



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(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:
13.08.2015

Дата регистрации:
11.02.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
13.08.2014 EP 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:
EP 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.)

(54) АНТИТЕЛА, СПЕЦИФИЧНЫЕ К ММР9

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к области иммунологии и биотехнологии. Предложены новые варианты антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые специфично связываются с ММР9 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 ММР9 заболеваний. Также предложен способ выявления присутствия и/или концентрации белка ММР9 ex vivo в биологическом образце на основе антитела, где интенсивность сигнала коррелирует с концентрацией белка ММР-9 в образце.

Использование изобретения обеспечивает антитела, которые способны нейтрализовать активность ММР9, что может найти применение при профилактике и/или лечении воспалительных,

аутоиммунных заболеваний и/или раковых заболеваний, связанных с ММР9. 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.

RU 2 7 1 4 0 4 3 C 2

RU 2 7 1 4 0 4 3 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(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:
13.08.2015Registration 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:
**ООО "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.

RU 2714043 C2

RU 2714043 C2

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.

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 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 IV в 92 кД или желатиназа В (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 (TKRs), молекул клеточной адгезии (Bauvois, 2012, Biochim Biophys Acta 1825(1): 29-36). При заболеваниях ММР9 секретируется многими 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, 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 (PEX).

Матриксная металлопротеиназа 2 (ММР2), также известная как коллагеназа типа IV в 72 кДа или желатиназа А (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 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).

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 мембраны 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 деградаци 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 фибросклерозом, склеродермальной реакцией "трансплантант против хозяина" у реципиентов при пересадке костного мозга, нефрогенным системным фиброзом, а также такими орган-специфичными
10 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
15 клеток в мезенхимальные и трансдифференцировки перицитов в миофибробласты (Zhao et al, 2013, World J Nephrol, 2(3): 84-9).

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
20 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).

Сердечнососудистые заболевания включают воспаление и ремоделирование
25 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).

30 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
35 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).

В различных нормальных и раковых клетках (Goldberg et al., 1992, J. Biol. Chem., 267, 40 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
45 клеток (Dufour et al., 2010, J. Biol. Chem., 285, 35944-35956), а изучение паттернов секреции 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

эффективного средства для нейтрализации MMP9 для эффективного ингибирования 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 ингибировании мишени.

Некоторые антитела, специфичные к MMP9, были описаны на предшествующем 15 уровне техники, как-то мышинное 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), мышинное 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.

Таким образом, существует потребность в разработке новых терапевтических средств, проявляющих высокое сродство и специфичность к MMP9 и проявляющих слабое или 25 ограниченное сродство 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

Настоящее изобретение направлено на белки, которые связываются с MMP9, в 30 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 45 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

б) 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;

15 (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, 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, как описано здесь, включающего культивирование клеток хозяина, трансформированных экспрессирующим вектором, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей данные антитела или их фрагменты, в условиях, достаточных для экспрессирования данных антител или их фрагментов.

В седьмом аспекте изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, включающие одно или несколько из следующего: (i) антитело, специфичное для ММР9, 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, включающих одно или несколько антител против ММР9 или их антиген-связывающих фрагментов, как описано здесь.

Девятый аспект изобретения составляет набор, включающий одно или несколько антител против ММР9 или их антиген-связывающих фрагментов, как описано здесь.

Десятый аспект изобретения касается антител или их лекарственных форм по изобретению для применения при профилактике и/или лечении связанных с ММР9 заболеваний, как-то воспалительных и/или аутоиммунных заболеваний либо раковых заболеваний или фиброзных заболеваний.

Одиннадцатый аспект касается способа профилактики и/или лечения связанных с ММР9 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 ММР9 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

5 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
10 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
15 тяжелой цепи антител человека, содержащих константную область тяжелой цепи и переменную область тяжелой цепи антител человека против MMP9 по изобретению. Последовательности фрагментов тяжелой цепи антител помечены по названиям последовательностей переменной области тяжелой цепи значком * перед названием:
* F20-VH, * F20-VH-GL1, * F20-VH-GL1-V1-V9, * F20-VH-GL1-V1-V9-V14, * F20-VH-
20 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 переменную область легкой цепи антител человека против MMP9 по изобретению.
25 Последовательности фрагментов легкой цепи антител помечены по названиям последовательностей переменной 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
30 легкой цепи антител человека, содержащих константную область легкой цепи и переменную область легкой цепи антител человека против MMP9 по изобретению. Последовательности фрагментов легкой цепи антител помечены по названиям последовательностей переменной области легкой цепи значком * перед названием:
* B08-VL, * B08-VL-GL6. Участки CDR подчеркнуты. Аннотации идентичны приведенным
35 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).

40 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
45 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 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 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 треугольнички) или IgG4 контрольного изотипа человека плюс биотинилированное вторичное Fab-антитело против IgG человека (темные 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 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 клетки MGC803 желудка человека инкубировали с форбол-12-миристат-13-ацетатом (РМА) 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 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. 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.

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 (А) общей гистологии, (В)

инфильтрата 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 трансплантатов в кишечнике мыши при окрашивании гематоксилином-эозином. (А) 5 День 0: свежeweыделенный 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 трансплантатов в кишечнике мыши при окрашивании с помощью Sinus red и 15 количественная оценка толщины коллагенового слоя. Свежeweыделенные при резекции 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 20 слоя в гетеротопических кишечных трансплантатах у мышей, получавших антитело против MMP9 или изотипный контроль. Представлены среднее значение и SD толщины коллагенового слоя из срезов трансплантатов 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 "MMP9", также известная как коллагеназа типа IV в 92 кДа, желатиназа в 92 кДа или желатиназа В (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 сродство 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 ММР9, 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) или каппа (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.

Термин "химерное антитело" в общем означает антитело, содержащее вариабельную область из одного источника или вида и по меньшей мере часть константной области,
45 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 "гуманизованное антитело" обозначает антитело 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. Гуманизованные антитела необязательно могут дополнительно содержать один или несколько каркасных остатков, происходящих из того другого вида, из
10 которого происходят CDRs.

Термин "человеческое антитело" или "полностью человеческое антитело" относится к таким антителам, у которых переменные области и константные области как тяжелых, так и легких цепей имеют человеческое происхождение или практически идентичны последовательностям человеческого происхождения, но не обязательно из
15 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
20 Life Sci., 848: 79-87), включая электрофоретические (например, SDS-PAGE, изоэлектрофокусирование, капиллярный электрофорез) или хроматографические (например, ионнообменной или обратнофазовой HPLC (высокоэффективной жидкостной хроматографии) методы.

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

"Полипептид" понимается как пептид, олигопептид, олигомер или белок, содержащий по меньшей мере две аминокислоты, соединенные друг с другом нормальной или
30 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 остоле, в боковой цепи или даже на С- или N-терминальных концах. Например, полипептидные модификации охватывают ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина,
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. 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.

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 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 меньшей мере на 99% идентична указанной аминокислотной последовательности. Последовательность варианта нуклеиновой 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 нуклеиновой кислоты. Идентичность двух аминокислотных последовательностей или двух нуклеотидных последовательностей 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 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 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 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 последовательности, но отличаются от 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
5	Arg (R)	Lys, Gln, Asn
	Asn (N)	Gln
	Asp (D)	Glu
	Cys (C)	Ser, Ala
	Gln (Q)	Asn
	Glu (E)	Asp
10	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
15	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
20	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, фосфора 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 антигеном означает по крайней мере временное взаимодействие или ассоциацию данного
 35 антитела с данным целевым антигеном (типа ММР9) или же с фрагментами данного целевого антигена, содержащего эпитоп, распознаваемый данным антителом.

Термины "избирательно связывается", "специфически связывается", "специфичное к" в применении к антителу означают, что антитело предпочтительно распознает и/или
 40 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.
 45 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: $[Bound] = N \times ([Free]) / ((1/K_a) + [Free])$. 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 мембраны (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 зависящего 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 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, сродства антитела к эффекторной молекуле типа Fc-рецептора или компонента комплемента.

Сродство 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 сродства связывания, делая эффекторный механизм неэффективным, как при непродуктивном связывании.

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 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.

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.

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 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; (b) торможение заболевания, то есть прекращение его развития; или (с) облегчение заболевания, то есть вызывая регрессию заболевания и/или его симптомов или состояния типа 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.

"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, септицемию,

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 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), 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.

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.

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 гематопозитический 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.

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.

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 фибросклероз, 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.

Термины "неврологические заболевания" или "нервно-психиатрические заболевания"

20 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.

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.

"Эффективность" лечения или способа по изобретению может быть измерена на

30 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 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:

40 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 варибельной области тяжелой цепи и/или по меньшей мере один фрагмент варибельной области легкой цепи антител, как описано здесь.

В одном воплощении изобретения предусмотрены выделенные антитела, специфичные к ММР9, в частности ММР9 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 ММР9, в частности ММР9 человека, либо их антигенсвязывающие фрагменты, характеризующиеся их связыванием с эпитопом на ММР9, как описано здесь.

10 Белок, с которым связываются антитела по изобретению или их фрагменты, может представлять собой белок ММР9 из любого вида.

Антитела по настоящему изобретению обычно проявляют высокую специфичность к ММР9 человека. Однако, в зависимости от степени идентичности последовательностей между гомологами ММР9 из разных видов (см. фиг. 2), данное антитело или

15 антигенсвязывающий фрагмент может проявлять перекрестную реактивность с ММР9 из по меньшей мере еще одного другого вида, например, мыши, крысы, мартышки, макаки (например, макаки-крабоеда), собаки и/или кролика. Для антител, направленных на ММР9 человека, может быть желательным некоторый уровень перекрестной реактивности с другими формами ММР9 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 ММР9 человека.

25 В другом воплощении антитела по изобретению либо их фрагменты проявляют перекрестную реактивность с ММР9 человека, ММР9 макаки-крабоеда, ММР9 крысы и необязательно ММР9 мыши.

В некоторых воплощениях сродство связывания (которое обратно пропорционально значению K_d) антител и их фрагментов по изобретению для ММР9 человека по меньшей

30 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 сродство связывания для других ММР9, а не человека.

В одном воплощении антитела по изобретению либо их фрагменты преимущественно связываются с ММР9 и необязательно также проявляют слабое связывание или

35 практически не связываются (т.е. незначительное связывание или оно не обнаруживается) с другими матриксными металлопротеиназами (MMPs), такими как ММР1, ММР2, ММР3, ММР7, ММР8, ММР9, ММР10, ММР12, ММР13, ММР14, ММР16, ММР17, ММР19.

В предпочтительном воплощении антитела по изобретению либо их фрагменты преимущественно связываются с ММР9 и проявляют слабое связывание или практически

40 не связываются (т.е. незначительное связывание или оно не обнаруживается) с ММР2.

Для терапевтического применения может быть выгодным, чтобы антитела по изобретению либо их фрагменты не связывались и тем самым не нейтрализовали ММР2 с тем, чтобы они существенно не влияли на активность ММР2. Действительно, ММР2 необходима для нормального гомеостаза тканей и также может иметь защитную

45 роль против заболеваний, о чем свидетельствуют наблюдения, согласно которым мыши с нокаутом ММР2 проявляют худший фенотип, чем мыши дикого типа, на нескольких моделях заболеваний (Grag et al., 2006, J. Immunol., 177(6): 4103-12).

В некоторых воплощениях сродство 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 сродство связывания для MMP2.

Сродство 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}) 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 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 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.

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

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.

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.

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.

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 нейтрализуют 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 нейтрализуют 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 ингибирующей 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 IC_{50} . 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 мембраны (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 IC_{50}) 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 IC_{50} , 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 IC_{50} , равное или меньше 100 нМ, в частности, менее 50 нМ, более предпочтительно 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 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 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 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 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 сродство 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, 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 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 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 вариательной областью, которая обычно включает вариательную область тяжелой цепи и вариательную область легкой цепи.

Характеристики MMP9-связывающих белков в отношении вариательной области тяжелой цепи

В одном воплощении изобретение касается выделенных антител, специфичных к MMP9, либо их антиген-связывающих фрагментов, содержащих вариательную 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 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, M100JL.

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.

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.

В другом конкретном воплощении изобретения антитела, специфичные к MMP9, или их антигенсвязывающие фрагменты содержат вариательную 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 ID NO: 12, соответственно.

В другом конкретном воплощении изобретения антитела, специфичные к MMP9, или их антигенсвязывающие фрагменты содержат вариательную 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 вариательной области тяжелой цепи.

В другом конкретном воплощении изобретения антитела, специфичные к MMP9, или их антигенсвязывающие фрагменты содержат вариательную 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, M100J, 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 M100JL.

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 10 варьируемой области тяжелой цепи заменена другой аминокислотой, в частности, по меньшей мере по одной из следующих замен: N53Q, N53R, N53K, N53H, D61E, S62T, M100LL, M100LI, N30D, D84A и V89L.

Конкретные примеры варьируемой 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 варьируемой 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.

Альтернативные конкретные примеры варьируемой области тяжелой цепи, 25 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 варьируемой области легкой цепи

В одном воплощении изобретение касается выделенных антител, специфичных к 35 MMP9, либо их антиген-связывающих фрагментов, содержащих варьируемую область тяжелой цепи, как описано выше, а также содержащих варьируемую 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 антигенсвязывающие фрагменты содержат варьируемую 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 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 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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 варьируемой 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 варьируемой области легкой цепи заменена другой аминокислотой, в частности, по меньшей мере по следующей замене: V104L.

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

В частности, специфичные к MMP9 антитела либо их фрагменты по изобретению включают вариант SEQ ID NO: 67, у которого аминокислота в положении 104 каркасного

15 участка легкой цепи заменена другой аминокислотой, в частности, по меньшей мере по следующей замене: V104L.

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

В альтернативном воплощении изобретение касается выделенных антител, специфичных к MMP9, либо их антиген-связывающих фрагментов, содержащих

30 варьируемую область тяжелой цепи, как описано выше, а также содержащих варьируемую 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

35 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 одном конкретном воплощении изобретения антитела, специфичные к MMP9, либо их антигенсвязывающие фрагменты содержат варьируемую область легкой цепи

40 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.

45 В одном конкретном воплощении изобретения антитела, специфичные к MMP9, либо их антигенсвязывающие фрагменты содержат варьируемую 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, 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, 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 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 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 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 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 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 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 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,
- (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.

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 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 предпочтительно IgG4.

В частности, когда молекула антитела предназначена 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 предназначена для терапевтического применения, но его 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 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 концевой лизина, что соответствует 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.

В предпочтительном аспекте изобретения антитела, специфичные к MMP9, либо их антигенсвязывающие фрагменты включают: (i) по меньшей мере одну тяжелую цепь, содержащую переменную область, как описано здесь, и константную область или ее часть из антитела типа IgG, и (ii) по меньшей мере одну легкую цепь, содержащую переменную 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 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 устраняет взаимодействия Fc-Fc (Rispen et al., 2013, Mol. Immunol. 53: 35-42), замену Lys (K) на Arg (R) в аллотипическом положении 409 (нумерация по EU), которая усиливает взаимодействия CH₃-CH₃ 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 каталитическом 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 здесь признаков в отношении последовательностей их переменных 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 переменные домены, указанные в таблице 2 (также см. фиг. 3, 4, 5).

Таблица 2

Наименование	Последовательность переменной области тяжелой цепи	Последовательность переменной 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

5

10

15

20

25

30

35

40

45

F20-VH-GL1/ B08-VL	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 29
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
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
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
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
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
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
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
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
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
	F20-VH-GL2/ B08-VL	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 29
5	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
	F20-VH-GL1-V11/ B08-VL	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 29
10	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
	F20-VH-GL1-V2/ B08-VL-GL6	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 30
15	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
	F20-VH-GL1-V13/ B08-VL-GL6	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 30
20	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
	F20-VH-GL1-V1/ B03-VL-GL2	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 57
25	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
	F20-VH-GL1-V14/ B03-VL-GL2	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 57
30	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
	F20-VH-GL1-V4-V9/ B03-VL-GL2	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 57
35	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
	F20-VH-GL1-V2/ B03-VL-GL2	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 57
40	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
	F20-VH-GL1-V13/ B03-VL-GL2	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 57
45	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
	F20-VH-GL1-V4/ B08-VL-GL1	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 58
5	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
	F20-VH-GL1-V1-V9/ B08-VL-GL1	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 58
10	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
	F20-VH-GL1/ B08-VL-GL3	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 60
5	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
	F20-VH-GL1-V9/ B08-VL-GL3	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 60
10	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
	F20-VH-GL1-V13/ B08-VL-GL4	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 61
5	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
	F20-VH-GL1-V3/ B08-VL-GL7	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 63
5	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
	F20-VH/ B03-VLc	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 67
10	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
	F20-VH-GL1-V4/ B03-VLc	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 67
15	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
	F20-VH-GL1-V14/ B08-VLc	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 69
5	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
	F20-VH-GL1-V4 -V9/ B08-VLc	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 69
10	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
	F20-VH-GL1/ B08-VL-GL6c	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 70
15	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
	F20-VH-GL1-V11/ B08-VLc	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 69
5	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
	F20-VH-GL1-V2/ B08-VL-GL6c	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 70
10	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,
 - 20 (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,
 - 25 (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,
 - 30 (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:
- 35 (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,
 - 40 (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,
 - 45 (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,

(хv) 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

- 35 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 именуется 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 - 25 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 30 проявляться под действием другого соединения, специфичного для этой метки и позволяющего легкое детектирование и количественное определение, или любые другие 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.

40 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, включающую любые молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению сами по себе или в сочетании. В предпочтительном воплощении молекулы нуклеиновой кислоты представляют собой кДНК.

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.

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

(1) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную 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 переменную 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 переменную 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 контролируемую 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 поксвирусы, вирусы псевдобешенства, ретровирусы. Эти рекомбинантные векторы могут в равной степени быть производными космид или фагемид.

Последовательности нуклеиновой кислоты можно вставить в рекомбинантный

30 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.

Рекомбинантный вектор может включать последовательности нуклеотидов, которые способствуют, контролируют или регулируют экспрессию и транскрипцию

35 полинуклеотида по изобретению, а также трансляцию полипептида по изобретению, причем эти последовательности выбирают в соответствии с используемыми клетками хозяина.

Так, например, в рекомбинантный вектор можно встроить подходящий сигнал секретиции с тем, чтобы полипептид, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты по

40 изобретению, направлялся в просвет эндоплазматического ретикулума, в периплазматическое пространство, на мембрану или во внеклеточную среду. Выбор надлежащего сигнала секретиции может способствовать последующей очистке белка.

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

45 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 грибов типа *Aspergillus* и дрожжей типа *Saccharomyces*, клетки насекомых, клетки яичников китайского хомячка (СНО), клетки линии С127 мыши, клетки линии ВНК сирийского хомячка, клетки 293 эмбриональных почек человека (НЕК 293). В предпочтительном воплощении клетками хозяина служат клетки СНО или клетки НЕК 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 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 антител, специфичных к ММР9, 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, адъюванты и т.п.

Соединения по изобретению вместе со стандартными адъювантами, 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 лиофилизованном виде или в жидком виде типа 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 такие стандартные дозовые формы могут содержать любое подходящее эффективное количество активного ингредиента, соизмеримое с предполагаемым диапазоном суточной дозировки.

Композиции настоящего изобретения могут представлять собой жидкие формы, включая, без ограничения, водные или масляные суспензии, растворы, эмульсии, сиропы и эликсиры. Жидкие формы, подходящие для перорального введения, могут включать подходящий водный или неводный носитель с буферами, суспендирующими 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 и добавки, включая, без ограничения, суспендирующие вещества, эмульгаторы, неводные носители и консерванты. Суспендирующие вещества включают, без ограничения, сироп из сорбитола, метилцеллюлозу, глюкозный/сахарный сироп, желатин, гидроксипропилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу, гель стеарата алюминия и гидрогенизированные пищевые жиры. Эмульгирующие вещества включают, без 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-п-гидроксibenзоат 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
10 смачивающие вещества. Связующие вещества включают, без ограничения, сироп, 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 пластыри, пластыри или мембраны.

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, суспендирующие, стабилизирующие и
30 диспергирующие вещества. Композиции также могут быть представлены в виде порошка для восстановления с подходящим носителем, включая, без ограничения, стерильную апиrogenную воду.

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).

Композиции настоящего изобретения также можно вводить в виде форм с
40 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.

В другом воплощении изобретения предусмотрены композиции для визуализации
45 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 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 радиоизотопов, биотина, авидина, стрептавидина, хромофоров, флуорофоров, хемилюминесцентных группировок, гаптен 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.

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 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 (Taxotere), паклитаксель (Taxol), Nab/паклитаксель, 5-фторурацил (5-FU), 6-меркаптопурин (6-MP), капецитабин (Xeloda), цитарабин (Ara-C), флуксуридин, флударабин, гемцитабин (Gemzar), гемцитабин-дисульфид, гидроксимочевина, метотрексат, пеметрексед (Alimta), иксабепилон (Ixempra), винбластин (Velban), винкристин (Oncovin), винорелбин (Navelbine) и эстрамустин (Emscyt)), ингибиторы 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 (Erbix), панитумумаб (Vectibix), 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 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 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 ММР9 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, внутриаартериальное, внутривнутрибрюшинное, подкожное, внутримышечное, интратекальное 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 ММР9 антитела либо их антиген-связывающие фрагменты по изобретению вводятся системно или локально.

В другом предпочтительном воплощении специфичные к ММР9 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.

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

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

Пациенты

Как правило, пациентами согласно изобретению являются больные, страдающие заболеваниями, связанными с ММР9, в частности, заболеваниями, связанными с ММР9, входящими в группу, состоящую из воспалительных и аутоиммунных заболеваний, 35 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 ММР9.

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 45 Шегрена, системный склероз, полимиозит, атеросклероз.

В предпочтительном воплощении пациентами согласно изобретению являются больные, страдающие воспалительными заболеваниями кишечника, более предпочтительно проникающей и стриктурирующей 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, 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, 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, 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, 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 волчанкой.

В другом воплощении пациентами согласно изобретению являются больные, страдающие глазными заболеваниями, к примеру, фиброзной патологией хрусталика, заболеваниями роговицы, диабетической ретинопатией, "сухой" или "влажной" 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 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 аритмией, фиброзом сердца и коронарной недостаточностью.

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 ММР9, либо их антиген-связывающие фрагменты, нуклеиновые кислоты, векторы, клетки хозяина, композиции по изобретению предназначены для применения при диагностике, профилактике или лечении заболеваний, связанных с, вызванных или сопровождающихся повышением уровня ММР9 и/или повышением активности ММР9.

В одном воплощении предусмотрены антитела, специфичные к ММР9, либо их антиген-связывающие фрагменты по изобретению для применения в качестве лекарственных средств.

В другом воплощении предусмотрены антитела либо их фрагменты по изобретению для применения при профилактике и/или лечении связанных с ММР9 заболеваний, входящих в группу, состоящую из воспалительных и аутоиммунных 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 или любых других связанных с ММР9 заболеваний или расстройств.

В другом воплощении предусмотрены антитела либо их фрагменты по изобретению для применения при профилактике и/или лечении связанных с ММР9 заболеваний, входящих 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 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), системной красной волчанки (SLE), синдрома Шёгрена, системного склероза, полимиозита, атеросклероза.

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, нервно-психиатрических заболеваний, диабета и глазных заболеваний.

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 гематопоетического 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, аденокарциномы желудка, аденокарциномы поджелудочной железы, гепатоцеллюлярной карциномы, более предпочтительно колоректального рака или аденокарциномы.

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 фибросклероза, склеродермальной реакции "трансплантат 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.

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 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 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, хронической аритмии, фиброза сердца и коронарной недостаточности.

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.

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 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.

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.

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 (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 ММР9 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 ММР9 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 гематопозитического 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 аденокарциномы, немелкоклеточного рака легких, плоскоклеточной карциномы легких, аденокарциномы легких, аденокарциномы желудка, аденокарциномы поджелудочной железы, гепатоцеллюлярной карциномы, более предпочтительно колоректального рака или аденокарциномы.

В одном конкретном воплощении предусмотрено применение специфичных к ММР9
25 антител либо их антиген-связывающих фрагментов по изобретению для получения фармацевтических композиций для профилактики и/или лечения колоректального рака или аденокарциномы.

В одном конкретном воплощении предусмотрено применение специфичных к ММР9 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 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
35 красной волчанки.

В одном конкретном воплощении предусмотрено применение специфичных к ММР9 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 ММР9 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, коаркции аорты, атеросклероза, инфаркта миокарда, сердечной недостаточности, ишемической

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

В одном конкретном воплощении предусмотрено применение специфических к ММР9 антител либо их антиген-связывающих фрагментов по изобретению для получения 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 с ММР9 заболеваний, входящих в группу, состоящую из воспалительных и аутоиммунных 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 или любых других связанных с ММР9 заболеваний или расстройств, который включает введение терапевтически эффективного количества специфичного к ММР9 антитела либо его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению нуждающемуся в этом лицу.

В одном конкретном воплощении предусмотрен способ профилактики и/или лечения воспалительных и аутоиммунных заболеваний, воспалительных заболеваний кишечника, раковых заболеваний, фиброзных заболеваний, сердечнососудистых заболеваний, нервно-психиатрических заболеваний или глазных заболеваний, который включает введение терапевтически эффективного количества специфичного к ММР9 антитела либо его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению нуждающемуся в этом лицу.

В одном конкретном воплощении предусмотрен способ профилактики и/или лечения воспалительных и аутоиммунных 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

Шёгрена, системного склероза, полимиозита, атеросклероза, который включает введение терапевтически эффективного количества специфичного к ММР9 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 проникающей и стриктурирующей болезни Крона и язвенного колита, который включает введение терапевтически эффективного количества специфичного к ММР9 антитела либо его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению нуждающемуся в этом лицу.

В другом конкретном воплощении предусмотрен способ 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 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 количества специфичного к ММР9 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 гематопоетического 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 карциомы легких, аденокарциномы легких, 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 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 фибросклероза, склеродермальной реакции "трансплантат 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 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 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.

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, 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 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.

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 мембраны 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 переменную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 19 и переменную 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 ММР9, 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 ММР9 с поверхности данного твердого матрикса;

(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,

при этом более высокий уровень сигнала, обнаруженного в образце субъекта, чем уровень сигнала, обнаруженного в отрицательном контроле, указывает на повышенный уровень ММР9, связанный с воспалительным и/или аутоиммунным или раковым заболеванием.

Наборы

Один аспект изобретения касается набора, содержащего по меньшей мере одно 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.

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 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.

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 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 авидин либо антитело и антиген. После прикрепления пептидов к твердому матриксу этот твердый матрикс можно инкубировать с блокирующим раствором (содержащим блокирующий белок типа бычьего 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

5 иммуноанализа.

В соответствии с другим воплощением набор по изобретению дополнительно содержит по меньшей мере один промывочный реагент для отмывки 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 вышеприведенного описания и сопровождающих рисунков. Такие модификации должны входить в рамки прилагаемой формулы изобретения.

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

20 Примеры

Пример 1. Создание и выделение антител против ММР9 по изобретению

Антитела против ММР9 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 РВМСс 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 ММР9 человека или мыши (полноразмерные, про- и активированные формы) методом фагового дисплея, затем эти scFvs переводили в формат IgG1 и проверяли на функциональную нейтрализацию активности ММР9 (в частности, путем определения IC_{50} , видоспецифичности, типа нейтрализации (proММР9 или ММР9).

35

Эта стадия позволила идентифицировать 10 антител-кандидатов, которые подразделялись на два класса по механизму: те, которые блокируют активность ММР9 путем препятствия активации латентной proММР9 (свидетельствуя, что про-домен является частью эпитопа, распознаваемого этими антителами), и те, которые

40 непосредственно препятствуют каталитической активности активированной ММР9 (свидетельствуя, что домен CAT_{fn} является частью эпитопа, распознаваемого этими антителами).

2) Оптимизация "попаданий" (НО) путем перетасовки цепи V_L для созревания сродства

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. ингибирования 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 рТТ (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 антителами. Показано, что MMP3, которая считается физиологически значимым
- 15 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 сигнал флуоресценции (возбуждение при 485 нм, излучение при 520 нм) пропорционален
- 30 расщеплению желатинового субстрата, а тем самым и каталитической активности зрелого фермента MMP9. Сигналы флуоресценции наносили на график относительно концентрации антител и выводили значения полумаксимального ингибирования (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 каталитической активности на желатине

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 сравнительным 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 сравнительное антитело 1 было неактивным.

Этот результат означает, что антитело F20-VH-GL1-V4-V9/B08-VL-GL6c по изобретению является ингибитором ферментативной активности MMP9, тогда как сравнительное антитело 1 - нет.

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

Пример 3. Видоспецифичность некоторых антител против MMP9 по изобретению 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-крабоведа (суно), крысы или мыши.

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

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

Таблица 6. Действенность и эффективность антител против MMP9 по 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%

Таблица 7. Действенность и эффективность антител против MMP9 по нейтрализации про-MMP9 крысы или активной MMP9 крысы при анализе методами 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

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, аликвоты 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 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 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 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 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 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 показано, что они связаны с заболеваниями.

Дальнейшая характеристика антител против MMP9 по изобретению включала 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 предобработки APMA (ацетатом п-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, аликвоты различных активированных APMA форм pro-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-GL6с) 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 "метод MMP3/MMP9", описанный в примере 2. Вариант антитела F20-VH/B08-VLc по изобретению (F20-VH-GL1-V4-V9/B08-VL-GL6с) ингибирует 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 ингибирование (25% эффективность) при всех формах MMP9 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-GL6с) должна трансформироваться в превосходную эффективность у пациентов с высокими уровнями мономерной, димерной MMP9 и/или комплекса NGAL/MMP9 в сыворотке.

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, 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-GL6с), и сравнительное антитело 1 хорошо связываются с MMP3-активированной MMP9 (фиг. 10). Сравнительное антитело 1 хорошо связывается и с про-MMP9, но у варианта F20-VH/B08-VLc (F20-VH-GL1-V4-V9/B08-VL-GL6с) (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-GL6с) и 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-GL6с) 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

Пример 7. Картирование 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-GL6с.

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:

SEQ ID NO: 41: ¹⁵⁰AVTPLTFTRVYSRDADIVIQF¹⁷⁰ (соответствует положениям аминокислот 150-170 в MMP9 человека) (далее именуется участком 1),

SEQ ID NO: 42: ¹⁹⁸IQGDAHFDDELWSLGKGVVVPTRFG²²³ (соответствует положениям аминокислот 198-223 в MMP9 человека) (далее именуется участком 2) и

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 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 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 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 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 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 C 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 матриксом планшетах типа Transwell. Вставные мембраны транслунк (входящие в набор фирмы Cultrex - 3455-024) покрывали экстрактом базальных мембран (BME×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 ресуспендировали при $0,5 \times 10^6$ клеток/мл в среде голодания, содержащей 100 нг/мл РМА (форбол-12-миристан-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 матриксом 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 транслунк 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-V9/B08-VL-GL6c) против MMP-9 эффективно ингибирует 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 мембраны, то этот результат означает, что антитела против MMP9 по изобретению могли бы стать эффективным 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 (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 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 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 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 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 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 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 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 повреждению 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 фиброза у мышей с гетеротопическими трансплантатами

20

Главным признаком воспалительной болезни кишечника (IBD) является тяжелое повреждение ткани слизистой оболочки. Повреждение ткани запускает репарационные действия окружающих клеток. Быстрое закрытие раны важно для сокращения времени, в течение которого нарушается барьерная функция стенки кишечника, но чрезмерная

25 репарация ткани способствует фиброзу, обычному явлению при болезни Крона (CD). Фиброз приводит к образованию стриктур 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 стриктурами пациентов (Cosnes et al., 2002, *supra*).

30 Гетеротопическая 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 внутривенно 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 знавшие о типе эксперимента. Микроскопическую оценку проводили с помощью AxioCam MRc5 на микроскопе Zeiss Axiophot. 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 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 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 НСТ-116 толстой кишки человека

Клетки раковой линии НСТ-116 толстой кишки человека (1×10^7 клеток) вводили подкожно в правый бок мышей nude и давали им вырасти до $\approx 100 \text{ мм}^3$ перед началом обработки. Внутривенно вводили антитело против MMP9 по изобретению F20-VH/B08-VLc, вариант F20-VH-GL1-V4-V9/B08-VL-GL6c, или контрольное изотипное 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 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

```
mslwqplvlv llvlgccfaa prqrqstlvt fpgdlrtnlt drqlaeeyly rygytrvaem
rgeskslgpa llllqkqlsl petgeldsat lkamrtprcg vpdigrfqtg egdlkwhhhn
itywiqnyse dlpravidda farafalwsa vtpltftvvy srdadiviqt gvaehgdgyp
fdgkdglah afpppggiqg dahfdddelw slgkgvvvpt rfgnadgaac hfpfifegrs
ysacttdgrs dglpwcstta nytdtdrfgf cpserlytqd gnadgkpcqf pfifqgqsys
acttdgrsdg yrwcatany drdklfgfcp tradstvmgg nsagelcvfp ftflgkeyst
ctsegrgdgr lwcattsndf sddkwgfcps qgyslflvaa hefghalgld hssvpealmy
pmyrftgpp lkhddvngir hlygprpepe prpptttptq ptapptvcpt gpptvhpser
ptagptgpps agptgpptag pstattvpls pvddacnvni fdaiaaignq lyfkdgkyw
rfsegrgsrp qgpfliadkw palprkldsv feerlskklf ffsgrqvwvy tgasvlgpr
ldklglgadv aqvtgalrsg rgkmllfsgf rlwrfdvkaq mvdprasev drmfpgvpld
thdvfyrek ayfcqdrfyw rvssrselnq vdqvgvytyd ilqcped
```

Аминокислотная последовательность F20-VH-CDR1 тяжелой цепи

SEQ ID NO: 2: **DYPMH**

Аминокислотная последовательность F20-VH-CDR2 тяжелой цепи

SEQ ID NO: 3: **GISSNSGSGVGYADSVKG**

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: **GISSNSGSGVGYAESVKG**

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:

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISSN
SGSVGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARDKIYYGSGSYDFYY
YYGMDVWGQGTTVTVSS

Аминокислотная последовательность F20-VH-GL1 тяжелой цепи

SEQ ID NO: 12:

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISSN
SGSVGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDKIYYGSGSYDFYY
YYGMDVWGQGTTVTVSS

Аминокислотная последовательность F20-VH-GL1-V1 тяжелой цепи

SEQ ID NO: 13:

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISS
QSGSVGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDKIYYGSGSYDFY
YYYGMDVWGQGTTVTVSS

Аминокислотная последовательность F20-VH-GL1-V4 тяжелой цепи

SEQ ID NO: 14:

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISSR
SGSVGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDKIYYGSGSYDFYY
YYGMDVWGQGTTVTVSS

Аминокислотная последовательность F20-VH-GL1-V9 тяжелой цепи

SEQ ID NO: 15:

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISSN
 SGSVGYAESVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDKIYYGSGSYDFYY
 YYGMDVWGQGTTVTVSS

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

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISSN
 SGSVGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDKIYYGSGSYDFYY
 10 YYGIDVWGQGTTVTVSS

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

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISS
 15 QSGSVGYAESVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDKIYYGSGSYDFY
 YYYGMDVWGQGTTVTVSS

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

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISS
 20 QSGSVGYAESVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDKIYYGSGSYDFY
 YYYGIDVWGQGTTVTVSS

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

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISSR
 25 SGSVGYAESVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDKIYYGSGSYDFYY
 YYGMDVWGQGTTVTVSS

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

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISSR
 30 SGSVGYAESVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDKIYYGSGSYDFYY
 YYGIDVWGQGTTVTVSS

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

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

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

45 SSELTDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVVIYGKNNRP
 SGIPDRFSGSSSGNTVSLTITGAQAEDEADYYCQSRDNIGNHRVVLFGGGTKVTVLG

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

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDLSRSYYASWYQQKPGQAPVVVIYGKNNRP

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:

QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSNDVGAYNRVSWYQQHPGKAPKLLIYGVS

NRPSGVSTRFSGSKSGNTASLTISGLLADEADFYCTSYSSSTTSYVVFGGGTKVTVLG

Аминокислотная последовательность B08-VL-GL6 легкой цепи

SEQ ID NO: 30:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSNDVGAYNRVSWYQQHPGKAPKLMIYGVS

NRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADFYCTSYSSSTTSYVVFGGGTKVTVLG

Нуклеотидная последовательность F20-VH-CDR1 тяжелой цепи

SEQ ID NO: 31: gactaccccatgcac

Нуклеотидная последовательность F20-VH-CDR2 тяжелой цепи

SEQ ID NO: 32: ggcattctctccaactccggtccgtgggctacgccgactccgtgaagggc

Нуклеотидная последовательность F20-VH-CDR3 тяжелой цепи

SEQ ID NO: 33: gacaagatctactacggctccggtcctacgactctactactactacggcatggacgtg

Нуклеотидная последовательность B03-VL-CDR1 легкой цепи

SEQ ID NO: 34: caaggcgattctctgctcatattatgcttc

Нуклеотидная последовательность B03-VL-CDR2 легкой цепи

SEQ ID NO: 35: ggaaaaaacaaccgaccatct

Нуклеотидная последовательность B03-VL-CDR3 легкой цепи

SEQ ID NO: 36: caatctcgagacaatataggaaccatagagtgttctg

Нуклеотидная последовательность B08-VL-CDR1 легкой цепи

SEQ ID NO: 37: acaggaacgtctaatgatgtgggggcttacaatcgcgctcagt

Нуклеотидная последовательность B08-VL-CDR2 легкой цепи

SEQ ID NO: 38: ggcgtgtctaacaggcctagc

Нуклеотидная последовательность B08-VL-CDR3 легкой цепи

SEQ ID NO: 39: acaagctacagtagcagtagcaccatcatatgtcgtc

Аминокислотная последовательность генноинженерной константной области тяжелой цепи IgG4 человека

SEQ ID NO: 40:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 5 QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG

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

15 SEQ ID NO: 42: IQGDAHFDDELWSLGKGVVVPTRFG

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:

QVQLKESGPGGLVAPSQSLSTCTVSGFSLLSYGVHWVRQPPGKGLEWLGVIWTG
 GTTNYNSALMSRLSISKDDSKSQVFLKMNSLQTDITAIYYCARYYYGMDYWGQGTSTV
 25 TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
 LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
 30 QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG

Аминокислотная последовательность легкой цепи сравнительного антитела 1

(известного как AB0041)

35 SEQ ID NO: 45:

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVRNTVAWYQQKTGQSPKLLIYSSSYR
 NTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYFCQGHYITPYTFGGGTKLEIKRTVAAPS
 VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
 40 SLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи сравнительного антитела 2

(известного как 539A-M0240-B03)

SEQ ID NO: 46:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYQMVWVRQAPGKGLEWVSVIYPS
 GGPTVYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDYYDSSGPGAFD
 IWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
 5 SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH
 TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
 10 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

SEQ ID NO: 47:

15 QYELTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVS
 KRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDADYYCCSYAGSYTLVFGGGTKLTVLGQP
 KANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQS
 NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

20 Аминокислотная последовательность F20-VH-GL2 тяжелой цепи

SEQ ID NO: 48:

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISSN
 25 SGSVGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDKIYYGSGSYDFY
YYGMDVWGQGTTVTVSS

Аминокислотная последовательность F20-VH-CDR2-V2 тяжелой цепи

SEQ ID NO: 49: **GISSHS**SGSVGYADSVKG

Аминокислотная последовательность F20-VH-CDR2-V3 тяжелой цепи

30 SEQ ID NO: 50: **GISSKS**SGSVGYADSVKG

Аминокислотная последовательность F20-VH-CDR2-V11 тяжелой цепи

SEQ ID NO: 51: **GISSNS**SGSVGYADTVKG

Аминокислотная последовательность F20-VH-CDR3-V13 тяжелой цепи

35 SEQ ID NO: 52: **DKIYYGSGSYDFY**YYGLDV

Аминокислотная последовательность F20-VH-GL1-V2 тяжелой цепи

SEQ ID NO: 53:

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISS
 40 HSGSVGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDKIYYGSGSYDFY
YYYGMDVWGQGTTVTVSS

Аминокислотная последовательность F20-VH-GL1-V3 тяжелой цепи

SEQ ID NO: 54:

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISS
 45 KSGSVGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDKIYYGSGSYDFY
YYYGMDVWGQGTTVTVSS

Аминокислотная последовательность F20-VH-GL1-V11 тяжелой цепи

SEQ ID NO: 55:

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISSN
SGSVGYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDKIYYGSGSYDFYY
YYGMDVWGQGTTVTVSS

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

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISSN
SGSVGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDKIYYGSGSYDFYY
YYGLDVWGQGTTVTVSS

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

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDLSRYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRP
SGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCQSRDNIGNHRVVLFGGGTKLTVL

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

QSALTQPRSVSGSPGQSITISCTGTSNDVGAYNRVSWYQQHPGKAPKLLIYGVS
NRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADFYCTSYSSSTTSYVVF
GGGTKVTVL

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

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSNDVGAYNRVSWYQQHPGKAPKLLIYGVS
NRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADFYCTSYSSSTTSYVVF
GGGTKVTVL

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

QSALTQPRSVSGSPGQSITISCTGTSNDVGAYNRVSWYQQHPGKAPKLLIYGVS
NRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCTSYSSSTTSYVVF
GGGTKVTVL

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

QSALTQPRSVSGSPGQSITISCTGTSNDVGAYNRVSWYQQHPGKAPKLLIYGVS
NRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADFYCTSYSSSTTSYVVF
GGGTKVTVL

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

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSNDVGAYNRVSWYQQHPGKAPKLLIYGVS
NRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCTSYSSSTTSYVVF
GGGTKVTVL

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

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSNDVGAYNRVSWYQQHPGKAPKLLIYGVS
NRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCTSYSSSTTSYVVF
GGGTKVTVL

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

SEQ ID NO: 64:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYPMWWVRQAPGKGLEWVSYIVP
 SGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRA YGDYVGWNG
 FDYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGA
 5 LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
 10 KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
 DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

SEQ ID NO: 65:

15 DIQMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSFLAWYQQKPGQAPRLLIYDASYRAT
 GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRGNWPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIF
 PPSDEQLKSGTASVVC LLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS
 TLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20 Аминокислотная последовательность генноинженерной константной области легкой
 цепи IgG4 человека

SEQ ID NO: 66:

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET
 25 TTPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Аминокислотная последовательность B03-VLc легкой цепи

SEQ ID NO: 67:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGD SLRSYYASWYQQKPGQAPVVVIYGKNNRP
 30 SGIPDRFSGSSSGNTVSLTITGAQAEDEADY YCQSRDNIGNHRVVLFGGGTKVTVL

Аминокислотная последовательность B03-VL-GL1c легкой цепи

SEQ ID NO: 68:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGD SLRSYYASWYQQKPGQAPVVVIYGKNNRP
 35 SGIPDRFSGSSSGNTVSLTITGAQAEDEADY YCQSRDNIGNHRVVLFGGGTKLTVL

Аминокислотная последовательность B08-VLc легкой цепи

SEQ ID NO: 69:

QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSNDVGAYNRVSWYQQHPGKAPKLLIYGVS
 40 NRPSGVSTRFSGSKSGNTASLTISGLLADEADFYCTSYSSSTTSYVVVFGGGTKVTVL

Аминокислотная последовательность B08-VL-GL6c легкой цепи

SEQ ID NO: 70:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSNDVGAYNRVSWYQQHPGKAPKLMIYGV
 45 NRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADFYCTSYSSSTTSYVVVFGGGTKVTVL

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:

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISSQSGSV
 GYAESVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDKIYYGSGSYDFYYYYYG
 MDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
 5 LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPP
 CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEV
 HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP
 10 REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDG
 SFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

Аминокислотная последовательность, объединяющая переменную 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:

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISSQSGSV
 GYAESVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDKIYYGSGSYDFYYYYGI
 DVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
 20 TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPP
 CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEV
 HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP
 25 REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDG
 SFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

Аминокислотная последовательность, объединяющая переменную 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:

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISSRSGSV
 GYAESVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDKIYYGSGSYDFYYYYYG
 MDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
 35 LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPP
 CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEV
 HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP
 40 REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDG
 SFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

Аминокислотная последовательность, объединяющая переменную 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:

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYPMHWVRQAPGKGLEWVSGISSR
 SGSVGYAESVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDKIYYGSGSYDFYY
 YYGIDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 5 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK
 YGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK
 GQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
 10 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG

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

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
 Gly Asp Leu Arg Thr Asn Leu Thr Asp Arg Gln Leu Ala Glu Glu Tyr
 30 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 Leu Gln Lys Gln Leu Ser Leu
 65 70 75 80
 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
 Asp Leu Lys Trp His His His Asn Ile Thr Tyr Trp Ile Gln Asn Tyr
 40 115 120 125
 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
 Ser Arg Asp Ala Asp Ile Val Ile Gln Phe Gly Val Ala Glu His Gly
 45 165 170 175
 Asp Gly Tyr Pro Phe Asp Gly Lys Asp Gly Leu Leu Ala His Ala Phe
 180 185 190

RU 2714 043 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
		210					215					220				
5	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
				245					250						255	
	Ser	Thr	Thr	Ala	Asn	Tyr	Asp	Thr	Asp	Asp	Arg	Phe	Gly	Phe	Cys	Pro
10				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
	290						295					300				
15	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
20				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
	370					375					380					
25	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
30				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	Thr	Pro	Gln	Pro	Thr	Ala	Pro
	450						455					460				
35	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
40				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				
45	Gly	Arg	Gly	Ser	Arg	Pro	Gln	Gly	Pro	Phe	Leu	Ile	Ala	Asp	Lys	Trp
	545					550					555					560
	Pro	Ala	Leu	Pro	Arg	Lys	Leu	Asp	Ser	Val	Phe	Glu	Glu	Arg	Leu	Ser
				565						570					575	

RU 2714 043 C2

Lys Lys Leu Phe 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 Tyr
 1 5 10 15
 Gly Met Asp Val
 20

<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

```

RU 2714 043 C2

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 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 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

RU 2714 043 C2

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 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 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

RU 2714 043 C2

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 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 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

RU 2714 043 C2

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 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 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

RU 2 714 043 C2

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

RU 2714 043 C2

```

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 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 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
45 <210> 27
<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 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

RU 2 714 043 C2

	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 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	
	gactaccccca tgcac	15
	<210> 32	
	<211> 51	
20	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> heavy chain F20-VH-CDR2	
	<400> 32	
25	ggcatctcct ccaactccgg ctccgtgggc tacgccgact 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	

ggaaaaaaca 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 gggggccttac aatcgcgctca 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 gtagcagtag 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 2714 043 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
 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
 100 105 110
 40 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 2714 043 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 2 714 043 C2

	50		55		60												
	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Ala	
	65					70					75					80	
	Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	His	Tyr	Ile	Thr	Pro	Tyr	
5					85					90					95		
	Thr	Phe	Gly	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	
										135				140			
	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	
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	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
30	1				5					10					15		
	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					80	
	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 2714 043 C2

	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		
5	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn
				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
10	225					230				235						240
	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		
15	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
		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
20	305					310				315						320
	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			
25	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						
	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
30	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
				420				425					430			
35	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														
	<210>	47														
40	<211>	216														
	<212>	PRT														
	<213>	Artificial Sequence														
	<220>															
	<223>	light chain of comparative antibody 2														
45	<400>	47														
	Gln	Tyr	Glu	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	Ser	Asp	Val	Gly	Gly	Tyr

RU 2714 043 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	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 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 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
 30 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 Phe Tyr Cys Thr Ser Tyr Ser Ser Ser
 85 90 95
 35 Thr Thr Ser Tyr Val Val Phe Gly 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

RU 2 714 043 C2

	35		40		45												
	Leu	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	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				15			
	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					80	
	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	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu	
30				100					105					110			
	<210>	61															
	<211>	112															
	<212>	PRT															
	<213>	Artificial Sequence															
	<220>																
35	<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				15			
	Ser	Ile	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Asn	Asp	Val	Gly	Ala	Tyr	
40				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					80	
	Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Phe	Tyr	Cys	Thr	Ser	Tyr	Ser	Ser	Ser	

RU 2 714 043 C2

				85					90					95			
	Thr	Thr	Ser	Tyr	Val	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu	
				100					105					110			
	<210>	62															
5	<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				80		
	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	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				80		
	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	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 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 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 2 714 043 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 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 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 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 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 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 Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 70

<211> 112

<212> PRT

40 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> light chain B08-VL-GL6c

<400> 70

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
 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 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 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 2714 043 C2

	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
5				260					265						270	
	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		
10	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
15				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				
20	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
25				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										
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	

RU 2714 043 C2

	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											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
	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
	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
	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

RU 2714 043 C2

	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						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					40					45	
35	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	
	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
 Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 10 225 230 235 240
 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 вариabельную 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

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.

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 переменная 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 переменная 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 переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность согласно (a) и переменная 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
- 40 последовательность SEQ ID NO: 24,
- 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.

35 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.

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

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 культивирование клеток-хозяев, трансформированных экспрессирующим вектором, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей данные антитела или их фрагменты, в условиях, достаточных для экспрессирования данных антител или их фрагментов.

21. Фармацевтическая композиция для использования в целях профилактики или лечения связанного с MMP9 заболевания, включающая одно или несколько из эффективного количества антитела, специфичного к MMP9, либо его антигенсвязывающего 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 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-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;

(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

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

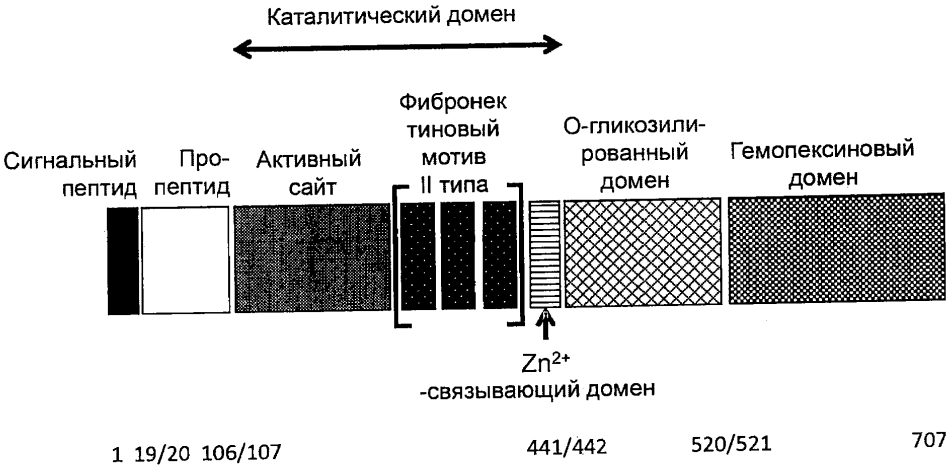
причем интенсивность сигнала коррелирует с концентрацией белка MMP9 в биологическом образце.

25. Способ ex vivo по п. 24 для выявления присутствия и/или концентрации активного 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

1/20



Фиг. 1

2

Человек
Макака
Крыса
Мышь

Человек
Макака
Крыса
Мышь

Человек
Макака
Крыса
Мышь

Человек
Макака
Крыса
Мышь

Человек
Макака
Крыса
Мышь

Фиг. 2

Человек
Макака
Крыса
Мышь

Человек
Макака
Крыса
Мышь

Человек
Макака
Крыса
Мышь

Человек
Макака
Крыса
Мышь

Человек
Макака
Крыса
Мышь

Фиг. 2 (продолжение)

Человек
Макака
Крыса
Мышь

Человек
Макака
Крыса
Мышь

Человек
Макака
Крыса
Мышь

Человек
Макака
Крыса
Мышь

ФИГ. 2 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

5/20

Фиг. 3

```
*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
```

*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

*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

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

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

Фиг. 3 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

8/20

	CDR1	CDR2
*B03-VL	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCOGDSLRSYYASWYQQKPGQAPFVVVIYGKNNRPSGIPDR	
*B03-VL-GL1	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCOGDSLRSYYASWYQQKPGQAPFVVVIYGKNNRPSGIPDR	

	CDR3	
*B03-VL	FSGSSSGNTVSLTITGAQAEDEADYYCQSRDNIGNHRVVLFGGGTKVTVLQGPKAAPSVT	
*B03-VL-GL1	FSGSSSGNTVSLTITGAQAEDEADYYCQSRDNIGNHRVVLFGGGTKVTVLQGPKAAPSVT	

*B03-VL	LFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNKNKYAASS	
*B03-VL-GL1	LFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNKNKYAASS	

*B03-VL	YLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	
*B03-VL-GL1	YLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	

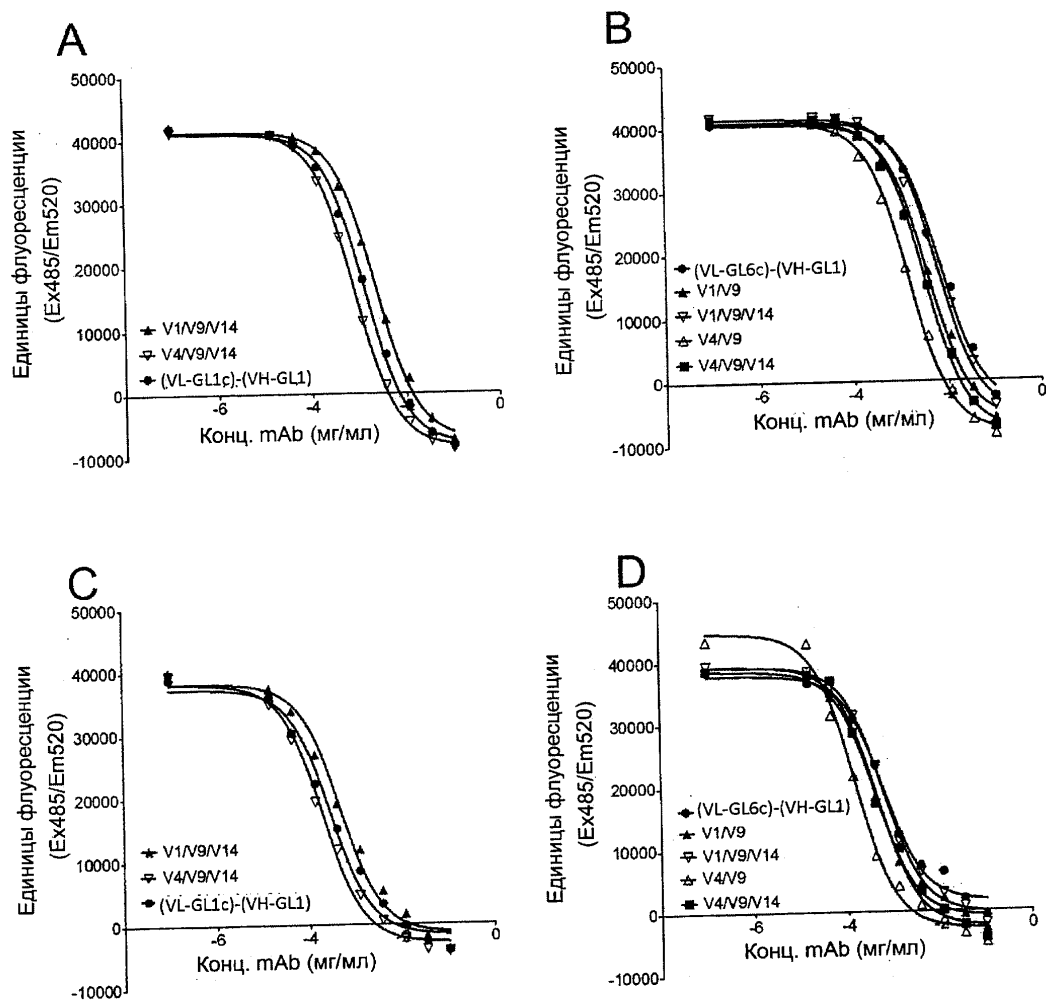
Фиг. 4

9/20

	CDR1	CDR2
*B08-VL	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSNDVGAYNRVSWYQQHPGKAPKLLIYGVSNRPSGV	
*B08-VL-GL6	QSALTQPASVSGSPGQSVTISCTGTSNDVGAYNRVSWYQQHPGKAPKLLIYGVSNRPSGV	
	*****	*****
	CDR3	
*B08-VL	STRFSGSKSGNTASLTISGLLADEADFYCTSYSSSTTSYVVFEGGKVTVLGQPKAAPS	
*B08-VL-GL6	SNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDEADFYCTSYSSSTTSYVVFEGGKVTVLGQPKAAPS	
	*****	*****
	*****	*****
*B08-VL	VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAA	
*B08-VL-GL6	VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAA	
	*****	*****
	*****	*****
*B08-VL	SSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	
*B08-VL-GL6	SSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	
	*****	*****
	*****	*****

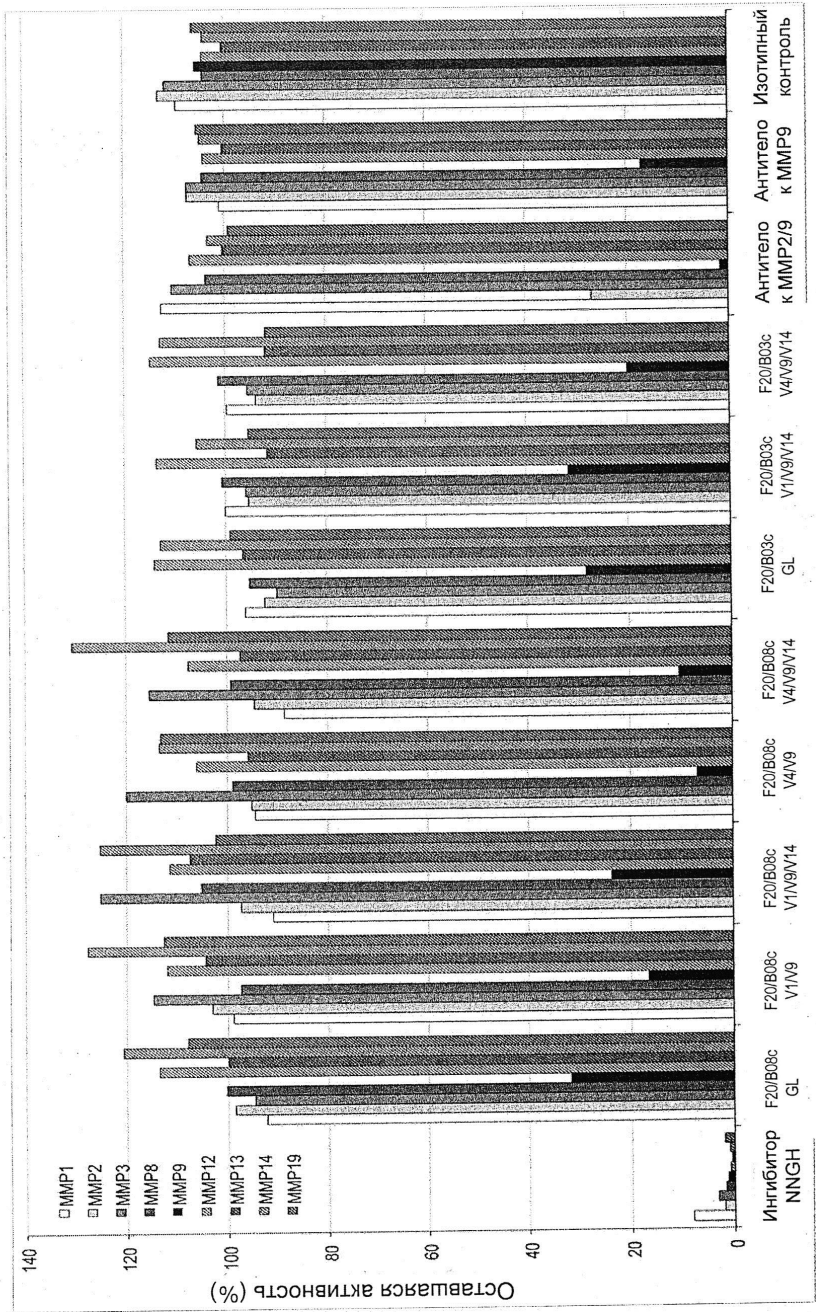
Фиг. 5

10/20



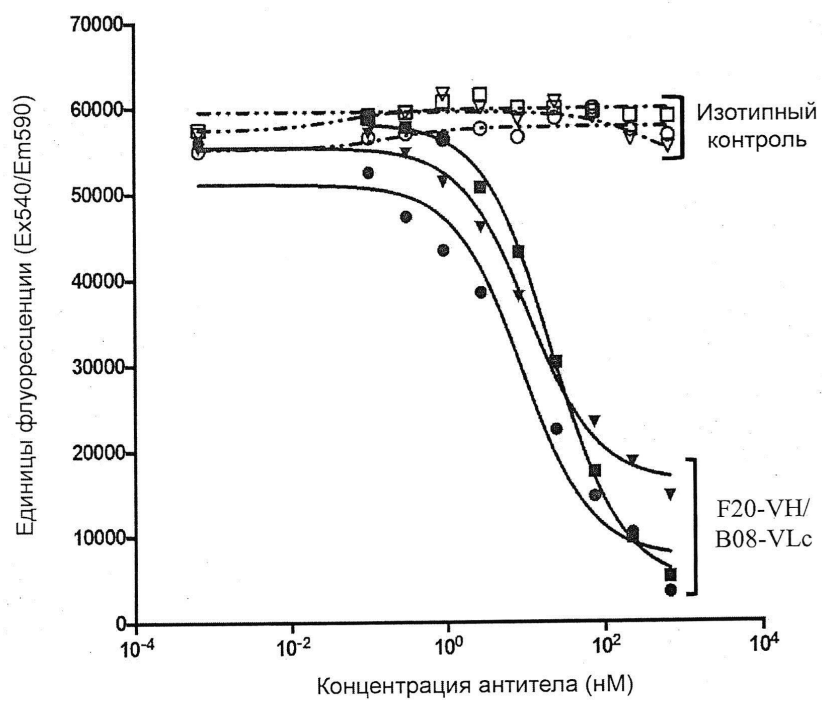
Фиг. 6

11/20



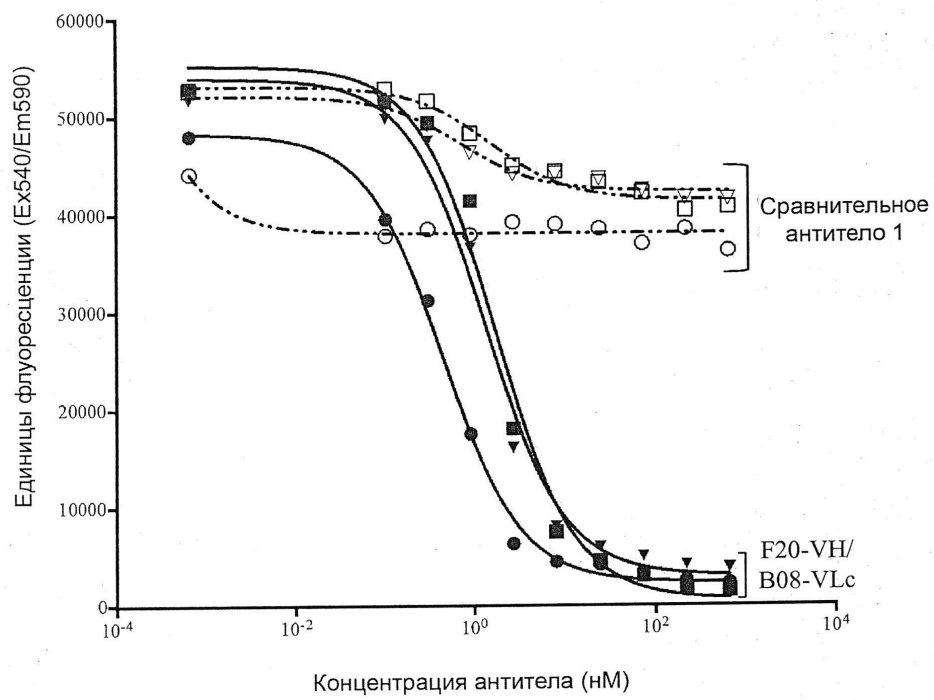
Фиг. 7

12/20



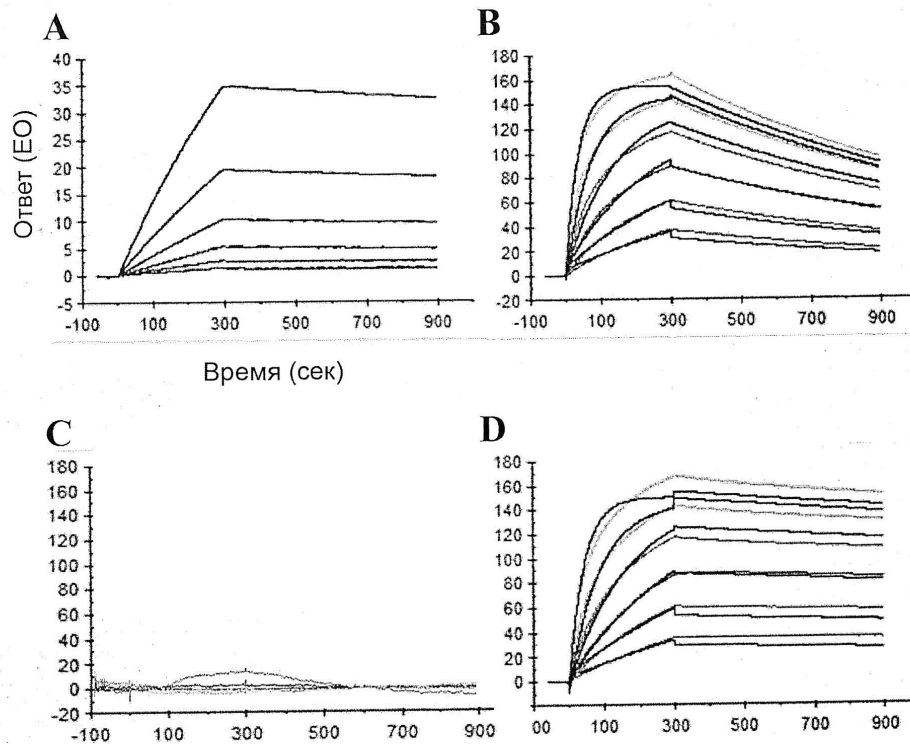
Фиг. 8

13/20



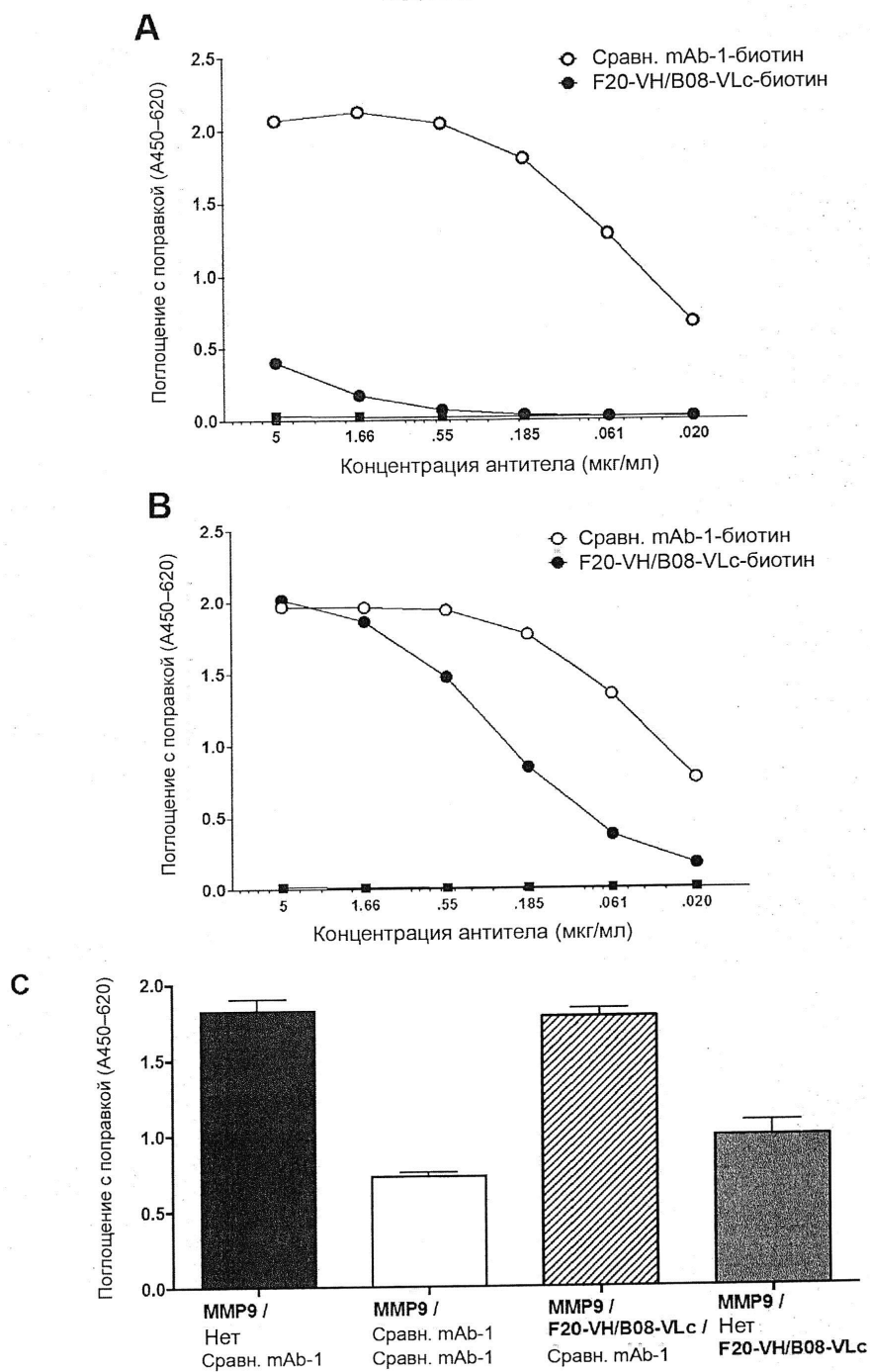
Фиг. 9

14/20



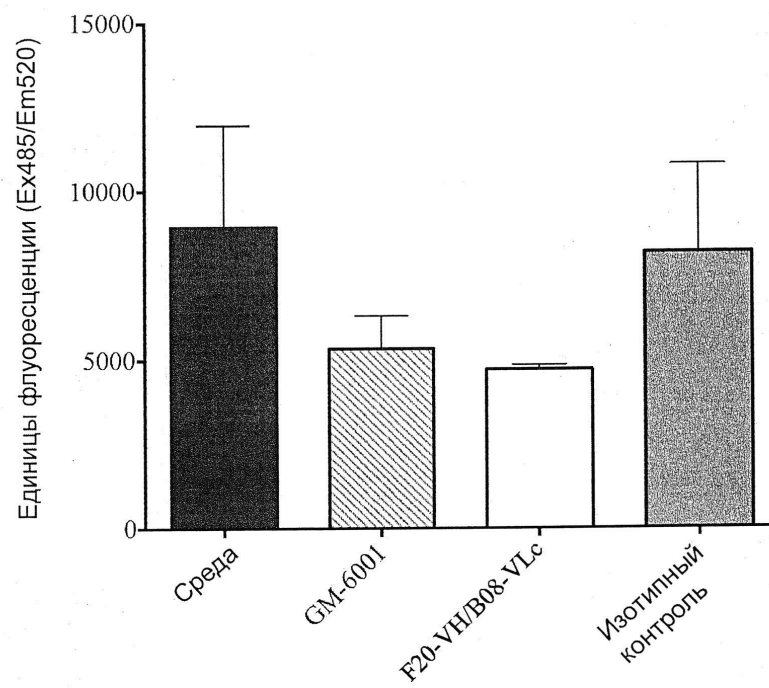
Фиг. 10

15/20



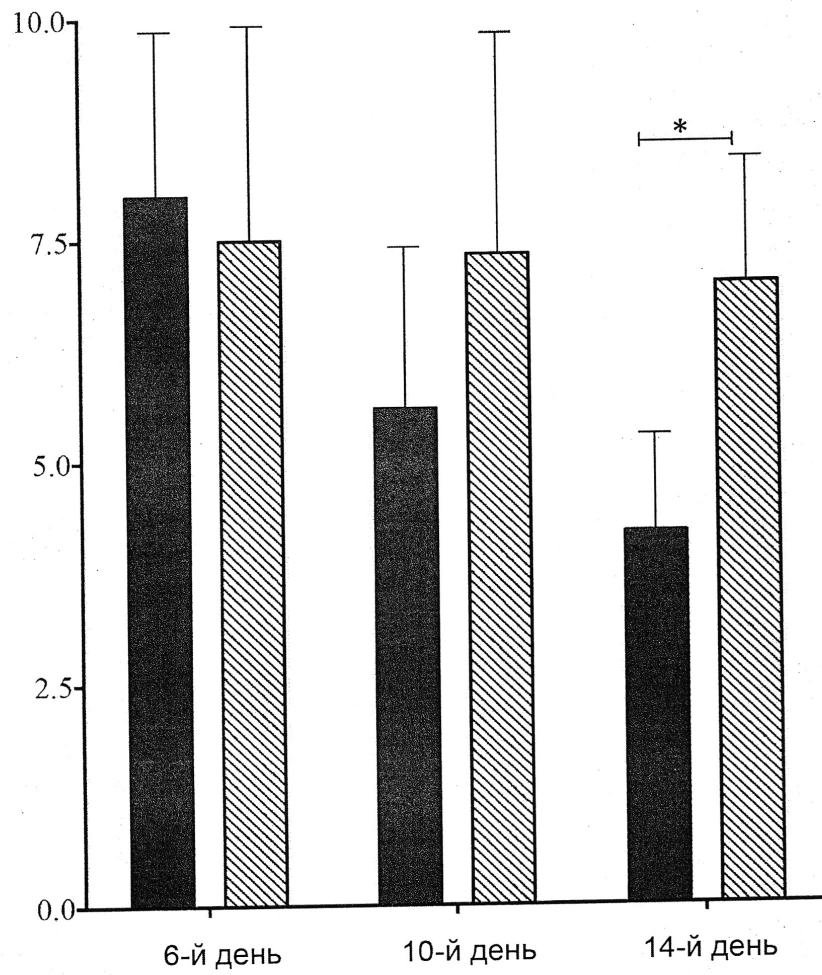
Фиг. 11

16/20



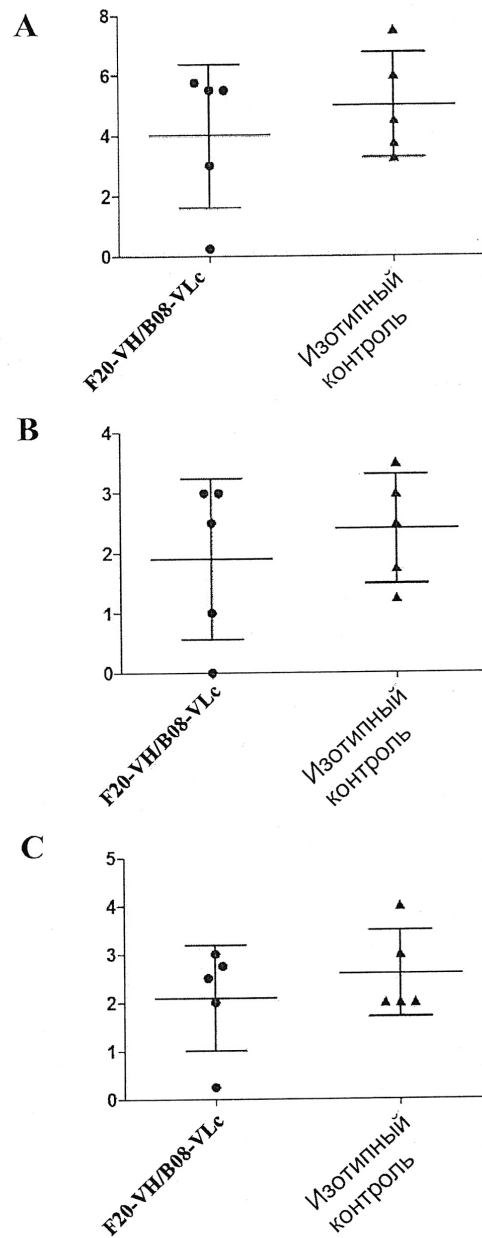
Фиг. 12

17/20



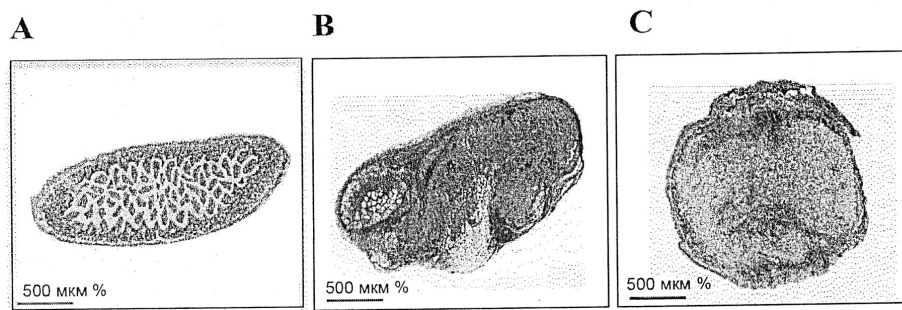
Фиг. 13

18/20



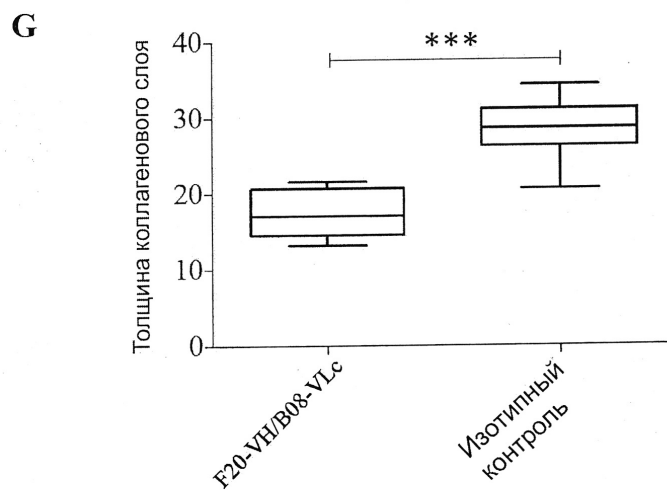
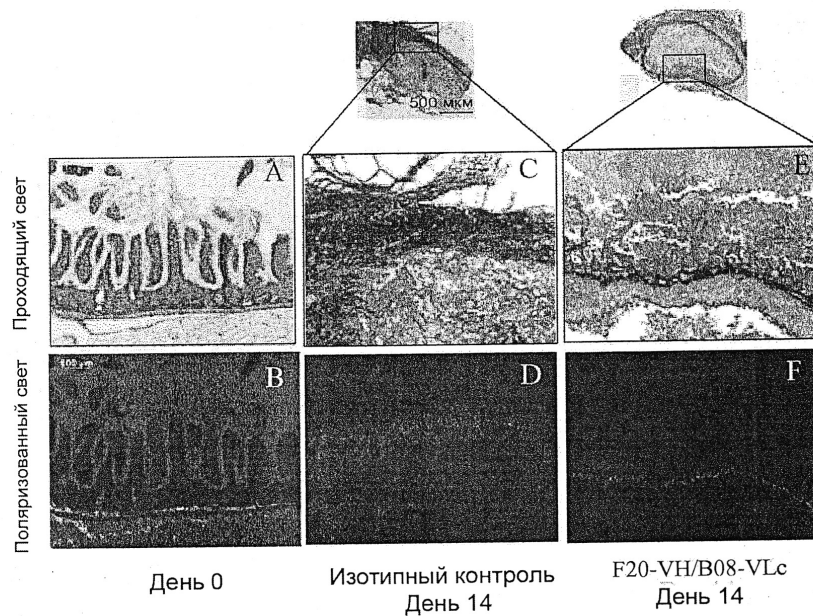
Фиг. 14

19/20



Фиг. 15

20/20



Фиг. 16