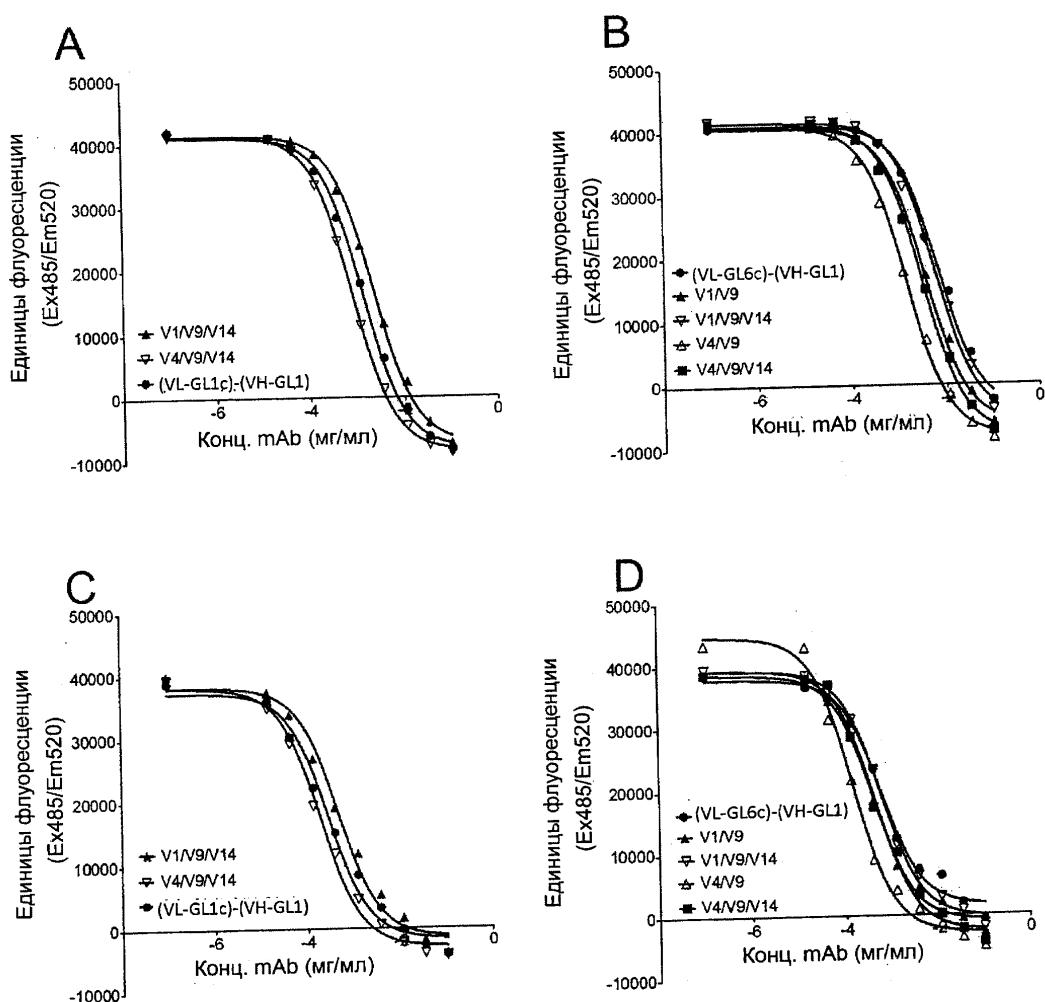
Фиг. 4

9/20

*B08-VL	QSALTOPRSVSGSPGQSVTISCLGTSNDGAYNRVSWYQHGPKA <u>KPLLIYGVSNRPSGV</u>	CDR2
*B08-VL-GL6	QSALTOPASVSGSPGQSVTISCLGTSNDGAYNRVSWYQHGPKA <u>KPLMIYGVSNRPSGV</u>	
*B08-VL	STRESGSKSGNTASLTISGLLAADEADFYCT <u>SYSSSTTSYVYEGGGTKVTVLGQDKRAAPS</u>	CDR3
*B08-VL-GL6	SNRESGSKSGNTASLTISGLOAEDADFYCT <u>SYSSSTTSYVYEGGGTKVTVLGQDKRAAPS</u>	
*B08-VL	VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPCGAVTVAWKA <u>KADSSPVKAGVETTPSKOSNNKYAA</u>	
*B08-VL-GL6	VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPCGAVTVAWKA <u>KADSSPVKAGVETTPSKOSNNKYAA</u>	
*B08-VL	SSYLSLTPEQWKS <u>HRSYSCQVTHEGSTVETKVAPECS</u>	
*B08-VL-GL6	SSYLSLTPEQWKS <u>HRSYSCQVTHEGSTVETKVAPECS</u>	

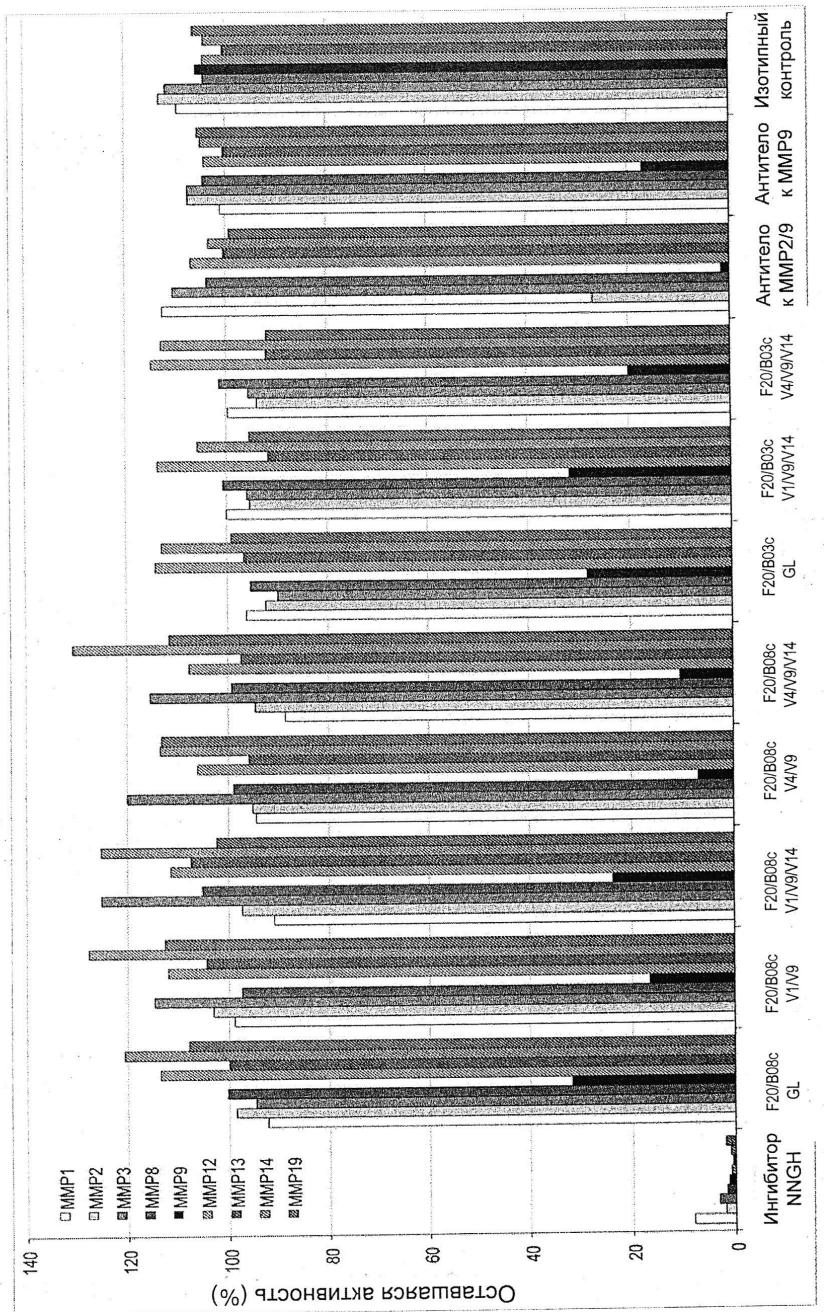
5

10/20



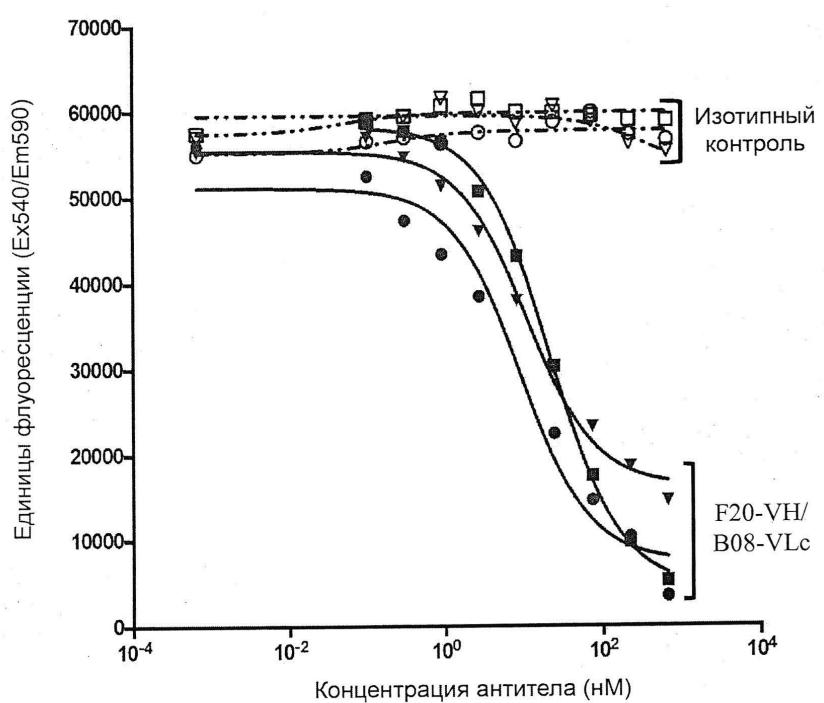
ФИГ. 6

11/20



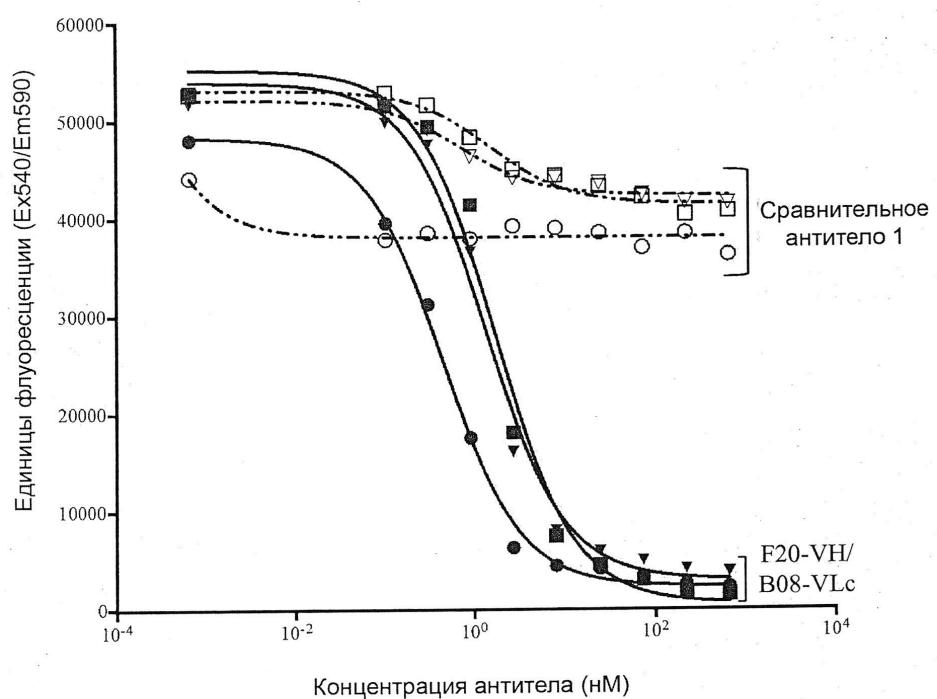
ФИГ. 7

12/20



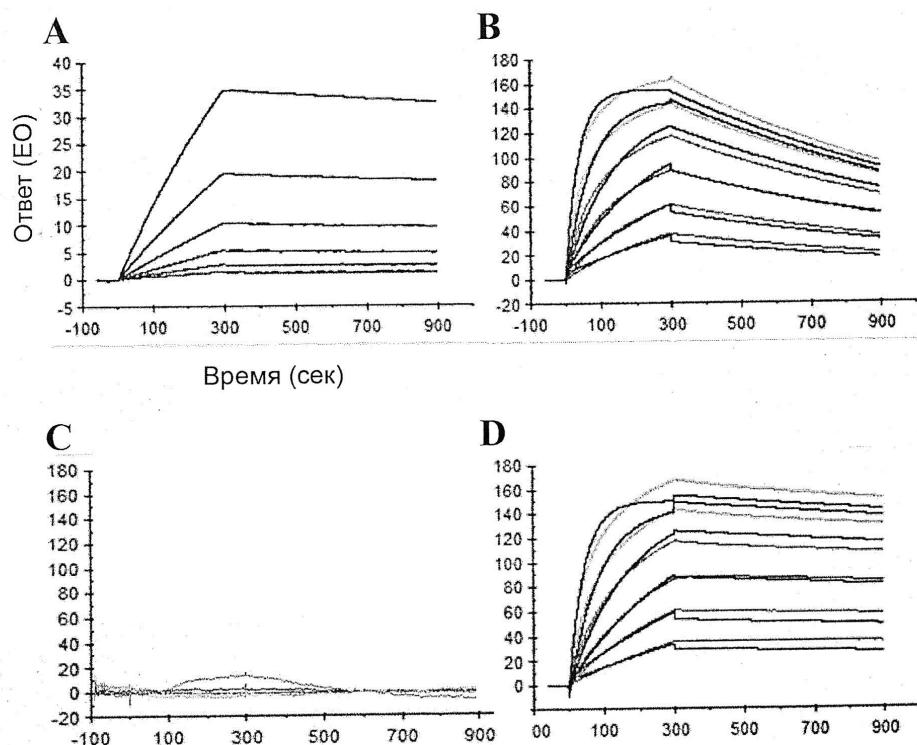
Фиг. 8

13/20



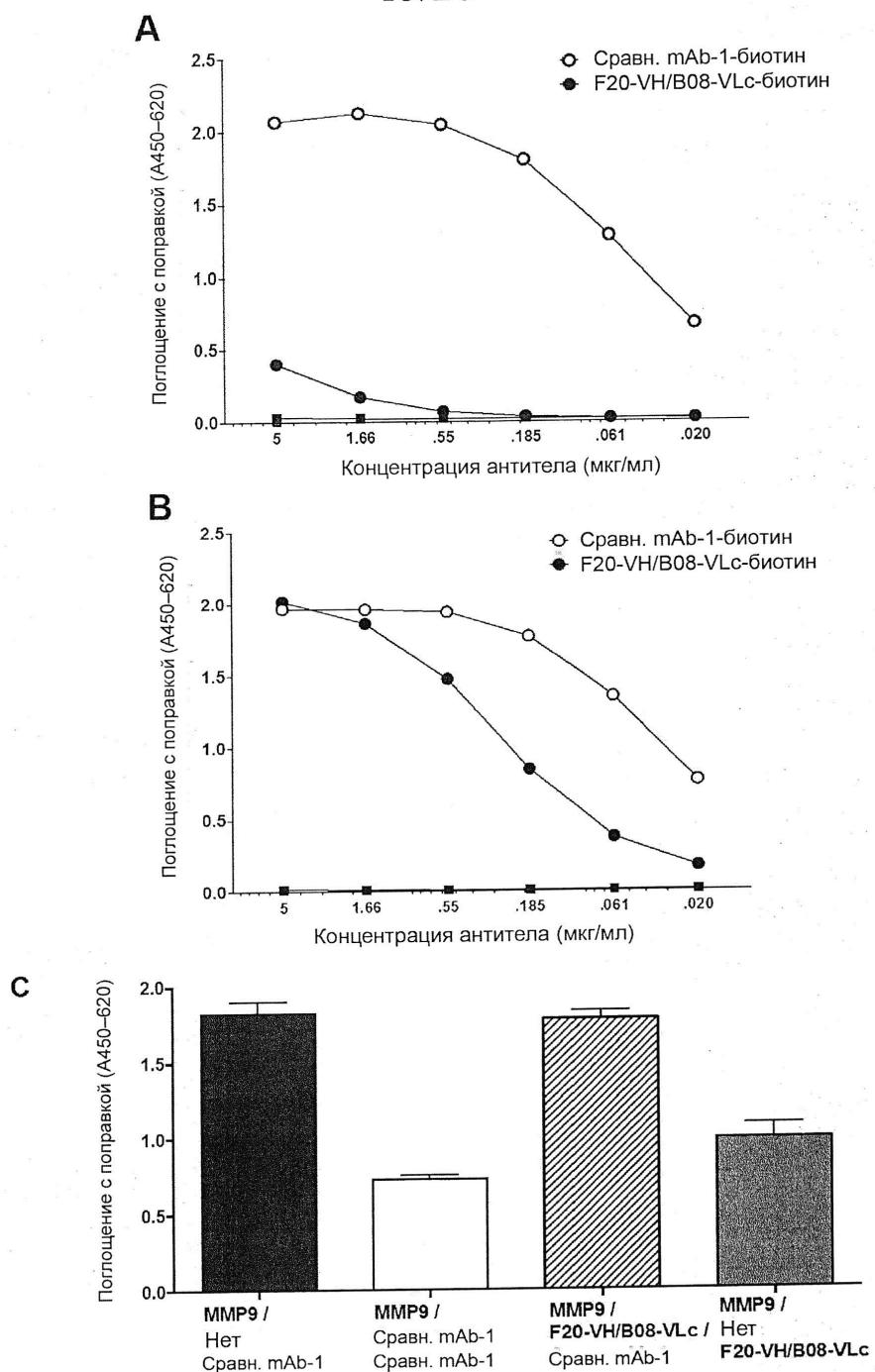
Фиг. 9

14/20



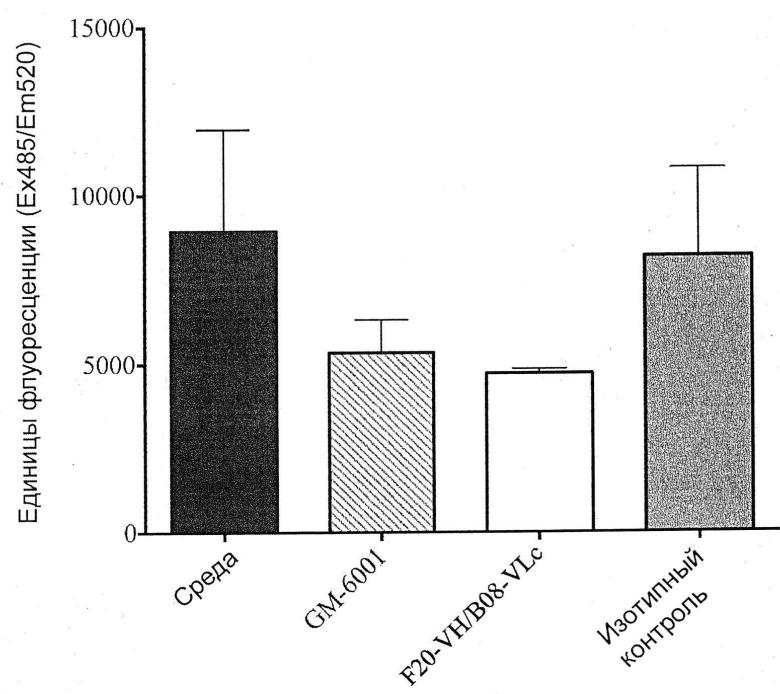
Фиг. 10

15/20



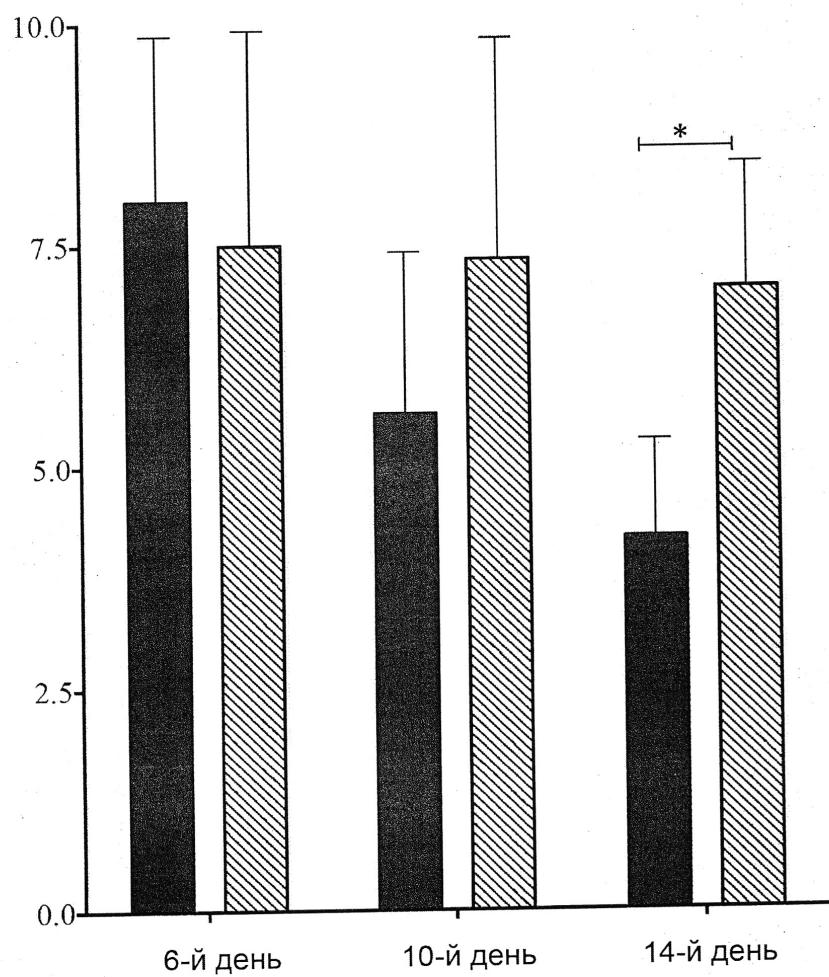
ФИГ. 11

16/20



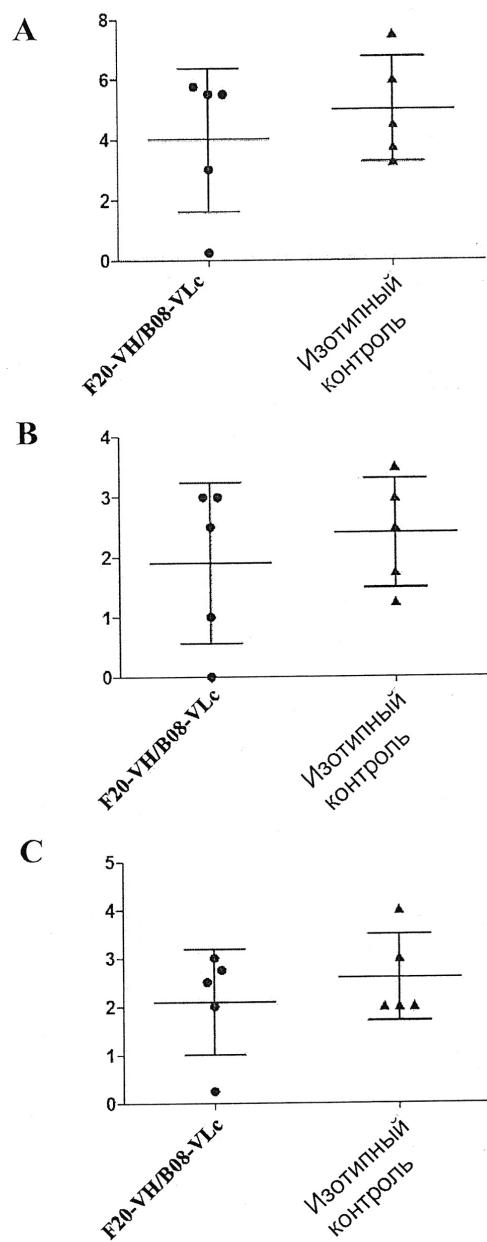
Фиг. 12

17/20



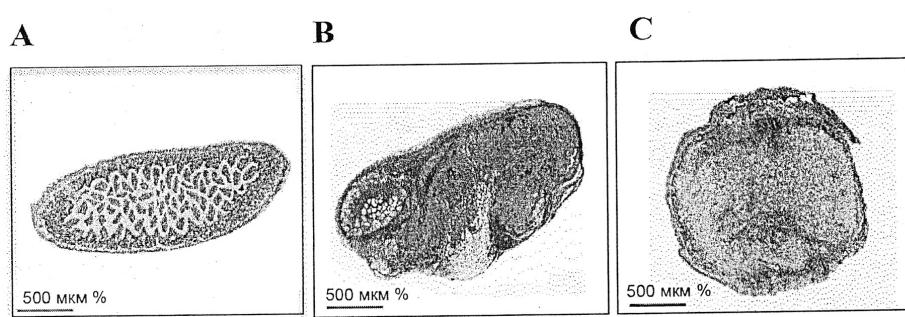
Фиг. 13

18/20



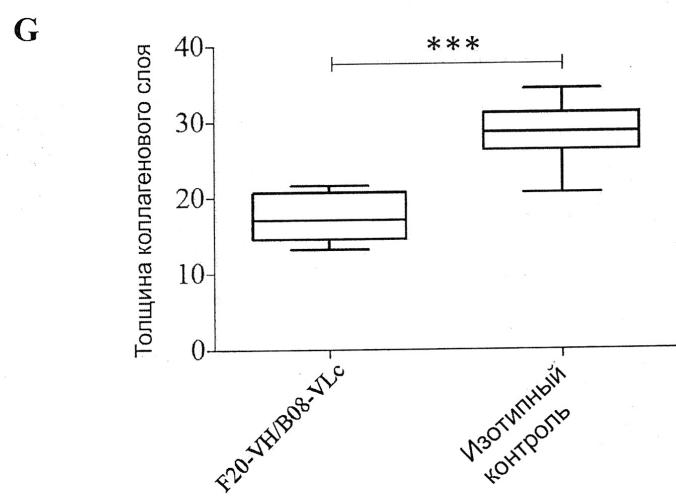
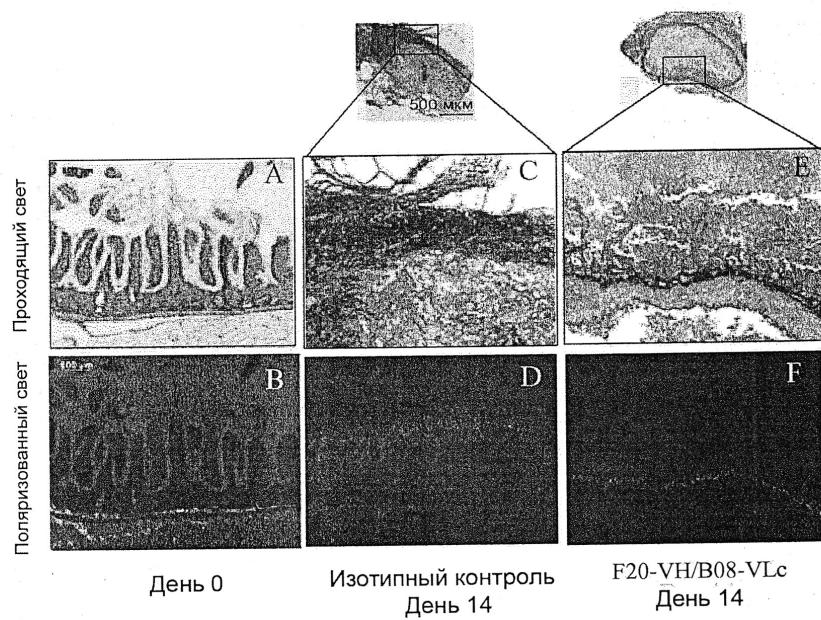
Фиг. 14

19/20



Фиг. 15

20/20



Фиг. 16