

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 048006

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.10.21

(21) Номер заявки
202191470

(22) Дата подачи заявки
2019.11.25

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА, СПЕЦИФИЧНО РАСПОЗНАЮЩИЕ РЕЦЕПТОР-АЛЬФА
ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО
ФАКТОРА, И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) PCT/CN2018/117581

(32) 2018.11.27

(33) CN

(43) 2021.09.07

(86) PCT/CN2019/120545

(87) WO 2020/108423 2020.06.04

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СТЕЙДСОН (БЕЙДЖИН)
БИОФАРМАСЬЮТИКАЛЗ КО., ЛТД.
(CN)

(72) Изобретатель:
Чжу Пинся, У Жань, Чжан Циншуан,
Хуан Цюнь (CN)

(74) Представитель:
Хмара М.В. (RU)

(56) CN-A-101443360
CN-A-101443360
CN-A-103193882
CN-A-103193882

(57) Согласно настоящему изобретению предложены антитела, в том числе их антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично распознают рецептор гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSFR α). Также предложены способы получения и применения этих антител.

048006

B1

048006

B1

Представление перечня последовательностей в текстовом файле в формате ASCII

Содержимое указанного ниже документа, представленного в текстовом файле в формате ASCII (Стандартный американский код обмена информацией), включено в данное описание посредством ссылки во всей своей полноте: а именно, машиночитаемой формы (CRF) Перечня последовательностей (с названием файла: 710262000140SEQLIST.txt, датой создания: 7 ноября 2018 г., размером: 248 кБ (килобайт)).

Область техники, к которой относится изобретение

Эта заявка относится к антителам, которые специфично распознают рецептор-альфа гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSFR α), и способам их получения и применения, в том числе способам лечения аутоиммунных и воспалительных состояний и рака.

Предшествующий уровень техники

Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) также известен как колониестимулирующий фактор 2 (CSF2). GM-CSF представляет собой провоспалительный цитокин I типа, который играет роль в обострении воспалительных, респираторных и аутоиммунных заболеваний. Рецептор GM-CSF является членом надсемейства рецепторов гемопоэтической системы. Он является гетеродимерным белком, состоящим из альфа- и бета-субъединиц. GM-CSF способен связываться с относительно низкой аффинностью с отдельно взятой α -субъединицей (K_d (константа диссоциации) 1-5 нМ), но совсем не связывается с отдельно взятой β -субъединицей. Однако, присутствие обеих α - и β -субъединиц приводит к образованию высокоаффинного лиганд-рецепторного комплекса (K_d примерно 100 пМ). Поэтому подавление связывания GM-CSF с GM-CSFR α представляет собой терапевтический подход к лечению заболеваний и состояний, опосредуемых GM-CSFR. Антитело к GM-CSFR α человека, обозначенное как маврилимуаб (моноклональное антитело (Mab), используемое в качестве контроля в разделе примеры), описано в WO2007110631.

Описания всех публикаций, патентов, патентных заявок и опубликованных патентных заявок, упомянутых в данном документе, тем самым включены в данную заявку посредством ссылки во всей своей полноте.

Краткое описание сущности данного изобретения

Согласно одному из аспектов настоящего изобретения предложено выделенное антитело к GM-CSFR α , которое специфично связывается с эпитопом на GM-CSFR α человека, при этом данный эпитоп содержит один, два, три, четыре, пять или шесть остатков аминокислот, выбранных из группы, состоящей из Val50, Glu59, Lys194, Lys195, Arg283 и Ile284 GM-CSFR α человека. В некоторых воплощениях эпитоп дополнительно содержит аминокислотные остатки: (1) Val51, Thr63 и Ile196; (2) Leu191 и Ile196; или (3) Arg49, Val51, Asn57 и Ser61. В некоторых воплощениях выделенное антитело к GM-CSFR α связывается с GM-CSFR α человека с K_d от примерно 0,1 пМ до примерно 1 нМ.

В некоторых воплощениях, соответствующих любому из выделенных антител к GM-CSFR α , описанных выше, выделенное антитело к GM-CSFR α содержит: варибельный домен тяжелой цепи (V_H), содержащий определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (HC-CDR1), содержащий $X_1X_2X_3H$ (SEQ ID NO: 76), где X_1 представляет собой E, N, G, D, M, S, P, F, Y, A, V, K, W, R или C, X_2 представляет собой S, C или P, и X_3 представляет собой I или M; HC-CDR2, содержащий $GFDX_1X_2X_3X_4EX_5X_6YAQKX_7QG$ (SEQ ID NO: 77), где X_1 представляет собой P, G, T, S или V, X_2 представляет собой E, D, G или A, X_3 представляет собой D, G, I, W, S или V, X_4 представляет собой G, E, D или H, X_5 представляет собой T или A, X_6 представляет собой N или I, и X_7 представляет собой S или F; и HC-CDR3, содержащий $GRYX_1X_2X_3X_4X_5X_6YGFDDY$ (SEQ ID NO: 78), где X_1 представляет собой C, T, S, I, A или V, X_2 представляет собой S, G, E, F, W, H, I, V, N, Y, T или R, X_3 представляет собой T, H, L, F, P, I, S, Y, K, A, D, V, N или G, X_4 представляет собой D, A, M, Y, F, S, T, G или W, X_5 представляет собой T, S, F, Q, A, N, L, E, I, G или M, и X_6 представляет собой C, T, N, S или A; и варибельный домен легкой цепи (V_L), содержащий определяющий комплементарность участок 1 легкой цепи (LC-CDR1), содержащий $RAX_1X_2X_3VX_4X_5X_6LA$ (SEQ ID NO: 293), где X_1 представляет собой S, L, N, A, K, R, I, Q, G, T, H, M или C, X_2 представляет собой Q, Y, P, A, I, F, T, R, V, L, E, S или C, X_3 представляет собой S, H, W, L, R, K, T, P, I, F, V, E, A или Q, X_4 представляет собой S, L, W, M, A, Y, K, R, G, T, E, V, N, F или C, X_5 представляет собой S, T, R, A, H, Q, P, M, L или G, и X_6 представляет собой Y, L или F; LC-CDR2, содержащий $X_1X_2X_3S\ RAT$ (SEQ ID NO: 294), где X_1 представляет собой S, A, W, R, L, T, Q, F, Y, H или N; и LC-CDR3, содержащий $QQYX_1X_2X_3PX_4T$ (SEQ ID NO: 79), где X_1 представляет собой N, D, S, R, A, T, L, Y, Q, W или G, X_2 представляет собой N, D, E, T, Y, G, A, M, F, S, I или L, X_3 представляет собой W, S, P, V, G или R, и X_4 представляет собой P, Y, H, S, F, N, D, V или G. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α содержит: V_H , содержащий HC-CDR1, содержащий ELX_1X_2H (SEQ ID NO: 295), где X_1 представляет собой S, C или P, и X_2 представляет собой I или M; HC-CDR2, содержащий $GFDX_1X_2X_3X_4EX_5X_6YAQKX_7QG$ (SEQ ID NO: 77), где X_1 представляет собой P, G, T, S или V, X_2 представляет собой E, D, G или A, X_3 представляет собой D, G, I, W, S или V, X_4 представляет собой G, E, D или H, X_5 представляет собой T

В некоторых воплощениях предложено выделенное антитело к GM-CSFR α , содержащее V_H, содержащий HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3 V_H, содержащего аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 80-121; и V_L, содержащий LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3 из V_L, содержащего аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 122-144.

- 2 -

их вариант, содержащий примерно до 5 аминокислотных замен в указанных HC-CDR; и V_L, содержащий LC-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, LC-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52, и LC-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57, или их вариант, содержащий примерно до 5 аминокислотных замен в указанных LC-CDR; (7) V_H, содержащий HC-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HC-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и HC-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, или их вариант, содержащий примерно до 5 аминокислотных замен в указанных HC-CDR; и V_L, содержащий LC-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, LC-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52, и LC-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, или их вариант, содержащий примерно до 5 аминокислотных замен в указанных LC-CDR; (8) V_H, содержащий HC-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, HC-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и HC-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, или их вариант, содержащий примерно до 5 аминокислотных замен в указанных HC-CDR; и V_L, содержащий LC-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, LC-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52, и LC-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57, или их вариант, содержащий примерно до 5 аминокислотных замен в указанных LC-CDR; (9) V_H, содержащий HC-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, HC-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и HC-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50, или их вариант, содержащий примерно до 5 аминокислотных замен в указанных HC-CDR; и V_L, содержащий LC-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, LC-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52, и LC-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57, или их вариант, содержащий примерно до 5 аминокислотных замен в указанных LC-CDR.

В некоторых воплощениях, соответствующих любому из выделенных антител к GM-CSFR α , описанных выше, выделенное антитело к GM-CSFR α содержит аминокислотные остатки: (1) E, H, N, G, D, M, S, P, F, Y, A, V, K, W, R или C в положении 31 V_H; и/или (2) S, L, N, A, K, R, I, Q, G, T, H, M или C в положении 26 V_L; и/или (3) Q, Y, P, A, I, F, T, R, V, L, E, S или C в положении 27 V_L; и/или (4) S, H, W, L, R, K, T, P, I, F, V, E, A или Q в положении 28 V_L; и/или (5) S, L, W, M, A, Y, K, R, G, T, E, V, N, F или C в положении 30 V_L; и/или (6) S, T, R, A, H, Q, P, M, L или G в положении 31 V_L; и/или (7) Y, L или F в положении 32 V_L; и/или (8) G или T в положении 50 V_L; и/или (9) A, G, R, H, K, S, T, M, F, N или V в положении 51 V_L; и/или (10) S, A, W, R, L, T, Q, F, Y, H или N в положении 52 V_L; и/или (11) D, A, Q, или W в положении 92 V_L; и/или (12) N, D, E, T, Y, G, A, M, F, S, I или L в положении 93 V_L; и/или (13) аминокислотные остатки, выбранные из T, H, V, E, P, L, M, S, W, C, A, G, N или K в положении 28 V_H; и/или (14) аминокислотные остатки, выбранные из T, P, D, E, Y, W, V, M, N, L, Q, G, S, A, K или R в положении 30 V_H, при этом нумерация соответствует EU-индексу по Kabat. В некоторых воплощениях, соответствующих любому из выделенных антител к GM-CSFR α , описанных выше, выделенное антитело к GM-CSFR α содержит: V_H, содержащий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 80-121 и 246-287 или ее вариант, имеющий по меньшей мере примерно 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 80-121 и 246-287; и V_L, содержащий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 122-144, 150-245 и 288-289 или ее вариант, имеющий по меньшей мере примерно 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 122-144, 150-245 и 288-289. В некоторых воплощениях выделенное антитело к GM-CSFR α содержит: (1) V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80; и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 123; (2) V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85; и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125; (3) V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86; и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126; (4) V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91; и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126; (5) V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99; и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122; (6) V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101; и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126; (7) V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103; и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 123; (8) V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99; и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126; (9) V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 121; и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126; (10) V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 250; и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 241; (11) V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 250; и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 193; (12) V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 248;

и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 188; (13) V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 248; и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 193; (14) V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 250; и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 288; (15) V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 250; и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 188; (16) V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 250; и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 236; или (17) V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91; и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 288.

В некоторых воплощениях предложено выделенное антитело к GM-CSFR α , которое специфично связывается с GM-CSFR α , конкурируя с любым из выделенных антител к GM-CSFR α , которые описаны выше. В некоторых воплощениях предложено выделенное антитело к GM-CSFR α , которое специфично связывается с тем же эпитопом, что и любое из выделенных антител к GM-CSFR α , которые описаны выше.

В некоторых воплощениях, соответствующих любому из выделенных антител к GM-CSFR α , описанных выше, выделенное антитело к GM-CSFR α содержит Fc фрагмент. В некоторых воплощениях выделенное антитело к GM-CSFR α представляет собой полноразмерное антитело IgG типа. В некоторых воплощениях выделенное антитело к GM-CSFR α представляет собой полноразмерное антитело IgG1 или IgG4 подтипа. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α является химерным, человеческим или гуманизированным.

В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, выбранный из группы, состоящей из Fab, Fab', F(ab')₂, Fab'-SH, одноцепочечного Fv (scFv), вариабельного фрагмента (Fv), однодоменного антитела (dAb), Fd, нанотела, диатела и линейного антитела.

В некоторых воплощениях предложена(ы) выделенная(ые) молекула(ы) нуклеиновой кислоты, которая(ые) кодирует(ют) любое из антител к GM-CSFR α , описанных выше. В некоторых воплощениях предложен вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, соответствующую любой из молекул нуклеиновой кислоты, описанных выше. В некоторых воплощениях предложена клетка-хозяин, содержащая любое из антител к GM-CSFR α , описанных выше, любое из молекул нуклеиновой кислоты, описанных выше, или любой из векторов, описанных выше. В некоторых воплощениях предложен способ получения антитела к GM-CSFR α , включающий: а) культивирование любой из клеток хозяина, описанных выше, в условиях, эффективных для экспрессии антитела к GM-CSFR α ; и б) выделение экспрессированного антитела к GM-CSFR α из клетки-хозяина.

В некоторых воплощениях предложен способ лечения заболевания или состояния у индивида, нуждающегося в этом, включающий введение индивиду эффективного количества антитела к GM-CSFR α , соответствующего любому из антител к GM-CSFR α , описанных выше. В некоторых воплощениях заболевание или состояние представляет собой воспалительное, респираторное или аутоиммунное заболевание или состояние. В некоторых воплощениях заболевание или состояние выбрано из группы, состоящей из ревматоидного артрита, астмы, хронической обструктивной болезни легких, аллергической реакции, рассеянного склероза, миелоидного лейкоза, атеросклероза.

Кроме того, предложены фармацевтические композиции, наборы и изделия производства, содержащие любое из антител к GM-CSFR α , описанных выше.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1A-1C показана аффинность связывания типичных антител к GM-CSFR α с GM-CSFR α человека, что проанализировано посредством ELISA (иммуноферментный твердофазный анализ). На фиг. 1A показаны кривые связывания T119, E9, E16, E27, E29, E30, E35, E36, E54 и E34 с GM-CSFR α человека. На фиг. 1B показаны кривые связывания T119, E108, E105, E113, E87, E85, E39, E40, E1155, E200a и E1181 с GM-CSFR α человека. На фиг. 1C показаны кривые связывания T119, E61, E83, E88, E90, E84, E172, E164, E1 и E31 с GM-CSFR α человека.

На фиг. 2 показана аффинность связывания E35, E200a, T119, E87 и E108 с GM-CSFR α яванского макака, что проанализировано посредством ELISA.

На фиг. 3 показана аффинность связывания E35, E87 и E108 с рецептором интерлейкина 3, тип A (IL3RA), рецептором интерлейкина 5, тип A (IL5RA) и G-CSFR (рецептор гранулоцитарного колоние-стимулирующего фактора) в сравнении с GM-CSFR α .

На фиг. 4 показана аффинность связывания E35-IgG4 с клетками WIL2S, экспрессирующими GM-CSFR α , в сравнении с контрольными клетками WIL2S, которые не экспрессируют GM-CSFR α , что проанализировано методом сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS).

На фиг. 5A-5D показаны результаты анализа конкурентного связывания в отношении способности исходного антитела T119 и антител, оптимизированных как соединения-лидеры, конкурировать с GM-CSFR α за связывание с GM-CSFR α , по результатам измерений с использованием конкурентного ELISA. На фиг. 5A показаны результаты анализа конкурентного связывания для T119, E01, E09, E194, E27, E29,

Е34, Е35, Е40 и Е30. На фиг. 5В показаны результаты анализа конкурентного связывания для Т119, Е83, Е87, ЕП81, Е85, Е54, ЕП55, Е31, Е105 и Е84. На фиг. 5С показаны результаты анализа конкурентного связывания для Т119, Е164, Е172, Е108, Е16, Е36, Е61, Е88 и Е39. На фиг. 5D показаны результаты анализа конкурентного связывания для Т119, Е90, ЕП33, Е200а, Е94, Е113 и ЕП52.

На фиг. 6А и 6В показаны температурные профили плавления и температурные профили агрегации антител к GM-CSFR α Mab-IgG1, Т119-IgG1, Е35-IgG1 и Е35b-IgG1, анализ которых выполнен с использованием платформы UNcle. На фиг. 6А показаны температурные профили плавления этих антител. На фиг. 6В показаны температурные профили агрегации этих антител.

На фиг. 7 показаны результаты анализа пролиферации TF-1 клеток в случае исходного антитела Т119 и оптимизированных как соединения-лидеры антител.

На фиг. 8 показаны результаты анализа изменения формы гранулоцитов человека в случае Е35, Е108 и Е87b.

На фиг. 9 показаны результаты анализа изменения формы гранулоцитов яванского макака в случае Е35.

На фиг. 10 показаны результаты анализа жизнеспособности гранулоцитов в случае Е35, Е108 и Е87b.

На фиг. 11 показаны результаты анализа экспрессии кластера дифференцировки 11b (CD11b) в случае Е35 и Е87b по сравнению с Mab.

На фиг. 12А и 12В показаны результаты анализов высвобождения фактора α некроза опухоли (TNF α) в случае Е35 и Е87b по сравнению с Mab. На фиг. 12А показаны результаты анализа высвобождения TNF α в случае Е35 и Е87b по сравнению с Mab по результатам измерений с использованием панели макрофагов/микроглий человека. На фиг. 12В показаны результаты анализа высвобождения TNF α в случае Е35 и Е87b по сравнению с Mab по результатам измерений посредством ELISA.

На фиг. 13 показаны результаты анализа продуцирования интерлейкина 1 β (IL-1 β) в случае Е35 и Е87b по сравнению с Mab.

На фиг. 14А и 14В показаны результаты фармакокинетического анализа Mab и Е35 на крысах по результатам измерений посредством ELISA. На фиг. 14А показаны концентрации антител Mab и Е35 в сыворотке крови после внутривенной инъекции соответствующих антител в дозе 2 мг/кг. На фиг. 14В показаны фармакокинетические параметры для Mab и Е35 после внутривенной инъекции соответствующих антител в дозе 20 мг/кг.

На фиг. 15 показаны результаты фармакокинетического анализа Mab и Е35 на яванских макаках по результатам измерений посредством ELISA.

На фиг. 16А-Д показаны полученные с использованием FACS диаграммы анализа изменения формы гранулоцитов *in vivo* после введения Mab-IgG4 или Е35-IgG4 яванским макакам. На фиг. 16А показаны полученные с использованием FACS диаграммы для гранулоцитов до введения антител. На фиг. 16В показаны полученные с использованием FACS диаграммы для гранулоцитов через 14 суток после введения антител. На фиг. 16С показаны полученные с использованием FACS диаграммы для гранулоцитов через 21 сутки после введения антител. На фиг. 16D показаны результаты анализа изменения формы гранулоцитов *in vivo* от момента до введения антитела до 21 суток включительно после введения антител.

На фиг. 17А-17G показаны результаты ингибирующего действия Е35-IgG4 на GM-CSF-индуцированное повышение уровня воспалительных клеток. На фиг. 17А показаны результаты ингибирующего действия Е35-IgG4 на GM-CSF-индуцированное повышение уровня лейкоцитов. На фиг. 17В показаны результаты ингибирующего действия Е35-IgG4 на GM-CSF-индуцированное повышение уровня нейтрофилов. На фиг. 17С показаны результаты ингибирующего действия Е35-IgG4 на GM-CSF-индуцированное повышение уровня лимфоцитов. На фиг. 17D показаны результаты ингибирующего действия Е35-IgG4 на GM-CSF-индуцированное повышение уровня базофилов. На фиг. 17Е показаны результаты ингибирующего действия Е35-IgG4 на GM-CSF-индуцированное повышение уровня эозинофилов. На фиг. 17F показаны результаты ингибирующего действия Е35-IgG4 на GM-CSF-индуцированное повышение уровня моноцитов. На фиг. 17G показаны результаты ингибирующего действия Е35-IgG4 на GM-CSF-индуцированное повышение уровня эритроцитов.

На фиг. 18А-18С показана аффинность связывания Е35-IgG4, Е87b-IgG4 и Т119-IgG4 с GMRah дикого типа и GMRah с мутациями в типичных аминокислотных остатках по результатам измерений посредством ELISA. На фиг. 18А показана аффинность связывания Е35-IgG4 с GMRah дикого типа и с содержащим мутации GMRah. На фиг. 18В показана аффинность связывания Е87b-IgG4 с GMRah дикого типа и с содержащим мутации GMRah. На фиг. 18С показана аффинность связывания Т119-IgG4 с GMRah дикого типа и с содержащим мутации GMRah.

На фиг. 19А-19В показаны результаты выравнивания последовательностей для последовательностей вариабельных доменов антител к GM-CSFR α . Указаны определяющие комплементарность участки. На фиг. 19А показаны результаты выравнивания последовательностей для последовательностей вариабельных доменов тяжелой цепи. На фиг. 19В показаны результаты выравнивания последовательностей для последовательностей вариабельных доменов легкой цепи.

На фиг. 20 показана нумерация остатков аминокислот 16-296 в GM-CSFR α .

Подробное описание изобретения

Согласно одному из аспектов настоящего изобретения предложены антитела к GM-CSFR α . Применяя сочетание селекции с использованием фаговых библиотек для scFv, созревания аффинности и соответствующим образом разработанных биохимических и биологических анализов, авторы изобретения идентифицировали высокоэффективные молекулы антител, которые связываются с GM-CSFR α человека и ингибируют действие GM-CSF человека на свой рецептор. Результаты, представленные в данном описании, указывают на то, что предложенные авторами изобретения антитела связываются с другим участком или эпитопом GM-CSFR α по сравнению с известным антителом к GM-CSFR α маврилимуабом, и неожиданным образом оказываются еще более эффективными, чем маврилимуаб, что продемонстрировано в ряде биологических анализов.

Антитела к GM-CSFR α , предложенные согласно настоящему изобретению, включают, например, полноразмерные антитела к GM-CSFR α , антитела к GM-CSFR α в формате scFv, антитела к GM-CSFR α в формате Fc-слитых белков, мультиспецифичные (например, биспецифичные) антитела к GM-CSFR α , иммуноконъюгаты на основе антитела к GM-CSFR α и тому подобное.

Согласно одному из аспектов предложены антитела к GM-CSFR α , которые специфично связываются с эпитопом на GM-CSFR α человека, при этом данный эпитоп содержит аминокислотные остатки Val50, Glu59, Lys194, Lys195, Arg283 и Ile284 из GM-CSFR α человека.

Согласно другому аспекту предложено антитело к GM-CSFR α , при этом антитело к GM-CSFR α содержит вариабельный домен тяжелой цепи (V_H), содержащий HC-CDR1, содержащий X₁X₂X₃H (SEQ ID NO: 76), где X₁ представляет собой E, N, G, D, M, S, P, F, Y, A, V, K, W, R или C, X₂ представляет собой S, C или P, и X₃ представляет собой I или M; HC-CDR2, содержащий GFDX₁X₂X₃X₄EX₅X₆YAQKX₇QG (SEQ ID NO: 77), где X₁ представляет собой P, G, T, S или V, X₂ представляет собой E, D, G или A, X₃ представляет собой D, G, I, W, S или V, X₄ представляет собой G, E, D или H, X₅ представляет собой T или A, X₆ представляет собой N или I, и X₇ представляет собой S или F; и HC-CDR3, содержащий GRYX₁X₂X₃X₄X₅X₆YGFDY (SEQ ID NO: 78), где X₁ представляет собой C, T, S, I, A или V, X₂ представляет собой S, G, E, F, W, H, I, V, N, Y, T или R, X₃ представляет собой T, H, L, F, P, I, S, Y, K, A, D, V, N или G, X₄ представляет собой D, A, M, Y, F, S, T, G или W, X₅ представляет собой T, S, F, Q, A, N, L, E, I, G или M, и X₆ представляет собой C, T, N, S или A; и вариабельный домен легкой цепи (V_L), содержащий LC-CDR1, содержащий RAX₁X₂X₃VX₄X₅X₆LA (SEQ ID NO: 293), где X₁ представляет собой S, L, N, A, K, R, I, Q, G, T, H, M или C, X₂ представляет собой Q, Y, P, A, I, F, T, R, V, L, E, S или C, X₃ представляет собой S, H, W, L, R, K, T, P, I, F, V, E, A или Q, X₄ представляет собой S, L, W, M, A, Y, K, R, G, T, E, V, N, F или C, X₅ представляет собой S, T, R, A, H, Q, P, M, L или G, и X₆ представляет собой Y, L или F; LC-CDR2, содержащий X₁X₂X₃S RAT (SEQ ID NO: 294), где X₁ представляет собой G или T, X₂ представляет собой A, G, R, H, K, S, T, M или F, и X₃ представляет собой S, A, W, R, L, T, Q, F, Y, H или N; и LC-CDR3, содержащий QQYX₁X₂X₃PX₄T (SEQ ID NO: 79), где X₁ представляет собой N, D, S, R, A, T, L, Y, Q, W или G, X₂ представляет собой N, D, E, T, Y, G, A, M, F, S, I или L, X₃ представляет собой W, S, P, V, G или R, и X₄ представляет собой P, Y, H, S, F, N, D, V или G.

Кроме того, предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела к GM-CSFR α , композиции, содержащие антитела к GM-CSFR α , и способы получения и применения антител к GM-CSFR α .

Определения.

Использованный в данном описании термин "лечение" или "подвергание лечению" относится подходу для получения благоприятных или желаемых результатов, в том числе клинических результатов. С точки зрения задач этой заявки благоприятные или желаемые клинические результаты включают, но не ограничиваются этим, один или более чем один результат из следующих: ослабление одного или более симптомов, обусловленных заболеванием, снижение степени заболевания, стабилизация заболевания (например, предотвращение или замедление ухудшения заболевания), предупреждение или задержка распространения (например, метастазирования) заболевания, предупреждение или задержка рецидива заболевания, задержка или замедление прогрессирования заболевания, уменьшение интенсивности симптомов болезненного состояния, обеспечение ремиссии (частичной или полной) заболевания, снижение дозы одного или более чем одного другого лекарственного средства, необходимого для лечения заболевания, для замедления прогрессирования заболевания, повышения или улучшения качества жизни, повышения прироста массы и/или продления выживаемости. Термином "лечение" также охватывается уменьшение патологического последствия заболевания (такого как, например, объем опухоли в случае рака). Способы по данной заявке предусматривают какой-либо один или более чем один из этих аспектов лечения.

Термин "антитело" включает в себя полноразмерные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты. Полноразмерное антитело содержит две тяжелые цепи и две легкие цепи. Вариабельные области легких или тяжелых цепей отвечают за связывание с антигеном. Вариабельные области в обеих цепях обычно содержат три высоко вариабельные петли, называемые определяющими комплементарность участками (CDR) (CDR легкой цепи (LC), включая LC-CDR1, LC-CDR2 и LC-CDR3, CDR тяжелой цепи (HC),

включая HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3). Границы CDR для антител и антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе, могут быть определены или идентифицированы в соответствии с правилами Kabat, Chothia или Al-Lazikani (Al-Lazikani, 1997; Chothia, 1985; Chothia, 1987; Chothia, 1989; Kabat, 1987; Kabat, 1991). Эти три CDR тяжелой или легкой цепей расположены между фланкирующими участками, известными как каркасные области (FR), которые характеризуются более высокой консервативностью, чем CDR, и образуют каркас для поддержки гипервариабельных петель. Константные области тяжелых и легких путей не участвуют в связывании с антигеном, но проявляют различные эффекторные функции. Антитела обозначают согласно классам на основе аминокислотной последовательности константной области своей тяжелой цепи. Существуют пять основных классов или изотипов антител IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, которые характеризуются наличием тяжелых цепей α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно. Некоторые из этих основных классов антител подразделяются на подклассы, такие как IgG1 (тяжелая цепь γ 1), IgG2 (тяжелая цепь γ 2), IgG3 (тяжелая цепь γ 3), IgG4 (тяжелая цепь γ 4), 11 gA1 (тяжелая цепь α 1) или 11 gA2 (тяжелая цепь α 2).

Использованный в данном описании термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к фрагменту антитела, включая, например, диатело, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv фрагмент, стабилизированный дисульфидными связями Fv фрагмент (dsFv), (dsFv)₂, биспецифичный dsFv (dsFv-dsFv'), стабилизированное дисульфидными связями диатело (ds диатело), одноцепочечный Fv (scFv), scFv димер (бивалентное диатело), мультиспецифичное антитело, образованное из части антитела, содержащее один или более CDR, однодоменное антитело, наноантитело, доменное антитело, бивалентное доменное антитело или любой другой фрагмент антитела, который связывается с антигеном, но по своей структуре не является полноразмерным антителом. Антигенсвязывающий фрагмент обладает способностью связываться с тем же антигеном, с которым связывается исходное антитело или фрагмент исходного антитела (например, исходный scFv). В некоторых воплощениях антигенсвязывающий фрагмент может содержать один или более чем один CDR из конкретного человеческого антитела, привитый к каркасной области из одного или более чем одного другого человеческого антитела.

Термин "эпитоп", использованный в данном описании, относится к специфической группе атомов или аминокислот в антигене, с которой связывается антитело или группировка антитела. Два антитела или две группировки антитела могут связываться с одним и тем же эпитопом в антигене, если они демонстрируют конкурентное связывание с данным антигеном.

Как использовано в данном описании, первое антитело "конкурирует" со вторым антителом за связывание с целевым GM-CSFR α , когда первое антитело ингибирует связывание второго антитела с целевым GM-CSFR α по меньшей мере примерно на 50% (как например, по меньшей мере приблизительно на любое значение из 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) в присутствии первого антитела в эквимольной концентрации или наоборот. Высокопроизводительный способ "биннинга" антител, основанный на их перекрестной конкуренции, описан в публикации PCT № WO 03/48731.

Использованный в данном описании термин "специфично связывается", "специфично распознающий" или "является специфичным к" относится к подлежащим измерению и воспроизводимым взаимодействиям, таким как связывание между мишенью и антителом, по которому можно определить наличие этой мишени в присутствии гетерогенной популяции молекул, в том числе биологических молекул. Например, антитело, специфично распознающее мишень (которой может быть эпитоп), представляет собой антитело, которое связывается с этой мишенью с более высокой аффинностью, авидностью, с большей легкостью и/или большей продолжительностью, чем в случае его связывания с другими мишенями. В некоторых воплощениях антитело, которое специфично распознает антиген, взаимодействует с одной или несколькими антигенными детерминантами антигена с аффинностью связывания, которая по меньшей мере примерно в 10 раз превышает его аффинность связывания с другими мишенями.

Термин "выделенное" антитело к GM-CSFR α , использованный в данном описании, означает антитело к GM-CSFR α , которое (1) не ассоциировано с белками, обнаруженными в природе, (2) не содержит других белков из того же источника, (3) экспрессируется клеткой другого вида или (4) не существует в природе.

Подразумевается, что использованный в данном описании термин "выделенная нуклеиновая кислота", означает геномную нуклеиновую кислоту, кДНК или нуклеиновую кислоту синтетического происхождения либо некоторую их комбинацию, которая в силу своего происхождения как "выделенная нуклеиновая кислота" (1) не ассоциирована со всем полинуклеотидом, или его частью, в котором "выделенная нуклеиновая кислота" встречается в природе, (2) функционально связана с полинуклеотидом, с которым она не соединена в природе, или (3) не существует в природе в виде части более длинной последовательности.

Подразумевается, что использованный в данном описании термин "CDR" или "определяющий комплементарность участок", означает несмежные связывающие антиген сайты, обнаруживаемые в пределах вариабельной области полипептидов обеих тяжелой и легкой цепей. Эти особые участки описаны в Kabat et al., J. Biol. Chem., 252: 6609-6616 (1977); Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of proteins of immunological interest" (1991); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196: 901-917 (1987); Al-

Lazikani B. et al., *J. Mol. Biol.*, 273: 927-948 (1997); MacCallum et al., *J. Mol. Biol.*, 262: 732-745 (1996); Abhinandan and Martin, *Mol. Immunol.*, 45: 3832-3839 (2008); Lefranc M.P. et al., *Dev. Comp. Immunol.*, 27: 55-77 (2003); и Honegger and Plückthun, *J. Mol. Biol.*, 309: 657-670 (2001), при этом в случае сравнения относительно друг друга данные определения включают перекрывающиеся аминокислотные остатки или их подмножества. Тем не менее подразумевается, что применение любого определения для обозначения CDR антитела или привитых антител либо их вариантов находится в объеме данного термина, как он определен и используется в данном описании. Аминокислотные остатки, которые входят в состав CDR, определенных в процитированных выше ссылках, приведены ниже в табл. 1 в качестве сравнения. Алгоритмы для предсказания CDR и их границы известны в данной области техники, включая, например, Abhinandan and Martin, *Mol. Immunol.*, 45: 3832-3839 (2008); Ehrenmann F. et al., *Nucleic Acids Res.*, 38: D301-D307 (2010); и Adolf-Bryfogle J. et al., *Nucleic Acids Res.*, 43: D432-D438 (2015). Содержание ссылок, процитированных в этом абзаце, включено в данное описание посредством ссылки во всей своей полноте для применения в настоящей заявке и для возможного включения в один или более пунктов формулы данного изобретения.

Таблица 1

Определения cdr					
	Kabat ¹	Chothia ²	MacCallum ³	IMGT ⁴	AHo ⁵
V _H CDR1	31-35	26-32	30-35	27-38	25-40
V _H CDR2	50-65	53-55	47-58	56-65	58-77
V _H CDR3	95-102	96-101	93-101	105-117	109-137
V _L CDR1	24-34	26-32	30-36	27-38	25-40
V _L CDR2	50-56	50-52	46-55	56-65	58-77
V _L CDR3	89-97	91-96	89-96	105-117	109-137

¹Нумерация остатков соответствует номенклатуре по Kabat и др., выше.

²Нумерация остатков соответствует номенклатуре по Chothia и др., выше.

³Нумерация остатков соответствует номенклатуре по MacCallum и др., выше.

⁴Нумерация остатков соответствует номенклатуре по Lefranc и др., выше (IMGT означает базу данных по иммуногенетике).

⁵Нумерация остатков соответствует номенклатуре по Honegger и Plückthun, выше.

Термин "химерные антитела" относится к антителам, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична соответствующим последовательностям или гомологична им в антителах, происходящих из определенного вида либо принадлежащих к определенному классу или подклассу антител, в то время как остальная часть цепи(ей) идентична соответствующим последовательностям или гомологична им в антителах, происходящих из другого вида либо принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также к фрагментам таких антител, при условии, что они проявляют биологическую активность согласно этой заявке (см. патент США № 4816567; и Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)).

"Fv" представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит полный сайт распознавания и связывания антигена. Этот фрагмент представляет собой димер, состоящий из одного домена варибельной области тяжелой цепи и одного домена варибельной области легкой цепи, находящихся в тесной нековалентной ассоциации. В результате фолдинга этих двух доменов образуются шесть гиперварибельных петель (по 3 петли на каждую из тяжелой и легкой цепи), которые обеспечивают наличие аминокислотных остатков для связывания с антигеном и придают этому антителу специфичность связывания с антигеном. Однако, способностью распознавать антиген и связываться с ним обладает даже единственный варибельный домен (или половина Fv, содержащая только три CDR, специфичные к антигену), хотя и с более низкой аффинностью, чем полный сайт связывания.

"Одноцепочечные Fv", также сокращенно обозначаемые как "sFv" или "scFv", представляют собой фрагменты антител, которые содержат V_H и V_L домены антитела, соединенные с образованием единой полипептидной цепи. В некоторых воплощениях полипептид scFv дополнительно содержит полипептидный линкер между V_H и V_L доменами, который дает возможность scFv образовывать желаемую структуру для связывания с антигеном. Для обзора по scFv см. Pluckthun в *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

Термин "диатела" относится к небольшим фрагментам антител, получаемым путем конструирования scFv фрагментов (см. предыдущий абзац), обычно с использованием коротких линкеров (как например, от приблизительно 5 до приблизительно 10 остатков) между V_H и V_L доменами, в результате чего осуществляется межцепочечное, а не внутрицепочечное спаривание V доменов, приводящее к получению бивалентного фрагмента, т.е. фрагмента, имеющего два антиген-связывающих сайта. Биспецифичные диатела представляют собой гетеродимеры, состоящие из двух "перекрещивающихся" scFv фрагментов, при этом V_H и V_L домены этих двух антител находятся на разных полипептидных цепях. Диатела более полно описаны, например, в EP 404097; WO 93/11161; и Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993).

"Гуманизированные" формы антител, не являющихся человеческими (например, грызунов), представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, происходящую из антитела, не являющегося человеческим. По большей части гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (реципиентное антитело), при этом остатки гипервариабельного участка (HVR) реципиентного антитела заменены на остатки гипервариабельного участка антител (донорного антитела) вида, не относящегося к человеку, такого как мышь, крыса, кролик или не являющийся человеком примат, имеющие желаемую специфичность, аффинность и функциональные возможности антитела. В некоторых случаях, остатки каркасной области (FR) иммуноглобулина человека заменены на соответствующие остатки антитела, не являющегося человеческими. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которых нет в реципиентном антителе или в донорном антителе. Эти модификации делаются с целью дальнейшего улучшения характеристик антител. В общем случае, гуманизированное антитело будет содержать по существу все переменные домены, выбранные из по меньшей мере одного и обычно двух переменных доменов, в которых все или по существу все из гипервариабельных петель соответствуют таковым из иммуноглобулина, не являющегося человеческим, и все или по существу все FR представляют собой области с последовательностью иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело возможно также будет содержать по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина, обычно иммуноглобулина человека. Для получения дополнительных сведений см. Jones et al, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-329 (1988); и Presta, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992).

"Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности" или "процент гомологии" по отношению к последовательностям полипептида и антитела, идентифицированным в данной заявке, определяют как процентную долю аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в подлежащем сравнению полипептиде после выравнивания последовательностей с учетом любых консервативных замен как части идентичности последовательностей. Выравнивание с целью определения процента идентичности аминокислотных последовательностей можно выполнить различными способами, которые находятся в пределах компетентности специалиста в данной области техники, например, используя такое общедоступное компьютерное программное обеспечение, как программное обеспечение BLAST (средство поиска основного локального выравнивания), BLAST-2, ALIGN, Megalign (DNASTAR) или MUSCLE. Специалисты в данной области техники могут определить соответствующие параметры для оценки выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Однако же, для целей данного изобретения значения % идентичности аминокислотных последовательностей получают, используя для сравнения последовательностей компьютерную программу MUSCLE (Edgar, R.C., *Nucleic Acids Research*, 32(5): 1792-1797, 2004; Edgar, R.C., *BMC Bioinformatics*, 5(1): 113, 2004).

Термины "Fc-рецептор" или "FcR" используют для описания рецептора, который связывается с Fc-областью антитела. В некоторых воплощениях FcR по этой заявке представляет собой рецептор, который связывается с антителом IgG-типа, (рецептор γ) и включает рецепторы подклассов Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII, в том числе аллельные варианты и формы этих рецепторов с альтернативным сплайсингом. Рецепторы Fc γ RII включают Fc γ RIIA ("активирующий рецептор") и Fc γ RIIB ("ингибирующий рецептор"), имеющие схожие аминокислотные последовательности, которые различаются главным образом своими цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор Fc γ RIIA содержит иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) в своем цитоплазматическом домене. Ингибирующий рецептор Fc γ RIIB содержит иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM) в своем цитоплазматическом домене (см. обзор в M. Daéron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15: 203-234 (1997)). Этот термин включает в себя аллотипы, такие как аллотипы Fc γ RIIA: Fc γ RIIA-Phe158, Fc γ RIIA-Val158, Fc γ RIIA-R131 и/или Fc γ RIIA-H131. Обзор по FcR приведен в Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9: 457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods*, 4: 25-34 (1994); и de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 126: 330-41 (1995). Другие FcR, включая те, которые будут идентифицированы в будущем, охватываются приведенным в данном описании термином "FcR". Этот термин также включает в себя неонатальный рецептор, FcRn, который отвечает за перенос материнских IgG к плоду (Guyer et al, *J. Immunol.*, 117: 587 (1976) и Kim et al., *J. Immunol.*, 24: 249 (1994)).

Термин "FcRn" относится к неонатальному Fc-рецептору (FcRn). По своей структуре FcRn сходен с главным комплексом гистосовместимости (МНС) и состоит из α -цепи, нековалентно связанной с β 2-микроглобулином. Многочисленные функции неонатального Fc-рецептора, FcRn, приведены в обзоре Ghetie and Ward (2000), *Annu. Rev. Immunol.*, 18, 739-766. FcRn принимает участие в пассивной доставке иммуноглобулинов IgG-типа от матери к детенышу и в регуляции уровней IgG в сыворотке крови. FcRn может действовать в качестве рецептора реутилизации, связывая и транспортируя пиноцитированные IgG в интактной форме как внутри клетки, так и между клетками, и спасая их от стандартного пути деградации.

"C_H1 домен" Fc-области IgG человека (также обозначаемый как домен "C1" в "H1") обычно простирается от примерно 118-й аминокислоты до примерно 215-й аминокислоты (согласно системе нуме-

рации EU).

"Шарнирную область" обычно определяют как простирающуюся от Glu216 до Pro230 в IgG1 человека (Burton, Molec. Immunol., 22: 161-206 (1985)). Можно провести выравнивание шарнирных областей IgG других изотипов с последовательностью IgG1 путем размещения первого и последнего остатков цистеина, образующих S-S связи между тяжелыми цепями, в одинаковых положениях.

"CH2 домен" Fc-области IgG человека (также обозначаемый как домен "C2" в "H2") обычно простирается от примерно 231-й аминокислоты до примерно 340-й аминокислоты. Уникальность CH2 домена заключается в том, что он не образует близко расположенную пару с другим доменом. Точнее, между двумя CH2 доменами интактной нативной молекулы IgG расположены две N-связанные разветвленные углеводные цепи. Высказано предположение, что наличие этих углеводных цепей может обеспечить спаривание доменов и помочь стабилизации CH2 домена. Burton, Molec. Immunol., 22: 161-206 (1985).

"CH3 домен" (также обозначаемый как домен "C3" в "H3") содержит отрезок, состоящий из C-концевых остатков по отношению к CH2 домену в Fc-области (т.е. примерно от аминокислотного остатка 341 до C-конца последовательности антитела, обычно аминокислотного остатка 446 или 447 в IgG).

"Функциональный Fc фрагмент" обладает "эффекторной функцией" Fc-области, имеющей нативную последовательность. Типичные "эффекторные функции" включают связывание с первым компонентом системы комплемента (C1q); комплементзависимую цитотоксичность (CDC); связывание с Fc-рецепторами; антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; отрицательную регуляцию рецепторов клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора, BCR) и так далее. Как правило, для осуществления таких эффекторных функций необходимо объединение Fc-области со связывающим доменом (например, варибельным доменом антитела), и это можно оценить с использованием различных анализов, известных в данной области техники.

Антитело, имеющее вариант Fc-области IgG с "измененной" аффинностью связывания с FcR или ADCC активностью, представляет собой антитело, которое обладает либо улучшенной, либо ослабленной активностью связывания с FcR (например, FcγR или FcRn) и/или ADCC активностью по сравнению с исходным полипептидом или с полипептидом, содержащим Fc-область с нативной последовательностью. Вариант Fc, который "демонстрирует более сильное связывание" с FcR, связывается по меньшей мере с одним FcR с более высокой аффинностью (например, с более низким кажущимся значением K_d или IC_{50} (концентрация, вызывающая 50%-ное ингибирование)), чем исходный полипептид или Fc-область IgG с нативной последовательностью. Согласно некоторым воплощениям, по сравнению с исходным полипептидом связывание улучшается примерно в 3 раза, как например, приблизительно в любое число раз из 5, 10, 25, 50, 60, 100, 150, 200 или 500 раз включительно, или улучшение в связывании составляет приблизительно от 25% до 1000%. Вариант полипептида, который "демонстрирует более низкое связывание" с FcR, связывается по меньшей мере с одним FcR с более низкой аффинностью (например, с более высоким кажущимся значением K_d или более высоким значением IC_{50}), чем исходный полипептид.

Уменьшение в связывании по сравнению с исходным полипептидом может составлять уменьшение в связывании примерно на 40% или больше.

"Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность" или "ADCC" означает форму цитотоксичности, при которой секретируемый Ig связывается с Fc-рецепторами (FcR), присутствующими на определенных цитотоксических клетках (например, природных киллерных (NK) клетках, нейтрофилах и макрофагах), давая возможность этим цитотоксическим эффекторным клеткам специфически связываться с антиген-несущей клеткой-мишенью и впоследствии уничтожать эту клетку-мишень с использованием цитотоксинов. Антитела "вооружают" цитотоксические клетки и необходимы для такого уничтожения. Первичные клетки, опосредующие ADCC, NK клетки, экспрессируют только FcγRIII, в то время как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Информация по экспрессии FcR на гемопоэтических клетках суммирована в табл. 3 на странице 464 в Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9: 457-92 (1991). Чтобы оценить ADCC активность представляющей интерес молекулы, можно выполнить анализ ADCC *in vitro*, как например анализ, описанный в патенте США № 5500362 или 5821337. Полезные для таких анализов эффекторные клетки включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и природные киллерные (NK) клетки. Альтернативно или помимо этого, ADCC-активность молекулы, представляющей интерес, можно оценить *in vivo*, например, в такой животной модели, которая описана в Clynes et al. PNAS (USA), 95:652-656(1998).

Полипептид, содержащий вариант Fc-области, который "демонстрирует более высокую ADCC" или опосредует ADCC в присутствии эффекторных клеток человека более эффективно, чем полипептид, имеющий Fc-область IgG дикого типа, или исходный полипептид, представляет собой полипептид, который проявляет существенно более высокую эффективность в опосредовании ADCC *in vitro* или *in vivo*, если количества полипептида с таким вариантом Fc-области и полипептида с Fc-областью дикого типа (или исходного полипептида) в данном анализе по существу одинаковые. Как правило, такие варианты будут идентифицированы с использованием любого анализа ADCC *in vitro*, известного в данной области техники, такого как анализы или методы определения ADCC активности, например, в животной модели, и так далее. В некоторых воплощениях вариант демонстрирует более высокую эффективность в опосре-

довании ADCC, чем Fc-область дикого типа (или исходный полипептид), с превышением от примерно в 5 раз до примерно 100 раз, например, от примерно 25 до примерно 50 раз.

"Комплементзависимая цитотоксичность" или "CDC" означает лизис клетки-мишени в присутствии системы комплемента. Активация системы комплемента по классическому пути инициируется посредством связывания первого компонента системы комплемента (C1q) с антителами (соответствующего под-класса), которые связаны с распознаваемым ими антигеном. Чтобы оценить активацию системы комплемента, можно провести анализ CDC, например, который описан в Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods, 202: 163 (1996). Варианты полипептидов с измененными аминокислотными последовательностями Fc-области и повышенной или пониженной способностью связывать C1q описаны в патенте США № 6194551B1 и в заявке WO99/51642. Содержания этих патентных публикаций специально включены в данное описание посредством ссылки. Также см. Idusogie et al. J. Immunol., 164: 4178-4184 (2000).

Если не указано иное, термин "нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность" охватывает все нуклеотидные последовательности, которые представляют собой вырожденные версии друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Нуклеотидная последовательность, которая кодирует белок, или РНК также может подразумевать наличие интронов в той степени, в которой данная нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, может в некоторой версии содержать интрон(ы).

Термин "функционально связанный" относится к функциональной связи между регуляторной последовательностью и гетерологичной нуклеиновокислотной последовательностью, приводящей к экспрессии последней. Например, первая нуклеиновокислотная последовательность функционально связана со второй нуклеиновокислотной последовательностью, если первая нуклеиновокислотная последовательность находится в функциональной взаимосвязи со второй нуклеиновокислотной последовательностью. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, если этот промотор воздействует на транскрипцию или экспрессию этой кодирующей последовательности. Как правило, функционально связанные последовательности ДНК являются смежными и, если необходимо соединить области, кодирующие два белка, то находятся в одной и той же рамке считывания.

Термин "гомологичные" относится к сходству или идентичности последовательностей между двумя полипептидами или между двумя молекулами нуклеиновой кислоты. Когда какое-либо положение в обеих из двух сравниваемых последовательностей занято одним и тем же основанием или одной и той же мономерной аминокислотной субъединицей, например, если положение в каждой из двух молекул ДНК занято аденином, тогда молекулы являются гомологичными по этому положению. Процент гомологии между двумя последовательностями является функцией от количества совпадающих или гомологичных положений, общих для двух данных последовательностей, деленного на количество сравниваемых положений, умноженного на 100. Например, если 6 из 10 положений в двух последовательностях совпадают или гомологичны, то эти две последовательности гомологичны на 60%. В качестве примера, последовательности ДНК ATTGCC и TATGGC обладают 50%-ной гомологией. Как правило, сравнение проводят, когда две последовательности выравнены для получения максимальной гомологии.

"Эффективное количество" антитела к GM-CSFR α или композиции, которые описаны в данной заявке, представляет собой количество, достаточное для выполнения конкретно заявленной цели. "Эффективное количество" может быть определено эмпирически и известными методами, относящимися к заявленной цели.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству антитела к GM-CSFR α или композиции, которые описаны в данной заявке, эффективному в отношении "лечения" заболевания или расстройства у индивида. В случае рака терапевтически эффективное количество антитела к GM-CSFR α или композиции, которые описаны в данном изобретении, может снижать количество раковых клеток; уменьшать размер или массу опухоли; подавлять (т.е. замедлять до некоторой степени и предпочтительно останавливать) инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; ингибировать (т.е. замедлять до некоторой степени и предпочтительно останавливать) метастазирование опухоли; подавлять до некоторой степени рост опухоли; и/или ослаблять до некоторой степени один или более симптомов, ассоциированных с раком. В той степени, в которой антитело к GM-CSFR α или композиция, которые описаны в данной заявке, могут предотвращать рост имеющихся раковых клеток и/или уничтожать их, они могут быть цитостатическими и/или цитотоксическими. В некоторых воплощениях терапевтически эффективное количество представляет собой подавляющее рост раковых клеток количество. В некоторых воплощениях терапевтически эффективное количество представляет собой количество, которое увеличивает продолжительность жизни пациента. В некоторых воплощениях терапевтически эффективное количество представляет собой количество, которое увеличивает продолжительность периода без прогрессирования заболевания у пациента.

Как использовано в данном описании, под "фармацевтически приемлемым" или "фармакологически совместимым" понимают вещество, которое не является нежелательным с биологической или иной точки зрения, например, вещество, которое может быть включено в фармацевтическую композицию, вводимую пациенту, без вызывания каких-либо значительных нежелательных биологических эффектов или взаи-

модействия неблагоприятным образом с какими-либо другими компонентами композиции, в которой оно содержится. Фармацевтически приемлемые носители или эксципиенты предпочтительно соответствуют требуемым стандартам токсикологических и производственных испытаний и/или включены в Справочник по неактивным ингредиентам, подготовленный Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США.

Очевидно, что воплощения заявки, изложенные в данном описании, включают термины "состоящий" и/или "состоящий по существу из" воплощений.

Упоминание в данном описании термина "примерно" в отношении величины или параметра включает (и описывает) вариации, которые относятся к такой величине или такому параметру как таковому. Например, описание, относящееся к "примерно X", включает описание "X".

Как использовано в данном описании, упоминание термина "не" в отношении величины или параметра как правило означает или описывает термин "отличающийся от" в отношении величины или параметра. Например, фраза "способ не применяют для лечения рака типа X" означает, что данный способ применяют для лечения типов рака, отличающихся от X.

Использованные в данном описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают объекты в форме множественного числа, если контекст ясно не предусматривает иное.

Антитела к GM-CSFR α .

Согласно одному из аспектов настоящего изобретения предложены антитела к GM-CSFR α , которые специфично связываются с GM-CSFR α . Антитела к GM-CSFR α включают, но не ограничиваются этим, гуманизированные антитела, химерные антитела, мышинные антитела, человеческие антитела и антитела, содержащие CDR тяжелой цепи и/или легкой цепи, рассмотренные в данном описании. Согласно одному из аспектов настоящей заявки предложены выделенные антитела, которые связываются с GM-CSFR α . Охваченные изобретением антитела к GM-CSFR α включают, например, полноразмерные антитела к GM-CSFR α (например, полноразмерный IgG1 или IgG4), антитела к GM-CSFR α в формате scFv, антитела к GM-CSFR α в формате Fc-слитых белков, мультиспецифичные (такие как биспецифичные) антитела к GM-CSFR α , иммуноконъюгаты на основе антител к GM-CSFR α и тому подобное. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α представляет собой полноразмерное антитело (например, полноразмерный IgG1 или IgG4) или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывается с GM-CSFR α . В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α представляет собой Fab, Fab', F(ab')₂, Fab'-SH, одноцепочечный Fv (scFv), Fv фрагмент, dAb, Fd, нанотело, диатело или линейное антитело. В некоторых воплощениях упоминание антитела, которое специфично связывается с GM-CSFR α , означает, что данное антитело связывается с GM-CSFR α с аффинностью, которая по меньшей мере примерно в 10 раз (в том числе, например, по меньшей мере примерно в любое число раз из 10, 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ или 10⁷) больше, чем его аффинность связывания с не являющимся мишенью объектом. В некоторых воплощениях не являющийся мишенью объект представляет собой антиген, который не является GM-CSFR α . Аффинность связывания можно оценить методами, известными в данной области техники, такими как ELISA, метод сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS) или радиоиммунопреципитационный анализ (RIA). Значение K_d может быть определено такими известными в данной области техники методами, как метод поверхностного плазмонного резонанса (SPR) или интерферометрия биослоев BLI).

Хотя в данном описании широко обсуждаются антитела к GM-CSFR α , содержащие последовательности из антитела человека (например, последовательности переменных доменов тяжелой и легкой цепи из антитела человека, содержащие последовательности CDR из антитела человека), также охвачены антитела к GM-CSFR α , не являющиеся человеческими. В некоторых воплощениях антитела к GM-CSFR α , не являющиеся человеческими, содержат CDR последовательности из антитела человека к GM-CSFR α , описанного в данной заявке, и каркасные последовательности из антитела, не являющегося человеческим. Каркасные последовательности из антитела, не являющегося человеческим, включают, в некоторых воплощениях, любую последовательность, которую можно использовать для создания синтетических переменных доменов тяжелой и/или легкой цепей с применением одной или нескольких последовательностей CDR антитела человека, описанных в данном изобретении, включая, например, таковые из млекопитающих, например, мыши, крысы, кролика, свиньи, крупного рогатого скота (например, коровы, быка, буйвола), оленя, овцы, козы, курицы, кошки, собаки, хорька, примата (например, мартышки, макаки резус) и так далее. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α , не являющееся человеческим, включает антитело к GM-CSFR α , созданное путем привития одной или нескольких последовательностей CDR из антитела человека, описанных в данном изобретении, к каркасной последовательности из антитела, не являющегося человеческими (например, каркасной последовательности из антитела мыши или курицы).

Полная аминокислотная последовательность типичного GM-CSFR α человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 148 или состоит из нее.

1 MLLLVTSLLL CELPHPAFLI IPEKSDLRTV APASSLNVRV DSRTMNLWD CQENTTFKSC
 61 FLTDKKNRVV EPRLSNNECS CTFREICLHE GVTFEVHVNT SQRGFQQKLL YPNSGREGTA
 121 AQNFSCFIYN ADLMNCTWAR GPTAPRDVQY FLYIRNSKRR REIRCPYYIQ DSGTHVGCHL
 181 DNLSGLTSRN YFLVNGTSRE IGIQFFDSLL DTKKIERFNP PSNVTVCNT THCLVRWKQP
 241 RTYQKLSYLD FQYQLDVHRK NTQPGTENLL INVSGDLENR YNFPSSSEPA KHSV KIRAAD
 301 VRILNWSSWS EAIEFGSDDG NLGSVYIYVL LIVGTLVCGI VLGFLFKRFL RIQRLFPVPV
 361 QIKDKLNDNH EVEDEIIWEE FTPEEGKGYR EEVLTVKEIT

Аминокислотная последовательность внеклеточного домена типичного GM-CSFR α человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 149 или состоит из нее.

1 MLLLVTSLLL CELPHPAFLI IPEKSDLRTV APASSLNVRV DSRTMNLWD CQENTTFKSC
 61 FLTDKKNRVV EPRLSNNECS CTFREICLHE GVTFEVHVNT SQRGFQQKLL YPNSGREGTA
 121 AQNFSCFIYN ADLMNCTWAR GPTAPRDVQY FLYIRNSKRR REIRCPYYIQ DSGTHVGCHL
 181 DNLSGLTSRN YFLVNGTSRE IGIQFFDSLL DTKKIERFNP PSNVTVCNT THCLVRWKQP
 241 RTYQKLSYLD FQYQLDVHRK NTQPGTENLL INVSGDLENR YNFPSSSEPA KHSV KIRAAD
 301 VRILNWSSWS EAIEFGSDDG

В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α , описанное в данном изобретении, специфично распознает эпитоп в пределах GM-CSFR α человека. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α дает перекрестную реакцию с GM-CSFR α из видов, отличающихся от человека. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α специфично только к GM-CSFR α человека и не проявляет перекрестной реактивности в отношении объектов других видов или типов, не имеющих отношения к человеку.

В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α , описанное в данном изобретении, специфично связывается с линейным эпитопом в пределах GM-CSFR α человека. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α , описанное в данном изобретении, специфично связывается с нелинейным эпитопом в пределах GM-CSFR α человека. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α , описанное в данной заявке, специфично связывается с эпитопом на GM-CSFR α человека, при этом данный эпитоп содержит один, два, три, четыре, пять или шесть остатков аминокислот, выбранных из группы, состоящей из Val50, Glu59, Lys194, Lys195, Arg283 и Ile284 в GM-CSFR α человека. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α , описанное в данном изобретении, специфично связывается с эпитопом на GM-CSFR α человека, при этом данный эпитоп содержит Val50, Glu59, Lys194, Lys195, Arg283 и Ile284 в GM-CSFR α человека. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α , описанное в данном изобретении, специфично связывается с эпитопом на GM-CSFR α человека, при этом данный эпитоп содержит один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или девять остатков аминокислот, выбранных из группы, состоящей из Val50, Glu59, Lys194, Lys195, Arg283, Ile284, Val51, Thr63 и Ile196. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α , описанное в данном изобретении, специфично связывается с эпитопом на GM-CSFR α человека, при этом данный эпитоп содержит аминокислотные остатки Val50, Glu59, Lys194, Lys195, Arg283, Ile284, Val51, Thr63 и Ile196. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α , описанное в данной заявке, специфично связывается с эпитопом на GM-CSFR α человека, при этом данный эпитоп содержит один, два, три, четыре, пять, шесть, семь или восемь остатков аминокислот, выбранных из группы, состоящей из Val50, Glu59, Lys194, Lys195, Arg283, Ile284, Leu191 и Ile196. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α , описанное в данном изобретении, специфично связывается с эпитопом на GM-CSFR α человека, при этом данный эпитоп содержит один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять остатков аминокислот, выбранных из группы, состоящей из Val50, Glu59, Lys194, Lys195, Arg283, Ile284, Arg49, Val51, Asn57 и Ser61. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α , описанное в данном изобретении, специфично связывается с эпитопом на GM-CSFR α человека, при этом данный эпитоп содержит аминокислотные остатки Val50, Glu59, Lys194, Lys195, Arg283, Ile284, Arg49, Val51, Asn57 и Ser61.

В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α дает перекрестную реакцию по меньшей мере с одним аллельным вариантом белка GM-CSFR α (или с его фрагментами). В некоторых воплощениях аллельный вариант имеет приблизительно до 30 (например, приблизительно любое число из 1, 2, 3, 4, 5, 6,

7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или 30) аминокислотных замен (таких как консервативные замены) по сравнению с встречающимися в природе GM-CSFR α (или его фрагментами). В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α не дает перекрестной реакции с каким-либо аллельным вариантом белка GM-CSFR α (или с его фрагментами).

В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α дает перекрестную реакцию по меньшей мере с одним межвидовым вариантом белка GM-CSFR α . В некоторых воплощениях, например, белок GM-CSFR α (или его фрагмент) представляет собой GM-CSFR α человека, а межвидовой вариант белка GM-CSFR α (или его фрагмента) представляет собой его вариант из яванского макака. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α не дает перекрестной реакции с каким-либо межвидовым вариантом белка GM-CSFR α .

В некоторых воплощениях, соответствующих любому из антител к GM-CSFR α , описанных в данном изобретении, антитело к GM-CSFR α содержит константную область тяжелой цепи антитела и константную область легкой цепи антитела. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α содержит константную область тяжелой цепи IgG1. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α содержит константную область тяжелой цепи IgG2. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α содержит константную область тяжелой цепи IgG3. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α содержит константную область тяжелой цепи IgG4. В некоторых воплощениях константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность (в том числе состоит из или по существу состоит из аминокислотной последовательности) с SEQ ID NO: 145. В некоторых воплощениях константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность (в том числе состоит из или по существу состоит из аминокислотной последовательности) с SEQ ID NO: 146. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α содержит константную область легкой цепи лямбда. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α содержит константную область легкой цепи каппа. В некоторых воплощениях константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность (в том числе состоит из или по существу состоит из аминокислотной последовательности) с SEQ ID NO: 147. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α содержит переменный домен тяжелой цепи антитела и переменный домен легкой цепи антитела.

В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α содержит V_H, содержащий HC-CDR1, содержащий X₁LX₂X₃H (SEQ ID NO: 76), где X₁ представляет собой E, N, G, D, M, S, P, F, Y, A, V, K, W, R или C, X₂ представляет собой S, C или P, и X₃ представляет собой I или M; HC-CDR2, содержащий GFDX₁X₂X₃X₄EX₅X₆YAQKX₇QG (SEQ ID NO: 77), где X₁ представляет собой P, G, T, S или V, X₂ представляет собой E, D, G или A, X₃ представляет собой D, G, I, W, S или V, X₄ представляет собой G, E, D или H, X₅ представляет собой T или A, X₆ представляет собой N или I, и X₇ представляет собой S или F; и HC-CDR3, содержащий GRYX₁X₂X₃X₄X₅X₆YGFDY (SEQ ID NO: 78), где X₁ представляет собой C, T, S, I, A или V, X₂ представляет собой S, G, E, F, W, H, I, V, N, Y, T или R, X₃ представляет собой T, H, L, F, P, I, S, Y, K, A, D, V, N или G, X₄ представляет собой D, A, M, Y, F, S, T, G или W, X₅ представляет собой T, S, F, Q, A, N, L, E, I, G или M, и X₆ представляет собой C, T, N, S или A; и V_L, содержащий LC-CDR1, содержащий RAX₁X₂X₃VX₄X₅X₆LA (SEQ ID NO: 293), где X₁ представляет собой S, L, N, A, K, R, I, Q, G, T, H, M или C, X₂ представляет собой Q, Y, P, A, I, F, T, R, V, L, E, S или C, X₃ представляет собой S, H, W, L, R, K, T, P, I, F, V, E, A или Q, X₄ представляет собой S, L, W, M, A, Y, K, R, G, T, E, V, N, F или C, X₅ представляет собой S, T, R, A, H, Q, P, M, L или G, и X₆ представляет собой Y, L или F; LC-CDR2, содержащий X₁X₂X₃S RAT (SEQ ID NO: 294), где X₁ представляет собой G или T, X₂ представляет собой A, G, R, H, K, S, T, M или F, и X₃ представляет собой S, A, W, R, L, T, Q, F, Y, H или N; и LC-CDR3, содержащий QQYX₁X₂X₃PX₄T (SEQ ID NO: 79), где X₁ представляет собой N, D, S, R, A, T, L, Y, Q, W или G, X₂ представляет собой N, D, E, T, Y, G, A, M, F, S, I или L, X₃ представляет собой W, S, P, V, G или R, и X₄ представляет собой P, Y, H, S, F, N, D, V или G.

В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α содержит V_H, содержащий HC-CDR1, содержащий ELX₁X₂H (SEQ ID NO: 295), где X₁ представляет собой S, C или P, и X₂ представляет собой I или M; HC-CDR2, содержащий GFDX₁X₂X₃X₄EX₅X₆YAQKX₇QG (SEQ ID NO: 77), где X₁ представляет собой P, G, T, S или V, X₂ представляет собой E, D, G или A, X₃ представляет собой D, G, I, W, S или V, X₄ представляет собой G, E, D или H, X₅ представляет собой T или A, X₆ представляет собой N или I, и X₇ представляет собой S или F; и HC-CDR3, содержащий GRYX₁X₂X₃X₄X₅X₆YGFDY (SEQ ID NO: 78), где X₁ представляет собой C, T, S, I, A или V, X₂ представляет собой S, G, E, F, W, H, I, V, N, Y, T или R, X₃ представляет собой T, H, L, F, P, I, S, Y, K, A, D, V, N или G, X₄ представляет собой D, A, M, Y, F, S, T, G или W, X₅ представляет собой T, S, F, Q, A, N, L, E, I, G или M, и X₆ представляет собой C, T, N, S или A; и V_L, содержащий: LC-CDR1, содержащий RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51); LC-CDR2, содержащий GASSRAT (SEQ ID NO: 52); и LC-CDR3, содержащий QQYX₁X₂X₃PX₄T (SEQ ID NO: 79), где X₁ представляет собой N, D, S, R, A, T, L, Y, Q, W или G, X₂ представляет собой N, D, E, T, Y, G, A, M, F, S, I или L, X₃ представляет собой W, S, P, V, G или R, и X₄ представляет собой P, Y, H, S, F, N, D, V или G.

В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α содержит V_H, содержащий: HC-CDR1, содержа-

идентичности последовательности, и V_L , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126 или ее вариант, имеющий по меньшей мере примерно 90% идентичности последовательности. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α содержит V_H , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91, и V_L , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126.

В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α содержит V_H , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99 или ее вариант, имеющий по меньшей мере примерно 90% (например, по меньшей мере примерно любое значение из 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности последовательности, и V_L , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122 или ее вариант, имеющий по меньшей мере примерно 90% идентичности последовательности. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α содержит V_H , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99, и V_L , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122.

В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α содержит V_H , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101 или ее вариант, имеющий по меньшей мере примерно 90% (например, по меньшей мере примерно любое значение из 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности последовательности, и V_L , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126 или ее вариант, имеющий по меньшей мере примерно 90% идентичности последовательности. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α содержит V_H , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101, и V_L , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126.

В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α содержит V_H , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103 или ее вариант, имеющий по меньшей мере примерно 90% (например, по меньшей мере примерно любое значение из 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности последовательности, и V_L , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 123 или ее вариант, имеющий по меньшей мере примерно 90% идентичности последовательности. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α содержит V_H , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103, и V_L , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 123.

В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α содержит V_H , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99 или ее вариант, имеющий по меньшей мере примерно 90% (например, по меньшей мере примерно любое значение из 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности последовательности, и V_L , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126 или ее вариант, имеющий по меньшей мере примерно 90% идентичности последовательности. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α содержит V_H , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99, и V_L , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α содержит V_H , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 121 или ее вариант, имеющий по меньшей мере примерно 90% (например, по меньшей мере примерно любое значение из 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности последовательности, и V_L , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126 или ее вариант, имеющий по меньшей мере примерно 90% идентичности последовательности. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α содержит V_H , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 121, и V_L , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126. В некоторых воплощениях функциональные эпитопы могут быть картированы с использованием комбинаторного аланинового сканирования. В этом способе стратегию комбинаторного аланинового сканирования можно использовать для идентификации аминокислот в белке GM-CSFR α , которые необходимы для взаимодействия с антителами к GM-CSFR α . В некоторых воплощениях эпитоп является конформационным, и для идентификации эпитопов может быть использована кристаллическая структура антител к GM-CSFR α , связанных с GM-CSFR α .

В некоторых воплощениях согласно настоящему изобретению предложены антитела, которые конкурируют с любым из антител к GM-CSFR α , описанных в данном документе, за связывание с GM-CSFR α . В некоторых воплощениях согласно настоящему изобретению предложены антитела, которые конкурируют с любым из антител к GM-CSFR α , предложенных в данном изобретении, за связывание с эпитопом на GM-CSFR α . В некоторых воплощениях предложено антитело к GM-CSFR α , которое связывается с тем же эпитопом, что и антитело к GM-CSFR α , содержащее V_H , содержащий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 80-121 и 246-287, и V_L , содержащий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 122-144, 150-245 и 288-289. В некоторых воплощениях предложено антитело к GM-CSFR α , которое специфично связывается с GM-CSFR α , конкурируя с антителом к GM-CSFR α , содержащим V_H , содержащий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 80-121 и 246-287, и V_L , содержащий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 122-144, 150-245 и 288-289.

В некоторых воплощениях для идентификации моноклонального антитела, которое конкурирует с антителом к GM-CSFR α , описанным в данном изобретении, за связывание с GM-CSFR α , могут быть использованы конкурентные анализы. Конкурентные анализы можно использовать для определения того,

связываются ли два антитела с одним и тем же эпитопом посредством распознавания идентичных или стерически перекрывающихся эпитопов или ингибирует ли одно антитело конкурентным образом связывание другого антитела с антигеном. В некоторых воплощениях такое конкурирующее антитело связывается с тем же эпитопом, с которым связывается антитело, описанное в данном изобретении. Типичные конкурентные анализы включают, но не ограничиваются этим, рутинные анализы, например, приведенные в Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, ch. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.). Подробные типичные методы картирования эпитопа, с которым связывается антитело, приведены в Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols" в *Methods in Molecular Biology*, vol. 66 (Humana Press, Totowa, N.J.). В некоторых воплощениях указывается, что два антитела связываются с одним и тем же эпитопом, если каждое блокирует связывание другого на 50% или больше. В некоторых воплощениях антитело, которое конкурирует с антителом к GM-CSFR α , описанным в данном изобретении, представляет собой химерное, гуманизированное или человеческое антитело.

Последовательности, типичные для антител к GM-CSFR α , показаны в табл. 2, 3 и 18 и на фиг. 19A, 19B. Специалистам в данной области техники будет понятно, что известно много алгоритмов для предсказания положений CDR и для определения границ переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи антитела. Антитела к GM-CSFR α , содержащие последовательности CDR, V_H и/или V_L из антител, описанных в данном изобретении, но основанные на алгоритмах предсказания, отличающихся от тех, что в качестве примеров приведены ниже в таблицах, находятся в пределах объема этого изобретения.

Таблица 2

Типичные последовательности CDR антител к GM-CSFR α

Наименование антитела	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3
T119	ELSIH (SEQ ID NO: 1)	GFDPEDGETNYAQKSQG (SEQ ID NO: 5)	GRYCSTDTCYGFDY (SEQ ID NO: 17)
E01	ELSIH (SEQ ID NO: 1)	GFDPEDGETNYAQKSQG (SEQ ID NO: 5)	GRYCSTDTCYGFDY (SEQ ID NO: 17)
E09	ELSMH (SEQ ID NO: 2)	GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 6)	GRYCGHASCYGFYD (SEQ ID NO: 18)
E105	ELSIH (SEQ ID NO: 1)	GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 6)	GRYTSLMFTYGFDY (SEQ ID NO: 19)
E108	ELSIH (SEQ ID NO: 1)	GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 6)	GRYTELYQNYGFYD (SEQ ID NO: 20)
E113	ELSIH (SEQ ID NO: 1)	GFDPEDGETIYAQKSQG (SEQ ID NO: 7)	GRYTELFASYGFYD (SEQ ID NO: 21)
E16	ELSIH (SEQ ID NO: 1)	GFDPEDGEAIYAQKSQG (SEQ ID NO: 8)	GRYSEHSTSYGFYD (SEQ ID NO: 22)
E194	ELSIH (SEQ ID NO: 1)	GFDPEDGETIYAQKSQG (SEQ ID NO: 7)	GRYTGLMNSYGFYD (SEQ ID NO: 23)
E27	ELSIH (SEQ ID NO: 1)	GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 6)	GRYISFMFTYGFDY (SEQ ID NO: 24)
E29	ELSIH (SEQ ID NO: 1)	GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 6)	GRYCFPDTCYGFDY (SEQ ID NO: 25)
E30	ELSIH (SEQ ID NO: 1)	GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 6)	GRYCSTDTCYGFDY (SEQ ID NO: 17)
E34	ELSIH (SEQ ID NO: 1)	GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 6)	GRYSFTDLAYGFYD (SEQ ID NO: 26)
E35	ELSIH (SEQ ID NO: 1)	GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 6)	GRYTSLATYGFYD (SEQ ID NO: 27)
E36	ELSMH (SEQ ID NO: 2)	GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 6)	GRYAFIDTAYGFYD (SEQ ID NO: 28)
E39	ELSIH (SEQ ID NO: 1)	GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 6)	GRYCSSLDCYGFYD (SEQ ID NO: 29)
E40	ELSIH (SEQ ID NO: 1)	GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 6)	GRYTSLDSEYGFYD (SEQ ID NO: 30)
E54	ELSMH (SEQ ID NO: 2)	GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 6)	GRYSSYDIAYGFYD (SEQ ID NO: 31)
E61	ELSMH (SEQ ID NO: 2)	GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 6)	GRYAWTDIAYGFYD (SEQ ID NO: 32)
E83	ELSIH (SEQ ID NO: 1)	GFDPEDGETIYAQKSQG (SEQ ID NO: 7)	GRYCFYDLCYGFYD (SEQ ID NO: 33)
E85	ELSIH (SEQ ID NO: 1)	GFDPEDGETIYAQKSQG	GRYSSYFTNYGFYD

		(SEQ ID NO: 7)	(SEQ ID NO: 34)
E87	ELSIH (SEQ ID NO: 1)	GFDPEDGETIYAQKSQG (SEQ ID NO: 7)	GRYVSLFFNYGFDY (SEQ ID NO: 35)
E88	ELSMH (SEQ ID NO: 2)	GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 6)	GRYCHKDGCYGFDY (SEQ ID NO: 36)
E90	ELSIH (SEQ ID NO: 1)	GFDPEDGETIYAQKSQG (SEQ ID NO: 7)	GRYTGLYASYGFDY (SEQ ID NO: 37)
E94	ELSMH (SEQ ID NO: 2)	GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 6)	GRYCETDICYGFDY (SEQ ID NO: 38)
E200a	ELPMH (SEQ ID NO: 3)	GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 6)	GRYTIITTNYGFDY (SEQ ID NO: 39)
EII33	ELSIH (SEQ ID NO: 1)	GFDGDGEETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 9)	GRYTSLAATYGFDY (SEQ ID NO: 40)
EII52	ELSIH (SEQ ID NO: 1)	GFDGDIEETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 10)	GRYTSLATYGYFDY (SEQ ID NO: 27)
EII81	ELSIH (SEQ ID NO: 1)	GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 6)	GRYTSLAATYGFDY (SEQ ID NO: 40)
E161	ELCMH (SEQ ID NO: 4)	GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 6)	GRYAVTDMAYGFDY (SEQ ID NO: 41)
E163	ELSIH (SEQ ID NO: 1)	GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 6)	GRYAFAGLAYGFDY (SEQ ID NO: 42)
E164	ELSMH (SEQ ID NO: 2)	GFDPEDGETIYAQKSQG (SEQ ID NO: 7)	GRYTNDNFANYGFDY (SEQ ID NO: 43)
E170	ELSMH (SEQ ID NO: 2)	GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 6)	GRYSSVGSTYGFDY (SEQ ID NO: 44)
E172	ELSMH (SEQ ID NO: 2)	GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 6)	GRYANLYNNYGFDY (SEQ ID NO: 45)
E174	ELSIH (SEQ ID NO: 1)	GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 6)	GRYVYLASNYGFDY (SEQ ID NO: 46)
E181	ELSMH (SEQ ID NO: 2)	GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 6)	GRYSTNFSNYGFDY (SEQ ID NO: 47)
E84	ELSMH (SEQ ID NO: 2)	GFDPEDGETIYAQKSQG (SEQ ID NO: 7)	GRYTRGWFNYGFDY (SEQ ID NO: 48)
EII55	ELSIH (SEQ ID NO: 1)	GFDGDWHETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 14)	GRYTSLDATYGFDY (SEQ ID NO: 49)
E87b	ELSIH (SEQ ID NO: 1)	GFDPEDGETIYAQKSQG (SEQ ID NO: 7)	GRYVSLFFNYGFDY (SEQ ID NO: 35)

E31	ELSIH (SEQ ID NO: 1)	GFDPEDGETIYAQKSQG (SEQ ID NO: 7)	GRYSESFASYGFDY (SEQ ID NO: 50)
E41	ELSIH (SEQ ID NO: 1)	GFDPAWGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 15)	GRYTSLATYGFY (SEQ ID NO: 27)
EII41	ELSIH (SEQ ID NO: 1)	GFDTGDEETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 11)	GRYTSLATYGFY (SEQ ID NO: 49)
EII46	ELSIH (SEQ ID NO: 1)	GFDSEWGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 12)	GRYTSLATYGFY (SEQ ID NO: 27)
EII49	ELSIH (SEQ ID NO: 1)	GFDVASGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 13)	GRYTSLATYGFY (SEQ ID NO: 49)
EII7	ELSIH (SEQ ID NO: 1)	GFDSEVGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 16)	GRYTSLATYGFY (SEQ ID NO: 40)
E35a	ELSIH (SEQ ID NO: 1)	GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 6)	GRYTSLATYGFY (SEQ ID NO: 27)
E35b	ELSIH (SEQ ID NO: 1)	GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 6)	GRYTSLATYGFY (SEQ ID NO: 27)
E35c	ELSIH (SEQ ID NO: 1)	GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 6)	GRYTSLATYGFY (SEQ ID NO: 27)
E35d	ELSIH (SEQ ID NO: 1)	GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 6)	GRYTSLATYGFY (SEQ ID NO: 27)
E35e	ELSIH (SEQ ID NO: 1)	GFDPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 6)	GRYTSLATYGFY (SEQ ID NO: 27)
Наименование антитела	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
T119	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYNNWPPT (SEQ ID NO: 53)
E01	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYDNWPPT (SEQ ID NO: 54)
E09	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYNNWPPT (SEQ ID NO: 53)
E105	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYNNWPPT (SEQ ID NO: 53)
E108	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYNNWPPT (SEQ ID NO: 53)
E113	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYNNWPYT (SEQ ID NO: 55)

E16	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYDSWPYT (SEQ ID NO: 56)
E194	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYDNWPYT (SEQ ID NO: 57)
E27	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYNNWPPT (SEQ ID NO: 53)
E29	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYDNSPHT (SEQ ID NO: 58)
E30	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYDNSPHT (SEQ ID NO: 58)
E34	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYDSSPPT (SEQ ID NO: 59)
E35	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYDNWPYT (SEQ ID NO: 57)
E36	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYSNSPPT (SEQ ID NO: 60)
E39	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYDNSPHT (SEQ ID NO: 58)
E40	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYDNSPYT (SEQ ID NO: 61)
E54	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYNSPPT (SEQ ID NO: 62)
E61	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYDNSPST (SEQ ID NO: 63)
E83	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYSNSPPT (SEQ ID NO: 60)
E85	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYNNWPYT (SEQ ID NO: 55)
E87	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYNNWPPT (SEQ ID NO: 53)
E88	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYDSSPHT (SEQ ID NO: 64)
E90	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYDNWPYT (SEQ ID NO: 57)
E94	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYNNWPPT (SEQ ID NO: 53)
E200a	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYDNWPPT (SEQ ID NO: 53)

	ID NO: 51)	52)	ID NO: 54)
EII33	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYRNWPFT (SEQ ID NO: 65)
EII52	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYANPPNT (SEQ ID NO: 66)
EII81	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYTNVPDT (SEQ ID NO: 67)
E161	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYNNSPPT (SEQ ID NO: 68)
E163	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYDNPPT (SEQ ID NO: 69)
E164	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYNNWPYT (SEQ ID NO: 55)
E170	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYDNPYT (SEQ ID NO: 61)
E172	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYNNWPPT (SEQ ID NO: 53)
E174	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYNNWPPT (SEQ ID NO: 53)
E181	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYDNWPYT (SEQ ID NO: 57)
E84	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYNNWPYT (SEQ ID NO: 55)
EII55	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYGNRPDT (SEQ ID NO: 73)
E87b	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYDNWPYT (SEQ ID NO: 57)
E31	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYDNWPYT (SEQ ID NO: 57)
E41	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYDNGPET (SEQ ID NO: 74)
EII41	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYLNPFPT (SEQ ID NO: 70)
EII46	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYSNVPVT (SEQ ID NO: 71)
EII49	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYYNGPGT (SEQ ID NO: 72)
EII7	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYRNGPPT (SEQ ID NO: 75)
E35a	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYDNPHT (SEQ ID NO: 58)
E35b	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYDNPYT (SEQ ID NO: 61)
E35c	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYDSSPHT (SEQ ID NO: 64)
E35d	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYDNWPPT (SEQ ID NO: 54)
E35e	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 51)	GASSRAT (SEQ ID NO: 52)	QQYSNSPPT (SEQ ID NO: 60)

Типичные последовательности

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
148	hGM-CSFR α	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEKSDLRTVAPASSLNVRFDSTMNLSWDC QENTTFSKCFLTDKKNRVVEPRLSNNECSCTFREICLHEGVTFEVHVNTS QRGFQKKLLYPNSGREGTAAQNFSCFIYNADLMNCTWARGPTAPRDVQ YFLYIRNSKRRREIRCPYYIQDSGTHVGCHLDNLSGLTSRNYFLVNGTSR EIGIQFFDSLLDTKKIERFNPPSNVTVRCNTTHCLVRWKQPRTYQKLSYLD FQYQLDVHRKNTQPGTENLLINVSGDLENRYNFPSSSEPRAKHSVKIRAAD VRILNWSSWSEAIEFGSDDGNLGSVYIYVLLIVGTLVCGIVLGFLFKRFLRI QRLFPPVPQIKDKLNDNHEVEDEIIWEEFTPEEGKGYREEVLTVKEIT
80	V _H из E01, T119	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSGHTLTELSIHWVRQAPGKGLEWM GGFDPEDGETNYAQKSQGRVTMTGDTSTDAYLELSSLRSEDTALYYCA TGRYCSTDTCYGFYWGQGLTVTVSS
81	V _H из E09	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSGHTLTELSMHWVRQAPGKGLEW MGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTGDTSTDAYLELSSLRSEDTALYYC ATGRYCGHASCYGFYWGQGLTVTVSS
82	V _H из E105	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSGYLTTELSIHWVRQAPGKGLEWM GGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTGDTSTDAYLELSSLRSEDTALYYCAT GRYTSLMFTYGFYWGQGLTVTVSS
83	V _H из E108 _H	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSGHTLTELSIHWVRQAPGKGLEWM GGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTGDTSTDAYLELSSLRSEDTALYYCAT GRYTELYQNYGFYWGQGLTVTVSS
84	V _H из E113	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSGYLTTELSIHWVRQAPGKGLEWM GGFDPEDGETIYAQKSQGRVTMTGDTSTDAYLELSSLRSEDTALYYCAT GRYTELFASYGFYWGQGLTVTVSS

85	V _H из E16	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSIHWVRQAPGKGLEWM GGFDPEDGEAIYAQKSQGRVTMTGDTSTDYALELSSLRSEDALYYCAT GRYSEHSTSYGFDYWGGGTLTVSS
86	V _H из E194	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSIHWVRQAPGKGLEWM GGFDPEDGETIYAQKSQGRVTMTGDTSTDYALELSSLRSEDALYYCAT GRYTGLMNSYGFDYWGGGTLTVSS
87	V _H из E27	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSIHWVRQAPGKGLEWM GGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTGDTSTDYALELSSLRSEDALYYCAT GRYSISFMFTYGFDYWGGGTLTVSS
88	V _H из E29	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGHTLTELSIHWVRQAPGKGLEWM GGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTGDTSTDYALELSSLRSEDALYYCAT GRYCFPDTCYGFDYWGGGTLTVSS
89	V _H из E30	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGHTLTELSIHWVRQAPGKGLEWM GGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTGDTSTDYALELSSLRSEDALYYCAT GRYCSTDTCYGFDYWGGGTLTVSS
90	V _H из E34	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSIHWVRQAPGKGLEWM GGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTGDTSTDYALELSSLRSEDALYYCAT GRYSFTDLAYGFDYWGGGTLTVSS
91	V _H из E35, E35a-e	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSIHWVRQAPGKGLEWM GGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTGDTSTDYALELSSLRSEDALYYCAT GRYTSLATTYGFDYWGGGTLTVSS
92	V _H из E36	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGHTLTELSMHWVRQAPGKGLEW MGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTGDTSTDYALELSSLRSEDALYYC ATGRYAFIDTAYGFDYWGGGTLTVSS
93	V _H из E39	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGHTLTELSIHWVRQAPGKGLEWM GGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTGDTSTDYALELSSLRSEDALYYCAT GRYCSSLDCYGFDYWGGGTLTVSS
94	V _H из E40	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGHTLTELSIHWVRQAPGKGLEWM GGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTGDTSTDYALELSSLRSEDALYYCAT GRYTSLDESYGFDYWGGGTLTVSS
95	V _H из E54	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEW MGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTGDTSTDYALELSSLRSEDALYYC ATGRYSSYDIAYGFDYWGGGTLTVSS
96	V _H из E61	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEW MGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTGDTSTDYALELSSLRSEDALYYC ATGRYAWTDIAYGFDYWGGGTLTVSS

97	V _H из E83	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSIHWVRQAPGKGLEWM GGFDPEDGETIYAQKSQGRVTMTGDTSTDYALELSSLRSEDALYYCAT GRYCFYDLCYGFYDWGQGLTVTVSS
98	V _H из E85	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSIHWVRQAPGKGLEWM GGFDPEDGETIYAQKSQGRVTMTGDTSTDYALELSSLRSEDALYYCAT GRYSSYFTNYGFYDWGQGLTVTVSS
99	V _H из E87, E87b	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSIHWVRQAPGKGLEWM GGFDPEDGETIYAQKSQGRVTMTGDTSTDYALELSSLRSEDALYYCAT GRYVSLFFNYGFYDWGQGLTVTVSS
100	V _H из E88	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGHTLTELSMHWVRQAPGKGLEW MGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTGDTSTDYALELSSLRSEDALYYC ATGRYCHKDGCYGFYDWGQGLTVTVSS
101	V _H из E90	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSIHWVRQAPGKGLEWM GGFDPEDGETIYAQKSQGRVTMTGDTSTDYALELSSLRSEDALYYCAT GRYTGLYASYGFYDWGQGLTVTVSS
102	V _H из E94	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGHTLTELSMHWVRQAPGKGLEW MGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTGDTSTDYALELSSLRSEDALYYC ATGRYCETDICYGFYDWGQGLTVTVSS
103	V _H из E200a	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELPMHWVRQAPGKGLEW MGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTGDTSTDYALELSSLRSEDALYYC ATGRYTIITTNYGFDYWGQGLTVTVSS
104	V _H из EII33	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSIHWVRQAPGKGLEWM GGFDGDGEETIYAQKFQGRVTMTGDTSTDYALELSSLRSEDALYYCAT GRYTSLAATYGFYDWGQGLTVTVSS
105	V _H из EII52	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSIHWVRQAPGKGLEWM GGFDGDIEETIYAQKFQGRVTMTGDTSTDYALELSSLRSEDALYYCAT GRYTSLATYGFYDWGQGLTVTVSS
106	V _H из EII81	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSIHWVRQAPGKGLEWM GGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTGDTSTDYALELSSLRSEDALYYCAT GRYTSLAATYGFYDWGQGLTVTVSS
107	V _H из E161	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGHTLTELCMHWVRQAPGKGLEW MGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTGDTSTDYALELSSLRSEDALYYW ATGRYAVTDMAYGFYDWGQETLVSVSS
108	V _H из E163	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSIHWVRQAPGKGLEWM GGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTGDTSTDYALELSSLRSEDALYYCAT GRYAFAGLAYGFYDWGQGLTVTVSS

109	V _H из E164	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCVSGHTLTLSMHWVRQAPGKGLEW MGGFDPEDGETIYAQKSQGRVTMTGDTSTDYALELSSLRSEDALYYC ATGRYTNDNFANYGFDYWGGGTLTVSS
110	V _H из E170	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCVSGHTLTLSMHWVRQAPGKGLEW MGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTGDTSTDYALELSSLRSEDALYYC ATGRYSSVGSTYGFDYWGGGTLTVSS
111	V _H из E172	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCVSGYTLTLSMHWVRQAPGKGLEW MGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTGDTSTDYALELSSLRSEDALYYC ATGRYANLYNNYGFDYWGGGTLTVSS
112	V _H из E174	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCVSGHTLTLSIHWVRQAPGKGLEWM GGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTGDTSTDYALELSSLRSEDALYYCAT GRYVYLASNYGFDYWGGGTLTVSS
113	V _H из E181	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCVSGYTLTLSMHWVRQAPGKGLEW MGGFDPEDGETIYAQKFQGRVTMTGDTSTDYALELSSLRSEDALYYC ATGRYSTNFSNYGFDYWGGGTLTVSS
114	V _H из E84	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCVSGYTLTLSMHWVRQAPGKGLEW MGGFDPEDGETIYAQKSQGRVTMTGDTSTDYALELSSLRSEDALYYC ATGRYTRGWFNYGFDYWGGGTLTVSS
115	V _H из EII41	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCVSGYTLTLSIHWVRQAPGKGLEWM GGFDTGDDGETIYAQKFQGRVTMTGDTSTDYALELSSLRSEDALYYCAT GRYTSLDATYGFDYWGGGTLTVSS
116	V _H из EII46	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCVSGYTLTLSIHWVRQAPGKGLEWM GGFDSEWGETIYAQKFQGRVTMTGDTSTDYALELSSLRSEDALYYCA TGRYTSLATTYGFDYWGGGTLTVSS
117	V _H из EII49	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCVSGYTLTLSIHWVRQAPGKGLEWM GGFDVASGETIYAQKFQGRVTMTGDTSTDYALELSSLRSEDALYYCAT GRYTSLDATYGFDYWGGGTLTVSS
118	V _H из EII55	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCVSGYTLTLSIHWVRQAPGKGLEWM GGFDGDWHETIYAQKFQGRVTMTGDTSTDYALELSSLRSEDALYYCA TGRYTSLDATYGFDYWGGGTLTVSS
119	V _H из E41	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCVSGYTLTLSIHWVRQAPGKGLEWM GGFDPAWGETIYAQKFQGRVTMTGDTSTDYALELSSLRSEDALYYCA TGRYTSLATTYGFDYWGGGTLTVSS
120	V _H из EII7	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCVSGYTLTLSIHWVRQAPGKGLEWM GGFDSEVGETIYAQKFQGRVTMTGDTSTDYALELSSLRSEDALYYCAT GRYTSLAATYGFDYWGGGTLTVSS

121	V _H из E31	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSQGYTLTELSIHWVRQAPGKGLEWM GGFDPEDGETIYAQKSQGRVTMTGDTSTDTAYLELSSLRSEDALYYCAT GRYSESFASYGFDYWGGQGLTVTVSS
122	V _L из T119, E87, E09, E105, E108, E27, E94, E172, E174	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYNNWPPTFG QGTKLEIK
123	V _L из E01, E200a, E35d	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDNWPPTFG QGTKLEIK
124	V _L из E113, E85, E164, E84	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYNNWPPTFG QGTKLEIK
125	V _L из E16	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDSWPPTFGQ GTKLEIK
126	V _L из E194, E35, E90, E181, E87b, E31	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDNWPPTFG QGTKLEIK
127	V _L из E29, E30, E39, E35a	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDNWPPTFGQ GTKLEIK
128	V _L из E34	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDSSPPTFGQ GTKLEIK
129	V _L из E36, E83, E35e	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYNSPPTFGQ GTKLEIK
130	V _L из E40, E170, E35b	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDNWPPTFGQ GTKLEIK
131	V _L из E54	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYNSPPTFGQ GTKLEIK
132	V _L из E61	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG

		ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDNSPSTFGQ GTKLEIK
133	V _L из E88, E35c	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDSSPHTFGQ GTKLEIK
134	V _L из EII33	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYRNWPFTFGQ GTKLEIK
135	V _L из EII52	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYANPPNTFGQ GTKLEIK
136	V _L из EII81	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYTNVPDTFGQ GTKLEIK
137	V _L из E161	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYNNSPPTFGQ GTKLEIK
138	V _L из E163	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDNSPPTFGQ GTKLEIK
139	V _L из EII41	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYLNPPFTFGQ GTKLEIK
140	V _L из EII46	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYSNPVTFGQ GTKLEIK
141	V _L из EII49	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYYNGPGTFGQ GTKLEIK
142	V _L из EII55	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGNRPDTFGQ GTKLEIK
143	V _L из E41	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDNGPETFGQ GTKLEIK
144	V _L из EII7	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYRNGPPTFGQ

		GTKLEIK
145	Константная область тяжелой цепи IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
146	Константная область тяжелой цепи IgG4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK
147	Константная область легкой цепи	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

GM-CSF.

Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), также известный как колониестимулирующий фактор 2 (CSF2), продуцируется макрофагами, Т-клетками, тучными клетками, природными киллерными клетками, эндотелиальными клетками и фибробластами. GM-CSF представляет собой провоспалительный цитокин I типа, который повышает выживаемость, усиливает пролиферацию и/или дифференцировку большого разнообразия типов гемопоэтических клеток, включая нейтрофилы, эозинофилы, моноциты и макрофаги, как например, дифференцировку миелоидных клеток, рекрутмент и дифференцировку происходящих из моноцитов дендритных клеток, инициацию и активацию нейтрофилов. Он также способствует образованию кровеносных сосудов, а также росту опухолей. В клиниках GM-CSF часто используют для улучшения восстановления костного мозга после процедур облучения.

GM-CSF является одним из первых провоспалительных цитокинов, которые появляются в места воспаления, и играет решающую роль в регуляции воспалительного процесса, посредством, например, усиления дифференцировки гемопоэтических клеток в нейтрофилы, эозинофилы, моноциты и макрофаги (Nature Reviews Rheumatology, 2015, 7 (11): 415-430). Активируя клетки эндотелия сосудов, GM-CSF способствует рекрутменту моноцитов и макрофагов. Кроме того, GM-CSF усиливает пролиферацию моноцитов и макрофагов, таких как макрофаги из синовиальных суставов при ревматоидном артрите; а также способствует продуцированию цитокинов макрофагами, включая GM-CSF и другие воспалительные цитокины, такие как TNF- α , IL-6, IL-1 и хемокины. Помимо этого, GM-CSF участвует в модулировании антигенпредставляющих клеток в воспалительных тканях и способствует продуцированию IL-23 макрофагами и дендритными клетками, что вместе с IL-6 и IL-1 модулирует дифференцировку Т-клеток. Эндогенный GM-CSF модулирует сенсорные нейроны, используя болевые сигналы и повышая чувствительность к боли. Нокаут GM-CSF у мышей не затрагивал развития миелоидных клеток, что подтверждает лимитированную роль GM-CSF в стимулировании развития миелоидных клеток (Stanley et al. PNAS, 1994, 91(12): 5592-5594). Однако, в связи с отсутствием соответствующих воспалительных реакций мыши с нокаутом GM-CSF оказались более предрасположены к инфекциям (Trapnell et al. N. Engl. J. Med., 2003, 349: 2527-2539; Dranoff et al. Science, 1994, 264: 713-716). Отсутствие GM-CSF снижало вероятность возникновения ревматоидного артрита, энцефаломиелита и аутоиммунного миокардита, и это позволяет предположить, что GM-CSF вовлечен главным образом в воспалительный процесс (Lawlor et al. Arthritis & Rheumatism, 2005, (52) 3749-3754; McQualter et al. Journal of Experimental Medicine, 2001; 194(7): 873-882; Sonderegger et al. Journal of Experimental Medicine 2008, 205(10): 2281-2294).

GM-CSFR.

Рецептор GM-CSF является членом надсемейства рецепторов гемопоэтической системы. Он является гетеродимерным белком, состоящим из альфа- и бета-субъединиц. Альфа-субъединица является высокоспецифичной субъединицей у GM-CSF, в то время как бета-субъединица является общей среди других рецепторов цитокинов, включая IL3 и IL5. Это находит отражение в более широком распределении бета-субъединицы рецептора в тканях. Альфа-субъединица, GM-CSFR α , экспрессируется главным образом в миелоидных клетках и негемопоэтических клетках, таких как нейтрофилы, макрофаги, эозинофилы, дендритные клетки, эндотелиальные клетки и клетки дыхательного эпителия. Полноразмерная GM-CSFR α представляет собой состоящий из 400 аминокислот мембранный гликопротеин I типа, который принадлежит к семейству цитокиновых рецепторов I типа и состоит из сигнального пептида из 22 аминокислот (положения 1-22), внеклеточного домена из 298 аминокислот (положения 23-320), трансмембранного

домена (положения 321-345) и короткого внутриклеточного домена из 55 аминокислот. Сигнальный пептид отщепляется с образованием зрелой формы белка GM-CSFR α из 378 аминокислот. Доступны клоны кДНК для GM-CSFR α человека и мыши, и на уровне белка, субъединицы этих рецепторов имеют идентичность 36%. GM-CSF способен связываться с относительно низкой аффинностью с отдельно взятой α -субъединицей (K_d 1-5 нМ), но совсем не связывается с отдельно взятой β -субъединицей. Однако, присутствие обеих α - и β -субъединиц приводит к образованию высокоаффинного лиганд-рецепторного комплекса (K_d примерно 100 пМ). При передаче сигнала с участием GM-CSF сначала происходит его связывание с α -цепью GM-CSFR, и затем происходит перекрестное объединение с более крупной субъединицей, общей β -цепью, для осуществления высокоаффинного взаимодействия, в результате чего происходит фосфорилирование участников пути JAK-STAT (янус-киназ-передатчиков сигнала и активаторов транскрипции). Обзор по связыванию GM-CSFR с GM-CSF приведен в Hama et al., *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274 (48). В результате этого взаимодействия также возможна передача сигнала через фосфорилирование остатков тирозина и активацию пути митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK). Показано, что при патологических состояниях GM-CSF играет роль в обострении воспалительных, респираторных и аутоиммунных заболеваний. Поэтому подавление связывания GM-CSF с GM-CSFR α представляет собой терапевтический подход к лечению заболеваний и состояний, опосредуемых GM-CSFR.

Полноразмерное антитело к GM-CSFR α .

Антитело к GM-CSFR α в некоторых воплощениях представляет собой полноразмерное антитело к GM-CSFR α . В некоторых воплощениях полноразмерное антитело к GM-CSFR α представляет собой IgA, IgD, IgE, IgG или IgM. В некоторых воплощениях полноразмерное антитело к GM-CSFR α содержит константные домены IgG, такие как константные домены любого из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, в том числе их варианты. В некоторых воплощениях полноразмерное антитело к GM-CSFR α содержит константную область легкой цепи лямбда. В некоторых воплощениях полноразмерное антитело к GM-CSFR α содержит константную область легкой цепи каппа. В некоторых воплощениях полноразмерное антитело к GM-CSFR α представляет собой полноразмерное антитело к GM-CSFR α человека. В некоторых воплощениях полноразмерное антитело к GM-CSFR α содержит последовательность Fc-области мышиного иммуноглобулина. В некоторых воплощениях полноразмерное антитело к GM-CSFR α содержит последовательность Fc-области, которая преобразована или по-иному изменена так, что она обладает усиленной эффекторной функцией в виде антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) или комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

Так, например, в некоторых воплощениях предложено полноразмерное антитело к GM-CSFR α , содержащее константные домены IgG1, при этом антитело к GM-CSFR α специфично связывается с GM-CSFR α . В некоторых воплощениях IgG1 представляет собой IgG1 человека. В некоторых воплощениях константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 145. В некоторых воплощениях константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 147. В некоторых воплощениях константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 145, и константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 147.

В некоторых воплощениях предложено полноразмерное антитело к GM-CSFR α , содержащее константные домены IgG2, при этом антитело к GM-CSFR α специфично связывается с GM-CSFR α . В некоторых воплощениях IgG2 представляет собой IgG2 человека. В некоторых воплощениях константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 147.

В некоторых воплощениях предложено полноразмерное антитело к GM-CSFR α , содержащее константные домены IgG3, при этом антитело к GM-CSFR α специфично связывается с GM-CSFR α . В некоторых воплощениях IgG3 представляет собой IgG3 человека. В некоторых воплощениях константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 147.

В некоторых воплощениях предложено полноразмерное антитело к GM-CSFR α , содержащее константные домены IgG4, при этом антитело к GM-CSFR α специфично связывается с GM-CSFR α . В некоторых воплощениях IgG4 представляет собой IgG4 человека. В некоторых воплощениях константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 146. В некоторых воплощениях константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 147. В некоторых воплощениях константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 146, и константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 147.

жит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 146. В некоторых воплощениях константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 147. В некоторых воплощениях константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 146, а константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 147.

В некоторых воплощениях предложено полноразмерное антитело к GM-CSFR α , содержащее константные домены IgG4, при этом антитело к GM-CSFR α содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 123. В некоторых воплощениях IgG4 представляет собой IgG4 человека. В некоторых воплощениях константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 146. В некоторых воплощениях константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 147. В некоторых воплощениях константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 146, а константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 147.

В некоторых воплощениях предложено полноразмерное антитело к GM-CSFR α , содержащее константные домены IgG4, при этом антитело к GM-CSFR α содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126. В некоторых воплощениях IgG4 представляет собой IgG4 человека. В некоторых воплощениях константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 146. В некоторых воплощениях константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 147. В некоторых воплощениях константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 146, а константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 147.

В некоторых воплощениях предложено полноразмерное антитело к GM-CSFR α , содержащее константные домены IgG4, при этом антитело к GM-CSFR α содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 121, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126. В некоторых воплощениях IgG4 представляет собой IgG4 человека. В некоторых воплощениях константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 146. В некоторых воплощениях константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 147. В некоторых воплощениях константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 146, а константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 147.

Аффинность связывания.

Аффинность связывания можно выразить, используя K_d , константу скорости диссоциации (K_{off}), константу скорости ассоциации (K_{on}) или константу аффинности (K_a). Подразумевается, что термин " K_{off} ", использованный в данном описании, относится к константе скорости диссоциации антитела из комплекса антитело/антиген, определяемой на основании набора кинетических данных.

Подразумевается, что термин " K_{on} ", использованный в данном описании, относится к константе скорости ассоциации антитела с антигеном с образованием комплекса антитело/антиген. Использованный в данном описании термин "равновесная константа диссоциации", " K_d ", относится к константе диссоциации конкретного комплекса, образованного в результате взаимодействия между антителом и антигеном, и описывает концентрацию антигена, необходимую для того, чтобы занять половину из всех антитело-связывающих доменов, присутствующих в растворе молекул антител в равновесии, и она равна K_{off}/K_{on} . Измерение K_d предполагает, что все участвующие в связывании вещества находятся в растворе. В случае, когда антитело связано с клеточной стенкой, например, в системе экспрессии дрожжей, соответствующую константу равновесия выражают в виде EC_{50} (эффективная концентрация, вызывающая эффект величиной 50%), что является хорошим приближением для оценки K_d . Константа аффинности, K_a , представляет собой величину, обратную константе диссоциации, K_d .

Константу диссоциации (K_d) используют в качестве индикатора, характеризующего аффинность группировок антитела к антигенам. Например, можно провести простой анализ согласно методу Скэт-

чарда, используя антитела, меченные разнообразными маркерными агентами, а также анализ с применением Biotec (производства Amersham Biosciences), анализ взаимодействий биомолекул методом поверхностного плазмонного резонанса в соответствии с руководством для пользователя и прилагаемым набором. Значение K_d , которое может быть получено с использованием этих методов, выражают в единицах измерения М (моль). Антитело, которое специфично связывается с мишенью, может иметь K_d , например, $\leq 10^{-7}$ М, $\leq 10^{-8}$ М, $\leq 10^{-9}$ М, $\leq 10^{-10}$ М, $\leq 10^{-11}$ М, $\leq 10^{-12}$ М или $\leq 10^{-13}$ М.

Специфичность связывания антитела может быть определена экспериментально методами, известными в данной области техники. Такие методы включают, но не ограничиваются этим, методы тестирования с использованием вестерн-блоттинга, ELISA, RIA, электрохемилюминесцентного анализа (ECL), иммунорадиометрического анализа (IRMA), иммуноферментного анализа (EIA), платформы Biotec и снятие пептидных сканограмм.

В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α специфично связывается с мишенью GM-CSFR α с K_d от приблизительно 10^{-7} М до приблизительно 10^{-13} М (как например, от приблизительно 10^{-7} М до приблизительно 10^{-13} М, от приблизительно 10^{-8} М до приблизительно 10^{-13} М, от приблизительно 10^{-9} М до приблизительно 10^{-13} М или от приблизительно 10^{-10} М до приблизительно 10^{-12} М). Так, в некоторых воплощениях K_d для связывания между антителом к GM-CSFR α и GM-CSFR α составляет от приблизительно 10^{-7} М до приблизительно 10^{-13} М, от приблизительно 1×10^{-7} М до приблизительно 5×10^{-13} М, от приблизительно 10^{-7} М до приблизительно 10^{-12} М, от приблизительно 10^{-7} М до приблизительно 10^{-11} М, от приблизительно 10^{-7} М до приблизительно 10^{-10} М, от приблизительно 10^{-7} М до приблизительно 10^{-9} М, от приблизительно 10^{-8} М до приблизительно 10^{-13} М, от приблизительно 1×10^{-8} М до приблизительно 5×10^{-13} М, от приблизительно 10^{-8} М до приблизительно 10^{-12} М, от приблизительно 10^{-8} М до приблизительно 10^{-11} М, от приблизительно 10^{-8} М до приблизительно 10^{-10} М, от приблизительно 10^{-8} М до приблизительно 10^{-9} М, от приблизительно 5×10^{-9} М до приблизительно 1×10^{-13} М, от приблизительно 5×10^{-9} М до приблизительно 1×10^{-12} М, от приблизительно 5×10^{-9} М до приблизительно 1×10^{-11} М, от приблизительно 5×10^{-9} М до приблизительно 1×10^{-10} М, от приблизительно 10^{-9} М до приблизительно 10^{-13} М, от приблизительно 10^{-9} М до приблизительно 10^{-12} М, от приблизительно 10^{-9} М до приблизительно 10^{-11} М, от приблизительно 10^{-9} М до приблизительно 10^{-10} М, от приблизительно 5×10^{-10} М до приблизительно 1×10^{-13} М, от приблизительно 5×10^{-10} М до приблизительно 1×10^{-12} М, от приблизительно 5×10^{-10} М до приблизительно 1×10^{-11} М, от приблизительно 1×10^{-10} М до приблизительно 10^{-13} М, от приблизительно 1×10^{-10} М до приблизительно 10^{-12} М, от приблизительно 1×10^{-10} М до приблизительно 10^{-11} М, от приблизительно 1×10^{-10} М до приблизительно 10^{-10} М, от приблизительно 1×10^{-10} М до приблизительно 5×10^{-13} М, от приблизительно 1×10^{-10} М до приблизительно 1×10^{-12} М, от приблизительно 1×10^{-10} М до приблизительно 5×10^{-12} М, от приблизительно 1×10^{-10} М до приблизительно 1×10^{-11} М, от приблизительно 10^{-11} М до приблизительно 10^{-13} М, от приблизительно 1×10^{-11} М до приблизительно 5×10^{-13} М, от приблизительно 10^{-11} М до приблизительно 10^{-12} М или от приблизительно 10^{-12} М до приблизительно 10^{-13} М. В некоторых воплощениях K_d для связывания между антителом к GM-CSFR α и GM-CSFR α составляет от приблизительно 10^{-7} М до приблизительно 10^{-13} М.

В некоторых воплощениях K_d для связывания между антителом к GM-CSFR α и не являющимся мишенью объектом превышает K_d для связывания между антителом к GM-CSFR α и мишенью, и в данном описании в случае некоторых воплощений называется аффинностью связывания антитела к GM-CSFR α с мишенью (например, GM-CSFR α), которая превышает таковую с не являющимся мишенью объектом. В некоторых воплощениях не являющийся мишенью объект представляет собой антиген, который не является GM-CSFR α . В некоторых воплощениях K_d для связывания между антителом к GM-CSFR α (против GM-CSFR α) и мишенью, не являющейся GM-CSFR α , может превышать по меньшей мере приблизительно в 10 раз, как например, приблизительно в 10-100 раз, приблизительно в 100-1000 раз, приблизительно в 10^3 - 10^4 раз, приблизительно в 10^4 - 10^5 раз, приблизительно в 10^5 - 10^6 раз, приблизительно в 10^6 - 10^7 раз, приблизительно в 10^7 - 10^8 раз, приблизительно в 10^8 - 10^9 раз, приблизительно в 10^9 - 10^{10} раз, приблизительно в 10^{10} - 10^{11} раз или приблизительно в 10^{11} - 10^{12} раз значение K_d для связывания между антителом к GM-CSFR α и мишенью GM-CSFR α .

В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α связывается с не являющимся мишенью объектом с K_d от приблизительно 10^{-1} М до приблизительно 10^{-6} М (как например, от приблизительно 10^{-1} М до приблизительно 10^{-6} М, от приблизительно 10^{-1} М до приблизительно 10^{-5} М или от приблизительно 10^{-2} М до приблизительно 10^{-4} М). В некоторых воплощениях не являющийся мишенью объект представляет собой антиген, который не является GM-CSFR α . Так, в некоторых воплощениях K_d для связывания между антителом к GM-CSFR α и мишенью, не являющейся GM-CSFR α , составляет от приблизительно 10^{-1} М до приблизительно 10^{-6} М, от приблизительно 1×10^{-1} М до приблизительно 5×10^{-6} М, от приблизительно 10^{-1} М до приблизительно 10^{-5} М, от приблизительно 1×10^{-1} М до приблизительно 5×10^{-5} М, от приблизительно 10^{-1} М до приблизительно 10^{-4} М, от приблизительно 1×10^{-1} М до приблизительно 5×10^{-4} М, от приблизительно 10^{-1} М до приблизительно 10^{-3} М, от приблизительно 1×10^{-1} М до приблизительно 5×10^{-3} М, от приблизительно 10^{-1} М до приблизительно 10^{-2} М, от приблизительно 10^{-2} М до приблизительно 10^{-6} М, от приблизительно 1×10^{-2} М до приблизительно 5×10^{-6} М, от приблизительно 10^{-2} М

до приблизительно 10^{-5} М, от приблизительно 1×10^{-2} М до приблизительно 5×10^{-5} М, от приблизительно 10^{-2} М до приблизительно 10^{-4} М, от приблизительно 1×10^{-2} М до приблизительно 5×10^{-4} М, от приблизительно 10^{-2} М до приблизительно 10^{-3} М, от приблизительно 10^{-3} М до приблизительно 10^{-6} М, от приблизительно 1×10^{-3} М до приблизительно 5×10^{-6} М, от приблизительно 10^{-3} М до приблизительно 10^{-5} М, от приблизительно 1×10^{-3} М до приблизительно 5×10^{-5} М, от приблизительно 10^{-3} М до приблизительно 10^{-4} М, от приблизительно 10^{-4} М до приблизительно 10^{-6} М, от приблизительно 1×10^{-4} М до приблизительно 5×10^{-6} М, от приблизительно 10^{-4} М до приблизительно 10^{-5} М или от приблизительно 10^{-5} М до приблизительно 10^{-6} М.

В некоторых воплощениях указание, что антитело к GM-CSFR α специфично распознает мишень GM-CSFR α с высокой аффинностью связывания и связывается с не являющимся мишенью объектом с низкой аффинностью связывания, означает, что антитело к GM-CSFR α будет связываться с мишенью GM-CSFR α с K_d от приблизительно 10^{-7} М до приблизительно 10^{-13} М (как например, от приблизительно 10^{-7} М до приблизительно 10^{-13} М, от приблизительно 10^{-8} М до приблизительно 10^{-13} М, от приблизительно 10^{-9} М до приблизительно 10^{-13} М или от приблизительно 10^{-10} М до приблизительно 10^{-12} М) и будет связываться с не являющимся мишенью объектом с K_d от приблизительно 10^{-1} М до приблизительно 10^{-6} М (как например, от приблизительно 10^{-1} М до приблизительно 10^{-6} М, от приблизительно 10^{-1} М до приблизительно 10^{-5} М или от приблизительно 10^{-2} М до приблизительно 10^{-4} М).

В некоторых воплощениях указание, что антитело к GM-CSFR α специфично распознает GM-CSFR α , означает, что аффинность связывания антитела к GM-CSFR α сопоставима с таковой у контрольного антитела к GM-CSFR α (такого как маврилиумаб). В некоторых воплощениях K_d для связывания между контрольным антителом к GM-CSFR α и GM-CSFR α может превышать по меньшей мере приблизительно в 2 раза, как например, приблизительно в 2 раза, приблизительно в 3 раза, приблизительно в 4 раза, приблизительно в 5 раз, приблизительно в 6 раз, приблизительно в 7 раз, приблизительно в 8 раз, приблизительно в 9 раз, приблизительно в 10 раз, приблизительно в 10-100 раз, приблизительно в 100-1000 раз, приблизительно в 10^3 - 10^4 раз K_d для связывания между антителом к GM-CSFR α , описанным в данном изобретении, и GM-CSFR α .

Нуклеиновые кислоты.

Также включены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела к GM-CSFR α . В некоторых воплощениях предложена нуклеиновая кислота (или набор нуклеиновых кислот), кодирующая полноразмерное антитело к GM-CSFR α , в том числе любое из полноразмерных антител к GM-CSFR α , описанных в данном изобретении. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота (или набор нуклеиновых кислот), кодирующая антитело к GM-CSFR α , описанное в данном изобретении, может дополнительно содержать нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую пептидную метку (такую как метка, используемая при очистке белков, например, гистидиновую метку (His-метку), HA (гемагглютинин) метку).

Кроме того, в данное описание включены выделенные клетки-хозяева, содержащие антитело к GM-CSFR α , выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептидные компоненты антитела к GM-CSFR α , или вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептидные компоненты антитела к GM-CSFR α , описанного в данном изобретении.

Настоящее изобретение также включает варианты этих нуклеиновокислотных последовательностей. Например, варианты включают нуклеотидные последовательности, которые гибридизуются с нуклеиновокислотными последовательностями, кодирующими антитела к GM-CSFR α по настоящему изобретению, по меньшей мере в умеренно жестких условиях гибридизации.

Кроме того, в настоящем изобретении предложены векторы, в которые встроена нуклеиновая кислота по настоящему изобретению.

Кратко резюмируя, экспрессия антитела к GM-CSFR α (например, полноразмерного антитела к GM-CSFR α) с участием существующей в природе или полученной методом синтеза нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело к GM-CSFR α , может быть достигнута путем вставки данной нуклеиновой кислоты в соответствующий экспрессирующий вектор таким образом, чтобы нуклеиновая кислота была функционально связана с 5'- и 3'-регуляторными элементами, в том числе, например, с промотором (например, специфичным для лимфоцитов промотором) и 3'-нетранслируемым участком (UTR). Векторы могут подходить для репликации и интеграции в эукариотические клетки-хозяева. Типичные клонирующие и экспрессирующие векторы содержат терминаторы транскрипции и трансляции, иницирующие последовательности и промоторы, полезные для регуляции экспрессии желаемой нуклеиновокислотной последовательности.

Нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению также можно использовать для иммунизации нуклеиновой кислотой и для генной терапии с применением стандартных протоколов доставки генов. Способы доставки генов известны в данной области техники. См., например, патенты США №№ 5399346, 5580859, 5589466, включенные в данное описание посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых воплощениях данного изобретения предложен вектор для генной терапии.

Нуклеиновая кислота может быть клонирована в векторы ряда типов. Например, нуклеиновая кислота может быть клонирована в вектор, в том числе в плазмиду, фагмиду, производное фага, вирус животных и космиду, но не ограничиваясь этим. Векторы, представляющие особый интерес, включают экспрессирующие векторы, репликативные векторы, генерирующие зонды векторы и векторы для секвенирования.

Кроме того, экспрессирующий вектор может быть доставлен в клетку в форме вирусного вектора. Технология с использованием вирусных векторов хорошо известна в данной области техники и описана, например, в Green and Sambrook (2013, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) и в других руководствах по вирусологии и молекулярной биологии. Вирусы, которые полезны в качестве векторов, включают, но не ограничиваются этим, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса и лентивирусы. В общем случае, подходящий вектор содержит ориджин репликации, функциональный по меньшей мере в одном организме, последовательность промотора, подходящие сайты эндонуклеаз рестрикции и один или более чем один селективируемый маркер (см., например, WO 01/96584, WO 01/29058 и патент США № 6326193).

Для переноса генов в клетки млекопитающих разработан ряд систем, основанных на использовании вирусов. Например, удобную платформу для систем доставки генов обеспечивают ретровирусы. Используя методы, известные в данной области техники, выбранный ген можно встроить в вектор и упаковать в ретровирусные частицы. Затем можно выделить рекомбинантный вирус и доставить в клетки субъекта или *in vivo*, или *ex vivo*. В данной области техники известен ряд ретровирусных систем. В некоторых воплощениях используют аденовирусные векторы. В данной области техники известен ряд аденовирусных векторов. В некоторых воплощениях используют лентивирусные векторы. Векторы, происходящие из ретровирусов, таких как лентивирус, являются подходящими инструментами для достижения долгосрочного переноса генов, поскольку они обеспечивают долгосрочную, стабильную интеграцию трансгена и его размножение в дочерних клетках. Лентивирусные векторы обладают дополнительным преимуществом по сравнению с векторами, происходящими из онкоретровирусов, таких как вирусы мышиного лейкоза, заключающимся в том, что они могут трансдуцировать непролиферирующие клетки, такие как гепатоциты. У них также есть дополнительное преимущество в виде низкой иммуногенности.

Дополнительные элементы промоторов, например энхансеры, регулируют частоту инициации транскрипции. Обычно они расположены в области 30-110 пар оснований (п.о.) вверх по течению от стартового сайта, хотя недавно было показано, что ряд промоторов также содержит функциональные элементы, расположенные вниз по течению от стартового сайта. Расстояние между элементами промотора часто бывает не строго установленным, благодаря чему функция промотора сохраняется, когда элементы инвертируются или перемещаются друг относительно друга. В промоторе гена тимидинкиназы (tk) расстояние между элементами промотора может быть увеличено до 50 п.о., прежде чем активность начнет снижаться.

Одним из примеров подходящего промотора является последовательность немедленно-раннего промотора цитомегаловируса (CMV). Последовательность этого промотора представляет собой последовательность сильного конститутивного промотора, способного задавать высокие уровни экспрессии любой полинуклеотидной последовательности, связанной с ним функционально. Другим примером подходящего промотора является промотор фактора-1 α элонгации роста (EF-1 α). Однако, также можно использовать последовательности других конститутивных промоторов, включая, но не ограничиваясь этим, ранний промотор обезьяньего вируса 40 (SV40), промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), промотор вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) на основе длинного концевой повтора (LTR), промотор вируса мышиного лейкоза Молони (MoMuLV), промотор вируса лейкоза птиц, немедленно-ранний промотор вируса Эпштейна-Барр, промотор вируса саркомы Рауса, а также промоторы генов человека, такие как, но не ограничиваясь этим, промотор гена актина, промотор гена миозина, промотор гена гемоглобина и промотор гена креатинкиназы. Кроме того, данное изобретение не ограничивается применением конститутивных промоторов. Также включены индуцибельные промоторы как часть данного изобретения. Применение индуцибельного промотора обеспечивает наличие молекулярного переключателя, способного включить экспрессию полинуклеотидной последовательности, связанной с ним функционально, когда эта экспрессия желательна, или выключить экспрессию, когда экспрессия нежелательна. Примеры индуцибельных промоторов включают, но не ограничиваются этим, промотор гена металлотионина, промотор генов глюкокортикоидных рецепторов, промотор гена рецептора прогестерона и тетрациклин-чувствительный промотор.

В некоторых воплощениях экспрессия антитела к GM-CSFR α является индуцибельной. В некоторых воплощениях нуклеиновокислотная последовательность, кодирующая антитело к GM-CSFR α , функционально связана с индуцибельным промотором, в том числе с любым индуцибельным промотором, описанным в данном изобретении.

Индукцибельные промоторы.

Применение индуцибельного промотора обеспечивает наличие молекулярного переключателя, способного включить экспрессию полинуклеотидной последовательности, связанной с ним функционально,

когда эта экспрессия желательна, или выключить экспрессию, когда экспрессия нежелательна. Типичные системы индуцибельных промоторов для применения в эукариотических клетках включают, но не ограничиваются этим, регулируемые гормонами элементы (например, см. Mader, S. and White, J.H. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 5603-5607), регулируемые синтетическими лигандами элементы (см., например, Spencer, D. M. et al. (1993) *Science*, 262: 1019-1024) и регулируемые ионизирующим излучением элементы (например, см. Manome, Y. et al. (1993) *Biochemistry*, 32: 10607-10613; Datta, R. et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 1014-10153). Другие типичные системы индуцибельных промоторов для применения в системах млекопитающих *in vitro* или *in vivo* приведены в обзоре Gingrich et al. (1998) *Annual Rev. Neurosci.*, 21: 377-405. В некоторых воплощениях система индуцибельного промотора для применения с целью экспрессии антитела к GM-CSFR α представляет собой Tet систему. В некоторых воплощениях система индуцибельного промотора для применения с целью экспрессии антитела к GM-CSFR α представляет собой систему лактозного(lac)-репрессора из *E.coli*.

Типичной системой индуцибельного промотора для применения в соответствии с настоящей заявкой является Tet система. Такие системы основаны на Tet системе, описанной Gossen и др. (1993). В типичном воплощении представляющий интерес полинуклеотид находится под контролем промотора, который содержит один или более чем один сайт для Tet оператора (TetO). В неактивном состоянии Tet репрессор (TetR) будет связываться с сайтами TetO и репрессировать транскрипцию с промотора. В активном состоянии, например, в присутствии индуцирующего агента, такого как тетрациклин (Tc), ангидротетрациклин, доксициклин (Dox) или их активный аналог, индуцирующий агент вызывает высвобождение TetR из TetO, тем самым позволяя осуществляться транскрипции. Доксициклин является членом тетрациклинового семейства антибиотиков, имея химическое название 1-диметиламино-2,4а,5,7,12-пентагидрокси-11-метил-4,6-диоксо-1,4а,11,11а,12,12а-гексагидротетрацен-3-карбоксамид.

В одном из воплощений TetR кодон-оптимизирован для экспрессии в клетках млекопитающих, например, мышинных или человеческих клетках. Большинство аминокислот кодируются более чем одним кодоном вследствие вырожденности генетического кода, что позволяет вносить существенные изменения в нуклеотидную последовательность заданной нуклеиновой кислоты без какого-либо изменения в аминокислотной последовательности, кодируемой этой нуклеиновой кислотой. Однако, многие организмы демонстрируют различия в частоте использования кодонов, также известные как "предпочтение кодонов" (т.е. предпочтение в отношении использования конкретного(ых) кодона(ов) для данной аминокислоты). Предпочтение кодонов часто коррелирует с наличием преобладающего вида транспортной РНК (тРНК) для конкретного кодона, что в свою очередь повышает эффективность трансляции мРНК. Соответственно, кодирующая последовательность, происходящая из конкретного организма (например, прокариота), может быть адаптирована для улучшенной экспрессии в другом организме (например, эукариоте) посредством оптимизации кодонов.

Другие конкретные варианты Tet системы включают следующие "Tet-Off" и "Tet-On" системы. В Tet-Off системе транскрипция неактивна в присутствии Tc или Dox. В этой системе контролируемый тетрациклином трансаактиваторный (tTA) белок, который состоит из TetR, слитого с сильным трансаактивирующим доменом белка VP16 из вируса простого герпеса, регулирует экспрессию целевой нуклеиновой кислоты, которая находится под транскрипционным контролем элемента тетрациклин-чувствительного промотора (TRE). TRE состоит из конкатемеров, содержащих последовательности TetO, слитых с промотором (обычно с минимальной последовательностью промотора, происходящей из немедленно-раннего промотора цитомегаловируса человека (hCMV)). В отсутствие Tc или Dox tTA связывается с TRE и активирует транскрипцию гена-мишени. В присутствии Tc или Dox tTA не может связываться с TRE, и экспрессия гена-мишени остается неактивированной.

В противоположность этому, в Tet-On системе, транскрипция активирована в присутствии Tc или Dox. Tet-On система основана на использовании обратного контролируемого тетрациклином трансаактиватора, pTA. Так же, как и tTA, pTA представляет собой слитый белок, содержащий репрессор TetR и трансаактивирующий домен VP16. Однако замена четырех аминокислот в ДНК-связывающей группировке TetR изменяет относящиеся к связыванию характеристики pTA так, что он может распознавать последовательности TetO в TRE трансгена-мишени только в присутствии Dox. Таким образом, в Tet-On системе транскрипция TRE-регулируемого гена-мишени стимулируется pTA только в присутствии Dox.

Другой системой индуцибельного промотора является система lac- репрессора из *E. coli* (см. Brown et al., *Cell*, 49: 603-612 (1987)). Система lac-репрессора функционирует, регулируя транскрипцию представляющего интерес полинуклеотида, функционально связанного с промотором, содержащим lac-оператор (lacO). Lac-репрессор (lacR) связывается с LacO, предотвращая таким образом транскрипцию представляющего интерес полинуклеотида. Экспрессия представляющего интерес полинуклеотида индуцируется подходящим индуцирующим агентом, например, изопропил- β -D-тиогалактопиранозидом (IPTG).

Чтобы оценить наличие экспрессии полипептида или его частей, экспрессирующий вектор, предназначенный для введения в клетку, также может содержать или ген селективируемого маркера, или репортерный ген, или и тот и другой, для облегчения идентификации и отбора экспрессирующих клеток из

популяции клеток, в отношении которых делается попытка трансфицирования или инфицирования с использованием вирусных векторов. Согласно другим аспектам селективируемый маркер может находиться на отдельном участке ДНК и использоваться в методике совместной трансфекции. И гены селективируемых маркеров, и репортерные гены могут быть фланкированы соответствующими регуляторными последовательностями для обеспечения экспрессии в клетках хозяина. Полезные селективируемые маркеры включают, например, гены устойчивости к антибиотикам, такие как *neo*, и тому подобное.

Репортерные гены используют для идентификации возможно трансфицированных клеток и оценки функциональности регуляторных последовательностей. Как правило, репортерный ген представляет собой ген, который не присутствует или не экспрессируется в организме или ткани реципиента и который кодирует полипептид, экспрессию которого можно обнаружить с использованием некоторого легко детектируемого свойства, например, ферментативной активности. Экспрессию репортерного гена оценивают в подходящий момент времени после введения ДНК в реципиентные клетки. Подходящие репортерные гены могут включать гены, кодирующие люциферазу, *p*-галактозидазу, хлорамфениколацетилтрансферазу, секретируемую щелочную фосфатазу, или ген зеленого флуоресцентного белка (например, Ui-Tel et al, 2000, FEBS Letters, 479: 79-82). Подходящие системы экспрессии хорошо известны и могут быть получены с использованием известных методов или приобретены путем закупки. Как правило, конструкцию с минимальным 5'-фланкирующим участком, показывающую самый высокий уровень экспрессии репортерного гена, идентифицируют как промотор. Такие промоторные участки могут быть соединены с репортерным геном и использованы для оценки агентов на предмет способности модулировать управляемую промотором транскрипцию.

В некоторых воплощениях предложена нуклеиновая кислота, кодирующая полноразмерное антитело к GM-CSFR α , соответствующее любому из полноразмерных антител к GM-CSFR α , описанных в данной заявке. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота содержит одну или несколько нуклеиновокислотных последовательностей, кодирующих тяжелые и легкие цепи полноразмерного антитела к GM-CSFR α . В некоторых воплощениях каждая из одной или нескольких нуклеиновокислотных последовательностей содержится в отдельном векторе. В некоторых воплощениях по меньшей мере некоторые из нуклеиновокислотных последовательностей содержатся в одном и том же векторе. В некоторых воплощениях все нуклеиновокислотные последовательности содержатся в одном и том же векторе. Векторы могут быть выбраны, например, из группы, состоящей из экспрессирующих векторов млекопитающих и вирусных векторов (таких как векторы, происходящие из ретровирусов, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов, вирусов герпеса и лентивирусов).

В данной области техники известны методы введения генов в клетку и их экспрессии в клетке. Что касается экспрессирующего вектора, то данный вектор может быть легко введен в клетку хозяина, например, клетку млекопитающих, бактерий, дрожжей или насекомых, любым известным в данной области техники методом. Например, клетку хозяина можно трансфицировать экспрессирующим вектором, используя физические, химические или биологические методы.

Физические методы введения полинуклеотида в клетку хозяина включают осаждение фосфатом кальция, липофекцию, бомбардировку частицами, микроинъекцию, электропорацию и тому подобное. Методы получения клеток, содержащих векторы и/или экзогенные нуклеиновые кислоты, хорошо известны в данной области техники. См., например, Green and Sambrook (2013, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York). В некоторых воплощениях введение полинуклеотида в клетку хозяина осуществляют путем трансфекции с использованием фосфата кальция.

Биологические методы введения представляющего интерес полинуклеотида в клетку хозяина включают применение ДНК и РНК векторов. Вирусные векторы, и особенно ретровирусные векторы, стали самым широко используемым средством для встраивания генов в клетки млекопитающих, например, человеческие клетки. Другие вирусные векторы могут происходить из лентивируса, поксвирусов, вируса простого герпеса 1, аденовирусов и аденоассоциированных вирусов и тому подобного. См., например, патенты США №№ 5350674 и 5585362.

Химические средства для введения полинуклеотида в клетку хозяина включают коллоидные дисперсионные системы, такие как макромолекулярные комплексы, нанокapsулы, микросферы, гранулы и системы на основе липидов, включая эмульсии типа масло-в-воде, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Типичной коллоидной системой для применения в качестве средства доставки *in vitro* и *in vivo* является липосома (например, искусственная мембранная везикула).

В том случае, когда используется невирусная система доставки, типичным средством доставки является липосома. Для введения нуклеиновых кислот в клетку хозяина (*in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*) предполагается применение липидных композиций. Согласно другому аспекту, нуклеиновая кислота может находиться в ассоциации с липидом. Нуклеиновая кислота, находящаяся в ассоциации с липидом, может быть инкапсулирована во внутреннюю водную часть липосомы, помещена в липидный бислой липосомы, присоединена к липосоме через связывающую молекулу, которая связана как с липосомой, так и с олигонуклеотидом, захвачена в липосому, может образовывать комплекс с липосомой, может быть диспергирована в растворе, содержащем липид, смешана с липидом, объединена с липидом, находиться в

виде суспензии в липиде, содержаться в мицелле или образовывать комплекс с мицеллой или иным образом быть ассоциированной с липидом. Ассоциированные с липидом, липидом/ДНК или липидом/экспрессирующим вектором композиции не ограничиваются какой-либо конкретной структурой в растворе. Например, они могут быть представлены в виде бислойной структуры, в виде мицелл или "коллапсированной" структуры. Они также могут быть просто введены в раствор с возможным образованием агрегатов неоднородного размера или формы. Липиды представляют собой жирные вещества, которые могут иметь природное или синтетическое происхождение. Например, липиды включают капли жира, которые естественным образом встречаются в цитоплазме, а также класс соединений, которые содержат длинноцепочечные алифатические углеводороды и их производные, такие как жирные кислоты, спирты, амины, аминспирты и альдегиды.

Для подтверждения присутствия последовательности рекомбинантной ДНК в клетке хозяина могут быть выполнены различные виды анализов независимо от метода, использованного для введения экзогенных нуклеиновых кислот в клетку хозяина, или от иного воздействия ингибитора по настоящему изобретению на клетку.

Такие анализы включают, например, "молекулярно-биологические" анализы, хорошо известные специалистам в данной области техники, такие как саузерн- и нозерн-блоттинг, ОТ-ПЦР (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией) и ПЦР; "биохимические" анализы, такие как детектирование наличия или отсутствия конкретного пептида, например, иммунологическими средствами (ELISA и вестерн-блоттинг) или с использованием анализов, изложенных в данном описании для идентификации агентов, попадающих в объем данного изобретения.

Получение антител к GM-CSFR α .

В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α представляет собой моноклональное антитело или происходит из моноклонального антитела. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α содержит V_H и V_L домены или их варианты из моноклонального антитела. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α дополнительно содержит C_{H1} и C_L домены или их варианты из моноклонального антитела. Моноклональные антитела могут быть получены, например, с использованием известных в данной области техники методов, включая методы с использованием гибридом, методы фагового дисплея или методы рекомбинантной ДНК. Кроме того, типичные методы фагового дисплея изложены в данном описании и в приведенном ниже разделе Примеры.

В методе с использованием гибридом иммунизацию хомяка, мыши или другого соответствующего животного-хозяина обычно проводят с использованием иммунизирующего агента, чтобы вызвать активацию лимфоцитов, продуцирующих или способных продуцировать антитела, которые будут специфично связываться с иммунизирующим агентом. Альтернативно, лимфоциты могут быть активированы *in vitro*. Иммунизирующий агент может представлять собой полипептид или белок, слитый с представляющим интерес белком. Как правило, если желательны клетки человеческого происхождения, то используют лимфоциты периферической крови ("PBL"), либо, если в качестве источников желательны млекопитающие, не являющиеся человеком, то используют клетки селезенки или клетки лимфатических узлов. Далее проводят слияние лимфоцитов с линией immortalized клеток, используя подходящий для слияния агент, такой как полиэтиленгликоль, с образованием гибридомы. Линии immortalized клеток обычно представляют собой трансформированные клетки млекопитающих, в частности, миеломные клетки грызунов, крупного рогатого скота и клетки человеческого происхождения. Обычно используют линии миеломных клеток крысы или мыши. Гибридомы можно культивировать в подходящей культуральной среде, которая предпочтительно содержит одно или несколько веществ, ингибирующих рост или выживаемость не подвергшихся слиянию immortalized клеток. Например, если в родительских клетках отсутствует фермент гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансфераза (HGPRT или HPRT), то культуральная среда для гибридом обычно будет включать в себя гипоксантин, аминоптерин и тимидин ("HAT среда"), что предотвращает рост HGPRT-дефицитных клеток.

В некоторых воплощениях слияние линий immortalized клеток с отобранными антитело-продуцирующими клетками происходит эффективно, при этом поддерживается стабильно высокий уровень экспрессии антитела и чувствительность к такой среде, как HAT среда. В некоторых воплощениях линии immortalized клеток представляют собой линии миеломных клеток мышей, которые могут быть получены, например, из Центра распределения клеток Института Солка, San Diego, California, и Американской коллекции типовых культур, Manassas, Virginia. Также описано использование линий миеломных клеток человека и гетеромиеломных клеток мыши-человека для получения моноклональных антител человека.

Далее культуральная среда, в которой культивируют гибридомы, может быть проанализирована на предмет наличия моноклональных антител, направленных против данного полипептида. Специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых гибридомами, можно определить посредством иммунопреципитации или в анализе связывания *in vitro*, таком как радиоиммуноанализ (RIA) или иммуноферментный твердофазный анализ (ELISA).

Такие методы и анализы известны в данной области техники. Аффинность связывания монокли-

нального антитела можно определить, например, методом Скэтчарда, приведенным в Munson and Pollard, *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

После идентификации желаемых гибридом клоны могут быть подвергнуты субклонированию с использованием процедур предельного разведения и выращены стандартными методами (Goding, выше). Подходящие для этой цели культуральные среды включают, например, модифицированную по способу Дульбекко среду Игла и среду 1640 от Мемориального института Розуэлла Парка (RPMI). Альтернативно, гибридомы можно выращивать *in vivo* в виде асцита в организме млекопитающего.

Моноклональные антитела, секретированные субклонами, могут быть выделены или очищены из культуральной среды или асцитной жидкости с использованием таких традиционных методик очистки иммуноглобулинов как, например, хроматография на сефарозе с иммобилизованным белком А, хроматография на гидроксилapatите, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография.

В некоторых воплощениях, соответствующих любому из антител к GM-CSFR α , описанных в данном изобретении, антитело к GM-CSFR α содержит последовательности из клона, выбранного из библиотеки антител (такой как фаговая библиотека, представляющая scFv или Fab фрагменты). Клон может быть идентифицирован путем скрининга комбинаторных библиотек для фрагментов антител с желаемой активностью или активностями. Например, в данной области техники известен ряд способов создания библиотек фагового дисплея и скрининга таких библиотек на предмет антител, обладающих желаемыми характеристиками связывания. Обзор таких методов представлен, например, в Hoogenboom et al., *Methods in Molecular Biology*, 178: 1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, N.J., 2001) и также описан, например, в McCafferty et al., *Nature*, 348: 552-554; Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, *Methods in Molecular Biology*, 248: 161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, N.J., 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.*, 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.*, 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(34): 12467-12472 (2004); и Lee et al., *J. Immunol. Methods*, 284(1-2): 119-132 (2004).

В некоторых методах фагового дисплея репертуары генов V_H и V_L клонируют по отдельности, используя полимеразную цепную реакцию (ПЦР), и снова объединяют случайным образом в фаговых библиотеках, которые затем могут быть подвергнуты скринингу на предмет антигенсвязывающего фага, как описано в Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Фрагменты антител проявляются на поверхности фага обычно в виде scFv фрагментов или в виде Fab фрагментов. Библиотеки из иммунизированных источников обеспечивают получение высокоаффинных антител к иммуногену без необходимости конструирования гибридом. Альтернативно, можно клонировать гены, относящиеся к наивному репертуару иммуноглобулинов (например, из человека), чтобы получить единый источник антител к широкому диапазону не являющихся собственными, а также собственных антигенов без какой-либо иммунизации, как описано в Griffiths et al., *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). Наконец, наивные библиотеки также могут быть получены путем синтеза с использованием клонирования не подвергнутых реаранжировке сегментов V генов из стволовых клеток и с использованием ПЦР праймеров, содержащих случайную последовательность для кодирования высоко варьируемых CDR3 участков и для завершения реаранжировки *in vitro*, как описано в Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Патентные публикации, описывающие фаговые библиотеки человеческих антител, включают, например: патент США № 5750373 и публикации патентных заявок США №№ 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 и 2009/0002360.

Антитела к GM-CSFR α можно получить, используя метод фагового дисплея для скрининга библиотек на предмет группировок антител к GM-CSFR α , специфичных к целевому GM-CSFR α . Такая библиотека может представлять собой библиотеку фагового дисплея для scFv антител человека, характеризующуюся разнообразием, составляющим по меньшей мере 1×10^9 (например, по меньшей мере, приблизительно любое значение из 1×10^9 , $2,5 \times 10^9$, 5×10^9 , $7,5 \times 10^9$, 1×10^{10} , $2,5 \times 10^{10}$, 5×10^{10} , $7,5 \times 10^{10}$ или 1×10^{11}) уникальных фрагментов человеческого антитела. В некоторых воплощениях библиотека представляет собой "наивную" библиотеку антител человека, сконструированную на основе ДНК, экстрагированной из PMBC человека и селезенки от здоровых доноров, охватывающую все подсемейства тяжелых и легких цепей иммуноглобулина человека. В некоторых воплощениях библиотека представляет собой "наивную" библиотеку антител человека, сконструированную на основе ДНК, экстрагированной из PBMC, выделенных от пациентов с различными заболеваниями, таких как пациенты с аутоиммунными заболеваниями, раковые пациенты и пациенты с инфекционными заболеваниями. В некоторых воплощениях библиотека представляет собой полусинтетическую библиотеку антител человека, в которой CDR3 тяжелых цепей является полностью рандомизированным, причем все аминокислоты (за исключением цистеина) с равной вероятностью находятся в любом заданном положении (см., например, Hoet, R.M. et al., *Nat. Biotechnol.*, 23(3): 344-348, 2005). В некоторых воплощениях CDR3 тяжелых цепей в такой полусинтетической библиотеке антител человека составляет по длине от приблизительно 5 до приблизительно 24 (например, приблизительно любое количество из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24) аминокислот. В некоторых воплощениях библиотека представляет собой полностью синтетическую библиотеку фагового дисплея. В некоторых воплощениях библиотека представляет собой биб-

лиотеку фагового дисплея антител, не являющихся человеческими.

Фаговые клоны, которые связываются с целевым GM-CSFR α с высокой аффинностью, могут быть отобраны путем повторяющегося связывания фага с целевым GM-CSFR α , который присоединен к твердой подложке (такой как, например, гранулы в случае пэннинга в растворе или клетки млекопитающих в случае клеточного пэннинга), с последующим удалением несвязавшегося фага и элюированием специфично связавшегося фага. Затем связавшиеся фаговые клоны элюируют и используют для инфицирования соответствующей клетки-хозяина, такой как E.coli XL1-Blue, для экспрессии и очистки. Пэннинг может быть выполнен за несколько (как например, приблизительно за любое число из 2, 3, 4, 5, 6 или более) раундов посредством пэннинга в растворе, клеточного пэннинга или комбинации их обоих с целью обогащения фаговых клонов, специфичных в отношении целевого GM-CSFR α . Обогащенные фаговые клоны могут быть протестированы на предмет специфического связывания с целевым GM-CSFR α любыми методами, известными в данной области техники, включая, например, ELISA и FACS.

Моноклональные антитела также могут быть получены методами рекомбинантной ДНК, такими как методы, описанные в патенте США № 4816567. ДНК, кодирующую моноклональные антитела по данной заявке, можно легко выделить и секвенировать, используя традиционные методики (например, с применением олигонуклеотидных зондов, которые способны специфично связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи мышиных антител). Гибридомы, описанные выше, или GM-CSFR α -специфичные фаговые клоны по данной заявке могут служить в качестве источника такой ДНК. По окончании выделения можно поместить ДНК в экспрессирующие векторы, которыми затем трансфицируют клетки-хозяева, такие как COS клетки обезьяны, клетки яичника китайского хомячка (CHO) или миеломные клетки, которые без этого не могут продуцировать белок иммуноглобулин, с целью синтеза моноклональных антител в таких рекомбинантных клетках хозяина. Кроме того, ДНК может быть модифицирована, например, путем введения последовательности, кодирующей константные домены и/или каркасные области тяжелой и легкой цепи антитела человека вместо гомологичных последовательностей антитела, не являющегося человеческим (патент США № 4816567; Morrison и др., выше), или путем ковалентного присоединения к последовательности, кодирующей иммуноглобулин, всей или части последовательности, кодирующей полипептид, не являющийся иммуноглобулином. Такой не являющийся иммуноглобулином полипептид может заменять константные домены антитела по данной заявке или может заменять переменные домены одного антигенсвязывающего сайта антитела по данной заявке с целью создания химерного бивалентного антитела.

Антитела могут представлять собой одновалентные антитела. Способы получения одновалентных антител известны в данной области техники. Например, один из способов включает рекомбинантную экспрессию легкой цепи иммуноглобулина и модифицированной тяжелой цепи. Тяжелую цепь обычно укорачивают в любой точке Fc-области, чтобы предотвратить перекрестное сшивание тяжелых цепей. Альтернативно, релевантные остатки цистеина заменяют на остатки других аминокислот или делетируют, чтобы предотвратить перекрестное сшивание.

Для получения одновалентных антител также подходят методы *in vitro*. Расщепление антител с получением их фрагментов, в частности, Fab фрагментов, может быть осуществлено с использованием любого метода, известного в данной области техники.

Можно провести слияние переменных доменов антител, обладающих желаемыми специфичностями связывания (антигенсвязывающих сайтов антитела), с последовательностями константных доменов иммуноглобулина. Слияние предпочтительно проводят с константным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащим по меньшей мере часть шарнирной области, CH2 и CH3 области. В некоторых воплощениях по меньшей мере в одной из слитых конструкций присутствует первая константная область тяжелой цепи (CH1), содержащая сайт, необходимый для связывания с легкой цепью. ДНК, кодирующие слитые конструкции на основе тяжелых цепей иммуноглобулинов и, при желании, легкой цепи иммуноглобулинов, встраивают в отдельные экспрессирующие векторы и используют для совместной трансфекции подходящего организма-хозяина.

Человеческие и гуманизированные антитела.

Антитела к GM-CSFR α (например, полноразмерные антитела к GM-CSFR α) могут представлять собой гуманизированные антитела или человеческие антитела. Гуманизированными формами группировок антител, не являющихся человеческими (например, мышиных), являются химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv или другие антигенсвязывающие подпоследовательности антител), которые обычно содержат минимальную последовательность, происходящую из иммуноглобулина, не являющегося человеческим. Группировки гуманизированных антител включают иммуноглобулины человека, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (реципиентное антитело), в которых остатки из CDR реципиента заменены на остатки из CDR антитела не относящегося к человеку вида (донорного антитела), такого как мышь, крыса или кролик, обладающие желаемой специфичностью, аффинностью и эффективностью. В некоторых случаях каркасные остатки Fv иммуноглобулина человека заменены на соответствующие остатки иммуноглобулина, не являющегося человеческим. Группировки гуманизированных антител также могут содержать остатки, которые не

обнаруживаются ни в реципиентном антителе, ни в последовательностях импортированных CDR или каркасов. В общем случае, гуманизированное антитело может содержать по существу все переменные домены, выбранные из по меньшей мере одного и обычно двух переменных доменов, в которых все или по существу все из участков CDR соответствуют таковым из иммуноглобулина, не являющегося человеческим, и все или по существу все из последовательностей FR областей представляют собой области из консенсусной последовательности иммуноглобулина человека.

Обычно гуманизированное антитело имеет один или несколько аминокислотных остатков, введенных в него из источника, который не относится к человеку. Эти не относящиеся к человеку аминокислотные остатки часто обозначают "импортируемыми" остатками, которые в типичном случае берутся из "импортируемого" переменного домена. Согласно некоторым воплощениям гуманизация по существу может быть осуществлена по методу Winter и коллег (Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), путем замены CDR или последовательностей CDR грызунов на соответствующие последовательности человеческого антитела. Соответственно, такие группировки "гуманизированных" антител представляют собой группировки антител (патент США № 4816567), в которых на соответствующую последовательность из не относящегося к человеку вида заменена часть, по существу меньшая, чем интактный переменный домен антитела человека. На практике, группировки гуманизированных антител обычно представляют собой группировки человеческих антител, в которых некоторые остатки CDR и возможно некоторые остатки FR заменены на остатки из аналогичных сайтов антител грызунов.

В качестве альтернативы гуманизации, фрагменты человеческих антител могут быть сконструированы. Например, в настоящее время имеется возможность создавать трансгенных животных (например, мышей), которые способны после иммунизации продуцировать полный репертуар человеческих антител в отсутствие продуцирования эндогенных иммуноглобулинов. Например, описано, что гомозиготная делеция в гене области соединения тяжелых цепей (JH) антитела у химерных мышей и мышей с мутантной зародышевой линией приводит к полному ингибированию продуцирования эндогенных антител. Перенос набора генов иммуноглобулинов зародышевой линии человека таким мышам с мутантной зародышевой линией будет приводить к получению человеческих антител после контрольного введения антигена. См., например, Jakobovits et al., *PNAS USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.*, 7: 33 (1993); патенты США №№ 5545806, 5569825, 5591669, 5545807; и WO 97/17852. Альтернативно, человеческие антитела могут быть получены в результате введения локусов генов иммуноглобулинов человека трансгенным животным, например, мышам, у которых гены эндогенных иммуноглобулинов были частично или полностью инактивированы. После контрольного введения наблюдается продуцирование человеческих антител, которое во всех отношениях очень похоже на таковое, имеющееся у людей, включая реаранжировку генов, сборку и репертуар антител. Этот подход описан, например, в патентах США №№ 5545807, 5545806, 5569825, 5625126, 5633425 и 5661016 и в Marks et al., *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology*, 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995).

Человеческие антитела также могут быть получены с использованием активированных *in vitro* В-клеток (см. патенты США 5567610 и 5229275) или с использованием различных методов, известных в данной области техники, включая применение библиотек фагового дисплея. Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991). Для получения моноклональных антител человека также могут быть применены методы Cole и др. и Boerner и др. (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) и Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1): 86-95 (1991)).

Варианты антитела к GM-CSFR α .

Некоторые воплощения предусматривают варианты аминокислотной последовательности антител к GM-CSFR α (например, полноразмерного антитела к GM-CSFR α), предложенных согласно данному изобретению. Например, может оказаться желательным улучшение аффинности связывания и/или других биологических свойств антитела. Варианты аминокислотной последовательности антитела могут быть получены посредством введения соответствующих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую данное антитело, или путем пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции из, и/или вставки в, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела. Для приближения к окончательной конструкции можно выполнить любую комбинацию делеции, вставки и замены при условии, что такая окончательная конструкция обладает желаемыми характеристиками, например, антигенсвязывающими характеристиками.

В некоторых воплощениях предложены варианты антител к GM-CSFR α , имеющие одну или более аминокислотных замены. Места, представляющие интерес с точки зрения мутагенеза с введением замен, включают HVR и FR. В антитело, представляющее интерес, можно ввести аминокислотные замены и продукты подвергнуть скринингу на предмет желаемой активности, например, улучшенной биологической активности, сохраненного/улучшенного связывания с антигеном, сниженной иммуногенности или улучшенной ADCC либо CDC. Консервативные замены показаны ниже в табл. 4.

Таблица 4

Консервативные замены

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

Аминокислоты могут быть классифицированы в соответствии с общими свойствами боковых цепей на:

- a) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- b) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- c) кислотные: Asp, Glu;
- d) основные: His, Lys, Arg;
- e) содержащие остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly, Pro;
- f) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативные замены повлекут за собой замену представителя одного из этих классов на представителя другого класса.

Типичным вариантом с заменами является антитело с "созревшей аффинностью", которое может быть создано подходящим образом, например, с использованием методов "созревания аффинности", основанных на применении фагового дисплея. Кратко, вводят мутации по одному или более остаткам CDR, проявляют варианты антитела на поверхности фага и проводят скрининг на предмет конкретной биологической активности (например, биологической активности на основе анализа пролиферации TF-1 клеток или аффинности связывания). Можно внести изменения (например, замены) в HVR, например, для улучшения биологической активности на основе анализа пролиферации TF-1 клеток или аффинности антител. Такие изменения могут быть выполнены в "горячих точках" HVR, т.е. в остатках, кодируемых кодонами, которые с высокой частотой подвержены мутации в процессе соматического созревания (см., например, Chowdhury, Methods Mol. Biol., 207: 179-196 (2008)), и/или в определяющих специфичность остатках (SDR), при этом полученный вариант V_H или V_L тестируют в отношении аффинности связывания. Метод созревания аффинности путем конструирования вторичных библиотек и повторного отбора из них описан, например, Hoogenboom и др. в Methods in Molecular Biology, 178: 1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ (2001)).

В некоторых воплощениях метода созревания аффинности разнообразие в гены варибельной области, выбранные для созревания, вносят любым из ряда способов (например, посредством допускающей ошибки ПЦР, перетасовки цепей или олигонуклеотид-направленного мутагенеза). Затем создают вторичную библиотеку. После этого проводят скрининг данной библиотеки с целью идентификации любых вариантов антител с желаемой аффинностью. Другой способ внесения разнообразия включает HVR-направленные подходы, при которых рандомизируют несколько остатков HVR (например, 4-6 остатков

одновременно). Остатки HVR, вовлеченные в связывание с антигеном, можно специфически идентифицировать, например, используя аланин-сканирующий мутагенез или моделирование. Особенно часто мишенями становятся CDR-H3 и CDR-L3.

В некоторых воплощениях замены, вставки или делеции могут осуществляться в пределах одного или более HVR при условии, что такие изменения по существу не снижают способности антитела связываться с антигеном. Например, в HVR могут быть выполнены консервативные изменения (например, консервативные замены, предусмотренные в данном изобретении), которые по существу не снижают аффинности связывания. Такие изменения могут быть вне "горячих точек" HVR или вне SDR. В некоторых воплощениях последовательностей вариантов VH и VL, предложенных выше, каждый HVR либо не изменен, либо содержит не более одной, двух или трех аминокислотных замен.

Полезный способ идентификации остатков или участков антитела, которые могут быть мишенью для мутагенеза, называется "аланин-сканирующим мутагенезом", описанным в Cunningham and Wells (1989) Science, 244: 1081-1085. В этом способе идентифицируют остаток или группу целевых остатков (например, заряженные остатки, такие как остатки arg, asp, his, lys и glu) и заменяют на остаток нейтральной или отрицательно заряженной аминокислоты (например, аланина или полиаланина), чтобы определить, повлияет ли это на взаимодействие антитела с антигеном. В положениях аминокислот, демонстрирующих функциональную чувствительность к первоначальным заменам, могут быть выполнены дальнейшие замены. Альтернативно или помимо этого, для идентификации точек контакта между антителом и антигеном может быть определена кристаллическая структура комплекса антиген-антитело. Такие контактирующие остатки и соседние с ними остатки могут быть выявлены в качестве мишени или исключены из кандидатов на замену. Варианты можно подвергнуть скринингу, чтобы определить, проявляют ли они желаемые свойства.

Вставки в аминокислотную последовательность включают вставки с получением amino- и/или карбоксил-концевых слитых конструкций длиной от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или более остатков, а также вставки одного или нескольких аминокислотных остатков внутрь последовательности. Примеры концевых вставок включают антитело с N-концевым метионильным остатком. Другие варианты молекулы антитела со вставками включают слитую конструкцию, в которой N- или C-конец антитела соединен с ферментом (например, для антитело-опосредованной терапии с использованием ферментов и пролекарств (ADEPT)) или полипептидом, что увеличивает период полувыведения антитела из сыворотки крови.

В некоторых воплощениях данного изобретения предложены антитела к GM-CSFR α , содержащие V_H, содержащий HC-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, HC-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и HC-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, или их вариант, содержащий примерно до 5 аминокислотных замен в V_H; и V_L, содержащий LC-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, LC-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52, и LC-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57 или их вариант, содержащий примерно до 5 аминокислотных замен в V_L.

В некоторых воплощениях данного изобретения предложены антитела к GM-CSFR α , содержащие V_H, содержащий HC-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, HC-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и HC-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, при этом данный V_H содержит аминокислотные замены, содержащие остатки аминокислот E, H, N, G, D, M, S, P, F, Y, A, V, K, W, R или C в положении 31.

В некоторых воплощениях данного изобретения предложены антитела к GM-CSFR α , содержащие V_H, содержащий HC-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, HC-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и HC-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, при этом данный V_H содержит аминокислотные остатки, выбранные из T, H, V, E, P, L, M, S, W, C, A, G, N или K в положении 28, и/или аминокислотные остатки, выбранные из T, P, D, E, Y, W, V, M, N, L, Q, G, S, A, K или R в положении 30.

В некоторых воплощениях данного изобретения предложены антитела к GM-CSFR α , содержащие V_L, содержащий LC-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, LC-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52, и LC-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57, при этом данный V_L содержит аминокислотные замены, содержащие S, L, N, A, K, R, I, Q, G, T, H, M или C в положении 26; и/или Q, Y, P, A, I, F, T, R, V, L, E, S или C в положении 27; и/или S, H, W, L, R, K, T, P, I, F, V, E, A или Q в положении 28; и/или S, L, W, M, A, Y, K, R, G, T, E, V, N, F или C в положении 30; и/или S, T, R, A, H, Q, P, M, L или G в положении 31; и/или Y, L или F в положении 32; и/или G или T в положении 50; и/или A, G, R, H, K, S, T, M, F, N или V в положении 51; и/или S, A, W, R, L, T, Q, F, Y, H или N в положении 52; и/или D, A, Q или W в положении 92; и/или N, D, E, T, Y, G, A, M, F, S, I или L в положении 93.

В некоторых воплощениях включена любая аминокислотная замена или комбинация аминокислотных замен, которые показаны в табл. 15.

функцией, часто обусловленной связыванием с Fc-рецепторами (FcR). В некоторых воплощениях вариант Fc-области обладает ослабленной ADCC эффекторной функцией. Имеется много примеров изменений или мутаций последовательностей Fc, которые могут затрагивать эффекторную функцию. Например, в WO 00/42072 и Shields et al., J. Biol. Chem., 9(2): 6591-6604 (2001) описываются варианты антитела с улучшенным или ухудшенным связыванием с FcR. Содержание этих публикаций специально включено в данное описание посредством ссылки.

Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC) представляет собой механизм действия терапевтического антитела против опухолевых клеток. ADCC представляет собой клеточно-опосредованную иммунную защиту, благодаря которой эффекторная клетка иммунной системы активно лизует клетку-мишень (например, раковую клетку), антигены на поверхности мембраны которой связаны со специфичными антителами (например, антителом к GM-CSFR α). Типичная ADCC заключается в активации NK клеток антителами. NK клетка экспрессирует CD16, который является Fc-рецептором. Этот рецептор распознает Fc часть и связывается с Fc частью антитела, связанного с поверхностью клетки-мишени. Самый распространенный Fc-рецептор на поверхности NK клетки называется CD16 или Fc γ RIII. Связывание Fc-рецептора с Fc-областью антитела приводит к активации NK клетки, высвобождению цитолитических гранул и последующему апоптозу клетки-мишени. Вклад ADCC в цитолиз опухолевых клеток можно измерить с применением специфического теста, в котором используются NK-92 клетки, трансфицированные геном высокоаффинного FcR. Результаты сравнивают с NK-92 клетками дикого типа, которые не экспрессируют FcR.

В некоторых воплощениях данное изобретение предусматривает вариант антитела к GM-CSFR α (как например, вариант полноразмерного антитела к GM-CSFR α), содержащий Fc-область, обладающий некоторыми, но не всеми эффекторными функциями, что делает его желаемым кандидатом для практических применений, в которых важным является период полувыведения антитела к GM-CSFR α *in vivo*, в то время как некоторые эффекторные функции (такие как CDC и ADCC) не являются необходимыми или являются вредными. Для подтверждения снижения/истощения CDC- и/или ADCC-активностей можно провести анализы цитотоксичности *in vitro* и/или *in vivo*. Например, можно провести анализы связывания с Fc-рецепторами (FcR), чтобы убедиться, что у данного антитела отсутствует способность связываться с Fc γ R (поэтому, вероятнее всего, отсутствует ADCC-активность), но сохраняется способность связываться с FcRn (неонатальный Fc-рецептор). Первичные клетки для опосредования ADCC, NK-клетки, экспрессируют только Fc γ RIII, в то время как моноциты экспрессируют Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII. Данные по экспрессии FcR на гемопоэтических клетках суммированы в табл. 3 на странице 464 в Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9: 457-492 (1991). Неограничивающие примеры анализов *in vitro* для оценки ADCC-активности молекулы, представляющей интерес, описаны в патенте США № 5500362 (см., например, Hellstrom I. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 83: 7059-7063 (1986)) и Hellstrom I. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 82: 1499-1502 (1985); в патенте США № 5821337 (см. Bruggemann M. et al., J. Exp. Med., 166: 1351-1361 (1987)). Альтернативно, можно применять нерадиоактивные методы анализа (см., например, анализ цитотоксичности ACTITM для проточной цитометрии без использования радиоактивной метки (Cell Technology, Inc. Mountain View, Calif.) и анализ цитотоксичности CYTOTOX 96TM без использования радиоактивной метки (Promega, Madison, Wis.). Полезные для таких анализов эффекторные клетки включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и природные киллерные (NK) клетки. Альтернативно или помимо этого, ADCC-активность молекулы, представляющей интерес, можно оценить *in vivo*, например, в животной модели, такой как описана в Clynes et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 95: 652-656 (1998). Также можно провести анализы связывания с C1q для подтверждения того, что антитело не обладает способностью связываться с C1q и, следовательно, не обладает CDC-активностью. См., например, данные ELISA по связыванию с C1q и C3c в WO 2006/029879 и WO 2005/100402. Для оценки активации системы комплемента можно провести анализ CDC (см., например, Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods, 202: 163 (1996); Cragg M.S. et al., Blood, 101: 1045-1052 (2003); и Cragg M.S. and M.J. Glennie, Blood, 103: 2738-2743 (2004)). Определения связывания с FcRn и клиренса/периода полувыведения *in vivo* также могут быть проведены с использованием методов, известных в данной области техники (см., например, Petkova S.B. et al., Int'l. Immunol. 18(12): 1759-1769 (2006)).

Антитела с ослабленной эффекторной функцией включают антитела с заменой одного или более остатков в Fc-области в положениях 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 (патент США № 6737056). Такие Fc-мутанты включают Fc-мутанты с заменами аминокислот в двух или более положениях 265, 269, 270, 297 и 327, включая так называемый Fc-мутант "DANA" с заменой остатков 265 и 297 на аланин (патент США № 7332581).

Описаны несколько вариантов антител с улучшенным или ухудшенным связыванием с FcR (см., например, патент США № 6737056; WO 2004/056312, и Shields et al., J. Biol. Спет., 9(2): 6591-6604 (2001)).

В некоторых воплощениях предложен вариант антитела к GM-CSFR α (такого как полноразмерное антитело к GM-CSFR α), содержащий вариант Fc-области, содержащий одну или несколько аминокислотных замен, которые улучшают ADCC. В некоторых воплощениях вариант Fc-области содержит одну

или несколько аминокислотных замен, которые улучшают ADCC, при этом замены находятся в положениях 298, 333 и/или 334 варианта Fc-области (нумерация остатков согласно EU). В некоторых воплощениях вариант антитела к GM-CSFR α (например, полноразмерного антитела к GM-CSFR α) содержит следующие аминокислотные замены в своем варианте Fc-области: S298A, ETMA и K334A.

В некоторых воплощениях в Fc-области выполнены изменения, которые влияют на (т.е. либо улучшают, либо ухудшают) связывание с C1q и/или комплементзависимую цитотоксичность (CDC), например, как описано в патенте США № 6194551, WO 99/51642 и Idusogie et al., J. Immunol., 164: 4178-4184 (2000).

В некоторых воплощениях предложен вариант антитела к GM-CSFR α (такого как полноразмерное антитело к GM-CSFR α), содержащий вариант Fc-области, содержащий одну или несколько аминокислотных замен, которые увеличивают период полувыведения и/или улучшают связывание с неонатальным Fc-рецептором (FcRn). Антитела с увеличенными периодами полувыведения и улучшенным связыванием с FcRn описаны в US2005/0014934A1 (Hinton и др.). Такие антитела содержат Fc-область с одной или несколькими заменами в ней, которые улучшают связывание Fc-области с FcRn. Такие варианты Fc-области включают варианты с заменами в одном или нескольких остатках Fc-области: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 или 434, например, с заменой остатка 434 в Fc-области (патент США №7371826).

Также см. Duncan & Winter, Nature, 322: 738-40 (1988); патент США №5648260; патент США № 5624821 и WO 94/29351, касающиеся других примеров вариантов Fc-области.

Включены антитела к GM-CSFR α (как например, полноразмерные антитела к GM-CSFR α), содержащие любой из вариантов Fc-области, описанных в данном изобретении, или их комбинации.

Варианты гликозилирования.

В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α (такое как полноразмерное антитело к GM-CSFR α), предложенное в данном изобретении, изменено с целью увеличения или уменьшения степени гликозилирования этого антитела к GM-CSFR α . Добавление или удаление сайтов гликозилирования у антитела к GM-CSFR α можно осуществлять подходящим образом путем изменения аминокислотной последовательности антитела к GM-CSFR α или части его полипептида таким образом, чтобы создавался или удалялся один или более чем один сайт гликозилирования.

В тех случаях, когда антитело к GM-CSFR α содержит Fc-область, присоединенный к ней углевод может быть изменен. Нативные антитела, продуцируемые клетками млекопитающих, обычно содержат разветвленный, биантенный олигосахарид, который, как правило, присоединен через N-связь к Asn297 CH2 домена Fc-области. См., например, Wright et al., TIBTECH, 15: 26-32 (1997). Олигосахарид может содержать различные углеводы, например, маннозу, N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), галактозу и сиаловую кислоту, а также фукозу, присоединенную к GlcNAc в "стволе" биантенной структуры олигосахарида. В некоторых воплощениях могут быть выполнены модификации олигосахарида в антителе к GM-CSFR α по данному изобретению с целью создания вариантов антитела к GM-CSFR α с определенными улучшенными свойствами.

N-Гликаны, присоединенные к CH2 домену Fc-области, являются гетерогенными. Антитела или слитые с Fc белки, образуемые в клетках CHO, являются фукозилированными в результате проявления фукозилтрансферазной активности. См. Shoji-Hosaka et al., J. Biochem., 2006, 140: 777-83. В норме в сыворотке крови человека может быть обнаружено небольшое процентное содержание природных нефукозилированных IgG. N-Гликозилирование Fc-области важно для связывания с Fc γ R; и отсутствие фукозилирования у N-гликана усиливает способность Fc-области связываться с Fc γ RIIIa. Усиление связывания с Fc γ RIIIa может повышать ADCC, что может иметь преимущество при определенных терапевтических применениях антител, для которых цитотоксичность является желательной.

В некоторых воплощениях усиленная эффекторная функция может быть неблагоприятна, когда нежелательна Fc-опосредуемая цитотоксичность. В некоторых воплощениях Fc фрагмент или CH2 домен не гликозилирован. В некоторых воплощениях сайт N-гликозилирования в CH2 домене подвергнут мутации для предотвращения гликозилирования.

В некоторых воплощениях предложены варианты антитела к GM-CSFR α (такого как полноразмерное антитело к GM-CSFR α), содержащие Fc-область, при этом углеводная структура, присоединенная к Fc-области, имеет сниженное содержание остатков фукозы или не содержит остатков фукозы, что может улучшить ADCC-функцию. В частности, в данную заявку включены антитела к GM-CSFR α , имеющие сниженное содержание остатков фукозы по сравнению с количеством остатков фукозы в таком же антителе к GM-CSFR α , образованном в клетке CHO дикого типа. То есть, они характеризуются меньшим количеством остатков фукозы, чем если бы они были образованы в нативных клетках CHO (например, в клетке CHO, в которой сохраняется нативная картина гликозилирования, такой как клетка CHO, содержащая нативный ген α -1,6-фукозилтрансферазы (FUT8)). В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α представляет собой антитело, у которого меньше чем примерно 50%, 40%, 30%, 20%, 10% или 5% N-связанных гликанов содержат остатки фукозы. Например, количество остатков фукозы в таком

антителе к GM-CSFR α может составлять от 1% до 80%, от 1% до 65%, от 5% до 65% или от 20% до 40%. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α представляет собой антитело, у которого ни один из N-связанных гликанов не содержит остатков фукозы, т.е. когда антитело к GM-CSFR α вообще не имеет остатков фукозы, или не содержит никаких остатков фукозы, или является нефукозилированным. Количество остатков фукозы определяют, подсчитывая среднее количество остатков фукозы в углеводной цепи при Asn297 относительно общего количества всех гликоструктур, присоединенных к Asn 297 (например, комплексных, гибридных и высокоманнозных структур) по данным время-пролетной масс-спектрометрии с ионизацией посредством лазерной десорбции ионов из матрицы (MALDI-TOF), как описано, например, в WO 2008/077546. Обозначение Asn297 относится к остатку аспарагина, локализованному примерно в положении 297 в Fc-области (нумерация остатков Fc-области согласно EU-индексу); однако, Asn297 также может быть локализован на расстоянии примерно 3 аминокислоты выше по течению или ниже по течению относительно положения 297, т.е. между положениями 294 и 300, вследствие незначительных вариаций последовательности антител. Такие фукозилированные варианты могут иметь улучшенную ADCC-функцию. См., например, публикации заявок на патент США №№ US 2003/0157108 (Presta L); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Примеры публикаций, касающихся "дефукозилированных" или "дефицитных по фукозе" вариантов антител, включают: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki et al., J. Mol. Biol., 336: 1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al., Biotech. Bioeng., 87: 614 (2004). Примеры клеточных линий, способных продуцировать дефукозилированные антитела, включают CHO-клетки Lec13, дефицитные по фукозилированию белка (Ripka et al., Arch. Biochem. Biophys., 249: 533-545 (1986); патентная заявка США № US 2003/0157108 A1, Presta L; и WO 2004/056312 A1, Adams и др., в частности, в примере 11), и нокаутные клеточные линии, как например, CHO-клетки с нокаутом гена альфа-1,6-фукозилтрансферазы, FUT8 (см., например, Yamane-Ohnuki et al., Biotech. Bioeng., 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4): 680-688 (2006) и WO 2003/085107).

Далее предложены варианты антитела к GM-CSFR α (такого как полноразмерное антитело к GM-CSFR α) с раздвоенными олигосахаридами, например, в которых биантенный олигосахарид, присоединенный к Fc-области антитела к GM-CSFR α , имеет точки ветвления при GlcNAc. Такие варианты антитела к GM-CSFR α (например, полноразмерного антитела к GM-CSFR α) могут иметь более низкую степень фукозилирования и/или улучшенную ADCC-функцию. Примеры таких вариантов антитела описаны, например, в WO 2003/011878 (Jean-Mairet и др.); патенте США № 6602684 (Umana и др.); US 2005/0123546 (Umana и др.) и в Ferrara et al., Biotechnology and Bioengineering, 93(5): 851-861 (2006). Также предложены варианты антитела к GM-CSFR α (такого как полноразмерное антитело к GM-CSFR α), содержащие по меньшей мере один остаток галактозы в олигосахариде, присоединенном к Fc-области. Такие варианты антитела к GM-CSFR α могут иметь улучшенную CDC-функцию. Такие варианты антител описаны, например, в WO 1997/30087 (Patel и др.); WO 1998/58964 (Raju S.) и WO 1999/22764 (Raju S.).

В некоторых воплощениях варианты антитела к GM-CSFR α (такого как полноразмерное антитело к GM-CSFR α), содержащие Fc-область, обладают способностью связываться с Fc γ RIII. В некоторых воплощениях варианты антитела к GM-CSFR α (такого как полноразмерное антитело к GM-CSFR α), содержащие Fc-область, обладают ADCC-активностью в присутствии эффекторных клеток человека (например, Т-клеток) или обладают более высокой ADCC-активностью в присутствии эффекторных клеток человека по сравнению с иным таким же антителом к GM-CSFR α (таким как полноразмерное антитело к GM-CSFR α), содержащим Fc-область человеческого IgG1 дикого типа.

Варианты, сконструированные с остатками цистеина.

В некоторых воплощениях может быть желательно создать сконструированные с остатками цистеина антитела к GM-CSFR α (такие как полноразмерное антитело к GM-CSFR α), в которых один или несколько аминокислотных остатков заменены на остатки цистеина. В некоторых воплощениях заменяемые остатки находятся в доступных сайтах антитела к GM-CSFR α . В результате замены этих остатков на остатки цистеина реакционноспособные тиоловые группы будут располагаться в доступных сайтах антитела к GM-CSFR α и могут быть использованы для конъюгирования антитела к GM-CSFR α с другими группировками, такими как группировки лекарственного средства или группировки соединенного с линкером лекарственного средства, с целью создания иммуноконъюгата на основе антитела к GM-CSFR α , как описано далее в данном изобретении. Сконструированные с остатками цистеина антитела к GM-CSFR α (например, полноразмерные антитела к GM-CSFR α) могут быть созданы так, как описано, например, в патенте США № 7521541.

Производные.

В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α (такое как полноразмерное антитело к GM-CSFR α), предложенное в данном изобретении, может быть дополнительно модифицировано с тем, чтобы

содержать дополнительные небелковые группировки, которые известны в данной области техники и легко доступны. Группировки, подходящие для получения производных антитела к GM-CSFR α , включают, но не ограничиваются этим, водорастворимые полимеры. Неограничивающие примеры водорастворимых полимеров включают, но не ограничиваются этим, полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена и малеинового ангидрида, полиаминокислоты (или гомополимеры, или статистические сополимеры), декстран или поли(N-винилпирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры пропропиленгликоля, сополимеры пропропиленоксида/этиленоксида, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси. Полиэтиленгликоль-пропиональдегид может иметь преимущества при изготовлении ввиду его стабильности в воде. Полимер может иметь любую молекулярную массу и может быть разветвленным или неразветвленным. Число молекул полимеров, присоединенных к антителу к GM-CSFR α , может варьировать и, если присоединено больше одной молекулы полимера, то они могут представлять собой одинаковые или разные молекулы. В общем случае число молекул и/или тип полимеров, используемых для получения производных, могут быть определены на основании соображений, включая, но не ограничиваясь этим, конкретные свойства или функции антитела к GM-CSFR α , подлежащие улучшению, а также будет ли производное антитела к GM-CSFR α использовано в терапии в определенных условиях и так далее.

Фармацевтические композиции.

Кроме того, в данном изобретении предложены композиции (такие как фармацевтические композиции, также называемые в данном описании как препараты), содержащие любое из антител к GM-CSFR α (таких как полноразмерное антитело к GM-CSFR α), нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, векторы, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, или клетки-хозяева, содержащие нуклеиновые кислоты или векторы, описанные в данном изобретении. В некоторых воплощениях предложена фармацевтическая композиция, содержащая любое из антител к GM-CSFR α , описанных в данном изобретении, и фармацевтически приемлемый носитель.

Подходящие композиции на основе антител к GM-CSFR α готовят путем смешивания антитела к GM-CSFR α , имеющего желаемую степень чистоты, с возможными фармацевтически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16-е издание, под ред. Osol A. (1980)) в форме лиофилизированных композиций или водных растворов. Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы нетоксичны для реципиентов в применяемых дозировках и концентрациях и включают буферы, например, на основе фосфата, цитрата и других органических кислот; антиоксиданты, в том числе аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмония хлорид; гексаметония хлорид; бензалкония хлорид; бензетония хлорид; фенол, бутиловый или бензиловый спирт;

алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (состоящие из менее чем примерно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, в том числе глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA); сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как ионы натрия; комплексы с металлами (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TweenTM, PLURONICSTM или полиэтиленгликоль (ПЭГ). Типичные композиции описаны в заявке WO98/56418, специально включенной в данное описание посредством ссылки. Лиофилизированные композиции, адаптированные для подкожного введения, описаны в WO97/04801. Такие лиофилизированные композиции могут быть повторно разведены в подходящем разбавителе с получением высокой концентрации белка и такую повторно разведенную композицию можно вводить подкожно подлежащему лечению индивиду согласно данному описанию. Чтобы доставить антитела к GM-CSFR α по этой заявке в клетки, можно использовать липофектины или липосомы.

Упомянутая в данном описании композиция также может содержать одно или более активных соединений помимо антитела к GM-CSFR α (такого как полноразмерное антитело к GM-CSFR α), если это необходимо для конкретного подлежащего лечению показания, предпочтительно соединений с дополняющими видами активности, которые не влияют друг на друга отрицательно. Например, может быть желательно обеспечить дополнительно наличие противоопухолевого агента, ингибирующего рост агента, цитотоксического агента или химиотерапевтического агента помимо антитела к GM-CSFR α . Такие молекулы соответственно присутствуют в комбинациях в количествах, которые эффективны для предполагаемой цели. Эффективное количество таких других агентов зависит от количества антитела к GM-CSFR α , присутствующего в композиции, типа заболевания или расстройства либо способа лечения и других факторов, обсуждаемых выше. Их обычно используют в тех же дозировках и с теми же путями введения, которые описаны в данном изобретении, или в количестве примерно от 1 до 99% от описанных

ранее дозировок.

Антитела к GM-CSFR α (например, полноразмерные антитела к GM-CSFR α) также могут быть заключены в микрокапсулы, приготовленные, например, с использованием методов коацервации или путем межфазной полимеризации, например, в микрокапсулы из гидроксиметилцеллюлозы или желатина и микрокапсулы из поли-(метилметакрилата), соответственно, в коллоидные системы лекарственной доставки (например, липосомы, микросферы из альбумина, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсии. Могут быть приготовлены препараты с длительным высвобождением.

На основе антител к GM-CSFR α (например, полноразмерных антител к GM-CSFR α) можно приготовить препараты с длительным высвобождением.

Подходящие примеры препаратов с длительным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из гидрофобных полимеров в твердой форме, содержащие антитело (или его фрагмент), причем эти матрицы существуют в виде изделий определенной формы, например, пленок или микрокапсул. Примеры матриц с длительным высвобождением включают сложные полиэфиры, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтил-метакрилат) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и этил-L-глутамата, неразлагаемый этилен-винилацетат, разлагаемые сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOTTM (инъекционные микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты и гликолевой кислоты и из ацетата лейпролида), и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту. В то время как полимеры, такие как этилен-винилацетат и сополимер молочной кислоты и гликолевой кислоты способны высвобождать молекулы в течение более 100 суток, высвобождение белков из некоторых гидрогелей происходит в течение более коротких периодов времени. Если инкапсулированные антитела остаются в организме в течение длительного времени, то они могут денатурировать или агрегировать под действием влаги при 37°C, что приводит к потере биологической активности и возможным изменениям в иммуногенности. В зависимости от задействованного механизма могут быть разработаны рациональные стратегии стабилизации антител к GM-CSFR α . Например, если обнаруживается, что механизм агрегации заключается в образовании межмолекулярных S-S связей посредством тиодисульфидного обмена, то стабилизация может быть достигнута путем модификации сульфгидрильных остатков, лиофилизации из кислых растворов, регулирования содержания влаги с использованием соответствующих вспомогательных веществ и разработки полимерных матриц специального состава.

В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α (такое как полноразмерное антитело к GM-CSFR α) готовят в буфере, содержащем цитрат, NaCl, ацетат, сукцинат, глицин, полисорбат 80 (твин 80) или любую комбинацию из перечисленного выше.

Композиции, применяемые для введения *in vivo*, должны быть стерильными.

Такую стерилизацию легко осуществить, например, посредством фильтрования через стерильные фильтрующие мембраны.

Способы лечения с использованием антител к GM-CSFR α .

Антитела к GM-CSFR α (например, полноразмерные антитела к GM-CSFR α) и/или композиции по данному изобретению могут быть введены индивидуам (например, млекопитающим, таким как люди) для лечения заболевания или расстройства, ассоциированного с высокими уровнями экспрессии GM-CSF и/или GM-CSFR α , и заболевания или расстройства с нарушенным функционированием GM-CSF и/или GM-CSFR α , такого как аутоиммунные и/или воспалительные состояния или рак, характеризующиеся высокими уровнями экспрессии GM-CSF и/или GM-CSFR α и/или аномальным функционированием GM-CSF/GM-CSFR α , например, ревматоидный артрит, астма и миелоидный лейкоз, легочное заболевание. Таким образом, согласно настоящему изобретению в некоторых воплощениях предложен способ лечения аутоиммунного и/или воспалительного состояния или рака, характеризующихся высокими уровнями экспрессии GM-CSF и/или GM-CSFR α и/или аномальным функционированием GM-CSF/GM-CSFR α (например, ревматоидного артрита, астмы или миелоидного лейкоза), у индивида, включающий введение индивиду эффективного количества композиции (такой как фармацевтическая композиция), содержащей антитело к GM-CSFR α (например, полноразмерное антитело к GM-CSFR α), как например, любое из антител к GM-CSFR α (например, полноразмерных антител к GM-CSFR α), описанных в данном изобретении.

В некоторых воплощениях заболевание или состояние выбрано, например, из группы, состоящей из ревматоидного артрита, астмы, хронической обструктивной болезни легких, аллергической реакции, рассеянного склероза, миелоидного лейкоза и атеросклероза. В некоторых воплощениях индивидом является человек.

Например, в некоторых воплощениях предложен способ лечения индивида, имеющего аутоиммунное и/или воспалительное состояние или рак, характеризующиеся высокими уровнями экспрессии GM-CSF и/или GM-CSFR α и/или аномальным функционированием GM-CSF/GM-CSFR α (например, ревматоидный артрит, астму или миелоидный лейкоз), включающий введение индивиду эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело к GM-CSFR α (например, полноразмерное антитело к GM-CSFR α), специфично связывающееся с эпитопом на GM-CSFR α человека, при этом дан-

ный эпитоп содержит аминокислотные остатки Val50, Glu59, Lys194, Lys195, Arg283 и Ile284 в GM-CSFR α человека. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α , описанное в данном изобретении, специфично связывается с эпитопом на GM-CSFR α человека, при этом данный эпитоп содержит аминокислотные остатки Val50, Glu59, Lys194, Lys195, Arg283, Ile284, Val51, Thr63 и Ile196. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α , описанное в данном изобретении, специфично связывается с эпитопом на GM-CSFR α человека, при этом данный эпитоп содержит аминокислотные остатки Val50, Glu59, Lys194, Lys195, Arg283, Ile284, Leu191 и Ile196. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α , описанное в данной заявке, специфично связывается с эпитопом на GM-CSFR α человека, при этом данный эпитоп содержит аминокислотные остатки Val50, Glu59, Lys194, Lys195, Arg283, Ile284, Arg49, Val51, Asn57, и Ser61. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α представляет собой полноразмерное антитело. В некоторых воплощениях полноразмерное антитело к GM-CSFR α представляет собой антитело IgG1 или IgG4 типа. В некоторых воплощениях заболевание или состояние выбрано из группы, состоящей из ревматоидного артрита, астмы, хронической обструктивной болезни легких, аллергической реакции, рассеянного склероза, миелоидного лейкоза и атеросклероза. В некоторых воплощениях индивидом является человек.

В некоторых воплощениях предложен способ лечения индивида, имеющего аутоиммунное и/или воспалительное состояние или рак, характеризующиеся высокими уровнями экспрессии GM-CSF и/или GM-CSFR α и/или аномальным функционированием GM-CSF/GM-CSFR α (например, ревматоидный артрит, астму или миелоидный лейкоз), включающий введение индивиду эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело к GM-CSFR α (например, полноразмерное антитело к GM-CSFR α), содержащее переменный домен тяжелой цепи (V_H), содержащий HC-CDR1, содержащий $X_1X_2X_3H$ (SEQ ID NO: 76), где X_1 представляет собой E, N, G, D, M, S, P, F, Y, A, V, K, W, R или C, X_2 представляет собой S, C или P, и X_3 представляет собой I или M; HC-CDR2, содержащий GFDX $_1X_2X_3X_4EX_5X_6YAQKX_7QG$ (SEQ ID NO: 77), где X_1 представляет собой P, G, T, S или V, X_2 представляет собой E, D, G или A, X_3 представляет собой D, G, I, W, S или V, X_4 представляет собой G, E, D или H, X_5 представляет собой T или A, X_6 представляет собой N или I, и X_7 представляет собой S или F; и HC-CDR3, содержащий GRYX $_1X_2X_3X_4X_5X_6YGFYD$ (SEQ ID NO: 78), где X_1 представляет собой C, T, S, I, A или V, X_2 представляет собой S, G, E, F, W, H, I, V, N, Y, T или R, X_3 представляет собой T, H, L, F, P, I, S, Y, K, A, D, V, N или G, X_4 представляет собой D, A, M, Y, F, S, T, G или W, X_5 представляет собой T, S, F, Q, A, N, L, E, I, G или M, и X_6 представляет собой C, T, N, S или A; и V_L , содержащий LC-CDR1, содержащий RAX $_1X_2X_3VX_4X_5X_6LA$ (SEQ ID NO: 293), где X_1 представляет собой S, L, N, A, K, R, I, Q, G, T, H, M или C, X_2 представляет собой Q, Y, P, A, I, F, T, R, V, L, E, S или C, X_3 представляет собой S, H, W, L, R, K, T, P, I, F, V, E, A или Q, X_4 представляет собой S, L, W, M, A, Y, K, R, G, T, E, V, N, F или C, X_5 представляет собой S, T, R, A, H, Q, P, M, L или G, и X_6 представляет собой Y, L или F; LC-CDR2, содержащий $X_1X_2X_3S$ RAT (SEQ ID NO: 294), где X_1 представляет собой G или T, X_2 представляет собой A, G, R, H, K, S, T, M или F, и X_3 представляет собой S, A, W, R, L, T, Q, F, Y, H или N; и LC-CDR3, содержащий QQYX $_1X_2X_3PX_4T$ (SEQ ID NO: 79), где X_1 представляет собой N, D, S, R, A, T, L, Y, Q, W или G, X_2 представляет собой N, D, E, T, Y, G, A, M, F, S, I или L, X_3 представляет собой W, S, P, V, G или R, и X_4 представляет собой P, Y, H, S, F, N, D, V или G.

В некоторых воплощениях предложен способ лечения индивида, имеющего аутоиммунное и/или воспалительное состояние или рак, характеризующиеся высокими уровнями экспрессии GM-CSF и/или GM-CSFR α и/или аномальным функционированием GM-CSF/GM-CSFR α (например, ревматоидный артрит, астму или миелоидный лейкоз), включающий введение индивиду эффективного количества композиции, содержащей антитело к GM-CSFR α , содержащее: V_H , содержащий HC-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1-4, HC-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5-16, и HC-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17-50, или их вариант, содержащий до 5 аминокислотных замен; и V_L , содержащий LC-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, LC-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52, и LC-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53-75, или их вариант, содержащий до 5 аминокислотных замен.

В некоторых воплощениях предложен способ лечения индивида, имеющего аутоиммунное и/или воспалительное состояние или рак, характеризующиеся высокими уровнями экспрессии GM-CSF и/или GM-CSFR α и/или аномальным функционированием GM-CSF/GM-CSFR α (например, ревматоидный артрит, астму или миелоидный лейкоз), включающий введение индивиду эффективного количества композиции, содержащей антитело к GM-CSFR α , содержащее V_H , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80-121 и 246-287, или его вариант, имеющий по меньшей мере примерно 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 80-121 и 246-287, и V_L , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122-144, 150-245 и 288-289, или его вариант, имеющий по меньшей мере примерно 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 122-144, 150-245 и 288-289.

В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α , предложенное в данном изобретении, представ-

последовательность или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 147.

В некоторых воплощениях предложен способ лечения индивида, имеющего аутоиммунное и/или воспалительное состояние или рак, характеризующиеся высокими уровнями экспрессии GM-CSF и/или GM-CSFR α и/или аномальным функционированием GM-CSF/GM-CSFR α (например, ревматоидный артрит, астму или миелоидный лейкоз), включающий введение индивиду эффективного количества композиции, содержащей антитело к GM-CSFR α , содержащее: V_H, содержащий HC-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, HC-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и HC-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50, или их вариант, содержащий до 5 аминокислотных замен; и V_L, содержащий LC-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, LC-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52, и LC-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57, или их вариант, содержащий до 5 аминокислотных замен.

В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α , предложенное в данном изобретении, содержит V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 121, и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126. В некоторых воплощениях антитело к GM-CSFR α , предложенное в данной заявке, представляет собой полноразмерное антитело к GM-CSFR α , содержащее константные домены IgG1 или IgG4. В некоторых воплощениях IgG1 представляет собой IgG1 человека. В некоторых воплощениях IgG4 представляет собой IgG4 человека. В некоторых воплощениях константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 145. В некоторых воплощениях константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 146. В некоторых воплощениях константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 147.

В некоторых воплощениях индивид представляет собой млекопитающее (например, человека, не являющегося человеком примата, крысу, мышь, корову, лошадь, свинью, овцу, козу, собаку, кошку и т.д.). В некоторых воплощениях индивидом является человек. В некоторых воплощениях индивидом является клинический пациент, доброволец клинического испытания, экспериментальное животное и так далее. В некоторых воплощениях возраст индивида составляет меньше примерно 60 лет (в том числе, например, возраст составляет меньше примерно 50, 40, 30, 25, 20, 15 или 10 лет). В некоторых воплощениях возраст индивида составляет выше примерно 60 лет (в том числе, например, возраст составляет выше 70, 80, 90 или 100 лет). В некоторых воплощениях у индивида диагностировано одно или несколько заболеваний или расстройств, описанных в данном изобретении, или он генетически предрасположен к ним (таким как ревматоидный артрит, астма, хроническая обструктивная болезнь легких, аллергическая реакция, рассеянный склероз, миелоидный лейкоз или атеросклероз). В некоторых воплощениях индивид имеет один или более факторов риска, ассоциированных с одним или более чем одним заболеванием или расстройством, описанным в данном изобретении.

Согласно настоящему изобретению в некоторых воплощениях предложен способ доставки антитела к GM-CSFR α (такого как любое из антител к GM-CSFR α , описанных в данном документе, например, выделенное антитело к GM-CSFR α) в клетку, экспрессирующую GM-CSFR α на своей поверхности, у индивида, способ, включающий введение данному индивиду композиции, содержащей антитело к GM-CSFR α .

В данной области техники известно много методов диагностики рака или любого другого заболевания, демонстрирующего аномальную экспрессию GM-CSF и/или GM-CSFR α , и клинических описаний этих заболеваний. Такие методы включают, но не ограничиваются этим, например, методы иммуногистохимии, ПЦР и флуоресцентной гибридизации in situ (FISH).

В некоторых воплощениях антитела к GM-CSFR α (например, полноразмерные антитела к GM-CSFR α) и/или композиции по данному изобретению вводят в комбинации со вторым, третьим или четвертым агентом (включая, например, противоопухолевый агент, ингибирующий рост агент, цитотоксический агент или химиотерапевтический агент) для лечения заболеваний или расстройств с вовлечением аномальной экспрессии GM-CSF/GM-CSFR α .

Лечение рака можно оценить, например, по регрессии опухоли, уменьшению массы или размера опухоли, времени до прогрессирования, продолжительности выживания, выживаемости без прогрессирования, общему коэффициенту ответа, продолжительности ответа, качеству жизни, экспрессии белка и/или активности. Для определения эффективности терапии можно использовать подходы, включающие, например, измерение ответа с использованием радиологической визуализации.

В некоторых воплощениях эффективность лечения измеряют в виде процента ингибирования роста опухоли (% TGI), рассчитанного с использованием уравнения $100 - (T/C \times 100)$, где T представляет собой средний относительный объем опухоли в случае подвергнутой лечению опухоли, а C представляет собой средний относительный объем опухоли в случае неподвергнутой лечению опухоли.

В некоторых воплощениях % TGI составляет примерно 10%, примерно 20%, примерно 30%, примерно 40%, примерно 50%, примерно 60%, примерно 70%, примерно 80%, примерно 90%, примерно

91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95% или выше 95%. В некоторых воплощениях эффективность лечения измеряют, используя изменение формы гранулоцитов и/или увеличение выживаемости гранулоцитов. В некоторых воплощениях эффективность лечения измеряют по возрастанию секреции цитокинов моноцитами.

Дозировка и способ введения антител к GM-CSFR α .

Доза композиций на основе антитела к GM-CSFR α (такого как выделенное антитело к GM-CSFR α), вводимых индивиду (такому как человек) может варьировать в зависимости от конкретной композиции, способа введения и типа подвергаемого лечению заболевания. В некоторых воплощениях количество композиции (такой как композиция, содержащая выделенное антитело к GM-CSFR α), является эффективным для получения объективного ответа (такого как частичный ответ или полный ответ) в лечении рака. В некоторых воплощениях количество композиции на основе антитела к GM-CSFR α является эффективным для получения полного ответа у индивида. В некоторых воплощениях количество композиции на основе антитела к GM-CSFR α является эффективным для получения частичного ответа у индивида. В некоторых воплощениях количество вводимой (например, вводимой отдельно) композиции на основе антитела к GM-CSFR α является достаточным для получения общего коэффициента ответа, превышающего любое значение из примерно 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 64%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% или 90% среди популяции индивидов, получающих лечение композицией на основе антитела к GM-CSFR α . Ответы индивида на лечение способами, описанными в данном изобретении, могут быть определены, например, на основании уровней Критериев оценки ответа при солидных опухолях (RECIST).

В некоторых воплощениях количество композиции (такой как композиция, содержащая выделенное антитело к GM-CSFR α) является достаточным для пролонгирования выживаемости индивида без прогрессирования заболевания. В некоторых воплощениях количество такой композиции является достаточным для пролонгирования общей выживаемости индивида. В некоторых воплощениях количество композиции (например, вводимой отдельно) является достаточным для получения клинической пользы, превышающей любое значение из примерно 50%, 60%, 70% или 77% среди популяции индивидов, получающих лечение композицией на основе антитела к GM-CSFR α .

В некоторых воплощениях количество композиции (такой как композиция, содержащая выделенное антитело к GM-CSFR α), самой по себе или в комбинации со вторым, третьим и/или четвертым агентом, составляет количество, достаточное для уменьшения размера опухоли, снижения количества раковых клеток или уменьшения скорости роста опухоли по меньшей мере на любую величину из примерно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100% по сравнению с соответствующим размером опухоли, количеством раковых клеток или скоростью роста опухоли у того же субъекта до лечения или по сравнению с соответствующим показателем у других субъектов, не получающих лечения. Для измерения величины этого эффекта можно использовать стандартные методы, такие как анализы *in vitro* с очищенным ферментом, анализы с применением клеток, животные модели или тестирование на людях.

В некоторых воплощениях количество антитела к GM-CSFR α (такого как полноразмерное антитело к GM-CSFR α) в данной композиции составляет величину ниже уровня, который вызывает токсикологический эффект (т.е. эффект, превышающий клинически приемлемый уровень токсичности), или находится на уровне, при котором возможный побочный эффект можно регулировать, или он может переноситься в случае введения данной композиции индивиду.

В некоторых воплощениях количество композиции близко к значению максимальной переносимой дозы (MTD) композиции после такого же режима введения. В некоторых воплощениях количество композиции превышает любое значение из примерно 80%, 90%, 95% или 98% от MTD.

В некоторых воплощениях количество антитела к GM-CSFR α (такого как полноразмерное антитело к GM-CSFR α) в данной композиции находится в диапазоне от примерно 0,001 мкг до примерно 1000 мкг.

В некоторых воплощениях любого из вышеупомянутых аспектов эффективное количество антитела к GM-CSFR α (такого как полноразмерное антитело к GM-CSFR α) в данной композиции находится в диапазоне от примерно 0,1 мкг/кг до примерно 100 мкг/кг общей массы тела.

Композицию на основе антитела к GM-CSFR α можно вводить индивиду (такому как человек) различными путями, включая, например, внутривенный, интраартериальный, внутрибрюшинный, внутривлагалищный, пероральный, ингаляционный, внутривезикулярный, внутримышечный, интратрахеальный, подкожный, интраокулярный, интратекальный, трансмукозальный и трансдермальный. В некоторых воплощениях может быть использована форма композиции с замедленным непрерывным высвобождением. В некоторых воплощениях композицию вводят внутривенно. В некоторых воплощениях композицию вводят интрапортально. В некоторых воплощениях композицию вводят интраартериально. В некоторых воплощениях композицию вводят внутрибрюшинно. В некоторых воплощениях композицию вводят внутривезикулярно. В некоторых воплощениях композицию вводят посредством инфузии в печеночную артерию. В некоторых воплощениях введение осуществляют в место инъекции, удаленное от места первого заболевания.

Изделия производства и наборы.

В некоторых воплощениях данного изобретения предложено изделие производства, содержащее материалы, полезные для лечения аутоиммунного и/или воспалительного состояния или рака, характеризующихся высоким уровнем экспрессии GM-CSF и/или GM-CSFR α и/или аномальным функционированием GM-CSF/GM-CSFR α (например, ревматоидного артрита, астмы или миелоидного лейкоза), или для доставки антитела к GM-CSFR α (такого как полноразмерное антитело к GM-CSFR α) в клетку, экспрессирующую GM-CSFR α на своей поверхности. Изделие производства может содержать контейнер и этикетку или инструкцию по применению на контейнере или в ассоциации с ним. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы и так далее. Контейнеры могут быть выполнены из разнообразных материалов, таких как стекло или пластик. Обычно контейнер содержит в себе композицию, которая эффективна для лечения заболевания или состояния, описанного в данной заявке, и может иметь стерильное входное отверстие (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или флакон, снабженный пробкой, поддающейся прокалыванию иглой для подкожных инъекций). По меньшей мере один активный агент в композиции представляет собой антитело к GM-CSFR α по данной заявке. На этикетке или в инструкции по применению есть указание на то, что композицию применяют для лечения конкретного состояния. Этикетка или инструкция по применению будет дополнительно содержать инструкции по введению композиции на основе антитела к GM-CSFR α пациенту. Также включены изделия производства и наборы, содержащие средства для комбинаторной терапии, описанные в данном изобретении.

Термин "инструкция по применению" относится к инструкциям, обычно включаемым в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию относительно показаний, применения, дозировки, введения, противопоказаний и/или предостережениях, касающихся применения таких терапевтических продуктов. В некоторых воплощениях в инструкции по применению есть указание на то, что данную композицию применяют для лечения аутоиммунных и/или воспалительных состояний (таких как ревматоидный артрит, астма, хроническая обструктивная болезнь легких, аллергическая реакция, рассеянный склероз, миелоидный лейкоз и атеросклероз). В некоторых воплощениях в инструкции по применению есть указание на то, что данную композицию применяют для лечения рака (например, миелоидного лейкоза).

Помимо этого, изделие производства может дополнительно содержать второй контейнер, включающий в себя фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Кроме того, оно может содержать другие необходимые с коммерческой и потребительской точки зрения материалы, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

Кроме того, предложены наборы, полезные для различных целей, например, для лечения аутоиммунного и/или воспалительного состояния или рака, характеризующихся высокими уровнями экспрессии GM-CSF и/или GM-CSFR α и/или аномальным функционированием GM-CSF/GM-CSFR α (например, ревматоидного артрита, астмы или миелоидного лейкоза), или для доставки антитела к GM-CSFR α (такого как полноразмерное антитело к GM-CSFR α) в клетку, экспрессирующую GM-CSFR α на своей поверхности, возможно в комбинации с изделиями производства. Наборы по данному изобретению включают в себя один или несколько контейнеров, содержащих композицию на основе антитела к GM-CSFR α (или стандартную лекарственную форму и/или изделие производства), а в некоторых воплощениях дополнительно содержат другой агент (такой как агенты, описанные в данном изобретении) и/или инструкции для применения в соответствии с любым из способов, описанных в данном изобретении. Набор может дополнительно содержать описание выбора индивидов, подходящих для лечения. Инструкции, поставляемые в наборах по данному изобретению, обычно представляют собой инструкции, написанные на этикетке или листовке-вкладыше (например, на листе бумаги, включенном в набор), но также приемлемы считываемые компьютером инструкции (например, инструкции на магнитном или оптическом диске).

Например, в некоторых воплощениях набор включает в себя композицию, содержащую антитело к GM-CSFR α (такое как полноразмерное антитело к GM-CSFR α). В некоторых воплощениях набор включает в себя а) композицию, содержащую любое из антител к GM-CSFR α , описанных в данном изобретении, и б) по меньшей мере один другой агент в эффективном количестве, при этом такой один другой агент усиливает эффект (например, лечебный эффект, относящийся к детекции эффект) антитела к GM-CSFR α . В некоторых воплощениях набор включает в себя а) композицию, содержащую любое из антител к GM-CSFR α , описанных в данном изобретении, и б) инструкции для введения композиции на основе антитела к GM-CSFR α индивиду для лечения аутоиммунного и/или воспалительного состояния или рака, характеризующихся высокими уровнями экспрессии GM-CSF и/или GM-CSFR α и/или аномальным функционированием GM-CSF/GM-CSFR α (например, ревматоидного артрита, астмы или миелоидного лейкоза). В некоторых воплощениях набор включает в себя а) композицию, содержащую любое из антител к GM-CSFR α , описанных в данном изобретении, б) по меньшей мере один другой агент в эффективном количестве, при этом такой один другой агент усиливает эффект (например, лечебный эффект, отно-

сящий к детекции эффект) антитела к GM-CSFR α , и с) инструкции для введения композиции на основе антитела к GM-CSFR α и другого(их) агента(ов) индивиду для лечения аутоиммунного и/или воспалительного состояния или рака, характеризующихся высокими уровнями экспрессии GM-CSF и/или GM-CSFR α и/или аномальным функционированием GM-CSF/GM-CSFR α (например, ревматоидного артрита, астмы или миелоидного лейкоза). Антитело к GM-CSFR α и другой(ие) агент(ы) могут быть представлены в отдельных контейнерах или в едином контейнере. Например, набор может включать в себя одну отдельную композицию либо две или несколько композиций, при этом одна композиция содержит антитело к GM-CSFR α , а другая композиция содержит другой агент.

В некоторых воплощениях набор включает в себя нуклеиновую кислоту (или ряд нуклеиновых кислот), кодирующую антитело к GM-CSFR α (такое как полноразмерное антитело к GM-CSFR α). В некоторых воплощениях набор содержит а) нуклеиновую кислоту (или ряд нуклеиновых кислот), кодирующую антитело к GM-CSFR α , и б) клетку хозяина для проведения экспрессии данной нуклеиновой кислоты (или ряда нуклеиновых кислот). В некоторых воплощениях набор содержит а) нуклеиновую кислоту (или ряд нуклеиновых кислот), кодирующую антитело к GM-CSFR α , и б) инструкции для 1) проведения экспрессии антитела к GM-CSFR α в клетке хозяина, 2) приготовления композиции, содержащей антитело к GM-CSFR α , и 3) введения композиции, содержащей антитело к GM-CSFR α , индивиду для лечения аутоиммунного и/или воспалительного состояния или рака, характеризующихся высокими уровнями экспрессии GM-CSF и/или GM-CSFR α и/или аномальным функционированием GM-CSF/GM-CSFR α (например, ревматоидного артрита, астмы или миелоидного лейкоза). В некоторых воплощениях набор содержит а) нуклеиновую кислоту (или ряд нуклеиновых кислот), кодирующую антитело к GM-CSFR α , и б) клетку хозяина для проведения экспрессии данной нуклеиновой кислоты (или ряда нуклеиновых кислот) и с) инструкции для 1) проведения экспрессии антитела к GM-CSFR α в этой клетке хозяина, 2) приготовления композиции, содержащей антитело к GM-CSFR α , и 3) введения композиции, содержащей антитело к GM-CSFR α , индивиду для лечения аутоиммунного и/или воспалительного состояния или рака, характеризующихся высокими уровнями экспрессии GM-CSF и/или GM-CSFR α и/или аномальным функционированием GM-CSF/GM-CSFR α (например, ревматоидного артрита, астмы или миелоидного лейкоза).

Наборы по данному изобретению находятся в подходящей упаковке. Подходящая упаковка включает, но не ограничивается этим, флаконы, бутылки, контейнеры, гибкую упаковку (например, герметично закрываемые майларовые или пластиковые пакеты) и тому подобное. Возможно, что наборы могут содержать дополнительные компоненты, такие как буферы, и пояснительную информацию. Таким образом, согласно настоящей заявке также предложены изделия производства, которые включают флаконы (такие как герметично закрываемые флаконы), бутылки, контейнеры, гибкую упаковку и тому подобное.

Инструкции, относящиеся к применению композиции на основе антитела к GM-CSFR α , обычно включают информацию, которая касается дозировки, режима приема и пути введения для предполагаемого лечения. В контейнерах могут содержаться стандартные дозы, объемные упаковки (например, многодозовые упаковки) или субстандартные дозы. Например, могут быть предоставлены наборы, которые содержат дозировки антитела к GM-CSFR α (такого как полноразмерное антитело к GM-CSFR α), описанного в данной заявке, достаточные для обеспечения эффективного лечения индивида в течение продолжительного периода времени, такого как любой интервал, выбранный из одной недели, 8 суток, 9 суток, 10 суток, 11 суток, 12 суток, 13 суток, 2-х недель, 3-х недель, 4-х недель, 6-ти недель, 8-ми недель, 3-х месяцев, 4-х месяцев, 5-ти месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев или больше. Кроме того, наборы могут включать в себя несколько стандартных доз антитела к GM-CSFR α и фармацевтических композиций и инструкции для применения, и могут быть упакованы в количествах, подходящих для хранения и применения в аптеках, например, больничных аптеках и в аптеках для приготовления препаратов по рецептам.

Специалистам в данной области техники будет известно, что возможны несколько воплощений в пределах объема и сущности этого изобретения. Теперь изобретение будет описано более подробно посредством ссылки на следующие неограничивающие примеры. Следующие далее примеры дополнительно иллюстрируют данное изобретение, но несомненно их не следует истолковывать как каким-либо образом ограничивающие его объем.

Примеры

В описании экспериментов, которое приведено ниже, применены следующие сокращения: GMF (GM-CSF человека); GMRa (GM-CSFR α человека);

GMRb (GM-CSFR β человека); Mab (маврилимумаб); GMRAh (6His-GM-CSFR α человека); BGMRa (биотин-Avi-GM-CSFR α); mGMRa (GM-CSFR α яванского макака);

mGMRah (6His-GM-CSFR α яванского макака).

Пример 1. Создание рекомбинантного GM-CSFR α человека и отбор антител к GM-CSFR α в формате scFv.

Создание рекомбинантного GM-CSFR α .

Полноразмерную последовательность GM-CSFR α человека (обозначаемого здесь как GMRa) субклонировали из вектора pSC-GM-CSFR α (Generay, Shanghai) в экспрессирующий вектор pTT5, используя сайты распознавания ферментами рестрикции HindIII и XhoI. Для мечения GMRa использовали His-метку или другие традиционно применяемые метки. Были созданы экспрессирующие векторы pTT5-GMRa-6His (ECD), pTT5-Avi-10His-GMRa (ECD) и pTT5-GMRa (400 аминокислот (aa)). "ECD" означает внеклеточный домен, "his или His" означает His-метку, и "Avi" означает авидиновую метку.

Кроме того, проводили клонирование рекомбинантной конструкции на основе GM-CSFR α яванского макака. Праймеры конструировали с учетом последовательности GM-CSFR α яванского макака из базы данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI) (XM_024791666.1) и использовали для получения кДНК для GM-CSFR α посредством обратной транскрипции РНК из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) яванских макаков. Кодировующую ECD последовательность амплифицировали из кДНК для GM-CSFR α и клонировали в экспрессирующий вектор эукариот pTT5 с получением pTT5-mGMRa-6his (ECD).

Экспрессию и очистку рекомбинантного GM-CSFR α человека, в том числе GMRa-6his (ECD), Avi-10His-GMRa (ECD) и mGMRa-6his (ECD), проводили в соответствии с протоколом производителя. Кратко, клетки 293F трансфицировали экспрессирующими векторами и клетки культивировали при 37°C в условиях 8% CO₂ и 120 об/мин в течение 5 суток. Культуральную среду собирали и очистку белков, экспрессирующих His-метку, проводили с использованием Ni-сефарозы в соответствии с протоколом производителя. Конкретно, для анализа методом аффинной хроматографии с иммобилизованным металлом (IMAC) использовали картриджи Qiagen Ni-NTA superflow. Сначала картриджи уравнивали буфером A1 (50 mM Na₃PO₄; 0,15 M NaCl; pH 7,2) со скоростью потока 150 см/ч. Значение pH супернатанта культуральной среды подвели до 7,2 и супернатант пропускали через картриджи при комнатной температуре со скоростью 150 см/ч. Затем для уравнивания картриджей использовали буфер A1 (в объеме, в 6 раз превышающем объем картриджей) со скоростью 150 см/ч. Для промывки картриджей использовали 50 mM забуференный фосфатом (PB) раствор (0,15 M NaCl и 0,2 M имидазол; pH 7,2) в объеме, в 10 раз превышающем объем картриджей, и осуществляли сбор элюата.

Создание биотинилированного антигена GM-CSFR α .

Биотинилирование Avi-10His-GMRa с использованием биотинлигазы B0101A (GeneCopoeia) проводили в соответствии с протоколом производителя. Кратко, к Avi-10His-GMRa добавляли буфер A/B и лигазу BirA, затем в течение 2 часов инкубировали при 30°C. Биотинилированный GMRa обозначен как Bavih-GMRa.

Эффективность биотинилирования измеряли с использованием ELISA. Кратко, готовили серийные разведения Bavih-GMRa в соотношении 1:2, исходя из начальной концентрации 500 нг/мл, после чего использовали для нанесения покрытия в лунки планшета для ELISA. Для детектирования использовали конъюгат стрептавидина и пероксидазы хрена (SA-HRP), а в качестве контроля использовали стандартные продукты биотинилирования. Было определено, что эффективность биотинилирования составляла 70%. Биологическую активность Bavih-GMRa подтверждали, используя анализ пролиферации TF-1 клеток. Отбор антител к GM-CSFR α в формате scFv. Создание библиотеки дрожжевого дисплея для антител в формате scFv. проводили обратную транскрипцию РНК, собранной из 2000 образцов крови человека, с получением кДНК, и фрагменты V_H и V_K амплифицировали, используя V_H- и V_K-специфичные праймеры. После экстракции из геля и очистки получали scFv фрагменты путем соединения V_H и V_K и клонировали в плазмиду для дрожжевого дисплея PYD1, которую затем использовали для электропорации дрожжей с целью создания библиотеки дрожжевого дисплея для антител в формате scFv.

Отбор антител к GM-CSFR α в формате scFv: scFv, которые распознавали GM-CSFR α , выделяли из библиотеки дрожжевого дисплея. Кратко, для обогащения клетками, экспрессирующими scFv антитела к GM-CSFR α , использовали метод сортировки магнитно-активированных клеток (MACS). Дрожжевые клетки в количестве, соответствующем 1000 единиц оптической плотности (OD), подвергали центрифугированию в течение 5 минут при 2500хд. Получали осадок клеток после центрифугирования и ресуспендировали в 1 л культуральной среды SGCAA (от англ. Synthetic Galactose plus Casein Amino Acid) с достижением OD₆₀₀ = 1 в качестве исходной концентрации. Экспрессию индуцировали в течение 40-48 часов при 20°C и 250 об/мин. После центрифугирования и промывки PBSM осадок после центрифугирования ресуспендировали в 5-10 кратном объеме 1 мкМ Bavih-GMRa (в PBSM), и инкубировали в течение одного часа при 4°C. После центрифугирования и промывки PBSM несвязанные антигены отмывали, используя PBSM. Добавляли магнитные гранулы и тщательно перемешивали, после чего инкубировали в течение 30 минут при 4°C в устройстве для вращения. После центрифугирования при 2500 xg в течение 5 минут отбрасывали супернатант и осадок после центрифугирования ресуспендировали в 5-10 кратном объеме PBSM. В колонку добавляли по 7 мл суспензии клеток за один раз до тех пор, пока все клетки не были пропущены через колонку. Связанные клетки собирали и после дальнейшего культивирования и центрифугирования проводили выделение плазмиды.

Создание библиотеки фагового дисплея и отбор антител в формате scFv. проводили ПЦР-

амплификацию генов scFv фрагментов антител из 30 отобранных дрожжевых клеток, применяя прямой (F) и обратный (R) праймеры для scFv (scFv-F и scFv-R). Чтобы создать библиотеки фагового дисплея, гены scFv фрагментов далее клонировали в вектор pDAN5 для фагового дисплея, используя Sfil. После проведения лигирования вектор использовали для трансдукции компетентных в отношении электропорации клеток TG1 для получения библиотеки фагового дисплея для scFv антител. scFv антитела, специфичные к GM-CSFR α , выделяли из библиотеки фагового дисплея в серии повторяющихся циклов отбора. Кратко, к биотинилированному GM-CSFR α добавляли фаговую библиотеку для scFv (2×10^{11} PFU (бляшкообразующих единиц)) и инкубировали в течение 2 часов при 37°C. GM-CSFR α со связанным фагом захватывали на магнитные гранулы, покрытые стрептавидином. Несвязавшиеся фаговые частицы вымывали. После 8-15-кратной промывки TBST (забуференным трисом физиологическим раствором в присутствии твина 20) (с увеличением числа промывок для каждого раунда отбора) фаг, специфически связанный с GM-CSFR α , вымывали раствором глицина-HCl (pH 2,2). Эти фаги использовали для трансдукции клеток TG1, находящихся в логарифмической фазе, с добавлением ампициллина и культивировали в течение одного часа. После добавления фага-помощника клетки культивировали на качалке в течение ночи при 200 об/мин и 28°C. Культуральную среду собирали на следующие сутки, центрифугировали, получая супернатант, и подвергали следующему раунду отбора. В конце процесса отбора получали панель дающих положительный ответ scFv антител.

Отбирали моноклональные scFv антитела и подвергали анализам по связыванию с лигандом. Первый анализ был разработан для идентификации scFv антител, которые связываются с GM-CSFR α человека и/или GM-CSFR α яванского макака. Кратко, лунки 96-луночного планшета покрывали GMRah (6His-GM-CSFR α человека) или mGMRah (6His-GM-CSFR α яванского макака) в PBS в количестве 0,2 мкг/лунка и оставляли на ночь при 4°C. Перед загрузкой scFv антител планшеты промывали TBST, блокировали в течение 1-2 часов при 37°C, используя 5%-ное молоко, и снова промывали TBST. Каждый образец scFv антитела сначала разбавляли до концентрации 40 мкг/мл и по 150 мкл добавляли в первый ряд лунок. Затем готовили серийные разведения образцов scFv антител в концентрации 40 мкг/мл в соотношении 1:3 и добавляли в оставшиеся лунки. После инкубирования в течение одного часа при 37°C с последующей 6-кратной промывкой TBST, в каждую лунку добавляли по 100 мкл смеси первичного антитела и вторичного антитела (мышинного антитела к FLAG-пептиду (1:2500) и антитела к Fc мыши, конъюгированного с щелочной фосфатазой (Fc-AP) (1:2000)). После инкубирования в течение одного часа при 37°C планшет 3 раза промывали, используя TBST. Затем добавляли п-нитрофенилфосфат (pNPP) в количестве 50 мкл/лунка и инкубировали в течение 10-20 минут при 37°C. Для остановки реакции использовали 3 М раствор NaOH. Далее анализировали результаты ELISA (OD₄₁₀) и с использованием программы PRISM получали кривые связывания.

Второй анализ был разработан для идентификации scFv антител, которые обладали способностью ингибировать связывание GM-CSF с GM-CSFR α , по результатам измерений с использованием конкурентного ELISA. Кратко, лунки 96-луночного планшета покрывали GM-CSF из расчета 0,5 мкг/лунка и 5%-ным молоком, инкубировали в течение 1-2 часов при 37°C и затем промывали, используя TBST. Каждый образец scFv антитела сначала разбавляли до концентрации 40 мкг/мл и по 100 мкл добавляли в первый ряд лунок. Затем готовили серийные разведения образцов scFv антител в концентрации 40 мкг/мл в соотношении 1:2 и добавляли в оставшиеся лунки. В каждую лунку добавляли по 50 мкл раствора Bavih-GMRa в PBS в концентрации 2,5 мкг/мл. После инкубирования в течение одного часа при 37°C лунки 6 раз промывали, используя TBST. Затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл SA-HRP (1:20000) и инкубировали в течение одного часа при 37°C. Лунки 6 раз промывали, используя TBST, после чего добавляли тетраметилбензидин (TMB) в количестве 50 мкл/лунка и инкубировали в течение 5-10 минут при 37°C. Для остановки реакции использовали 2 М раствор H₂SO₄. Анализировали результаты ELISA (OD₄₅₀) и с использованием программы PRISM получали кривые связывания.

Анализ пролиферации TF-1 клеток: scFv антитела, обладающие способностью ингибировать связывание между GM-CSF и GM-CSFR α , оценивали на предмет биологической активности в анализе пролиферации TF-1, согласно которому анализировали способность антител ингибировать пролиферацию TF-1 клеток, стимулированных GM-CSF. TF-1 представляет собой линию премиелоидных клеток человека, полученную от пациента с эритролейкозом. Эта клеточная линия является фактор-зависимой в отношении выживаемости и пролиферации и обычно поддерживается в присутствии GM-CSF человека. Кратко, TF-1 клетки поддерживали в среде RPMI-1640, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (FBS), GM-CSF в концентрации 10 нг/мл, и пересевали два раза в неделю. Клетки промывали средой без GM-CSF (RPMI1640, 10% FBS) три раза и ресуспендировали в той же среде. В каждую лунку 96-луночного планшета добавляли приблизительно 10000 клеток и культивировали в течение ночи. На следующий день готовили серийные разведения scFv антител в соотношении 1:10 (от 10 мкг/мл до 0,0001 мкг/мл) и добавляли к клеткам. После инкубирования при 37°C в течение одного часа добавляли GM-CSF (Pepro-tech) в конечной концентрации 200 пг/мл. На следующий день анализировали жизнеспособность клеток, используя набор для анализа Celltiter-glo (Promega). IC₅₀ рассчитывали с использованием PRISM.

Пример 2. Создание и характеристика полноразмерных антител к GM-CSFR α человека.

Создание полноразмерных антител к GM-CSFR α .

Самые сильнодействующие scFv антитела были переформатированы в молекулы антитела человека IgG1 или IgG4-типа, содержащие константный домен тяжелой цепи IgG1 или IgG4 человека и константный домен легкой цепи-каппа IgG человека. VL и VH амплифицировали из экспрессирующего вектора для прокариот и вводили в экспрессирующие векторы эукариот pTT5-L (содержащий ген константного домена каппа-цепи) и pTT5-H1 (содержащий ген константного домена тяжелой цепи IgG1) или pTT5-H4 (содержащий ген константного домена тяжелой цепи IgG4). Плазмиды, экспрессирующие легкую или тяжелую цепи, экстрагировали и использовали для трансфекции клеток 293F. После культивирования клеток при 37°C, 8% CO₂ и 120 об/мин в течение пяти суток культуральные среды очищали, используя аффинную хроматографию на иммобилизованном белке А. Кратко, колонку с иммобилизованным белком А сначала уравнивали PBS-буфером, содержащим 50 mM PBS и 0,15 M NaCl (pH 7,2), при скорости потока 150 см/ч и с использованием объема, в шесть раз превышающего объем колонки. Супернатант культуральных сред (с pH, подведенным до 7,2) пропускали через колонку при скорости 150 см/ч. После дополнительного уравнивания колонку промывали, используя 50 mM раствор цитрата натрия (pH 3,5), и собирали элюат. Из полноразмерных антител, которые были получены, отбирали T119 как исходное антитело в качестве соединения-лидера. Используя T119 в формате scFv, создавали библиотеку фагового дисплея для scFv, содержащую мутации в участках CDR. Варианты, которые обладали способностью связываться с GM-CSFR α человека с высокой аффинностью и с низкой скоростью диссоциации, оценивали в отношении биологической активности в анализе пролиферации TF-1 клеток. scFv антитела, которые демонстрировали улучшенную биологическую активность по сравнению с T119 в формате scFv, использовали для создания полноразмерных антител. Дальнейший раунд отбора полноразмерных антител проводили, используя анализ пролиферации TF-1 клеток. Затем отобранные оптимизированные как соединения-лидеры антитела подвергали дальнейшему биохимическому и биологическому анализу.

Аффинность антител к GM-CSFR α .

Аффинность исходного антитела T119 и оптимизированных как соединения-лидеры антител (переформатированных в IgG1 человека) в отношении GM-CSFR α человека оценивали, используя ELISA. Как показано на фиг. 1A-1C, оптимизированные как соединения-лидеры антитела проявляли улучшенную аффинность связывания по сравнению с T119. Затем, используя ELISA, оценивали аффинность исходного антитела T119 и оптимизированных как соединения-лидеры антител E35, E200a, E87 и E108 (переформатированных в IgG4 человека) в отношении GM-CSFR α яванского макака (mGMRah). Как показано на фиг. 2, антитела к GM-CSFR α перекрестно взаимодействовали с GM-CSFR α яванского макака.

Специфичность антител к GM-CSFR α .

Перекрестная реактивность с гомологичными белками: с использованием ELISA антитела E35, E87 и E108 (переформатированных в IgG4 человека) тестировали на предмет перекрестной реактивности с белками, гомологичными GM-CSFR α , включая IL3RA, IL5RA и G-CSFR. Как показано на фиг. 3, эти антитела связывались специфично с GMRah по сравнению с другими тестируемыми гомологичными белками, подтверждая, что антитела к GM-CSFR α обладают специфичностью к GM-CSFR α .

Специфичность связывания с GM-CSFR α -экспрессирующими WIL2S клетками: антитело к GM-CSFR α E35-IgG4 дополнительно оценивали на предмет связывания с WIL2S клетками, экспрессирующими GM-CSFR α . Антитело к GM-CSFR α E35-IgG4 метили флуоресцентной меткой, используя GYL-650 (Dylight Amine-Reactive Dyes, Thermo Fisher) в соответствии с протоколом производителя.

WIL2S клетки, экспрессирующие GM-CSFR α , получали с использованием электропорации экспрессирующим вектором, содержащим ген полноразмерного GM-CSFR α , и в качестве контролей использовали необработанные клетки WIL2S. Через 48 часов после электропорации в конические пробирки емкостью 15 мл переносили как подвергнутые электропорации, так и необработанные клетки, центрифугировали в течение 5 минут при 1000 об/мин и содержимое ресуспендировали в DPBS. Затем в каждую пробирку типа эппендорф добавляли 1×10^6 клеток и центрифугировали в течение 5 минут при 1000xg. GM-CSFR α -экспрессирующие WIL2S клетки обрабатывали E35-IgG4 (15 мкг/мл) в 100 мкл 1%-ного раствора бычьего сывороточного альбумина (BSA) (GMRa-E35), а контрольные WIL2S клетки обрабатывали либо 100 мкл 1%-ного раствора BSA (CK), либо E35-IgG4 (5 мкг/мл) в 100 мкл 1%-ного раствора BSA (NC-E35). Клетки из всех трех групп инкубировали в течение 40 минут при 37°C, дважды промывали 1 мл PBS, ресуспендировали в 0,2 мл PBS и подвергали анализу с использованием FACS. Как показано на фиг. 4, E35-IgG4 не связывались с контрольными WIL2S клетками, но демонстрировали сильное связывание с WIL2S клетками, экспрессирующими GM-CSFR α .

Характеристика аффинности связывания и константы диссоциации (K_d).

Аффинность связывания антител к GM-CSFR α E35 и E87b (переформатированных в IgG4 человека) характеризовали, используя Biacore T200 (GE). Антитела E35 и E87b иммобилизовали на сенсорном чипе с карбоксиметилированным декстраном CM5. Оценивали аффинности для GMRah в различных концентрациях. В диапазон концентраций включали значения 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,15625; 0,078;

0,039; 0,0195 и 0 нМ. Эксперименты с концентрациями 0,625 и 0 нМ повторяли еще один раз. С использованием технологии SPR измеряли константы скорости ассоциации и диссоциации и определяли аффинность связывания. В табл. 5 показаны K_{on} , K_{off} и K_d для E35 и E87b.

Таблица 5

Антитело	k_{on} (1/М·с)	k_{off} (1/с)	K_d (М)
E35	$5,37 \times 10^6$	$4,78 \times 10^{-5}$	$8,90 \times 10^{-12}$
E87b	$3,58 \times 10^6$	$2,42 \times 10^{-5}$	$6,75 \times 10^{-12}$

Антитела к GM-CSFR α конкурируют с GM-CSF за связывание с GM-CSFR α .

Эксперименты с конкурентным ELISA проводили так, как описано в примере 1, с целью оценки способности антител к GM-CSFR α распознавать сайт связывания с лигандом на GM-CSFR α и конкурировать с GM-CSF за связывание с GM-CSFR α . Как показано на фиг. 5A-5D, исходное антитело T119 и оптимизированные как соединения-лидеры антитела (переформатированные в IgG4 человека) обладали способностью блокировать связывание GM-CSF с GM-CSFR α человека, подтверждая наличие конкурентного связывания антител с лиганд-связывающим сайтом на GM-CSFR α .

Анализ стабильности антител к GM-CSFR α .

Анализ термостабильности: анализ термостабильности T119-IgG1, E35-IgG1, E35b-IgG1 и Mab-IgG1 проводили, используя платформу UNcle. Для каждого антитела измеряли значения температуры плавления ($T_{пл}$) и температуры агрегации (T_{agg}). Значение $T_{пл}$ указывает температуру разворачивания антитела в ходе изменения температуры, а T_{agg} указывает на температуру агрегации антитела в ходе изменения температуры. Как показано в табл. 6 и на фиг. 6A-6B, для T119-IgG1, E35-IgG1 и E35b-IgG1 продемонстрировано повышение температуры плавления по сравнению с Mab-IgG1, при этом E35-IgG1 и E35b-IgG1 демонстрировали более высокую температуру плавления, чем исходное антитело T119-IgG1. Для T119-IgG1, E35-IgG1 и E35b-IgG1 также показано повышение температуры агрегации по сравнению с Mab-IgG1, при этом E35-IgG1 и E35b-IgG1 демонстрировали более высокую температуру агрегации, чем исходное антитело T119-IgG1. Эти результаты позволяют предположить, что E35-IgG1 и E35b-IgG1 демонстрировали улучшенную термостабильность по сравнению с исходным антителом T119-IgG1, а также контрольным антителом Mab-IgG1.

Таблица 6

Лунка	Образец	$T_{пл1}$ (°C)	T_{agg} 266 (°C)	T_{agg} 473 (°C)
H1	Mab-IgG1, 2 мг/мл	67,8	64,56	65,6
I1	T119-IgG1, 2 мг/мл	69,53	56,65	70,01
J1	E35-IgG1, 2 мг/мл	73,52	67,15	77,37
K1	E35b-IgG1, 2 мг/мл	70,42	69,01	77,64

Анализ пролиферации TF-1 клеток.

Анализ пролиферации TF-1 клеток проводили так, как описано в примере 1. Исходное антитело T119 и оптимизированные как соединения-лидеры антитела (переформатированные в IgG4 человека) тестировали в отношении их способности ингибировать пролиферацию TF-1 клеток. Как показано на фиг. 7, для оптимизированных как соединения-лидеры антител продемонстрирована сопоставимая или улучшенная способность ингибировать пролиферацию TF-1 клеток по сравнению с исходным антителом T119.

Анализ изменения формы гранулоцитов.

Далее антитела к GM-CSFR α исследовали с применением анализов изменения формы гранулоцитов человека. Кратко, PBMC выделяли из 10 мл периферической крови человека, используя градиент плотности фиколла. После удаления PBMC и буфера на основе фиколла выполняли лизис эритроцитов, используя буфер для лизиса клеток. Оставшиеся клетки промывали PBS и средой для культивирования клеток. В каждую лунку 96-луночного планшета добавляли по 100000 клеток и инкубировали в течение 30 минут при 37°C. Затем клетки обрабатывали GM-CSF в концентрации 100 пг/мл, а также серийно разведенными антителами (в разведении 1:10; от 10 мкг/мл до 0,0001 мкг/мл). После инкубирования в течение 3 часов при 37°C клетки подвергали анализу с применением FACS и изменение формы гранулоцитов оценивали на основании среднего геометрического значения по данным прямого рассеяния. Как показано на фиг. 8, E35, E108 и E87b (переформатированные в IgG4 человека) предотвращали изменение формы гранулоцитов. Значение IC_{50} для каждого антитела показано в приведенной ниже табл. 7.

Таблица 7

Антитело	E35	E108	E87b
IC_{50} (мкг/мл)	0,002050	0,002066	0,001505

Далее антитело к GM-CSFR α E35 (переформатированное в IgG4 человека) оценивали, используя анализы изменения формы гранулоцитов яванского макака. Гранулоциты яванского макака очищали из

цельной крови и обрабатывали GM-CSF в концентрации 100 пг/мл, а также серийно разведенным E35 (в разведении 1:10; от 10 мкг/мл до 0,0001 мкг/мл). Клетки подвергали анализу с применением FACS и изменение формы гранулоцитов оценивали на основании среднего геометрического значения по данным прямого рассеяния. Результаты продемонстрировали, что применение E35 предотвращало изменение формы гранулоцитов яванского макака (фиг. 9) с IC_{50} 0,002527 мкг/мл.

Анализ жизнеспособности гранулоцитов человека.

Гранулоциты оказываются жизнеспособными в течение более продолжительного периода в присутствии GM-CSF. В анализе жизнеспособности гранулоцитов человека оценивали способность антител к GM-CSFR α ингибировать этот ответ. Кратко, гранулоциты выделяли из периферической крови человека и обрабатывали GM-CSF в концентрации 100 пг/мл. Готовили серийные разведения антител в соотношении 1:10 (от 10 мкг/мл до 0,0001 мкг/мл) и добавляли к клеткам. После инкубирования в течение 48 часов проводили анализ жизнеспособности клеток, используя набор для анализа Celltiter-glo (Promega). Как показано на фиг. 10, применение E35, E108 и E87b эффективно ингибировало жизнеспособность гранулоцитов. В табл. 8 показаны значения IC_{50} для каждого антитела для ингибирования жизнеспособности гранулоцитов человека.

Таблица 8

Антитело	E35-IgG4	E108-IgG4	E87b-IgG4
IC_{50} (мкг/мл)	0,004200	0,005521	0,002528

Ингибирующее действие в отношении высвобождения цитокинов Ингибирующее действие в отношении экспрессии CD11b: антитела к GM-CSFR α E35 и E87b, а также Mab оценивали в отношении их способностей ингибировать экспрессию CD11b из клеток периферической крови человека. Кратко, в каждую лунку 96-луночного планшета добавляли по 50 мкл периферической крови человека и инкубировали с серийно разведенными антителами (в разведении 1:10; от 10 мкг/мл до 0,0001 мкг/мл). После инкубирования в течение 1 часа при 37°C добавляли GM-CSF в концентрации 10 нг/мл и затем инкубировали в течение еще одного часа. Для меченного CD11b использовали конъюгированное с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) антитело к CD11b (BD55310), проводя инкубацию в течение 30 минут при 4°C. Затем выполняли лизис эритроцитов, используя 1 мл буфера для лизиса эритроцитов (BD349202), и после двух промывок PBS проводили анализ экспрессии CD11b, применяя FACS. Как показано на фиг. 11 и в табл. 9, применение E35 и E87b демонстрировало улучшенную способность ингибировать экспрессию CD11b по сравнению с Mab. Значения IC_{50} для антител показаны в табл. 9.

Таблица 9

Антитело	Mab-IgG4	E35-IgG4	E87b-IgG4
IC_{50} (мкг/мл)	0,1813	0,1111	0,1439

Ингибирующее действие в отношении продуцирования цитокинов: чтобы оценить ингибирующее действие антител к GM-CSFR α в отношении продуцирования цитокинов, из 10 мл периферической крови человека выделяли PBMC, используя градиент плотности фиколла, дважды промывали PBS и ресуспендировали в среде для культивирования клеток. В каждую лунку 96-луночного планшета добавляли по 1000000 клеток (100 мкл), в эти лунки добавляли по 50 мкл серийно разведенных антител (100-0,001 мкг/мл) и инкубировали в течение одного часа при 37°C. Затем добавляли липополисахарид (LPS) и GM-CSF до конечной концентрации 100 нг/мл и 50 нг/мл, соответственно. После инкубирования при 37°C в течение 48 часов собирали супернатант и проводили анализ уровней TNF α и IL-1 β , используя панель макрофагов/микроглии человека (Biolegend, 740503). Как показано на фиг. 12A и в табл. 10, применение E35 и E87b (переформатированных в IgG4 человека) демонстрировало улучшенное ингибирующее действие в отношении секреции TNF α по сравнению с Mab-IgG4. Как показано на фиг. 13 и в табл. 11, применение обоих антител E35 и E87b (переформатированных в IgG4 человека) демонстрировало улучшенное ингибирующее действие в отношении секреции IL-1 β по сравнению с Mab-IgG4.

Таблица 10

Антитело	Mab	E35	E87b
IC_{50} (мкг/мл)	3,094	0,2777	0,06664

Таблица 11

Антитело	Mab	E35	E87b
IC_{50} (мкг/мл)	0,01263	0,003535	0,01333

Далее супернатант анализировали на предмет уровней TNF α , применяя ELISA. Результаты ELISA подтверждали, что применение E35 и E87b демонстрировало улучшенное ингибирующее действие в отношении секреции TNF α по сравнению с Mab (фиг. 12B и табл. 12).

Таблица 12

Антитело	Mab	E35	E87b
IC ₅₀ (мкг/мл)	1,741	0,3290	0,09349

Фармакокинетическое исследование антител к GM-CSFR α . Значения фармакокинетических (ФК) параметров на крысах: 10 здоровых взрослых крыс (массой приблизительно по 0,2 кг) разделяли на две группы с учетом массы, по 5 в каждой группе. Крысам из первой группы внутривенной инъекцией вводили Mab-IgG4 или E35-IgG4 в дозе 20 мг/кг, тогда как крысам из второй группы внутривенной инъекцией вводили Mab-IgG4 или E35-IgG4 в дозе 2 мг/кг. Первый раз кровь отбирали через один час после инъекции, а после этого через 2 суток, 3 суток, 5 суток, 9 суток и 15 суток после инъекции. После центрифугирования, для анализа концентрации антител с применением ELISA использовали плазму крови. Кратко, для покрытия лунок 96-луночного планшета использовали синтезированный GM-CSFR α . На следующий день, после промывки PBS, содержащим твин (PBST), блокирования 200 мкл смеси PBS и молока в течение одного часа, затем другой промывки с использованием PBST, добавляли плазму крови и инкубировали в течение одного часа при 37°C. Планшет промывали 6 раз 0,1%-ным TBST, после чего в каждую лунку добавляли по 100 мкл конъюгированного с АР антитела козы к Fc-области иммуноглобулина человека (1:3000 в PBS) и инкубировали в течение одного часа. После 6-кратной промывки 0,1%-ным TBST в каждую лунку добавляли по 50 мкл rNPP, и наблюдали за развитием окраски в течение 10-20 минут при 37°C. Результаты прочитывали, используя ридер для микропланшетов при 410 нм, что позволяло сделать вывод, что период полувыведения E35-IgG4 был больше, чем таковой у Mab-IgG4 (фиг. 14А-14В и табл. 13).

Таблица 13

Антитело	Mab-IgG4	E35-IgG4
T1/2		
T1/2 (20 мг/кг)	129 ч	190,9 ч
T1/2 (2 мг/кг)	53,09 ч	186,7 ч

ФК и фармакодинамические (ФД) исследования на яванских макаках: четырем яванским макакам (массой приблизительно по 3 кг) вводили инъекцией либо E35-IgG4, либо контрольное антитело Mab-IgG4 в дозе 10 мг/кг. Конкретно, животным № 1 и № 2 вводили инъекцией Mab-IgG4, а животным № 3 и № 4 вводили инъекцией E35-IgG4. У каждого животного отбирали по 6 мл крови за одни сутки до инъекции (-1-е сут), через один час после инъекции (1-е сут) и затем на 2-е сут, 4-е сут, 8-е сут, 15-е сут, 22-е сут, 29-е сут и 36-е сут. Чтобы оценить фармакокинетические параметры антител, готовили плазму из 1 мл образца крови, отобранной в каждый момент времени, путем центрифугирования в течение 15 минут при 5000 xg и хранили при -80°C в виде аликвот объемом 50 мкл. Концентрации E35-IgG4 и Mab-IgG4 анализировали с использованием ELISA, проводимого так, как описано выше для фармакокинетического исследования на крысах. Как показано на фиг. 15 и в табл. 14, период полувыведения E35-IgG4 оказался больше такового для Mab-IgG4. Чтобы оценить фармакодинамические параметры антител, выделяли гранулоциты из 5 мл образца крови, отобранной в каждый момент времени, и подвергали анализу изменения формы гранулоцитов. Кратко, в каждую лунку 96-луночного планшета добавляли по 100 мкл суспензии гранулоцитов (2×10^6 /мл) и инкубировали в течение 30 минут при 37°C, после чего инкубировали с GM-CSF в концентрации 100 пг/мл в течение 3 часов. Затем эти клетки подвергали анализу изменения формы с использованием FACS, как описано выше, чтобы проанализировать изменение формы гранулоцитов. Результаты показали, что применение обоих антител E35-IgG4 и Mab-IgG4 предотвращало изменение формы гранулоцитов. Неожиданным образом, действие Mab-IgG4 продолжалось только в течение 14 суток после инъекции, в то время как действие E35-IgG4 продолжалось в течение по меньшей мере 21 суток (фиг. 16А-16D).

Таблица 14

Антитело	№ животного	T1/2 (ч)	Среднее значение T1/2 (ч)	T _{max} (ч)	C _{max} (нг/мл)	AUC
Mab-IgG4	1	44,86346	69,41	1	95783,719	17340604
	2	93,956602		1	76499,663	14508393
E35-IgG4	3	104,10626	106,4	1	73486,786	14118941
	4	108,76885		1	77001,042	15830767

Ингибирующее действие на GM-CSF-индуцированное увеличение уровня воспалительных клеток.

Чтобы исследовать ингибирующее действие антител к GM-CSFR α на GM-CSF-индуцированное увеличение уровня воспалительных клеток, яванским макакам, предварительно получившим инъекцию E35-IgG4 или раствора NaCl в качестве контроля, вводили GM-CSF и после введения GM-CSF оценивали

уровни лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов, базофилов, эозинофилов, моноцитов и эритроцитов. Кратко, 4 яванских макака распределяли на две группы, по 2 в каждой группе. Одной группе путем внутривенных инъекций в 1-е сутки и 3-й сутки вводили E35-IgG4. Другой группе вводили путем инъекции раствор NaCl в качестве контроля. На 3-й, 4-е и 5-е сутки обеим группам вводили путем инъекции GM-CSF в дозе 5,0 мкг/кг (два раза в сутки, с интервалом приблизительно 8 часов между инъекциями). Образцы крови отбирали перед первой инъекцией GM-CSF и затем через 0,5 ч, 4,0 ч, 28,0 ч, 52,0 ч, 76,0 ч, 124,0 ч и 176,0 ч после первой инъекции и анализировали уровни клеток различных типов в каждый момент времени.

Результаты показали, что по сравнению с контрольной группой антитело E35-IgG4 полностью подавляло GM-CSF-индуцированное повышение уровня лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов, базофилов, эозинофилов и моноцитов. И наоборот, уровни эритроцитов оставались неизменными до и после обработки GM-CSF в случае обеих групп (фиг. 17A-17G).

Пример 3. Идентификация вариантов E35, сохраняющих биологическую активность.

Последовательность меченного меткой his E35-scFv клонировали в экспрессирующий вектор прокариот. По остаткам, выбранным в участках CDR, проводили насыщающий мутагенез и скрининг. Подвергнутые мутациям версии встраивали в экспрессирующие векторы прокариот и использовали для трансфицирования BL21. После высевания отбирали случайным образом 60 клонов для секвенирования и получали 14-19 разных мутаций в каждом положении. Создавали scFv, содержащие эти мутации, проводили очистку и выполняли анализ пролиферации TF-1 клеток, чтобы оценить их биологическую активность. Мутации и соответствующие значения IC₅₀ в отношении ослабления пролиферации клеток TF-1 показаны в приведенной ниже табл. 15 (нумерация соответствует EU-индексу по Kabat).

Таблица 15

Указанной единицей измерения для значений IC₅₀ является мкг/мл

Мут.	IC ₅₀	Мут.	IC ₅₀	Мут.	IC ₅₀	Мут.	IC ₅₀	Мут.	IC ₅₀	Мут.	IC ₅₀	Мут.	IC ₅₀
HE31N	0,11	E35	0,12	HT28H	0,06	LS26L	0,044	LQ27Y	0,065	LS31T	0,060	LS28H	0,058
HE31G	0,116	HT30P	0,126	HT28V	0,08	LS26N	0,054	LQ27P	0,097	LS31R	0,069	LS28W	0,060
E35	0,12	HT30D	0,132	HT28E	0,091	LS26A	0,062	LQ27A	0,104	LS31A	0,078	LS28L	0,067
HE31D	0,13	HT30E	0,132	HT28P	0,093	LS26K	0,069	LQ27I	0,105	LS31H	0,106	LS28R	0,077
HE31M	0,13	HT30Y	0,142	HT28L	0,100	LS26R	0,072	LQ27F	0,113	LS31Q	0,117	LS28K	0,082
HE31S	0,14	HT30W	0,151	HT28M	0,11	LS26I	0,073	LQ27T	0,113	E35	0,12	LS28T	0,088
HE31P	0,17	HT30V	0,158	HT28S	0,11	LS26Q	0,075	LQ27R	0,117	LS31P	0,139	LS28P	0,089
HE31F	0,18	HT30M	0,174	HT28W	0,11	LS26G	0,078	E35	0,12	LS31M	0,156	LS28I	0,091
HE31Y	0,2	HT30N	0,178	HT28C	0,12	LS26T	0,081	LQ27V	0,120	LS31L	0,235	LS28F	0,100
HE31A	0,21	HT30L	0,181	E35	0,12	LS26H	0,089	LQ27L	0,128	LS31G	0,279	LS28V	0,104
HE31V	0,22	HT30Q	0,192	HT28A	0,13	LS26M	0,089	LQ27E	0,135	LS31W	0,649	LS28E	0,111
HE31K	0,23	HT30G	0,199	HT28G	0,16	LS26C	0,114	LQ27S	0,138	LS31I	0,681	LS28A	0,116
HE31W	0,26	HT30S	0,213	HT28N	0,17	E35	0,12	LQ27C	0,142	LS31E	0,832	E35	0,12
HE31R	0,31	HT30A	0,215	HT28K	0,217					LS31D	1,34	LS28Q	0,154
HE31C	0,36	HT30K	0,325										
		HT30R	0,350										
Мут.	IC ₅₀	Мут.	IC ₅₀	Мут.	IC ₅₀	Мут.	IC ₅₀	Мут.	IC ₅₀	Мут.	IC ₅₀	Мут.	IC ₅₀
LS30L	0,069	LY32L	0,07	LS52A	0,068	LA51G	0,12	E35	0,12	E35	0,12	LN93D	0,045
LS30W	0,071	E35	0,12	LS52W	0,073	LA51R	0,12	LG50T	0,25	LD92A	0,282	LN93E	0,081
LS30M	0,073	LY32F	0,21	LS52R	0,089	E35	0,12	LG50A	0,5	LD92Q	0,328	E35	0,12
LS30A	0,078	LY32M	0,42	LS52L	0,115	LA51H	0,162	LG50D	0,88	LD92W	0,342	LN93T	0,14
LS30Y	0,082	LY32T	0,51	E35	0,12	LA51K	0,168	LG50Q	0,93	LD92V	0,387	LN93Y	0,156
LS30K	0,083	LY32Q	0,87	LS52T	0,136	LA51S	0,18	LG50I	1,08	LD92L	0,420	LN93G	0,205
LS30R	0,088	LY32W	1,17	LS52Q	0,138	LA51T	0,18	LG50S	1,3	LD92T	0,494	LN93A	0,21
LS30G	0,092	LY32V	1,23	LS52F	0,167	LA51M	0,264	LG50V	1,4	LD92R	0,495	LN93M	0,27
LS30T	0,092	LY32A	1,35	LS52Y	0,181	LA51F	0,294	LG50N	1,59	LD92M	0,507	LN93F	0,3
LS30E	0,100	LY32G	1,35	LS52H	0,192	LA51N	0,36	LG50P	1,86	LD92G	0,522	LN93S	0,3
E35	0,12	LY32C	1,9	LS52N	0,253	LA51V	0,36	LG50R	2,79	LD92H	0,530	LN93I	0,33
LS30V	0,124	LY32N	2,05	LS52P	1,055	LA51C	0,37	LG50L	3,9	LD92I	0,597	LN93L	0,33
LS30N	0,132	LY32R	3,12	LS52D	1,751	LA51L	0,5	LG50H	4,29	LD92S	0,598	LN93H	0,45
LS30F	0,160	LY32E	3,75			LA51E	0,81	LG50C	25,7	LD92K	0,640	LN93R	0,6
LS30C	0,221	LY32P	5,15			LA51W	1,59	LG50E	29,85	LD92P	0,881	LN93P	0,66
		LY32K	9,6			LA51P	2,1	LG50Y	32			LN93K	0,78
		LY32S	NA			LA51Q	18,17	LG50W	NA				

NA означает "данные отсутствуют".

На основании этих результатов было определено, что scFv антитела, имеющие приведенные ниже аминокислотные последовательности, происходящие из антитела E35 в формате scFv, сохраняли свои

биологические активности, что оценивали с использованием анализа пролиферации TF-1 клеток:

- (1) E, H, N, G, D, M, S, P, F, Y, A, V, K, W, R или C в положении 31 V_H;
- (2) S, L, N, A, K, R, I, Q, G, T, H, M или C в положении 26 V_L;
- (3) Q, Y, P, A, I, F, T, R, V, L, E, S или C в положении 27 V_L;
- (4) S, H, W, L, R, K, T, P, I, F, V, E, A или Q в положении 28 V_L;
- (5) S, L, W, M, A, Y, K, R, G, T, E, V, N, F или C в положении 30 V_L;
- (6) S, T, R, A, H, Q, P, M, L или G в положении 31 V_L;
- (7) Y, L или F в положении 32 V_L;
- (8) G или T в положении 50 V_L;
- (9) A, G, R, H, K, S, T, M, F, N или V в положении 51 V_L;
- (10) S, A, W, R, L, T, Q, F, Y, H или N в положении 52 V_L;
- (11) D, A, Q или W в положении 92 V_L;
- (12) N, D, E, T, Y, G, A, M, F, S, I или L в положении 93 V_L;
- (13) аминокислотные остатки, выбранные из T, H, V, E, P, L, M, S, W, C, A, G, N или K в положении 28 V_H;
- (14) аминокислотные остатки, выбранные из T, P, D, E, Y, W, V, M, N, L, Q, G, S, A, K или R в положении 30 V_H.

Кроме того, создавали варианты E35, содержащие мутации, внесенные комбинаторным мутагенезом. Анализировали значения IC₅₀ в отношении ослабления пролиферации клеток TF-1 для полноразмерных антител IgG4 типа, содержащих варианты E35, и они показаны в приведенной ниже табл. 16. Эти результаты позволяли предположить, что варианты E35, содержащие мутации, внесенные комбинаторным мутагенезом, демонстрировали улучшенную эффективность в отношении ослабления пролиферации клеток TF-1.

Таблица 16

Антитело	IC ₅₀ (мкг/мл)	Нормирование
E35-IG4	0,0474	1,0000
E35-VL93D-IG4	0,03714	0,7835
E35-VH28H-IG4	0,05693	1,2011
E35-VH28E-IG4	0,03073	0,6483
E35-VH28H-VL93L-IG4	0,01628	0,3435
E35-VH28H-VL93D-IG4	0,02783	0,5871
E35-VH28H-VL30L-IG4	0,02959	0,6243
E35-VH28H-VL30C-IG4	0,04306	0,9084
E35-VH28E-VL30L-IG4	0,02682	0,5658
E35-VH28E-VL30C-IG4	0,02077	0,4382
E35-VH28H-VL30L-93D-IG4	0,02414	0,5093

Типичные последовательности переменных доменов тяжелой цепи и переменных доменов легкой цепи вариантов E35 показаны ниже в табл. 17.

Таблица 17

Антитело	Замена	SEQ ID NO для V _H	SEQ ID NO для V _L	Антитело	Замена	SEQ ID NO для V _H	SEQ ID NO для V _L
AbM-1	LS26A	91	150	AbM-74	LS52H	91	222
AbM-2	LS26C	91	151	AbM-75	LS52L	91	223
AbM-3	LS26G	91	152	AbM-76	LS52N	91	224
AbM-4	LS26H	91	153	AbM-77	LS52Q	91	225
AbM-5	LS26I	91	154	AbM-78	LS52R	91	226
AbM-6	LS26K	91	155	AbM-79	LS52T	91	227
AbM-7	LS26L	91	156	AbM-81	LS52W	91	229
AbM-8	LS26M	91	157	AbM-83	LS52Y	91	231
AbM-9	LS26N	91	158	AbM-84	LD92A	91	232
AbM-10	LS26Q	91	159	AbM-85	LD92Q	91	233
AbM-11	LS26R	91	160	AbM-86	LD92W	91	234
AbM-12	LS26T	91	161	AbM-87	LN93A	91	235
AbM-13	LQ27A	91	162	AbM-88	LN93D	91	236
AbM-14	LQ27C	91	163	AbM-89	LN93E	91	237
AbM-15	LQ27E	91	164	AbM-90	LN93F	91	238
AbM-16	LQ27F	91	165	AbM-91	LN93G	91	239
AbM-17	LQ27I	91	166	AbM-92	LN93I	91	240
AbM-18	LQ27L	91	167	AbM-93	LN93L	91	241
AbM-19	LQ27P	91	168	AbM-94	LN93M	91	242
AbM-20	LQ27R	91	169	AbM-95	LN93S	91	243
AbM-21	LQ27S	91	170	AbM-96	LN93T	91	244
AbM-22	LQ27T	91	171	AbM-97	LN93Y	91	245

048006

AbM-23	LQ27V	91	172	AbM-98	HT28A	246	126
AbM-24	LQ27Y	91	173	AbM-99	HT28C	247	126
AbM-25	LS28A	91	174	AbM-100	HT28E	248	126
AbM-26	LS28E	91	175	AbM-101	HT28G	249	126
AbM-27	LS28F	91	176	AbM-102	HT28H	250	126
AbM-28	LS28H	91	177	AbM-103	HT28K	251	126
AbM-29	LS28I	91	178	AbM-104	HT28L	252	126
AbM-30	LS28K	91	179	AbM-105	HT28M	253	126
AbM-31	LS28L	91	180	AbM-106	HT28N	254	126
AbM-32	LS28P	91	181	AbM-107	HT28P	255	126
AbM-33	LS28Q	91	182	AbM-108	HT28S	256	126
AbM-34	LS28R	91	183	AbM-109	HT28V	257	126
AbM-35	LS28T	91	184	AbM-110	HT28W	258	126
AbM-36	LS28V	91	185	AbM-111	HT30A	259	126
AbM-37	LS28W	91	186	AbM-112	HT30D	260	126
AbM-38	LS30A	91	187	AbM-113	HT30E	261	126
AbM-39	LS30C	91	188	AbM-114	HT30G	262	126
AbM-40	LS30E	91	189	AbM-115	HT30K	263	126
AbM-41	LS30F	91	190	AbM-116	HT30L	264	126
AbM-42	LS30G	91	191	AbM-117	HT30M	265	126
AbM-43	LS30K	91	192	AbM-118	HT30N	266	126
AbM-44	LS30L	91	193	AbM-119	HT30P	267	126
AbM-45	LS30M	91	194	AbM-120	HT30Q	268	126
AbM-46	LS30N	91	195	AbM-121	HT30R	269	126
AbM-47	LS30R	91	196	AbM-122	HT30S	270	126
AbM-48	LS30T	91	197	AbM-123	HT30V	271	126
AbM-49	LS30V	91	198	AbM-124	HT30W	272	126
AbM-50	LS30W	91	199	AbM-125	HT30Y	273	126
AbM-51	LS30Y	91	200	AbM-126	HE31A	274	126
AbM-52	LS31A	91	201	AbM-127	HE31C	275	126
AbM-53	LS31G	91	202	AbM-128	HE31D	276	126
AbM-54	LS31H	91	203	AbM-129	HE31F	277	126
AbM-55	LS31L	91	204	AbM-130	HE31G	278	126
AbM-56	LS31M	91	205	AbM-131	HE31K	279	126
AbM-57	LS31P	91	206	AbM-132	HE31M	280	126
AbM-58	LS31Q	91	207	AbM-133	HE31N	281	126
AbM-59	LS31R	91	208	AbM-134	HE31P	282	126

AbM-60	LS31T	91	209	AbM-135	HE31R	283	126
AbM-61	LY32F	91	210	AbM-136	HE31S	284	126
AbM-62	LY32L	91	211	AbM-137	HE31V	285	126
AbM-63	LG50T	91	212	AbM-138	HE31W	286	126
AbM-64	LA51F	91	289	AbM-139	HE31Y	287	126
AbM-65	LA51G	91	213	AbM-140	E35-28H-93L-IG4	250	241
AbM-66	LA51H	91	214	AbM-141	E35-28H-30L-IG4	250	193
AbM-67	LA51K	91	215	AbM-142	E35-28E-30C-IG4	248	188
AbM-68	LA51M	91	216	AbM-143	E35-28E-30L-IG4	248	193
AbM-69	LA51R	91	217	AbM-144	E35-28H-30L93D-IG4	250	288
AbM-70	LA51S	91	218	AbM-145	E35-28H-30C-IG4	250	188
AbM-71	LA51T	91	219	AbM-146	E35HT28H-LN93D-IG4	250	236
AbM-72	LS52A	91	220	AbM-147	E35-LS30L-LN93D-IG4	91	288

Пример 4. Эпитопное картирование антител к GM-CSFR α .

Аминокислотные остатки вблизи сайтов связывания с GM-CSF на GM-CSFR α идентифицировали на основании соответствующих кристаллических структур, нумерация в GM-CSFR α находится в соответствии с кристаллической структурой (идентификационный номер в Банке данных по трехмерной структуре белков (PDB id): 4RS1), как показано на фиг. 20. Используя программное обеспечение Discovery Studio, идентифицировали предсказанные сайты связывания для E35, выбирали аминокислотные остатки в пределах сайтов связывания и вблизи сайтов связывания и подвергали процедуре аланинового сканирования. Проводили экспрессию белков GM-CSFR α с такими отобранными мутациями. Аффинность связывания E35-IgG4, E87b-IgG4 и T119-IgG4 с каждым подвергнутым мутациям белком GM-CSFR α анализировали, используя ELISA. На фиг. 18A-18C показаны полученные с использованием ELISA кривые связывания антител с подвергнутым мутациям GM-CSFR α . Как использовано в данном описании, GMRah представляет собой меченный меткой His человеческий GM-CSFR α дикого типа (GM-CSFR α -6His). Мутации в различные положения аминокислотной последовательности GM-CSFR α дикого типа вносили, используя аланиновое сканирование, которое описано выше. Как показано на фиг. 18A-18C, мутация в положении C60 оказывала значительное влияние на аффинность связывания E35, E87b и T119, и ее определяли как мутацию, которая оказывала влияние на белковую структура GM-CSFR α . На основании этих результатов идентифицировали, что типичные эпитопы антител E35, E87b и T119 содержат аминокислотные остатки, которые показаны в табл. 18. Нумерация аминокислотных остатков в GM-CSFR α (SEQ ID NO: 292) показана на фиг. 20.

Таблица 18

Анти-тело	R49	V50	V51	N57	E59	S61	T63	L191	K194	K195	I196	R283	I284
E35		GMR-V50	GMR-V51		GMR-E59		GMR-T63		GMR-K194	GMR-K195	GMR-I196	GMR-R283	GMR-I284
E87b		GMR-V50			GMR-E59			GMR-L191	GMR-K194	GMR-K195	GMR-I196	GMR-R283	GMR-I284
T119	GMR-R49	GMR-V50	GMR-V51	GMR-V57	GMR-E59	GMR-S61			GMR-K194	GMR-K195		GMR-R283	GMR-I284

(11) V_H, содержащий HC-CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, HC-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и HC-CDR3, содержащий

4. Выделенное антитело к GM-CSFR α по п. 3, содержащее следующие аминокислотные остатки:

- (1) E, H, N, G, D, M, S, P, F, Y, A, V, K, W, R или C в положении 31 V_H; и/или
- (2) S, L, N, A, K, R, I, Q, G, T, H, M или C в положении 26 V_L; и/или
- (3) Q, Y, P, A, I, F, T, R, V, L, E, S или C в положении 27 V_L; и/или
- (4) S, H, W, L, R, K, T, P, I, F, V, E, A или Q в положении 28 V_L; и/или
- (5) S, L, W, M, A, Y, K, R, G, T, E, V, N, F или C в положении 30 V_L; и/или
- (6) S, T, R, A, H, Q, P, M, L или G в положении 31 V_L; и/или
- (7) Y, L или F в положении 32 V_L; и/или
- (8) G или T в положении 50 V_L; и/или
- (9) A, G, R, H, K, S, T, M, F, N или V в положении 51 V_L; и/или
- (10) S, A, W, R, L, T, Q, F, Y, H или N в положении 52 V_L; и/или
- (11) D, A, Q или W в положении 92 V_L; и/или
- (12) N, D, E, T, Y, G, A, M, F, S, I или L в положении 93 V_L; и/или
- (13) аминокислотные остатки, выбранные из T, H, V, E, P, L, M, S, W, C, A, G, N или K в положении 28 V_H; и/или
- (14) аминокислотные остатки, выбранные из T, P, D, E, Y, W, V, M, N, L, Q, G, S, A, K или R в положении 30 V_H, при этом нумерация соответствует EU-индексу по Kabat.

5. Выделенное антитело к GM-CSFR α по любому из пп.1-4, содержащее:

V_H, содержащий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 80-121 и 246-287 или ее вариант, имеющий по меньшей мере примерно 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 80-121 и 246-287; и

V_L, содержащий аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 122-144, 150-245 и 288-289 или ее вариант, имеющий по меньшей мере примерно 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 122-144, 150-245 и 288-289.

6. Выделенное антитело к GM-CSFR α по п.5, содержащее:

(1) V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80 или ее вариант, имеющий по меньшей мере примерно 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 80; и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 123 или ее вариант, имеющий по меньшей мере примерно 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 123;

(2) V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85 или ее вариант, имеющий по меньшей мере примерно 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 85; и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125 или ее вариант, имеющий по меньшей мере примерно 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 125;

(3) V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86 или ее вариант, имеющий по меньшей мере примерно 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 86; и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126 или ее вариант, имеющий по меньшей мере примерно 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 126;

(4) V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91 или ее вариант, имеющий по меньшей мере примерно 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 91; и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126 или ее вариант, имеющий по меньшей мере примерно 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 126;

(5) V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99 или ее вариант, имеющий по меньшей мере примерно 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 99; и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122 или ее вариант, имеющий по меньшей мере примерно 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 122;

(6) V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101 или ее вариант, имеющий по меньшей мере примерно 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 101; и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126 или ее вариант, имеющий по меньшей мере примерно 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 126;

(7) V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103 или ее вариант, имеющий по меньшей мере примерно 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 103; и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 123 или ее вариант, имеющий по меньшей мере примерно 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 123;

(8) V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99 или ее вариант, имеющий

10. Выделенное антитело к GM-CSFR α по любому из пп.1-9, где указанное антитело к GM-CSFR α является химерным, человеческим или гуманизированным.

11. Выделенное антитело к GM-CSFR α по любому из пп.1-6, где указанное антитело к GM-CSFR α представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, выбранный из группы, состоящей из Fab, Fab', F(ab')₂, Fab'-SH, одноцепочечного Fv (scFv), вариабельного фрагмента (Fv), однодоменного антитела (dAb), Fd, нанотела, диатела и линейного антитела.

12. Выделенное антитело к GM-CSFR α по любому из пп.1-11, где указанное антитело к GM-CSFR α имеет T_{пл} по меньшей мере примерно 69°C.

13. Выделенное антитело к GM-CSFR α по любому из пп.1-12, где указанное антитело к GM-CSFR α связывается с GM-CSFR α человека с константой диссоциации (K_d) от примерно 0,1 пМ до примерно 1 нМ.

14. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеиновую последовательность, которая кодирует антитело к GM-CSFR α по любому из пп.1-13.

15. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.14.

16. Выделенная клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.14 или вектор по п.15.

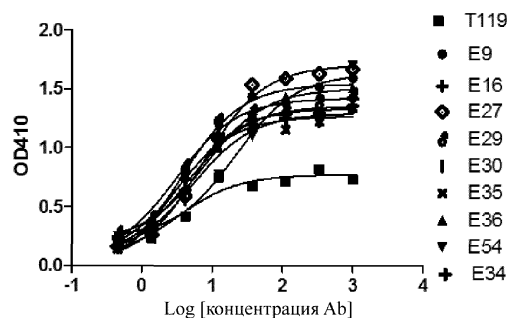
17. Способ получения антитела к GM-CSFR α , включающий:

а) культивирование клетки-хозяина по п.16 в условиях, эффективных для экспрессии антитела к GM-CSFR α ; и

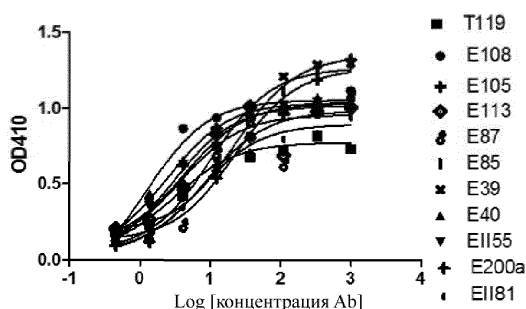
б) выделение экспрессированного антитела к GM-CSFR α из клетки-хозяина.

18. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело к GM-CSFR α по любому из пп.1-13, нуклеиновую кислоту по п.14, вектор по п.15 или выделенную клетку-хозяина по п.16 и фармацевтически приемлемый носитель.

19. Способ лечения заболевания или состояния у индивида, нуждающегося в этом, включающий введение указанному индивиду эффективного количества фармацевтической композиции по п.18, где заболевание или состояние представляет собой воспалительное, респираторное или аутоиммунное заболевание или состояние, и причем указанное заболевание или состояние выбрано из группы, состоящей из ревматоидного артрита, астмы, хронической обструктивной болезни легких, аллергической реакции, рассеянного склероза, миелоидного лейкоза, атеросклероза.

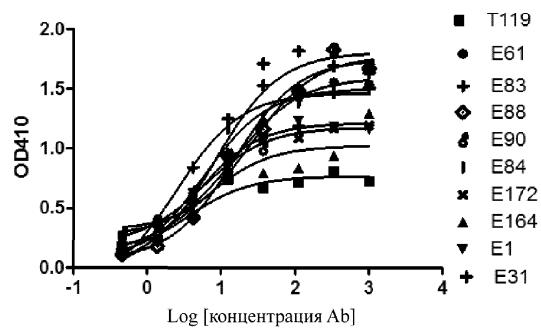


Фиг. 1А

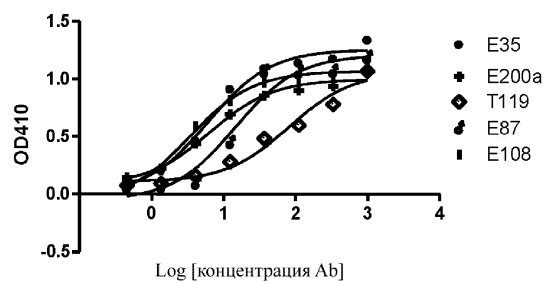


Фиг. 1В

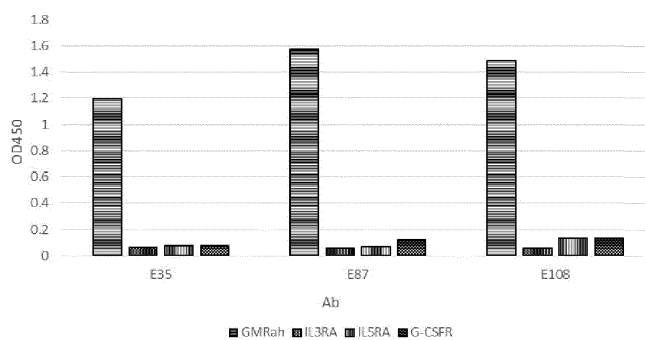
048006



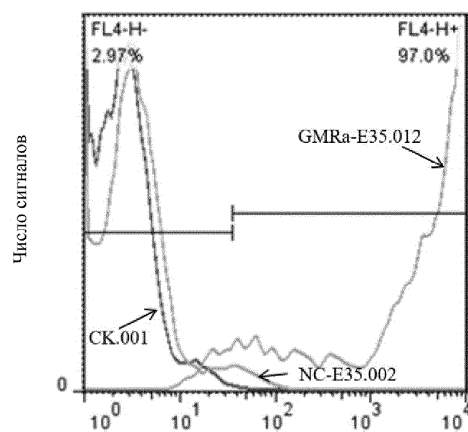
Фиг. 1С



Фиг. 2



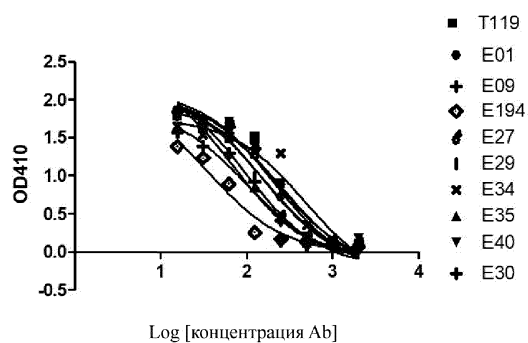
Фиг. 3



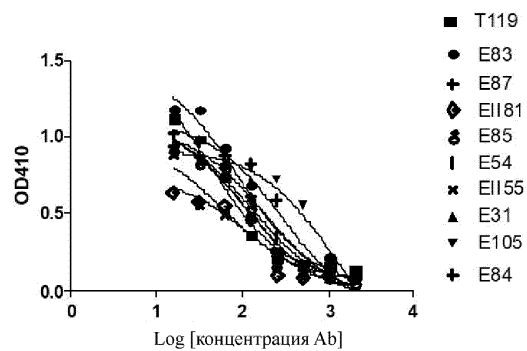
FL-4-H (интенсивность сигнала
в канале флуоресценции 4)

Фиг. 4

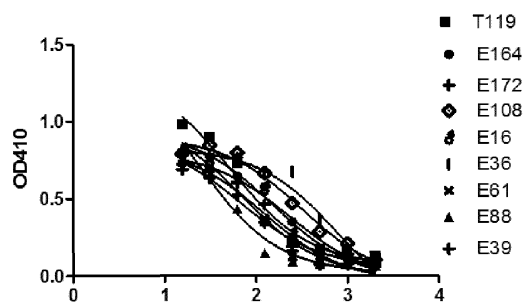
048006



Фиг. 5А

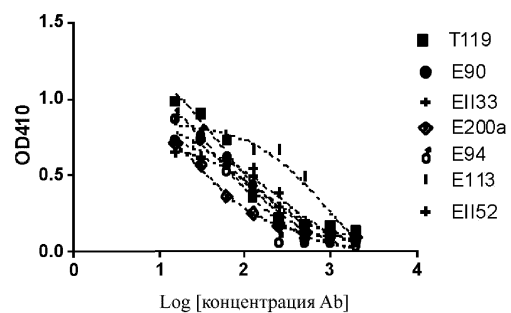


Фиг. 5В

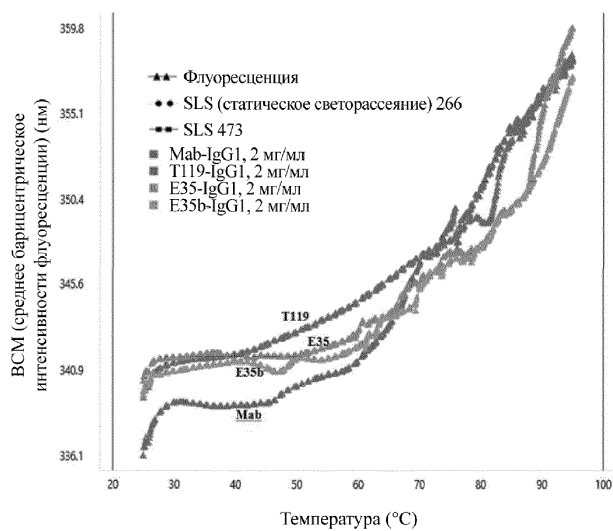


Фиг. 5С

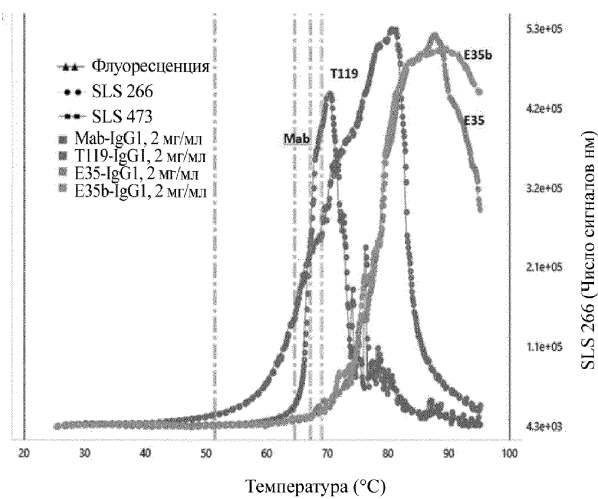
Блокирование связывания CM-CSF с GMRAh



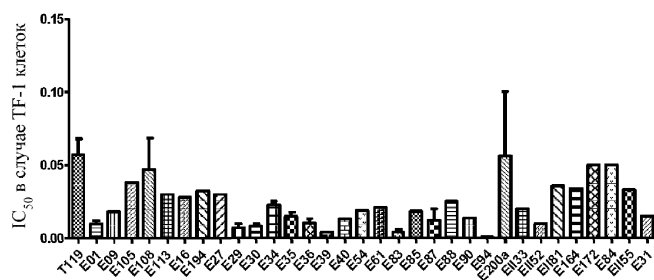
Фиг. 5D



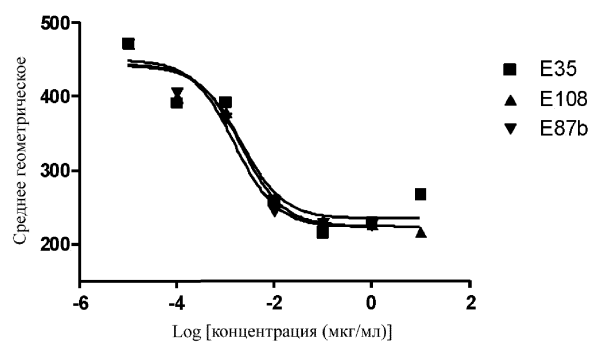
Фиг. 6А



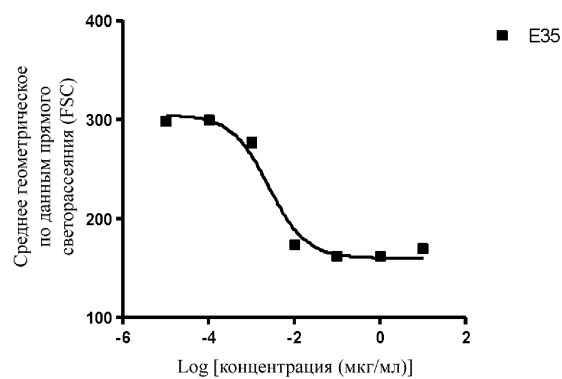
Фиг. 6В



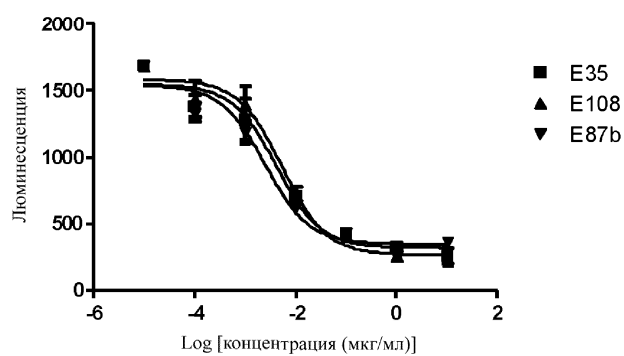
Фиг. 7



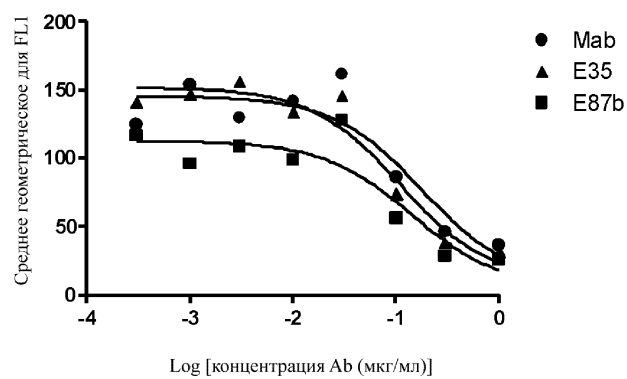
Фиг. 8



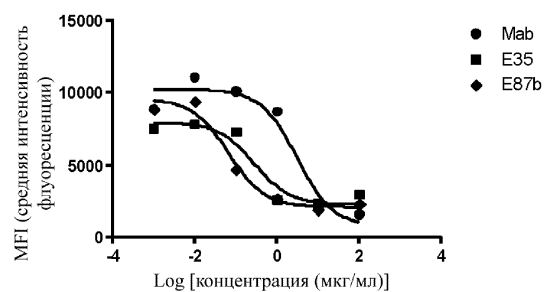
Фиг. 9



Фиг. 10

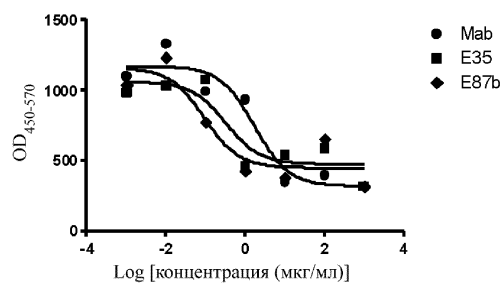


Фиг. 11

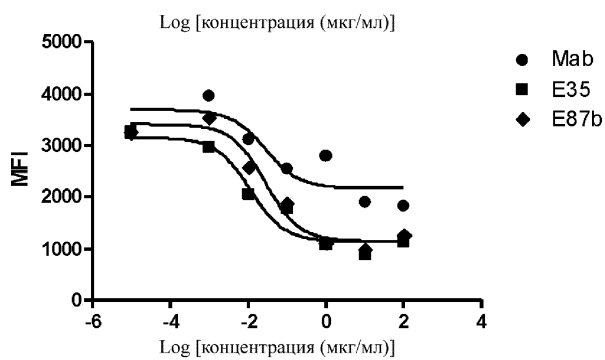


Фиг. 12А

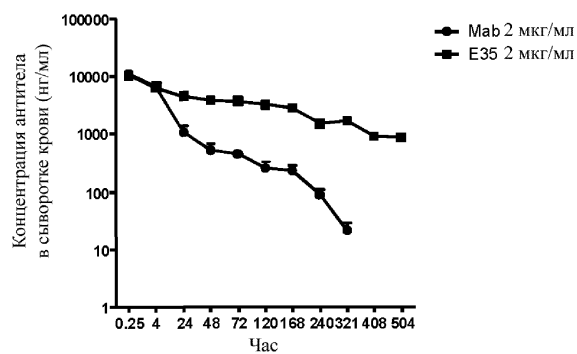
048006



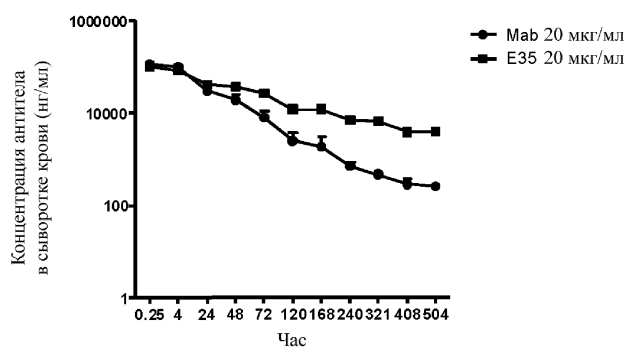
Фиг. 12В



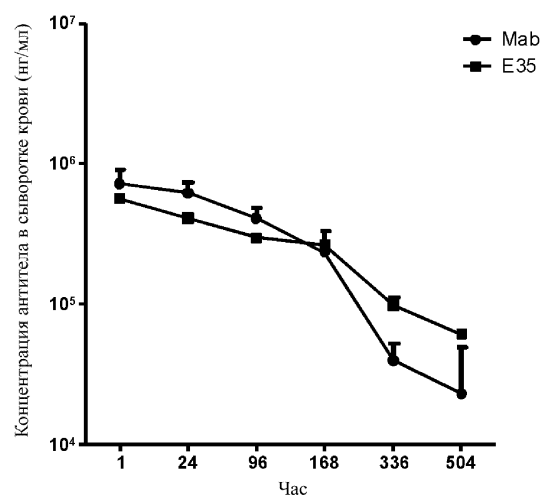
Фиг. 13



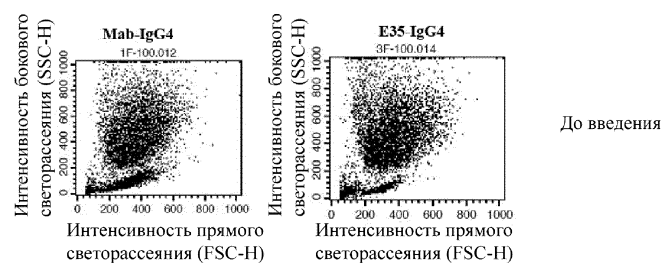
Фиг. 14А



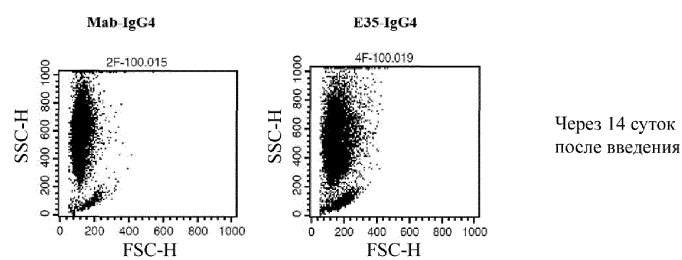
Фиг. 14В



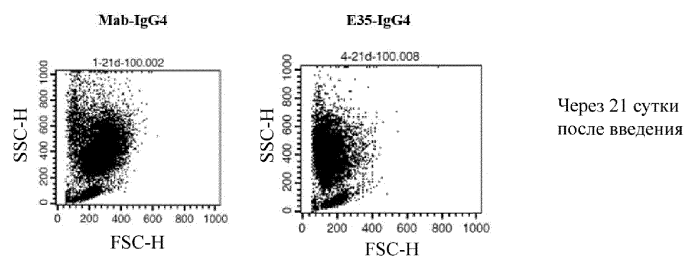
Фиг. 15



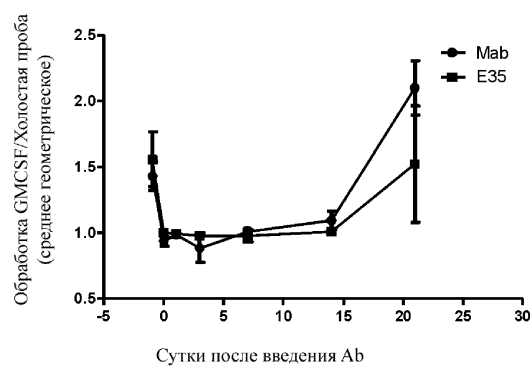
Фиг. 16А



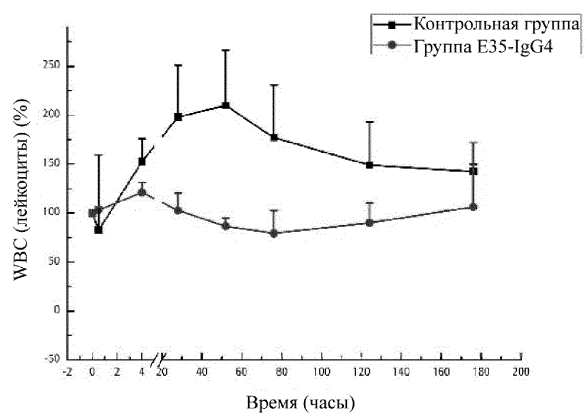
Фиг. 16В



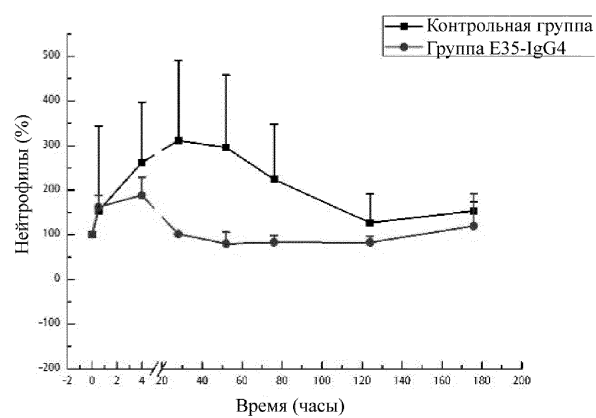
Фиг. 16С



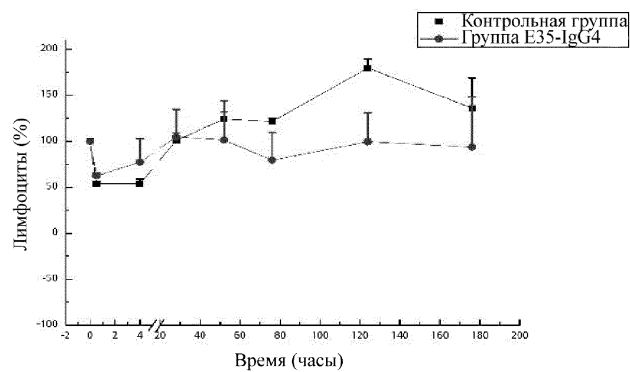
Фиг. 16D



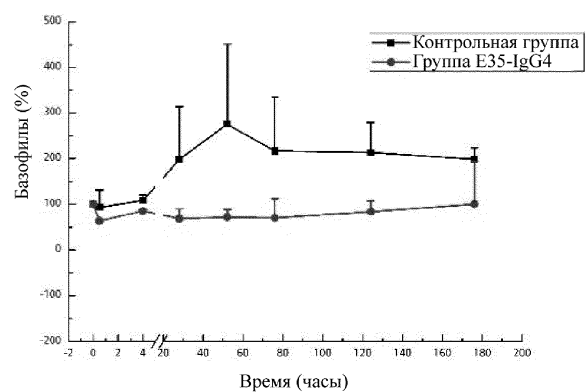
Фиг. 17A



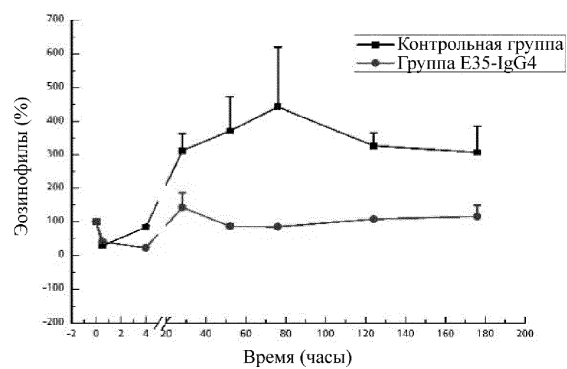
Фиг. 17B



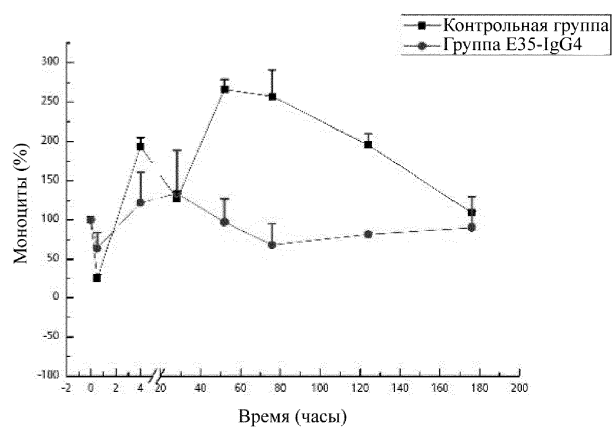
Фиг. 17C



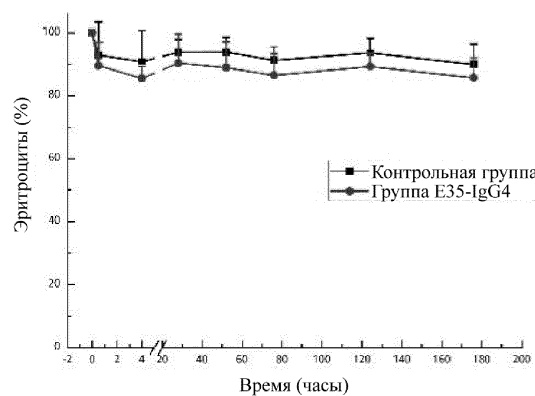
Фиг. 17D



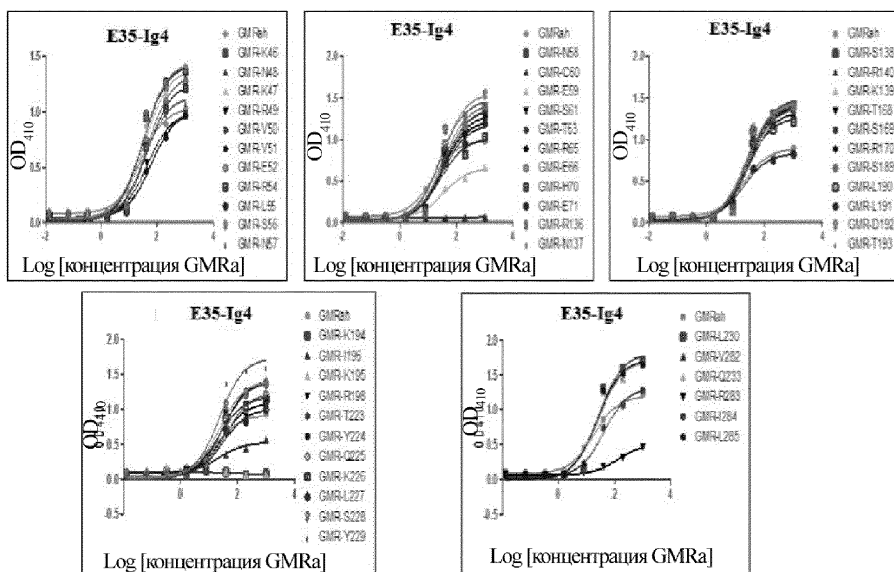
Фиг. 17E



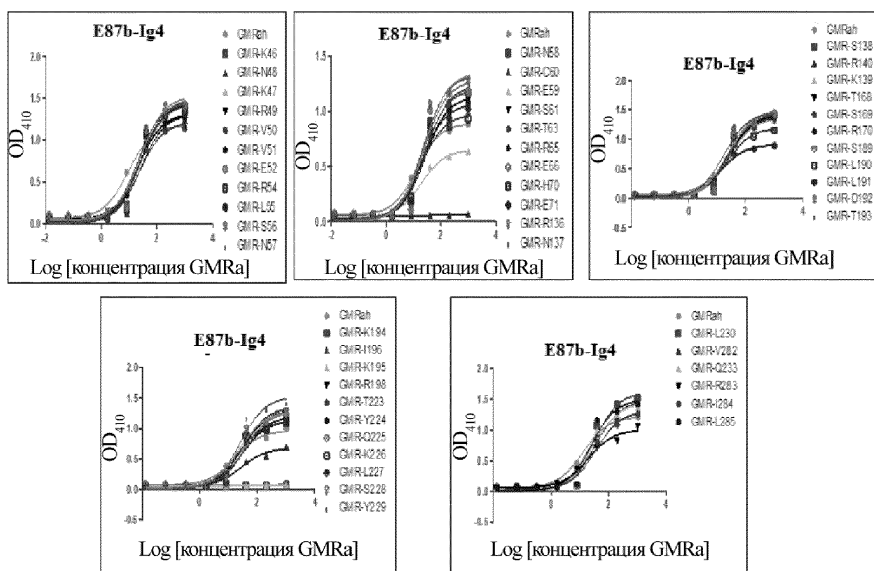
Фиг. 17F



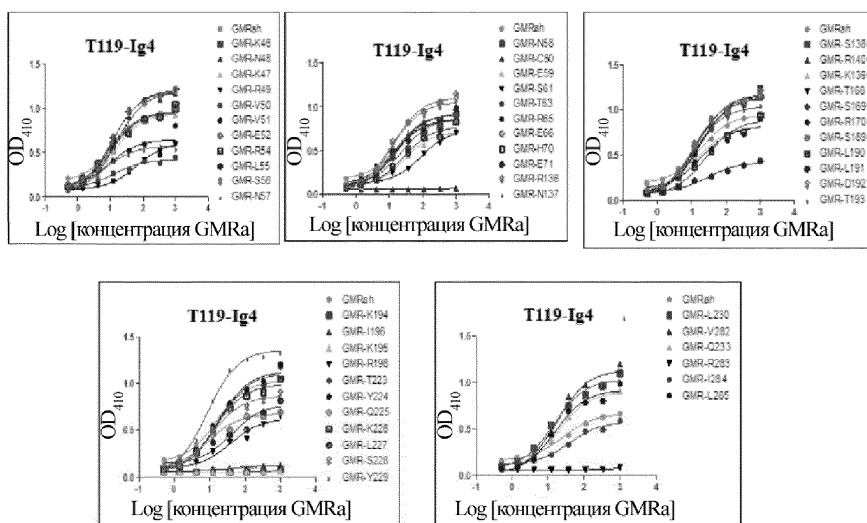
Фиг. 17G



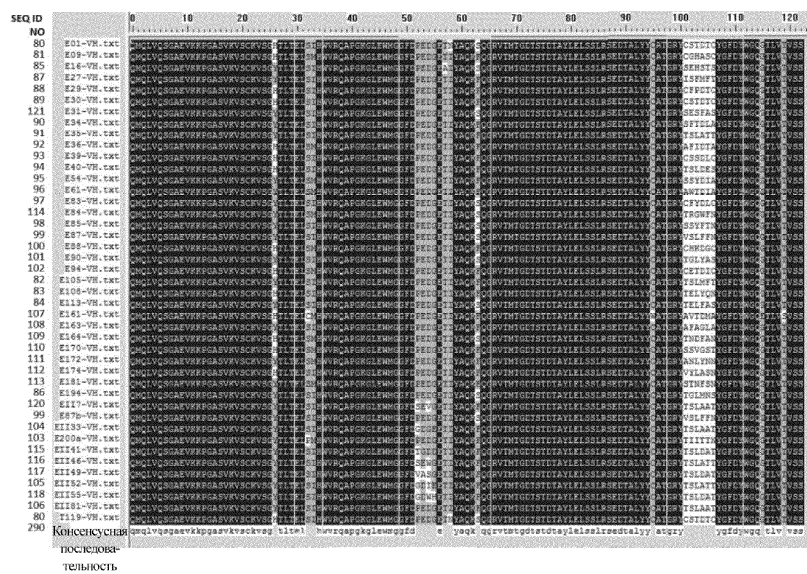
Фиг. 18А



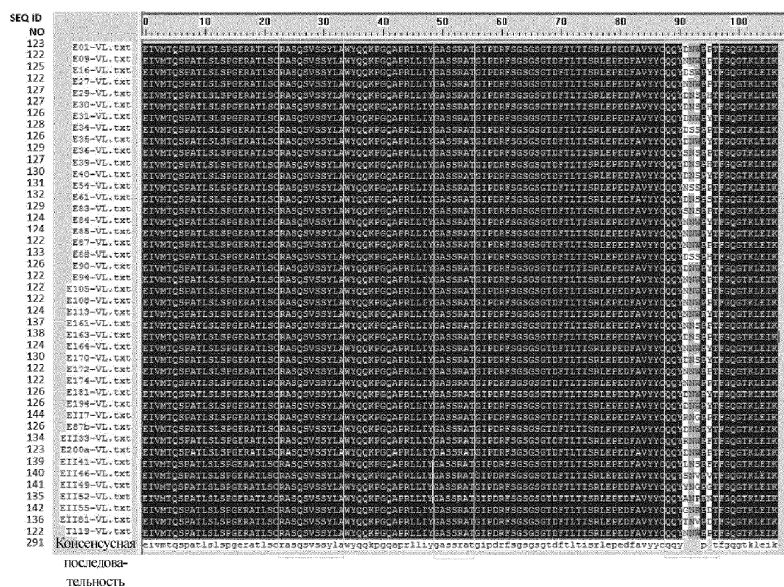
Фиг. 18В



Фиг. 18С



Фиг. 19А



Фиг. 19В

16	20	30	40	50	60	70	75
S L N V R F D S R T M Q L S W D C Q E Q T T F S K C F L T D K K N R V E P R L S N N E C S C T F R E I C L H E G V T F							
76	80	90	100	110	120	130	135
E V H V Q T S Q R G F Q K L L Y P N S G R E G T A A Q N F S C F I Y N A D L M N C T W A R G P T A P R D V Q Y F L Y I							
136	140	150	160	170	180	190	195
R N S K R R R E I R C P Y Y I Q D S G T H V G C H L D N L S G L T S R N Y F L V N G T S R E I G I Q F F D S L L D T K K							
196	200	210	220	230	240	250	255
I E R F N P P S N V T V R C N T T H C L V R W K Q P R T Y Q K L S Y L D F Q Y Q L D V H R K N T Q P G T E N L L I N V S							
256	260	270	280	290	295	(SEQ ID NO: 292)	
G D I E N R Y N E P S S F P R A K H S Y K I R A D V R I L N W S S W S E A I E F							

Фиг. 20