

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11)

**014229**

(13)

**B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации  
и выдачи патента: **2010.10.29**

**(51)** Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)

**(21)** Номер заявки: **200702532**

**(22)** Дата подачи: **2006.05.19**

---

**(54) АНТИТЕЛО ПРОТИВ МСП-1, СОДЕРЖАЩИЕ ЕГО КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ  
ПРИМЕНЕНИЯ АНТИТЕЛА И КОМПОЗИЦИЙ**

---

**(31)** **60/682,654; 60/682,620**

**(56)** **WO-A2-0202640**

**(32)** **2005.05.19**

**(33)** **US**

**(43)** **2008.06.30**

**(86)** **PCT/US2006/019627**

**(87)** **WO 2006/125202 2006.11.23**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**СЕНТОКОР, ИНК. (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Дас Анук, Свит Рэймонд, Цзун Пин (US),  
Бардрофф Михель (DE)**

**(74)** Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

---

**(57)** Настоящее изобретение относится по меньшей мере к одному новому антителу против МСП-1, в том числе к выделенным нуклеиновым кислотам, кодирующим по меньшей мере одно антитело против МСП-1, МСП-1, векторам, клеткам-хозяевам, трансгенным животным или растениям и способам их получения и применения, в том числе к терапевтическим композициям, способам и устройствам.

---

**B1**

**014229**

**014229**

**B1**

### Перекрестная ссылка на родственную заявку

Настоящая заявка претендует на приоритет предварительных заявок на патенты США с серийными №№ 60/682654 и 60/682620, поданных 19 мая 2005, содержание которых полностью включено посредством ссылки.

### Область техники

Настоящее изобретение относится к антителам, в том числе точно определенным частям или вариантам, специфичным в отношении по меньшей мере одного моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 (MCP-1) человека или его фрагмента, а также антиидиотипическим антителам, и к кодирующим такие антитела против MCP-1 нуклеиновым кислотам, комплементарным нуклеиновым кислотам, векторам, клеткам-хозяевам и способам их получения и использования, в том числе к терапевтическим композициям, введению и устройствам.

### Родственный уровень техники

Моноцитарный хемоаттрактантный белок-1 (MCP-1) человека (также называемый CCL-2), содержащий 76 аминокислотных остатков белок с М.м. 8,6 кДа, является членом C-C (или хемокин-бета)-семейства цитокинов. Хемокины являются низкомолекулярными (8-10 кДа), индуцируемыми, секретлируемыми, провоспалительными хемотаксическими цитокинами, которые, как показано, играют центральную роль в перемещении и периваскулярной аккумуляции специфических субпопуляций лейкоцитов в местах повреждения ткани. В зависимости от позиций четырех консервативных цистеинов определили два основных семейства. CXС или  $\alpha$ -хемокины преимущественно вызывают аттракцию нейтрофилов, в то время как CC или  $\beta$ -хемокины преимущественно вызывают аттракцию моноцитов и других лейкоцитов, но не нейтрофилов (Leonard and Yoshimura et al., 1990). Члены MCP-1 (моноцитарный хемотаксический белок-1)-семейства образуют главную составляющую C-C-семейства цитокинов, и их считают основными хемокинами, вовлеченными в рекрутмент моноцитов, макрофагов и активированных лимфоцитов. При анализе гомологии MCP-1 от различных видов MCP-1 человека и обезьяны отличаются только по двум аминокислотам, обнаруживая идентичность последовательностей, составляющую 97%, в то время как крысиный MCP-1, содержащий 125 аминокислотных остатков белок с М.м. 13,8 кДа, отличается от MCP-1 человека по молекулярному размеру и степени гликозилирования.

Рецепторы хемокинов принадлежат к большому семейству соединенных с G-белком рецепторов с семью трансмембранными доменами (7 TM) (GPCR, также называемых змеевидными рецепторами). На основе номенклатуры рецепторов, принятой в 1996 г. на исследовательской конференции Гордона по хемотаксическим цитокинам, рецепторы хемокинов, связывающиеся с хемокинами CXС, обозначают CXCR, а рецепторы, связывающиеся с хемокинами CC, обозначают CCR.

Известно, что MCP-1 связывается с хемокиновым рецептором CCR2 и передает через него сигнал. CCR2 является проходящим через мембрану семь раз, соединенным с G-белком рецептором, экспрессированным на многих клетках, в том числе моноцитах, Т-клетках, В-клетках и базофилах. Клонировали два специфичных в отношении MCP-1 рецептора, CCR2A и CCR2B, которые передают сигнал в ответ на наномолярные (нМ) концентрации MCP-1. CCR2A (CC-CKR2A) и CCR2B (CC-CKR2B) представляют собой две кДНК, которые кодируют два специфичных в отношении MCP-1 рецептора с подвергнутыми альтернативному сплайсингу карбоксильными концами. MCP-1 связывается с обеими изоформами с высокой аффинностью. MCP-1 индуцирует поступление кальция в клетки, экспрессирующие CCR2B, но не в клетки, экспрессирующие CCR2A. MCP-1 индуцирует хемотаксис на 5 порядков меньше в клетках, экспрессирующих CCR2B, по сравнению с клетками, экспрессирующими CCR2A.

Известны другие белки с определенной функциональной гомологией с MCP-1 человека и гомологией последовательностей с этим белком. Особенно схожими с MCP-1 (GenBank NP\_002973) являются MCP-2 (GenBank NP\_005614) и эотаксин (GenBank NP\_51671), при этом идентичность последовательностей MCP-1 и MCP-2 составляет 61,8%, а MCP-1 и эотаксина-1 - 63,2%. Диапазон активностей и спектр вовлечения этих белков в гомеостатические механизмы и патологию человека недостаточно понятен в отношении гомологов MCP-1. Например, MCP-2 (переименованный CCL8) является близкородственным к MCP-1 и MCP-3 (переименованный CCL7, GenBank NP\_006264) и использует в качестве своих функциональных рецепторов оба CCR1, а также CCR2B. MCP-3 связывается с рецептором, обозначенным D6. MCP-3 также связывается с CCR10 и CCR1. Последовательности MCP-3 (97 аминокислот) и MCP-1 идентичны на 74%, а последовательности MCP-3 и MCP-2 - на 58%.

Секретируемый MCP-3 отличается от MCP-1 тем, что он является N-гликозилированным. Идентичность последовательностей MCP-4 (переименованный CCL13, GenBank NP\_005399) и трех известных моноцитарных хемотаксических белков составляет 56-61 процент, а с эотаксином-1 MCP-4 идентичен на 60 процентов. Функции MCP-4, по-видимому, весьма схожи с функциями MCP-3 и эотаксина.

Подобно MCP-3 MCP-4 является сильным хемоаттрактантом для моноцитов и Т-лимфоцитов. Он является неактивным в отношении нейтрофилов. MCP-4 связывается с рецепторами моноцитов, которые узнают MCP-1, MCP-3, RANTES (CCL5) и эотаксин, (рецепторами CCR1 и CCR3) и демонстрирует полную перекрестную десенсибилизацию эотаксином-1. MCP-5 представляет собой крысиный CC-хемокин и является наиболее близкородственным к MCP-1 человека (идентичность аминокислот на 66%). Обо-

значением гена для MCP-5 (переименованный CCL12) является SCYA12.

Показано, что клетки, трансфицированные хемокиновым рецептором CCR2, отвечают на MCP-5. В отношении общей информации по цитокинам и хемокинам см. <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi>, а в отношении находящейся в обращении классификационной системы - Zlotnic A., Yoshie O. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12: 121-127.

<sup>125</sup>I-MCP-1 связывается с моноцитами, и анализ графика Скэтчарда указывает на то, что моноциты имеют минимум ~1700 сайтов связывания на клетку с Kd, составляющей ~2 нМ (Yoshimura and Leonard, 1990). Позже, с помощью экспериментов, касающихся равновесного связывания, обнаружили присутствие приблизительно 3000 сайтов связывания на клетку с Kd, составляющей 0,77 нМ (Ernst et al., 1994). <sup>125</sup>I-MCP-1 также продемонстрировал связывание с высокой аффинностью с клетками dEoL-3, экспрессирующими рецептор CCR2, со значением Kd, составляющим 0,4 нМ (Sarau et al., 1997), что подтверждает субнаномолярную аффинность MCP-1 к своему рецептору. Для идентификации районов MCP-1, контактирующих со своим рецептором, CCR2, все выставленные на поверхность остатки заменили аланином. Некоторые остатки также мутировали в другие аминокислоты для определения важности заряда, гидрофобности или ароматичности в конкретных положениях. Два кластера первоначально основных остатков (R24, K35, K38, K49 и Y13), разделенные гидрофобной 35 А-бороздкой, уменьшали уровень связывания на 15-100-порядков. Данные говорят о модели, в которой с рецептором контактирует большая площадь поверхности MCP-1, а аккумуляция ряда слабых взаимодействий приводит к 35 пМ-аффинности, наблюдаемой с белком дикого типа (WT) (Hemmerich et al., 1999). Аффинность в диапазоне от 2 нМ вниз до 35 пМ, описанная в литературе, может быть обусловлена используемыми анализами и ограничениями соответствующих анализов.

Известны другие белки с определенной функциональной гомологией с MCP-1 человека и гомологией последовательностей с этим белком. Особенно схожими с MCP-1 (GenBank NP\_002973) являются MCP-2 (GenBank NP\_005614) и эотаксин (GenBank NP 51671), при этом идентичность последовательностей MCP-1 и MCP-2 составляет 61,8 процентов, а MCP-1 и эотаксина - 63,2 процента. Диапазон активностей и спектр вовлечения этих белков в гомеостатические механизмы и патологию человека недостаточно понятен в отношении гомологов MCP-1. Например, MCP-2 является близкородственным к MCP-1 и MCP-3 (GenBank NP\_006264) и использует в качестве своих функциональных рецепторов оба CCR1,

а также CCR2B. MCP-3 связывается с рецептором, обозначенным D6. MCP-3 также связывается с CCR10. Последовательности белка MCP-3 (97 аминокислот) и MCP-1 идентичны на 74 процента, а последовательности белка MCP-3 и MCP-2 - на 58 процентов. Секретируемый MCP-3 отличается от MCP-1 тем, что он является N-гликозилированным. Идентичность последовательностей MCP-4 (GenBank NP\_005399) и трех известных моноцитарных

хемоаттрактантных белков составляет 56-61 процент, а с эотаксином-1 MCP-4 идентичен на 60 процентов. Функции MCP-4, по-видимому, весьма схожи с функциями MCP-3 и эотаксина. Подобно MCP-3, MCP-4 является сильным хемоаттрактантом для моноцитов и Т-лимфоцитов. Он является неактивным в отношении нейтрофилов. MCP-4 связывается с рецепторами моноцитов, которые узнают MCP-1, MCP-3 и RANTES, (CCR2). В отношении эозинофилов MCP-4 имеет сходную с MCP-3, RANTES и эотаксином действенность и силу. MCP-4 делит рецепторы с эотаксином (CCR1 и CCR3) и демонстрирует полную перекрестную десенсибилизацию эотаксином-1.

Сообщалось о других антителах, способных связываться с MCP-1: в JP9067399 описывается антитело, полученное из выделенных клеток крови, а в JP05276986 описывается гибридома, секретирующая IgM против MCP-1 человека. Более недавно описаны антитела, способные связываться с множеством бета-хемокинов, в том числе MCP-1, (WO03048083) и связывающееся с MCP-1-антитело, которое также связывается с эотаксином (US20040047860).

Соответственно, существует необходимость в обеспечении антителами человека, специфичных в отношении MCP-1 человека, для использования в терапии с целью ослабления или устранения симптомов MCP-1-зависимых заболеваний, а также в улучшении известных антител или их фрагментов. **ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Настоящим изобретением обеспечиваются выделенные антитела против MCP-1, являющиеся антителами человека, примата, грызуна, млекопитающего, химерными, гуманизированными и/или CDR-привитыми, и другие происходящие из иммуноглобулинов белки, фрагменты, продукты расщепления и другие их точно определенные

части и варианты, а также композиции антител против MCP-1, кодирующие или комплементарные нуклеиновые кислоты, векторы, клетки-хозяева, композиции, составы, устройства, трансгенные животные, трансгенные растения и способы их получения и применения, как здесь описывается и делается возможным в сочетании с тем, что известно в данной области. В дополнение к описанной здесь композиции антител антитело согласно изобретению определяют по его аффинности к MCP-1 человека, специфичности в отношении MCP-1 человека и способности блокировать биологическую активность MCP-1 человека.

Настоящим изобретением также обеспечивается по меньшей мере одно выделенное антитело против MCP-1, такое как, без ограничения, по меньшей мере одно антитело, слитый с антителом белок или

фрагмент, описанные здесь. Антитело в соответствии с настоящим изобретением включает любую содержащую белок или пептид молекулу, которая включает по меньшей мере часть молекулы иммуноглобулина, такую как, без ограничения, по меньшей мере один лигандсвязывающий домен, такой как, без ограничения, вариабельная область тяжелой или легкой цепи, определяющий комплементарность участков (CDR) тяжелой или легкой цепи или его лигандсвязывающая часть, представленный в таблице 4А, В, D и E (SEQ ID NO: 6-26) и необязательно функционально связанный с каркасной областью (например, FR1, FR2, FR3, FR4 и их фрагментами, как описано в табл. 4С (SEQ ID NO: 2-5)), кроме того необязательно включает по меньшей мере СН1, шарнирную область, СН2 или СН3 иммуноглобулина человека. Аминокислотная последовательность по меньшей мере одного антитела может, кроме того, необязательно включать в себя по меньшей мере одну точно определенную замену, вставку или делецию, описанную здесь или известную в данной области.

В одном варианте осуществления согласно изобретению лигандсвязывающие части антитела включают SEQ ID NO: 27 и 28. В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается по меньшей мере одно выделенное антитело млекопитающего против MCP-1, включающее по меньшей мере одну вариабельную область, включающую SEQ ID NO: 27 или 28.

В другом аспекте настоящим изобретением обеспечивается по меньшей мере одно выделенное антитело млекопитающего против MCP-1, включающее в себя или (i) аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 9 всех определяющих комплементарность участков (CDR) тяжелой цепи, или (ii) аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13, 14 и 16 всех CDR легкой цепи.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечиваются выделенные молекулы нуклеиновых кислот, включающие полинуклеотид, кодирующий специфические антитела против MCP-1, включающие по меньшей мере одну их специфическую последовательность, домен, часть или вариант, комплементарные такому полинуклеотиду или гибридизующиеся с таким полинуклеотидом. Кроме того, настоящим изобретением обеспечиваются рекомбинантные векторы, включающие указанные молекулы нуклеиновых кислот для антител против MCP-1, клетки-хозяева, содержащие такие нуклеиновые кислоты и/или рекомбинантные векторы, а также способы получения и/или применения таких нуклеиновых кислот для антител, векторов и/или клеток-хозяев.

По меньшей мере одно антитело согласно изобретению связывается с по меньшей мере одним специфическим эпитопом, специфичным в отношении по меньшей мере одного белка MCP-1 или варианта, или производного, как, например, те, которые представлены в SEQ ID NO: 1. По меньшей мере один эпитоп может включать в себя по меньшей мере одну антитело-связывающую область, которая включает по меньшей мере одну часть указанного белка, предпочтительно указанный эпитоп состоит из по меньшей мере 1-5 аминокислот по меньшей мере одной части белка, такой как, без ограничения, по меньшей мере одного функционального, внеклеточного, растворимого, гидрофильного, наружного или цитоплазматического домена указанного белка или любой его части.

По меньшей мере одно антитело может необязательно включать в себя по меньшей мере одну специфическую часть по меньшей мере одного определяющего комплементарность участка (CDR) (например, CDR1, CDR2 или CDR3 вариабельной области тяжелой или легкой цепи, представленной SEQ ID NO: 27 или 28, соответственно), представленного SEQ ID NO: 6, 7, 9, 13, 14 и 16, и необязательно, кроме того, включать в себя по меньшей мере одну каркасную область константной или вариабельной области или ее часть, причем антитело блокирует, ингибирует или предотвращает по меньшей мере одну активность, такую как, без ограничения, связывание MCP-1 с рецептором на клеточной поверхности, интернализация рецептора CCR2, стимулируемая MCP-1 мобилизация  $\text{Ca}^{2+}$  или любой другой известный подходящий анализ MCP-1. Таким образом, антитело против MCP-1 можно скринировать в отношении соответствующей активности в соответствии с известными способами, такой как, без ограничения, по меньшей мере одна биологическая активность по направлению к белку MCP-1.

Кроме того, настоящим изобретением дополнительно обеспечивается по меньшей мере одно MCP-1-антиидиотипическое антитело против по меньшей мере одного MCP-1-антитела согласно изобретению. Антиидиотипическое антитело включает любую содержащую белок или пептид молекулу, которая включает по меньшей мере часть молекулы иммуноглобулина, такую как, без ограничения, по меньшей мере одна лигандсвязывающая часть (LBP), такая как, без ограничения, определяющий комплементарность участок (CDR) тяжелой или легкой цепи или его лигандсвязывающая часть, вариабельная область тяжелой или легкой цепи, константная область тяжелой или легкой цепи, каркасная область или любая их часть, которую можно включить в антиидиотипическое антитело согласно изобретению.

Антиидиотипическое антитело согласно изобретению может включать в себя или происходить от любого млекопитающего, такого как, без ограничения, человек, мышь, кролик, крыса, грызун, примат и т.п.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечиваются выделенные молекулы нуклеиновых кислот, включающие полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере одно MCP-1 антиидиотипическое антитело, включающее в себя по меньшей мере одну его специфическую последовательность, домен, часть или вариант, комплементарные такому полинуклеотиду или гибридизующиеся с таким полинуклеотидом. Кроме того, настоящим изобретением дополнительно обеспечиваются рекомбинантные векторы,

включающие указанные молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие МРС-1 антиидиотипическое анти-тело, клетки-хозяева, содержащие такие нуклеиновые кислоты и/или рекомбинантные векторы, а также способы получения и/или применения таких нуклеиновых кислот для антиидиотипических антител, векторов и/или клеток-хозяев.

Настоящим изобретением также обеспечивается по меньшей мере один способ экспрессии по меньшей мере одного антитела против МСР-1 или МРС-1 антиидиотипического антитела в клетке-хозяине, включающий в себя культивирование клетки-хозяина, описанной здесь, в условиях, когда по меньшей мере одно антитело против МСР-1 экспрессируется в определяемых и/или выделяемых количествах.

Настоящим изобретением также обеспечивается по меньшей мере одна композиция, содержащая (а) выделенную кодирующую антитело против МСР-1 нуклеиновую кислоту и/или антитело, описанные здесь; и (б) подходящий носитель или разбавитель. Носитель или разбавитель могут быть необязательно фармацевтически приемлемыми, в соответствии с известными носителями или разбавителями. Кроме того, композиция может необязательно содержать по меньшей мере один дополнительный компонент, белок или композицию.

Кроме того, настоящим изобретением обеспечивается по меньшей мере один способ или композиция с использованием антитела против МСР-1 для введения терапевтически эффективного количества с целью модулирования или лечения по меньшей мере одного связанного с МСР-1 состояния в клетке, ткани, органе, у животного или пациента и/или до, после или во время связанного с МСР-1 состояния, известного в данной области и/или описанного здесь.

Настоящим изобретением также обеспечивается по меньшей мере одна композиция, устройство и/или способ доставки терапевтически или профилактически эффективного количества по меньшей мере одного антитела против МСР-1 в соответствии с настоящим изобретением.

Кроме того, настоящим изобретением обеспечивается по меньшей мере один способ или композиция с использованием антитела против МСР-1 для диагностики по меньшей мере одного связанного с МСР-1 состояния в клетке, ткани, органе, у животного или пациента и/или до, после или во время связанного с МСР-1 состояния, известного в данной области и/или описанного здесь.

Настоящим изобретением также обеспечивается по меньшей мере одна композиция, устройство и/или способ доставки для диагностики по меньшей мере одного антитела против МСР-1 в соответствии с настоящим изобретением.

В одном аспекте настоящим изобретением обеспечивается по меньшей мере одно выделенное антитело млекопитающего против МСР-1, включающее в себя по меньшей мере одну переменную область, включающую SEQ ID NO: 27 или 28.

В другом аспекте настоящим изобретением обеспечивается по меньшей мере одно выделенное антитело млекопитающего против МСР-1, включающее в себя или (i) аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 8 или 9 всех определяющих комплементарность участков (CDR) тяжелой цепи, или (ii) аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13, 14 и 15 или 16 всех CDR легкой цепи.

В другом аспекте настоящим изобретением обеспечивается по меньшей мере одно выделенное антитело млекопитающего против МСР-1, включающее в себя по меньшей мере одну из (i) аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 6, 7 и 8 или 9 всех определяющих комплементарность участков (CDR) тяжелой цепи, или (ii) аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 13, 14 и 15 или 16 всех CDR легкой цепи.

По меньшей мере одно антитело может, кроме того, необязательно проявлять одну из следующих активностей: связываться с МСР-1 с по меньшей мере одной аффинностью, выбранной из по меньшей мере  $10^{-9}$  М, по меньшей мере  $10^{-10}$  М, по меньшей мере  $10^{-11}$  М и по меньшей мере  $10^{-12}$  М; существенно нейтрализовать по меньшей мере одну активность по меньшей мере одного белка МСР-1. Также обеспечивается выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая по меньшей мере одно выделенное антитело млекопитающего против МСР-1, вектор, включающий в себя выделенную нуклеиновую кислоту, и/или прокариотическая или эукариотическая клетка-хозяин, включающая выделенную нуклеиновую кислоту. Клетка-хозяин может необязательно быть по меньшей мере одной из клеток, выбранных из NSO, COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, HepG2, UB2/0, SP2/0, HeLa, клетки миеломы или лимфомы или их любого производного, иммортализованной или трансформированной клетки. Также обеспечивается способ получения по меньшей мере одного антитела против МСР-1, включающий в себя трансляцию кодирующей антитело нуклеиновой кислоты в условиях *in vitro*, *in vivo* или *in situ*, так что антитело против МСР-1 экспрессируется в определяемых и/или выделяемых количествах.

Также обеспечивается композиция, содержащая по меньшей мере одно выделенное антитело млекопитающего против МСР-1 и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

Также обеспечивается способ диагностики или лечения связанного с МСР-1 состояния в клетке, ткани, органе или у животного, включающий в себя (а) приведение в контакт композиции, содержащей эффективное количество по меньшей мере одного выделенного антитела млекопитающего против МСР-1 согласно изобретению, с клеткой, тканью, органом или животным или введение такой композиции в

клетку, ткань, орган или животному.

Также обеспечивается медицинское устройство, включающее в себя по меньшей мере одно выделенное антитело млекопитающего против МСР-1 согласно изобретению, причем устройство пригодно для приведения в контакт или введения по меньшей мере одного антитела против МСР-1 по меньшей мере одним способом, выбранным из парентерального, подкожного, внутримышечного, внутривенного, интраартикулярного, эндобронхиального, интраабдоминального, интракапсульного, внутривисцерального, внутриполосного, внутрибрюшного, внутримозжечкового, интрацеребровентрикулярного способа, введения в толстую кишку, интрацервикального, внутрижелудочного, внутрипеченочного, интрамиокардиального, внутрикостного способа, введения в почечную лоханку, интраперикардиального, интраперитонеального, интраплеврального способа, введения в предстательную железу, внутрилегочного, интаректального, внутripочечного, интареинального, интраспинального, внутрисуставного, интраторакального, внутриматочного, внутрипузырного способа, введения внутрь повреждения, болюса, вагинального, ректального, трансбуккального, подъязычного, интраназального или трансдермального способа.

Также обеспечивается изделие производства для фармацевтического или диагностического применения для человека, включающее в себя упаковочный материал и контейнер, содержащий раствор, (макро)частицу или лиофилизированную форму по меньшей мере одного выделенного антитела млекопитающего против МСР-1 согласно изобретению.

Также обеспечивается способ получения по меньшей мере одного выделенного антитела млекопитающего против МСР-1 согласно изобретению, включающий в себя обеспечение клетки-хозяина или трансгенного животного, или трансгенного растения, или клетки растения, способных экспрессировать антитело в выделяемых количествах. Кроме того, настоящим изобретением обеспечивается по меньшей мере одно антитело против МСР-1, полученное вышеуказанным способом.

Настоящим изобретением, кроме того, обеспечивается любое описанное здесь изобретение.

## Краткое описание списка последовательностей

SEQ ID NO:	Описание
1	MCP-1 (CCL2) человека и варианты, использованные для отбора анти-MCP-1 связующих веществ
2	Вариабельная последовательность тяжелой цепи VH1A: FR1, CDR1, FR2, варианты CDR2, FR3, CDR3, FR4
3	Вариабельная последовательность тяжелой цепи VH3: FR1, CDR1, FR2, варианты CDR2, FR3, CDR3, FR4
4	Вариабельная последовательность легкой цепи каппа3: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, варианты CDR3, FR4
5	Вариабельная последовательность легкой цепи лямбда3: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, варианты CDR3, FR4
6	CDR1 VH1A всех MOR03471
7	CDR2 VH1A 3781, 3790, CNT0888
8	CDR2 VH1A 3899
9	CDR3 VH1A всех MOR03471
10	CDR1 VH3 всех MOR03548
11	CDR2 VH3 3744, 3747
12	CDR3 VH3 всех MOR03548
13	CDR1 каппа3 всех MOR03471
14	CDR2 каппа3 всех MOR03471
15	CDR3 каппа3 3781
16	CDR3 каппа3 3790, CNT0888
17	CDR3 каппа3 3899
18	CDR1 лямбда3 всех MOR03548
19	CDR2 лямбда3 всех MOR03548
20	CDR3 лямбда3 3744
21	CDR3 лямбда3 3747
22	Варианты CDR2 VH1A
23	Варианты CDR2 VH3
24	Варианты CDR3 легкой цепи κ
25	Варианты CDR3 легкой цепи λ
26	Варианты CDR1 тяжелой цепи
27	Вариабельная область тяжелой цепи CNT0888
28	Вариабельная область легкой цепи CNT0888

## Подробное описание изобретения

Настоящим изобретением обеспечивается по меньшей мере одно очищенное, выделенное, рекомбинантное и/или синтетическое антитело против MCP-1, являющееся антителом человека, примата, грызуна, млекопитающего, химерным, гуманизированным, полученным методами инженерии и/или CDR-привитым, и MCP-1-антиидиотипическое антитело против него, а также композиции и кодирующие молекулы нуклеиновых кислот, включающие по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере одно антитело против MCP-1 или антиидиотипическое антитело. Кроме того, настоящее

изобретение включает, но не ограничивается перечисленными, способы получения и применения таких нуклеиновых кислот и антител, и антиидиотипических антител, в том числе диагностические и терапевтические композиции, способы и устройства.

Ссылки: Все публикации или патенты, на которые здесь ссылаются, полностью включены сюда посредством ссылки, поскольку они показывают уровень техники во время создания согласно изобретению и/или обеспечивают описание и осуществление согласно изобретению. Публикации относятся к любым научным или патентным публикациям или любой другой информации, находящейся в любой форме носителя, в том числе все записанные на пленку, электронные или напечатанные формы. Следующие ссылки полностью включены сюда посредством ссылки: Ausubel, et al., ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2004); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, *Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2004); Colligan, et al., *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, NY (1987-2004). Сокращения Aa: аминокислота; BSA: бычий сывороточный альбумин; CDR: определяющие комплементарность участки; ECL: электрохемилюминесценция; HuCAL®: комбинаторная библиотека антител человека; HSA: сывороточный альбумин человека; MCP-1: моноцитарный хемоаттрактантный белок-1; Ig: иммуноглобулин; IPTG: изопропил-β-D-тиогалактозид; mAb: моноклональное антитело; PBS: забуференный фосфатом раствор, pH 7,4; SET: титрование до равновесия в растворе; VH: переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина; VL: переменная область легкой цепи иммуноглобулина.

### Определения

Используемые здесь термины "антитело против CCL2", "антитело против MCP-1", "часть антитела против MCP-1" или "фрагмент антитела против MCP-1" и/или вариант антитела против MCP-1" и т.п. включают любые содержащие белок или пептид молекулы, которые включают по меньшей мере часть молекулы иммуноглобулина, такую как, без ограничения, по меньшей мере один определяющий комплементарность участок (CDR) тяжелой или легкой цепи или его лигандсвязывающую часть, переменная область тяжелой цепи или легкой цепи, константная область тяжелой цепи или легкой цепи, каркасная область или любая их часть, или по меньшей мере одну часть рецептора MCP-1 или MCP-1-связывающего белка, которая может быть включена в антитело согласно изобретению. Такое антитело необязательно, кроме того, действует на специфический лиганд, например, без ограничения, такое антитело модулирует, уменьшает, увеличивает, действует в качестве антагониста или агониста, смягчает, облегчает, блокирует, ингибирует, отменяет и/или мешает по меньшей мере одной активности или связыванию MCP-1 или активности рецептора MCP-1 или связыванию с таким рецептором *in vitro*, *in situ* и/или *in vivo*. Неограничивающим примером является подходящее антитело против MCP-1, специфическая часть или вариант согласно изобретению, которые могут связываться с по меньшей мере одним MCP-1 или его точно определенными частями, вариантами или доменами.

Используемый здесь термин "эпитоп" означает сегмент или образование белка, способное специфически связываться с антителом. Эпитопы обычно состоят из химически активных поверхностных группировок молекул, таких как аминокислоты или сахарные боковые цепи, и, как правило, имеют специфические свойства трехмерной структуры, а также специфические зарядные характеристики. Конформационные и неконформационные эпитопы отличаются тем, что в присутствии денатурирующих растворов связывание с конформационным эпитопом, в отличие от неконформационного эпитопа, не происходит. Включаются эпитопы белка, являющиеся результатом конформационной укладки молекулы MCP-1, происходящей, когда аминокислоты различных частей линейной последовательности молекулы MCP-1 близко собираются вместе в трехмерном пространстве.

Под "MCP-1" подразумевается последовательность из 76 аминокислот, на которую имеется ссылка в NCBI под номером официального доступа NP\_002973 и которая известна под разными именами: MCP (моноцитарный хемотаксический белок), SMC-CF (хемотаксический фактор гладкомышечных клеток), LDCF (происходящий из лимфоцитов хемотаксический фактор), GDCF (происходящий из глиомы моноцитарный хемотаксический фактор), TDCF (происходящие из опухоли хемотаксические факторы), HC11 (цитокин-11 человека), MCAF (моноцитарный хемотаксический и активирующий фактор). SCYA2 является обозначением гена, гена JE на хромосоме-17 человека, а новым обозначением является CCL2 (Zlotnik, Yoshie 2000. *Immunity* 12: 121-127). JE является мышинным гомологом MCP-1/CCL2 человека.

Используемый здесь термин "антитело человека" относится к антителу, в котором по существу каждая часть белка (например, CDR, каркасная область, домены C<sub>L</sub>, C<sub>H</sub> (например, C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2, C<sub>H</sub>3), шарнирная область (V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>)) является результатом событий рекомбинации последовательностей генов иммуноглобулинов зародышевой линии человека или происходит из последовательностей зрелых антител человека. Помимо выделения из людей такие антитела человека можно получить иммунизацией трансгенных мышей, способных индуцировать иммунный ответ на гены иммуноглобулинов зародышевой линии человека (Lonberg et al., *Int Rev Immunol* 13(1): 65-93 (1995) and Fishwall et al., *Nat Biotechnol* 14(7): 845-851 (1996)), или отобрать из библиотеки спектра антител человека, такой как та, которая здесь описана. Источник таких последовательностей генов человека можно найти в любой пригодной библиотеке, такой



как VBASE, базе данных генов антител человека (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc>) или их транслированных продуктов или на сайте <http://people.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/>, на котором приводятся антитела человека, классифицированные в группы на основе сходств их аминокислотных последовательностей. В пределах данного определения находятся комбинированные антитела или функциональные фрагменты комбинированных антител человека, которые включают каркасные области из одной или нескольких последовательностей антител человека и CDR-участки из двух различных источников, являющихся человеком или не являющихся им. В рамки определения "антитело человека" входит комбинированное антитело или функциональный фрагмент комбинированного антитела человека, который содержит каркасные области из последовательностей и антител человека зародышевой линии, и реаранжированных антител человека и CDR-участки антител из двух различных источников. Комбинированное антитело человека или функциональный фрагмент комбинированного антитела человека в соответствии с настоящим описанием включает каркасные области из одной или нескольких последовательностей антител человека и CDR-участки, происходящие из последовательностей антител человека или не являющихся человеком видов, или могут быть полностью синтетическими. Следовательно, антитело человека отличается от химерного или гуманизированного антитела. Подчеркивается, что антитело человека можно получить при использовании не являющегося человеком животного или прокариотической или эукариотической клетки, которые способны экспрессировать функционально реаранжированные гены иммуноглобулинов человека (например, тяжелой цепи и/или легкой цепи). Кроме того, когда антитело человека является одноцепочечным, оно может содержать линкерный пептид, который не обнаруживается у встречающихся в природе антител человека. Например,  $F_v$  может включать в себя линкерный пептид, как, например, от двух до приблизительно восьми остатков глицина или других аминокислот, который соединяет переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи. Считается, что такие линкерные пептиды происходят из человека.

"Гуманизированные" формы антител не являющихся человеком видов (например, крысиных антител) являются химерными антителами, которые имеют в значительной степени замененные части последовательностей, происходящие из иммуноглобулинов не являющихся человеком видов. Большей частью гуманизированные антитела являются иммуноглобулинами человека (реципиентное антитело), в которых остатки CDR (определяющих комплементарность участков, также известных в качестве гипервариабельных участков) заменяют остатками CDR от не являющихся человеком видов (донорское антитело), таких как мышь, крыса, кролик или не являющийся человеком примат, имеющих желаемые специфичность, аффинность и способность. В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) иммуноглобулина человека заменяют соответствующими остатками не являющихся человеком видов. Более того, гуманизированные антитела могут включать в себя остатки, которые не обнаруживаются в реципиентном антителе или донорском антителе. Эти модификации осуществляют для дальнейшего усовершенствования характеристики антитела. Как правило, гуманизированное антитело включает по существу все из по меньшей мере одного, а обычно двух переменных доменов, в которых все или по существу все гипервариабельные участки соответствуют гипервариабельным участкам иммуноглобулина не являющегося человеком вида, и все или по существу все FR являются FR последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело необязательно также включает по меньшей мере часть константной области ( $F_c$ ) иммуноглобулина, обычно  $F_c$  иммуноглобулина IgG человека. Для получения дополнительных деталей смотри Jones et al., *Nature* 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988); and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992).

Используемый здесь  $K_d$ -антитела относится к константе диссоциации,  $K_D$ , антитела, специфичного в отношении заранее определенного антигена, и представляет собой меру аффинности антитела к специфической мишени. Антитела с высокой аффинностью к заранее определенному антигену имеют  $K_D$ , составляющую  $10^{-8}$  М или меньше, более предпочтительно  $10^{-9}$  М или меньше и даже более предпочтительно  $10^{-10}$  М или меньше. Подразумевается, что используемые здесь термины " $K_{dis}$ " или " $K_D$ " или " $K_d$ " относятся к скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. " $K_D$ " представляет собой отношение скорости диссоциации ( $k_2$ ), также называемой скоростью высвобождения ( $k_{off}$ ), к скорости ассоциации ( $k_1$ ) или скорости связывания ( $k_{on}$ ). Таким образом,  $K_D$  равняется  $k_2/k_1$  или ( $k_{off}/k_{on}$ ) и выражается в молярной концентрации (М). Следовательно, чем меньше  $K_D$ , тем сильнее связывание. Значит  $K_D$ , составляющая  $10^{-6}$  М (или 1 мкМ), указывает на более слабое связывание по сравнению с  $10^{-9}$  М (или 1 нМ).

Используемые здесь термины "специфичность в отношении" и "специфическое связывание" и "связывается специфически" относятся к связыванию антитела с заранее определенным антигеном с большей аффинностью, чем с другими антигенами или белками. Как правило, антитело связывается с константой диссоциации ( $K_D$ ), составляющей  $10^{-7}$  М или меньше, и связывается с заранее определенным антигеном с  $K_D$ , которая по меньшей мере на два порядка меньше  $K_D$  при связывании с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином или любым другим определенным полипептидом), отличающимся от заранее определенного антигена. Фразы "узнающее антиген антитело" и "специфичное в отношении антигена антитело" используются здесь взаимозаменяемо с термином "антитело, которое специфически связывается с антигеном" или "антиген-специфичное антитело", например, MCP-1-специфичное антитело.

### 1. Получение антител согласно изобретению

Получение антител человека, которые специфичны в отношении белка МСР-1 человека или его фрагмента, такого как выделенный белок МСР-1 или его фрагмент (в том числе такие синтетические молекулы как синтетические пептиды), можно осуществить с использованием любого подходящего метода, известного в данной области. Антитела человека можно продуцировать с использованием различных методов, известных в данной области. В одном варианте осуществления согласно изобретению антитела человека отбирают из библиотеки фагов, экспрессирующих антитела человека (Vaughan et al. *Nature Biotechnology* 14: 309-314 (1996); Sheets et al. *PITAS (USA)* 95: 6157-6162 (1998); Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks et al. *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991)).

Антитела человека можно также создать путем введения локусов иммуноглобулинов человека в трансгенных животных, например, мышей, в которых эндогенные гены иммуноглобулинов частично или полностью инактивированы. Например, трансгенную мышь, содержащую функционально реаранжированный трансген тяжелой цепи иммуноглобулина человека и трансген, содержащий ДНК из локуса легкой цепи иммуноглобулина человека, который можно подвергнуть реаранжировке, можно иммунизировать МСР-1 человека или его фрагментом для индуцирования продукции антител. Если требуется, продуцирующие антитела клетки можно выделить, а гибридомы или другие иммортализованные продуцирующие антитела клетки можно приготовить, как описано здесь и/или известно в данной области. В альтернативном случае антитело, точно определенную часть или вариант можно экспрессировать, используя кодирующую нуклеиновую кислоту или ее часть, в подходящей клетке-хозяине.

При стимулировании соответствующим антигеном наблюдают продукцию антител человека, которая близко напоминает наблюдаемую у людей продукцию во всех отношениях, в том числе реаранжировки генов, сборки и спектра антител. Этот подход описывается, например, в патентах США №№ 5545807, 5545806, 5569825, 5625126, 5633425, 5661016 и в следующих научных публикациях: Marks et al., *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-13 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14: 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996); Lonberg and Huezar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995). В альтернативном случае антитело человека можно получить через иммортализацию В-лимфоцитов человека, продуцирующих антитело, направленное против целевого антигена, (такие В-лимфоциты можно выделить из индивидуума, или они могут быть сенсибилизированы *in vitro*. См., например, Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., *J. Immunol.*, 147 (1): 86-95 (1991); и патент США № 5750373. Продуцирующие антитела клетки можно также получить из периферической крови или, предпочтительно, селезенки или лимфатических узлов человека или других подходящих животных, иммунизированных представляющим интерес антигеном. Можно также использовать любую другую подходящую клетку-хозяина для экспрессии гетерологичной или эндогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело, его точно определенный фрагмент или вариант согласно изобретению. Слитые клетки (гибридомы) или рекомбинантные клетки можно выделить, используя селективные условия культивирования или другие подходящие известные способы, и клонировать с помощью предельного разведения или сортировки клеток, или других известных способов. Клетки, продуцирующие антитела требуемой специфичности, можно отобрать с помощью подходящего анализа (например, ELISA - твердофазного иммуноферментного анализа).

При одном подходе гибридому получают слиянием подходящей бессмертной клеточной линии (например, линии клеток миеломы, такой как, без ограничения, Sp2/0, Sp2/0-AG14, NSO, NS1, NS2, AE-1, L.5.243, P3X63Ag8.653, Sp2 SA3, Sp2 MAI, Sp2 SS1, Sp2 SA5, U937, MLA 144, ACT IV, MOLT4, DA-1, JURKAT, WENI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMAIWA, NEURO 2A или т.п., или гетеромиелом, продуктов их слияния, или любой клетки или происходящей из нее слитой клетки, или любой подходящей клеточной линии, известной в данной области, см., например, [www.atcc.org](http://www.atcc.org), [www.lifetech.com](http://www.lifetech.com) и т.п.) с продуцирующими антитело клетками, такими как, без ограничения, выделенные или клонированные клетки селезенки, периферической крови, лимфы, миндалин или другие иммунные или содержащие В-клетки клетки, или любыми другими клетками, экспрессирующими последовательности CDR или каркасных областей, или константных или переменных областей тяжелой или легкой цепей в виде эндогенной или гетерологичной нуклеиновой кислоты, в виде рекомбинантной или эндогенной ДНК, ДНК вируса, бактерии, водоросли, земноводного, насекомого, пресмыкающегося, рыбы, млекопитающего, грызуна, лошади, овцы, козы, барана, примата, прокариотической, эукариотической, геномной ДНК, кДНК, рДНК, митохондриальной ДНК или РНК, хлоропластной ДНК или РНК, чнРНК, мРНК, тРНК, одно-, двух- или трехцепочечной, гибридизующейся и т.п. или любых их комбинаций. См., например, Ausubel, выше, и Colligan, *Immunology*, выше, глава 2, полностью включенные сюда посредством ссылки.

Антитела человека, которые связываются с МСР-1 человека и включают установленную переменную область тяжелой или легкой цепи, можно получить с использованием подходящих способов, таких как фаговый дисплей (Katsube, Y., et al., *Int. J. Mol. Med.*, 1(5): 863-868 (1998)). Можно использовать другие подходящие способы получения или выделения антител требуемой специфичности, включающие, но не ограничивающиеся перечисленными, способы, с помощью которых отбирают рекомбинантное анти-

тело из пептидной или белковой библиотеки (например, без ограничения, библиотеки бактериофагов, рибосом, олигонуклеотидов, РНК, кДНК и т.п., библиотеки в виде дисплея, например, имеющихся у Cambridge Antibody Technologies, Cambridgeshire, UK; MorphoSys, Martinsreid/Planegg, DE; Biovation, Aberdeen, Scotland, UK; BioInvent, Lund, Sweden; Dyax Corp., Enzon, Affymax/Biosite; Xoma, Berkeley, CA; Ixsys. см., например, EP 368684, PCT/GB91/01134; PCT/GB92/01755; PCT/GB92/002240; PCT/GB92/00883; PCT/GB93/00605; US 08/350260 (5/12/94); PCT/GB94/01422; PCT/GB94/02662; PCT/GB97/01835; (CAT/MRC); WO90/14443; WO90/14424; WO90/14430; PCT/US94/1234; WO92/18619; WO96/07754; (Scripps); WO96/13583; WO97/08320 (MorphoSys); WO95/16027 (BioInvent); WO88/06630; WO90/3809 (Dyax); US 4704692 (Enzon); PCT/US91/02989 (Affymax); WO89/06283; EP 371998; EP 550400; (Xoma); EP 229046; PCT/US91/07149 (Ixsys); или стохастически образованные пептиды или белки (US 5723323, 5763192, 5814476, 5817484, 5824514, 5976862, WO 86/05803, EP 590689 (Ixsys, в настоящее время Applied Molecular Evolution (AME)), все из которых полностью включены сюда посредством ссылки), или методы, основанные на иммунизации трансгенных животных (например, мышей SCID, Nguyen et al., Microbiol. Immunol. 41: 901-907 (1997); Sandhu et al., Crit. Rev. Biotechnol. 16: 95-118 (1996); Eren et al., Immunol. 93: 154-161 (1998), все из которых полностью включены посредством ссылки).

### Конкретный вариант осуществления

Авторы согласно изобретению привели в качестве примера способ отбора и получения антител человека с требуемой аффинностью, специфичностью и биологической активностью в отношении к МСР-1 человека, начинающийся с Fab-библиотеки в виде фагового дисплея. В итоге скринировали 17856 клонов из всех 10 пэннингов, что привело к выделению 1104 первично положительных клонов и, в конце концов, к 26 уникальным Fab.

Для обеспечения уникального лиганда, который служил примером антигена, сохраняющего способность связываться со встречающимися в природе рецепторами МСР-1, химически синтезировали МСР-1 человека и его аналоги или "мутеины", и их модифицировали для специфического использования при отборе, для анализов аффинности и биологических анализов. МСР-1 Ile<sup>41</sup> человека и МСР-1 Tyr<sup>43</sup> человека использовали в исходном твердофазном пэннинге, а также при других видах отбора антител и анализах созревания аффинности, и они описаны здесь, а также биотинилированные варианты мутеина МСР-1: Ile<sup>41</sup>, Lys(биотин-PEG<sub>4</sub>)<sup>69</sup> и Ile<sup>41</sup>, Lys(биотин-PEG<sub>4</sub>)<sup>75</sup> (SEQ ID NO: 1).

Поскольку ни один из 26 уникальных Fab не имел аффинности, соответствующей K<sub>D</sub> < 0,5 нМ, или требуемых значений IC<sub>50</sub> в определенных биологических исследованиях, было необходимо созревание. Кандидатов на созревание аффинности отбирали в виде Fab, а соответствующие IgG анализировали параллельно процессу созревания. Критериями отбора являлись (1) активность в анализе связывания с рецептором целой клетки, (2) активность в анализе мобилизации кальция, (3) аффинность к МСР-1 человека, (4) специфичность в отношении МСР-1 человека и (5) аффинность к МСР-1 яванской макаки и связывание со встречающимся в природе

#### МСР-1.

Измерения аффинности в Bioscra методом захвата Fab белком МСР-1 в растворе работали хорошо в отношении распределения кандидатов на созревание, и аффинности находились в диапазоне от 49 до 406 нМ. Наилучший родительский Fab продемонстрировал аффинность, составляющую 50 нМ, что указывает на то, что аффинность необходимо оптимизировать на по меньшей мере 100 порядков для достижения критерия успешной аффинности. Кроме того, связывание с МСР-1 яванской макаки и встречающимся у человека МСР-1 можно было определить способом захвата Fab, что было дополнительно необходимо как условие созревания. Аффинности к МСР-1 яванской макаки находились в том же диапазоне, что и в случае МСР-1 человека. Из-за возможных модификаций, например, гликозилирования, продемонстрировали, что антитела не только узнают синтетический или рекомбинантный МСР-1, но также и встречающийся в природе МСР-1, который эндогенно экспрессировали и очистили из супернатанта клеток PANC-1 человека.

Специфичность в отношении МСР-1 измеряли способом захвата антител в Bioscra, добавляя 100 нМ каждого хемокина и определяя сигнал связывания. Большинство Fab-кандидатов на созревание были специфическими, в то время как два из них продемонстрировали перекрестную реактивность с гомологичными хемокинами.

Очень важной особенностью Fab была нейтрализующая активность, и поставили несколько различных исследований для анализа этой активности. Анализ связывания <sup>125</sup>I-МСР-1 с клетками Thr-1 был наиболее чувствительным анализом, который особенно важен после оптимизации. Родительские Fab продемонстрировали значения IC<sub>50</sub> от 10 до 650 нМ. Помимо анализа связывания меченного радиоактивными изотопами лиганда спланировали другие вторичные биологические анализы, удостоверяющие нейтрализующую активность на различных уровнях пути передачи сигнала от МСР-1 в прямом направлении.

Аттракция моноцитов является одной из основных функций МСР-1, но наиболее вероятно вследствие потери активности, совместно очищаемых факторов или эндотоксина родительские Fab не работали в анализе хемотаксиса, и поэтому решили проверять только соответствующие IgG1, вместо того, чтобы пытаться заставить работать в этом анализе Fab. Другим результатом передачи сигнала в прямом направ-

лении является высвобождение в цитоплазму кальция. Действительно все Fab, которые продемонстрировали нейтрализующую активность в анализе связывания меченного радиоактивными изотопами лиганда, ингибировали индуцируемую MCP-1 мобилизацию кальция в клетках Thp-1 с  $IC_{50}$  в диапазоне от 0,1 до 3 мкМ. Следовало показать, что биологическая активность родительских Fab полностью сохраняется после превращения в форму IgG. Как и ожидалось, все соответствующие IgG продемонстрировали активность в анализе связывания меченного радиоактивными изотопами лиганда, анализе мобилизации кальция и даже в анализе хемотаксиса, что, в конце концов, удостоверяет, что все IgG сохраняли активности, наблюдаемые для Fab-форм, и даже ингибировали индуцируемый MCP-1 хемотаксис.

Для созревания аффинности отобрали в соответствии с их свойствами семь различных Fab с  $K_D$  в диапазоне 10-400 нМ и значениями  $IC_{50}$  в диапазоне 10-650 нМ в анализе связывания меченного радиоактивными изотопами лиганда. Впоследствии их сгруппировали в 3 группы для клонирования в виде библиотеки и последующего отбора. Параллельно проводили оптимизацию в отношении L-CDR3 и H-CDR2. Создали библиотеки высокого качества. В процессе отбора использовали пэннинг в растворе, и строгость отбора увеличивали с помощью уменьшения антигена, отбора скорости диссоциации и очень продолжительных стадий промывок. Для следующего процесса скрининга использовали скрининг BioVeris, делающий возможным высокомасштабное распределение оптимизированных связующих веществ. Для идентификации улучшенных связующих веществ скрининг работал очень эффективно. Кроме того, можно было идентифицировать оптимизированные в отношении L-CDR3 и H-CDR2 Fab, что делало возможным перекрестное клонирование производных MOR03471 и MOR03548. Особенно успешным было перекрестное клонирование производных MOR03471, что послужило введением дальнейшего улучшения на 100 порядков аффинности по сравнению с двумя оптимизированными начальными Fab. Из 17 оптимизированных Fab 16 отобрали для детальной характеристики, и, в конце концов, 4 связующих вещества, которые удовлетворяли всем критериям успеха, происходящие из родительского MOR03471, два из которых были оптимизированы в отношении только L-CDR3, а два других явились результатом перекрестного клонирования. Анализы кандидатов со зрелой аффинностью и последовательности представлены в деталях в примерах 3 и 4, табл. 4-6 и SEQ ID NO: 2-28.

После созревания было невозможно проанализировать в Biacore аффинность оптимизированных связующих веществ, главным образом поскольку достигли порогов обнаружения. В MorphoSys использовали очень чувствительный способ определения  $K_D$ , представляющий собой титрование до равновесия в растворе (SET) в сочетании с методом BioVeris. Константы моновалентной диссоциации можно было рассчитать с помощью моделей соответствующих подгонок для Fab и IgG. Помимо измерения аффинности этот способ использовали для исследований перекрестной реактивности. Аффинности конечных кандидатов к MCP-1 человека и яванской макаки, измеренные в BioVeris и подтвержденные с помощью KinexA в Centocor, находились в диапазоне от 10 до 320 пМ. Проверка специфичности с использованием BioVeris показала отсутствие перекрестной реактивности с MCP-2 человека у всех проверенных 16 Fab и IgG. Несколько Fab и IgG также продемонстрировали отсутствие значительной перекрестной реактивности с эотаксином человека. В соответствии с критерием успеха критерий специфичности определяли в виде отсутствия связывания с гомологом MCP-2, 3, 4 при 100 нМ и эотаксином 1, 2 и 3 при 100 нМ в способе захвата антител Biacore. В способе захвата Fab Biacore все отобранные Fab продемонстрировали различную степень перекрестной реактивности с MCP-2 и эотаксином. Неспецифическому связыванию могли способствовать предполагаемая немного увеличенная нестабильность Fab по сравнению IgG и общая способность к неспецифическому связыванию хемокинов. Некоторые из отобранных IgG не продемонстрировали значительного сигнала связывания с хемокинами-гомологами и удовлетворили критериям успешной специфичности в способе захвата IgG Biacore. В экспериментах титрования до равновесия в растворе с использованием BioVeris даже некоторые Fab не продемонстрировали перекрестной реактивности. Для анализа того, преобразуется ли активность связывания Fab с MCP-2, определяемая в Biacore, в нейтрализующую активность, в Centocor разработали анализы связывания меченного радиоактивными изотопами лиганда с целыми клетками. Проверенные в этом анализе Fab не продемонстрировали значительного ингибирования связывания  $^{125}I$ -меченного MCP-2 с рецептором CCR2 на клетках Thp-1 ( $IC_{50} \geq 2$  мкМ).

Из-за низкого требуемого количества MCP-1, составляющего 1 нг/мл, анализ связывания меченного радиоактивными изотопами лиганда являлся наиболее чувствительным анализом в этом проекте с определяемым в анализе предельным значением  $IC_{50}$ , составляющим приблизительно 100 пМ для Fab и даже 20 пМ для IgG. Помимо аффинности активность в этом анализе использовали для распределения и отбора оптимизированных связующих веществ с целью детальной характеристики. Коэффициент общего улучшения активности во время оптимизации составлял до 1000х, и в конце один происходящий из MOR03471 Fab, MOR03878, продемонстрировал наибольшую аффинность при 100 пМ. Все проверенные IgG сохраняли активность в анализе связывания меченного радиоактивными изотопами лиганда. Значения  $IC_{50}$  4 конечных IgG-кандидатов MOR03781, MOR03790, MOR03850 и MOR03878 находились в диапазоне 20-50 пМ и были даже немного лучше по сравнению с соответствующими активностями Fab. Одной из причин улучшенной активности является то, что бивалентные IgG нейтрализуют два MCP-1 на молекулу (коэффициент 2х). IgG являлись результатом чистой высокомасштабной продукции, и, следо-

вательно, другой причиной могла служить чистота, стабильность или активность антител. В качестве вторичного биологического анализа успешно разработали основанный на FACS (клеточном сортере с возбуждением флуоресценции) анализ, в котором измеряется ингибирование индуцируемой MCP-1 интернализации рецептора CCR2. В конце концов, этот анализ сделал даже возможным определение  $IC_{50}$  и распределение. Значения  $IC_{50}$  4 конечных Fab-кандидатов, MOR03790, MOR03850, MOR03781 и MOR03878, находились в диапазоне 3-5 нМ.

Требовался встречающийся в природе MCP-1 для подтверждения активности антител против MCP-1, выделенных с использованием синтетических или рекомбинантных MCP-1. Встречающийся в природе MCP-1 очищали из супернатанта PANC1 и использовали для индукции высвобождения кальция. Оптимизированные Fab продемонстрировали ингибирование индуцируемой встречающимся в природе MCP-1 мобилизации кальция с более высокой активностью по сравнению с эталонным антителом C775. Все происходящие из MOR03548 предварительно отобранные Fab полностью ингибировали связывание C775 с MCP-1 в конкурентном ELISA (твердофазном иммуноферментном анализе). Все происходящие из MOR03471 предварительно отобранные Fab продемонстрировали частичную (~60%) конкуренцию в ELISA, что указывает на то, что эпитопы являются по меньшей мере перекрывающимися. Наконец, четыре антитела, MOR03781, MOR03790, MOR03850 и MOR03878, удовлетворили всем критериям успеха, в том числе критерию специфичности и нейтрализации встречающегося в природе MCP-1.

#### **Другие подходящие методы получения антител**

Другие методы получения антител согласно изобретению, способные продуцировать спектр антител человека, известны в данной области и/или описаны здесь. Такие методы включают, но не ограничиваются перечисленными, рибосомный дисплей (Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 4937-4942 (May 1997); Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 14130-14135 (Nov. 1998)); методы продуцирования антител одной клеткой (например, метод антител отобранного лимфоцита ("SLAM")(патент США № 5627052, Wen et al., J. Immunol. 17: 887-892 (1987); Babcook et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7843-7848 (1996)); микрокапелька в геле и проточная цитометрия (Powell et al., Biotechnol. 8: 333-337 (1990)); системы одной клетки, Cambridge, MA; Gray et al., J. Imm. Meth. 182: 155-163 (1995); Kenny et al., Bio/Technol. 13: 787-790 (1995)); отбор В-клетки (Steenbakkers et al., Molec. Biol. Reports 19: 125-134 (1994); Jonak et al., Progress Biotech, vol. 5, in Vitro Immunization in Hybridoma Technology, Borrebaeck, ed., Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Netherland (1998)).

Методы инженерии или гуманизации антител не являющихся человеком видов или человека также можно использовать, и они хорошо известны в данной области. Как правило, гуманизированное или полученное методами инженерии антитело имеет один или несколько аминокислотных остатков из источника, который не является человеком, например, без ограничения, мыши, крысы, кролика, не являющегося человеком примата или другого млекопитающего. На эти аминокислотные остатки человека часто ссылаются как на "импортные" остатки, которые обычно происходят из "импортного" переменного, константного или другого домена известной последовательности человека. Последовательности известных Ig человека хорошо известны в данной области и могут быть любой известной последовательностью. Разработаны различные стратегии оптимизации связывания, конформации и уменьшенной иммуногенности полученных методами инженерии гуманизированных антител. См., например, Presta et al. J. Immunol. 151: 2623-2632, 1993; WO200302019 и WO2005080432.

Такие импортируемые последовательности можно использовать для уменьшения иммуногенности или уменьшения, увеличения или модификации связывания, аффинности, скорости ассоциации, скорости диссоциации, авидности, специфичности, времени полужизни или любого другого подходящего свойства, известного в данной области. Как правило, сохраняют часть или все последовательности CDR не являющихся человеком видов или человека, в то время как последовательности переменных и константных областей не являющихся человеком видов заменяют аминокислотами человека или другими аминокислотами. Антитела можно также необязательно гуманизировать с сохранением высокой аффинности к антигену и других благоприятных биологических свойств. Для достижения этой цели гуманизированные антитела можно необязательно получить в процессе анализа родительских последовательностей и различных умозрительных гуманизированных продуктов с использованием моделей в трехмерном пространстве родительских и гуманизированных последовательностей. Модели иммуноглобулинов в трехмерном пространстве обычно доступны и знакомы квалифицированным в данной области специалистам. Имеются компьютерные программы, иллюстрирующие и отображающие возможные трехмерные конформационные структуры последовательностей отобранных иммуноглобулинов-кандидатов. Изучение этих отображений позволяет анализировать вероятную роль остатков в функционировании последовательности иммуноглобулина-кандидата, т.е. анализировать остатки, влияющие на способность иммуноглобулина-кандидата связываться со своим антигеном. Таким способом остатки FR можно отобрать и скомбинировать из консенсусной и импортной последовательностей так, чтобы достичь требуемых свойств антитела, например увеличенной аффинности к целевому(ым) антигену(ам). Как правило, остатки CDR напрямую и наиболее существенно оказывают влияние на связывание с антигеном. Гуманизацию или получение методами инженерии антител согласно изобретению можно осуществить с использованием любого известного метода, такого как, без ограничения, те, которые описаны у Winter (Jones et

al., Nature 321: 522 (1986); Riechmann et al., Nature 332: 323 (1998); Verhoeyen et al., Science 239: 1534 (1988)); Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901 (1987); Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151: 2623 (1993), патенты США №№ 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5766886, 5714352, 6204023, 6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539, 4816567, PCT/: US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755, WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 22924 6, все из которых полностью включены сюда посредством ссылки, в том числе процитированные в них ссылки.

Трансгенных мышей, продуцирующих спектр антител человека, связывающихся с антигенами человека, можно получить с помощью известных способов (например, без ограничения, патенты США №№ 5770428, 5569825, 5545806, 5625126, 5625825, 5633425, 5661016 и 5789650, выданные Lonberg et al.; Jakobovits et al. WO98/50433, Jakobovits et al. WO98/24893, Lonberg et al. WO98/24884, Lonberg et al. WO97/13852, Lonberg et al. WO94/25585, Kucherlapate et al. WO96/34096, Kucherlapate et al. EP 0463151 B1, Kucherlapate et al. EP 0710719 A1, Suram et al. патент США № 5545807, Bruggemann et al. WO 90/04036, Bruggemann et al. EP 0438474 B1, Lonberg et al. EP 0814259 A2, Lonberg et al. GB 2272440 A, Lonberg et al. Nature 368: 856-859 (1994), Taylor et al., Int. Immunol. 6(4) 579-591 (1994), Green et al, Nature Genetics 7: 13-21 (1994), Mendez et al., Nature Genetics 15: 146-156 (1997), Taylor et al., Nucleic Acids Research 20(23): 6287-6295 (1992), Tuailon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(8) 3720-3724 (1993), Lonberg et al. Int. Rev. Immunol. 13(1): 65-93 (1995) и Fishwald et al., Nat. Biotechnol. 14(7): 845-851 (1996), все из которых полностью включены сюда посредством ссылки). Как правило, эти мыши содержат по меньшей мере один трансген, включающий в себя ДНК из по меньшей мере одного иммуноглобулинового локуса человека, который функционально реаранжирован или который может подвергнуться функциональной реаранжировке. Эндогенный иммуноглобулиновый locus у таких мышей может быть разрушен или делетирован для исключения способности животного продуцировать антитела, кодируемые эндогенными генами.

Скрининг антител в отношении специфического связывания со схожими белками или фрагментами можно подходящим образом выполнить с использованием библиотек в виде пептидного дисплея. Этот метод включает скрининг больших коллекций пептидов в отношении индивидуальных членов, имеющих требуемую функцию или структуру. Скрининг антител в библиотеках в виде пептидного дисплея хорошо известен в данной области. Длины последовательностей пептидов в библиотеке в виде дисплея могут составлять от 3 до 5000 или более аминокислот, зачастую от 5 до 100 аминокислот и часто от 8 до 25 аминокислот. Помимо методов прямого химического синтеза для генерирования пептидных библиотек описаны несколько методов рекомбинантных ДНК. Один из типов включает дисплей пептидной последовательности на поверхности бактериофага или клетки. Каждый бактериофаг или клетка содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность конкретного пептида в библиотеке в виде дисплея. Такие методы описаны в PCT-заявках на патенты №№ 91/17271, 91/18980, 91/19818 и 93/08278. Другие системы генерирования пептидных библиотек имеют аспекты и метода химического синтеза, и рекомбинантного метода. См., в PCT-заявки на патенты №№ 92/05258, 92/14843 и 96/19256. См. также патенты США №№ 5658754 и 5643768. Библиотеки в виде пептидного дисплея, векторы и наборы для скрининга коммерчески доступны от таких поставщиков, как Invitrogen (Carlsbad, CA) и Cambridge antibody Technologies (Cambridgeshire, UK). См., например, патенты США №№ 4704692, 4939666, 4946778, 5260203, 5455030, 5518889, 5534621, 5656730, 5763733, 5767260, 5856456, переуступленные Enzon; 5223409, 5403484, 5571698, 5837500, переуступленные Dyax; 5427908, 5580717, переуступленные Affymax; 5885793, переуступленный Cambridge antibody Technologies; 5750373, переуступленный Genentech; 5618920, 5595898, 5576195, 5698435, 5693493, 5698417, переуступленные Xoma, Colligan, выше; Ausubel, выше; или Sambrook, выше, все из вышеуказанных патентов и публикаций полностью включены сюда посредством ссылки.

## 2. Нуклеиновые кислоты согласно изобретению

Используя представленную здесь информацию, например, нуклеотидные последовательности, кодирующие по меньшей мере 70-100% смежных аминокислот по меньшей мере одной из SEQ ID NO: 2-5 и 27-28, их точно определенные фрагменты, варианты или консенсусные последовательности, можно получить молекулы нуклеиновых кислот согласно изобретению, кодирующие по меньшей мере одно антитело против MCP-1, с помощью методов, описанных здесь или известных в данной области. Выделенные молекулы нуклеиновых кислот согласно изобретению могут включать в себя молекулы нуклеиновых кислот, содержащие открытую рамку считывания (ORF), необязательно с одним или несколькими интронами, например, без ограничения, по меньшей мере одну точно определенную часть по меньшей мере одного CDR, такого как CDR1, CDR2 и/или CDR3 по меньшей мере одной тяжелой цепи (например, SEQ ID NO: 6-12, 22 и 23) или легкой цепи (например, SEQ ID NO: 13-21 и 24-26); молекулы нуклеиновых кислот, содержащие последовательность, кодирующую антитело против MCP-1 или вариативную область (например, SEQ ID NO: 2-5, 27 и 28); и молекулы нуклеиновых кислот, содержащие нуклеотидную последовательность, которая существенно отличается от описанных выше, но которая вследствие вырожденности генетического кода все еще кодирует по меньшей мере одно антитело против MCP-1,

описанное здесь и/или известное в данной области. Генетический код, конечно, хорошо известен в данной области. Следовательно, для квалифицированного в данной области специалиста генерирование таких вариантов вырожденных нуклеиновых кислот, кодирующих специфические антитела против МСР-1 согласно изобретению, будет представлять собой рутинную процедуру. См., например, Ausubel et al., выше, и такие варианты нуклеиновых кислот включены в настоящее изобретение.

Как здесь указывается, молекулы нуклеиновых кислот согласно изобретению, которые содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело против МСР-1, могут включать в себя, не ограничиваясь перечисленными, последовательности, кодирующие аминокислотную последовательность фрагмента антитела, отдельно; последовательность, кодирующую полное антитело или его часть; последовательность, кодирующую антитело, фрагмент или часть, а также дополнительные последовательности, такие как последовательность, кодирующая по меньшей мере один сигнальный пептид или слитый белок, с вышеуказанными дополнительными кодирующими последовательностями, такими как по меньшей мере один интрон, или без них и вместе с дополнительными некодирующими последовательностями, в том числе, без ограничения, некодирующими 5'- и 3'-последовательностями, такими как транскрибируемые, нетранслируемые последовательности, играющие роль в транскрипции, процессинге мРНК, в том числе сигнальные последовательности сплайсинга и полиаденилирования (например, связывания рибосом и стабильности мРНК); дополнительную кодирующую последовательность, которая кодирует дополнительные аминокислоты, такие как те, которые обеспечивают дополнительные функциональности. Таким образом, кодирующую антитело последовательность можно слить с маркерной последовательностью, например, последовательностью, кодирующей пептид, облегчающий очистку слитого антитела, включающего фрагмент или часть антитела.

Полинуклеотиды, которые избирательно гибридизуются с описанным здесь полинуклеотидом

Настоящим изобретением обеспечиваются выделенные нуклеиновые кислоты, которые гибридизуются в условиях избирательной гибридизации с описанным здесь полинуклеотидом. Таким образом, полинуклеотиды этого варианта осуществления согласно изобретению можно использовать для выделения, обнаружения и/или количественного определения нуклеиновых кислот, включающих такие полинуклеотиды. Например, полинуклеотиды согласно изобретению можно использовать для идентификации, выделения или амплификации частичных или полноразмерных клонов в находящейся на хранении библиотеке. В некоторых вариантах осуществления согласно изобретению полинуклеотидами являются выделенные последовательности геномной ДНК или кДНК, или в противном случае комплементарные им последовательности, кДНК из библиотеки нуклеиновых кислот человека или млекопитающего.

Предпочтительно библиотека кДНК включает по меньшей мере 80% полноразмерных последовательностей, предпочтительно по меньшей мере 85 или 90% полноразмерных последовательностей, а более предпочтительно по меньшей мере 95% полноразмерных последовательностей. Библиотеку кДНК можно нормализовать для увеличения представленности редких последовательностей. Гибридизацию в условиях низкой или средней жесткости обычно, но не исключительно, используют с последовательностями, имеющими сниженную идентичность последовательностей относительно комплементарных последовательностей. Условия средней или высокой жесткости можно необязательно использовать для последовательностей с большей идентичностью. Условия низкой жесткости делают возможной избирательную гибридизацию последовательностей, идентичных приблизительно на 70%, и их можно использовать для идентификации ортологичных или паралогичных последовательностей.

Необязательно полинуклеотиды согласно изобретению кодируют по меньшей мере часть антитела, кодируемого описанными здесь полинуклеотидами. Полинуклеотиды согласно изобретению охватывают последовательности нуклеиновых кислот, которые можно использовать для избирательной гибридизации с полинуклеотидом, кодирующим антитело согласно изобретению. См., например, Ausubel, выше; Collihan, выше, все из которых полностью включены сюда посредством ссылки.

#### **Конструкция нуклеиновых кислот**

Выделенные нуклеиновые кислоты согласно изобретению можно приготовить с использованием (а) рекомбинантных методов, (б) синтетических методов, (с) методов очистки или их комбинаций, хорошо известных в данной области.

Рекомбинантные методы конструирования нуклеиновых кислот. Композиции выделенных нуклеиновых кислот согласно изобретению, например, РНК, кДНК, геномной ДНК или их комбинации, можно получить из биологических источников с использованием любого числа методологий клонирования, известных квалифицированным в данной области специалистам. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения олигонуклеотидные зонды, избирательно гибридизующиеся в жестких условиях с полинуклеотидами согласно изобретению, используют для идентификации требуемой последовательности в библиотеке кДНК или геномной ДНК. Выделение РНК и конструирование библиотек кДНК и геномной ДНК хорошо известно квалифицированным в данной области специалистам (смотри, например, Ausubel, выше; или Sambrook, выше).

Методы скрининга и выделения нуклеиновых кислот. Библиотеку кДНК и геномной ДНК можно скринировать с использованием зонда на основе последовательности полинуклеотида согласно изобретению, такого как те, которые здесь раскрыты. Зонды можно использовать для гибридизации с последо-

вательностями геномной ДНК или кДНК для выделения гомологичных генов в одном и том же организме или разных организмах. Квалифицированные в данной области специалисты принимают во внимание то, что при анализе можно использовать различные степени жесткости гибридизации; жесткой может быть или гибридизации или среда для отмывки. По мере увеличения жесткости условий гибридизации должна увеличиваться степень комплементарности между зондом и мишенью для того, чтобы имело место образование дуплекса. Степень жесткости можно контролировать с помощью одного или нескольких из следующих параметров: температуры, ионной силы, pH и присутствия частично денатурирующего раствора, такого как формамид. Например, жесткость гибридизации подходящим образом меняют с помощью изменения полярности реагентного раствора посредством, например, манипуляции с концентрацией формамида в пределах диапазона от 0 до 50%. Степень комплементарности (идентичность последовательности), требуемая для определяемого связывания, изменяется в соответствии с жесткостью среды для гибридизации и/или среды для отмывок. Оптимальная степень комплементарности составляет 100% или 70-100%, или любой диапазон или величина в пределах вышеуказанного диапазона. Однако должно быть понятно, что минорные вариации последовательности в зондах и праймерах можно компенсировать с помощью уменьшения жесткости гибридизации и/или среды для отмывок.

Методы амплификации РНК или ДНК хорошо известны в данной области, и их можно использовать в соответствии с настоящим изобретением без чрезмерного экспериментирования, основываясь на представленные здесь доктрину и руководство. Известные методы амплификации ДНК или РНК включают, но не ограничиваются перечисленными, полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и родственные способы амплификации (Mullis et al., патент США 4683202 (1987); и Innis et al., PCR Protocols A Guide to Methods and Applications, Eds., Academic Press Inc., San Diego, CA (1990)).

### **Синтетические методы конструирования нуклеиновых кислот**

Выделенные нуклеиновые кислоты согласно изобретению можно также получить с помощью прямого химического синтеза известными способами (см., например, Ausubel, et al., выше). С помощью химического синтеза обычно продуцируют одноцепочечный олигонуклеотид, который можно превратить в двухцепочечную ДНК с помощью гибридизации с комплементарной последовательностью или с помощью полимеризации с участием ДНК-полимеразы с использованием одноцепочечной последовательности в качестве матрицы. Квалифицированный в данной области специалист знает, что, несмотря на то, что химический синтез ДНК может быть ограничен последовательностями размером приблизительно 100 или более оснований, последовательности большего размера можно получить с помощью лигирования более коротких последовательностей. Об особенно предпочтительном методе химического синтеза кодирующих последовательностей говорится в патентах США №№ 6521427 и 6670127.

### **3. Векторы и экспрессирующие системы**

Настоящим изобретением обеспечиваются векторы, предпочтительно экспрессирующие векторы, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело против MCP-1, или настоящее изобретение можно использовать для получения плазмид, содержащих гены HC или LC различных антител или их части. Используемый здесь термин "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной переносить другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Одним из типов векторов является "плазмида", которая относится к двухцепочечной ДНК в виде кольца, с которой можно лигировать дополнительные ДНК-сегменты. Другим типом векторов является вирусный вектор, причем с вирусным геномом можно лигировать дополнительные ДНК-сегменты. Настоящее изобретение также относится к векторам, которые включают выделенные молекулы нуклеиновых кислот согласно изобретению, клеткам-хозяевам, полученным методами генной инженерии с использованием рекомбинантных векторов, и получению по меньшей мере одного антитела против MCP-1 с помощью рекомбинантных методов, также хорошо известных в данной области. См., например, Sambrook, et al., выше; Ausubel, et al., выше; все из которых полностью включены сюда посредством ссылки.

Для экспрессии антител или их фрагментов ДНК, кодирующие частичные или полноразмерные легкую и тяжелую цепи, можно вставить в экспрессирующие кассеты или векторы так, чтобы гены были функционально связаны с контролируемыми транскрипцию и трансляцию последовательностями. Кодирующую антитело кассету можно собрать в виде конструкции. Конструкцию можно приготовить с использованием хорошо известных в данной области способов. Конструкцию можно приготовить в виде части большей плазмиды. Такое приготовление делает возможным клонирование и отбор правильных конструкций эффективным способом. Конструкцию можно расположить между удобными рестрикционными сайтами на плазмиде или другом векторе так, чтобы их можно было легко отделить от остальных последовательностей плазмиды.

Как правило, плазмидный вектор вводят в преципитате, таком как преципитат фосфата кальция, или в комплексе с заряженным липидом DEAE-декстрана. Если вектором является вирус, его можно упаковать *in vitro* с использованием пакующей клеточной линии и затем трансдуцировать в клетки-хозяев. Введение векторной конструкции в клетку-хозяина можно также осуществить с помощью электропорации или других известных способов. Такие способы описаны в данной области, как, например, Sambrook, выше, главы 1-4 и 16-18; Ausubel, выше, главы 1, 9, 13, 15, 16.

В данном контексте подразумевается, что термин "функционально связанный" означает, что ген ан-



титела лигирован с вектором так, что контролирующие транскрипцию и трансляцию последовательности внутри вектора служат предназначенной им функции регулирования транскрипции и трансляции гена антитела. Экспрессирующий вектор и контролирующие экспрессию последовательности выбирают так, чтобы они были совместимы с используемой для экспрессии клеткой-хозяином. Ген легкой цепи антитела и ген тяжелой цепи антитела можно встроить в отдельные векторы или, более типично, оба гена встраивают в один и тот же экспрессирующий вектор. Гены антител встраивают в экспрессирующий вектор с помощью стандартных способов (например, лигирования комплементарных рестрикционных сайтов на фрагменте гена антитела и векторе или лигирования по тупым концам, если нет рестрикционных сайтов).

Вариабельные области легкой и тяжелой цепей описанных здесь антител можно использовать для создания полноразмерных генов антител любого изотипа путем встраивания их в экспрессирующие векторы, уже кодирующие константные области тяжелой цепи и константные области легкой цепи требуемого изотипа так, чтобы сегмент VH был функционально связан с сегментом(ами) CH в пределах вектора, а сегмент VL был функционально связан с сегментом(ами) CL в пределах вектора. Дополнительно или альтернативно рекомбинантный экспрессирующий вектор может кодировать сигнальный пептид, облегчающий секрецию цепи антитела из клетки-хозяина. Ген цепи антитела можно клонировать в векторе так, чтобы сигнальный пептид находился в рамке считывания с аминоконцом гена цепи антитела. Сигнальный пептид может быть сигнальным пептидом иммуноглобулина или гетерологичным сигнальным пептидом (т.е. сигнальным пептидом из не являющегося иммуноглобулином белка).

Хотя теоретически возможно экспрессировать антитела согласно изобретению или в прокариотических, или в эукариотических клетках-хозяевах, предпочтительной является экспрессия антител в эукариотических клетках, а наиболее предпочтительной - в клетках млекопитающего, поскольку такие эукариотические клетки, и особенно клетки млекопитающего, соберут и секретируют иммунологически активное антитело с правильной укладкой с большей вероятностью, чем прокариотические клетки.

Как правило, предназначенный для экспрессии в млекопитающем вектор будет содержать (1) регуляторные элементы, обычно в форме последовательностей вирусного промотора или энхансера и характеризующиеся широким диапазоном хозяев и тканей; (2) последовательность "полилинкера", облегчающую встраивание ДНК-фрагмента, который содержит кодирующую антитело последовательность, в плазмидный вектор; и (3) последовательности, ответственные за сплайсинг интронов и полиаденилирование мРНК-транскриптов. На этот смежный район промотор-полилинкер-сайт полиаденилирования обычно ссылаются как на единицу транскрипции. Вероятно, вектор будет также содержать (4) селективный(ые) маркерный(ые) ген(ы) (например, ген бета-лактамазы), часто придающий устойчивость к антибиотикам (как, например, ампициллину), что делает возможным отбор первоначальных положительных трансформатов в *E.coli*; и (5) последовательности, облегчающие репликацию вектора как в хозяине в виде бактерий, так и в хозяине в виде млекопитающего. Плазмидную область начала репликации включают для размножения экспрессирующей конструкции в *E.coli* и для временной экспрессии в клетках *Cos*, а в экспрессирующую плазмиду включают область начала репликации SV40.

Промотор можно выбрать из промотора SV40 (например, позднего и раннего промоторов SV40), промотора CMV (патенты США №№ 5168062 и 5385839), промотора tk HSV, промотора pgk (фосфоглицераткиназы), промотора EF-1 альфа (патент США № 5266491), по меньшей мере одного промотора иммуноглобулина человека.

Экспрессирующие векторы предпочтительно, но не обязательно, включают по меньшей мере один селективный маркерный ген. Такие маркерные гены включают, например, без ограничения, ген устойчивости к метотрексату (MTX), ген дигидрофолатредуктазы (DHFR, патенты США №№ 4399216, 4634665, 4656134, 4956288, 5149636, 5179017), гены устойчивости к ампициллину, неомицину (G418), микофеноловой кислоте или ген глутаминсинтетазы (GS, патенты США №№ 5122464, 5770359, 5827739) для культивирования эукариотических клеток или гены устойчивости к тетрациклину или ампициллину для культивирования *E.coli* или других бактерий, или прокариот (вышеуказанные патенты полностью включены сюда посредством ссылки). Подходящие культуральные среды и условия для описанных выше клеток-хозяев известны в данной области. Подходящие векторы вполне очевидны квалифицированному специалисту.

Если применяют эукариотические клетки-хозяев, в вектор обычно включают сигнал полиаденилирования или терминирующую транскрипцию последовательность. Примером терминирующей последовательности является сигнал полиаденилирования из гена гормона роста быка. Также можно включить последовательности для точного сплайсинга транскрипта. Примером подвергнутой сплайсингу последовательности является VP1-интрон из SV40 (Sprague et al., J. Virol. 45: 773-781 (1983)). Кроме того, в вектор можно включить известные в данной области последовательности генов, контролирующие репликацию в клетке-хозяине. Также во избежание высокой экспрессии молекул тяжелой цепи на поверхности может потребоваться использовать экспрессирующий вектор, исключая сплайсинговые варианты трансмембранного домена.

Дополнительные элементы включают энхансеры, последовательности Козак и интронные последовательности, фланкированные донорскими или акцепторными сайтами для сплайсинга РНК. Высокоэф-

фективной транскрипции можно достичь при использовании раннего и позднего промоторов из SV40, длинных концевых повторов (LTRS) из ретровирусов, например, RSV, HTLV, HIV, и раннего промотора из цитомегаловируса (CMV). Однако можно также использовать клеточные элементы (например, промотор актина человека). Подходящие экспрессирующие векторы, используемые для осуществления согласно изобретению, включают, например, такие векторы, как pIRESneo, pRetro-Off, pRetro-On, PLXSN или pLNCX (Clontech Labs, Palo Alto, CA), pcDNA3.1 (+/-), pcDNA/Zeo (+/-) или pcDNA3.1/Hygro (+/-) (Invitrogen), PSVL и PMSG (Pharmacia, Uppsala, Sweden), pRSVcat (ATCC 37152), pSV2dhfr (ATCC 37146) и pBC12MI (ATCC 67109).

В альтернативном случае нуклеиновые кислоты, кодирующие последовательность антитела, можно экспрессировать в стабильных клеточных линиях, которые содержат интегрированный в хромосому ген. Котрансфекция с использованием селективного маркера, такого как dhfr, gpt, неомицин или гигромицин, позволяет идентифицировать и выделить трансфицированные клетки, которые экспрессируют большие количества кодируемых антител. Маркер DHFR (дигидрофолатредуктаза) используют для разработки клеточных линий, которые несут несколько сотен или даже несколько тысяч копий представляющего интерес ген. Другим полезным селективным маркером является фермент глутаминсинтаза (GS) (Murphy, et al., Biochem. J. 227: 277-279 (1991); Bebbington, et al., Bio/Technology 10: 169-175 (1992)). Используя эти маркеры, клетки млекопитающих выращивают в селективной среде и отбирают клетки с наибольшей устойчивостью. Эти клеточные линии содержат амплифицированный(ые) ген(ы), интегрированные в хромосому. Для продукции антител часто используют клетки яичника китайского хомячка (CHO) и NSO.

В ДНК-конструкциях, используемых для продукции антител согласно изобретению, можно необязательно включить по меньшей мере одну изоляторную последовательность. Термины "изолятор", "изоляторная последовательность" и "изоляторный элемент" используют здесь взаимозаменяемо. Изоляторный элемент - это контролирующий элемент, который изолирует транскрипцию генов, помещенных в пределы его действия, но который не влияет на экспрессию генов, или положительно, или отрицательно. Предпочтительно, изоляторную последовательность встраивают с одной из двух сторон транскрибируемой ДНК-последовательности. Например, изолятор можно поместить 5' от промотора на расстоянии от приблизительно 200 п. о. до приблизительно 1 т.п.о. и на 3'-конце представляющего интерес гена на расстоянии по меньшей мере от приблизительно 1 т.п.о. до приблизительно 5 т.п.о. от промотора. Расстояние от изоляторной последовательности до промотора и 3'-конца представляющего интерес гена может быть определено квалифицированными в данной области специалистами в зависимости от относительных размеров представляющих интерес генов, используемых в конструкции промотора и энхансера. Кроме того, можно расположить более одной изоляторной последовательности 5' от промотора или на 3'-конце трансгена. Например, две или более изоляторных последовательностей можно расположить 5' от промотора. Изолятор или изоляторы на 3'-конце трансгена можно расположить на 3'-конце представляющего интерес гена или на 3'-конце 3'-регуляторной последовательности, например 3'-нетранслируемого района (UTR) или 3'-фланкирующей последовательности.

Примеры подходящих экспрессирующих векторов, индуцибельные не слитые белки белков в E.coli, включают pTrc (Amann et al., (1988) Gene 69: 301-315) и pET 11d (Studier et al., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89). В основе экспрессии целевого гена из вектора pTrc лежит транскрипция с гибридного trp-lac-слитого промотора с помощью РНК-полимеразы хозяина. В основе экспрессии целевого гена из вектора pET 11d лежит транскрипция с T7 gn10-lac-слитого промотора, опосредуемая совместно экспрессируемой вирусной РНК-полимеразой (T7 gn1). Эта вирусная полимеразу поставляется штаммами клеток-хозяев BL21(DE3) или HMS174(DE3) из присутствующего в них профага X, несущего ген T7 gn1 под транскрипционным контролем промотора lacUV5.

В другом варианте осуществления согласно изобретению экспрессирующим вектором является вектор экспрессии в дрожжах. Примеры векторов для экспрессии в дрожжах S.cerevisiae включают pYerSec1 (Baldari et al. (1987) EMBO J. 6: 229-234), pMFa (Kurjan and Herskowitz, (1982) Cell 30: 933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) Gene 54: 113-123), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.) и pPicZ (Invitrogen Corp., San Diego, Calif.).

В альтернативном случае экспрессирующим вектором является бакуловирусный экспрессирующий вектор. Бакуловирусные векторы, пригодные для экспрессии белков в культивируемых клетках насекомых (например, клетках Sf9), включают серии pAc (Smith et al. (1983) Mol. Cell Biol. 3: 2156-2165) и серии pVL (Lucklow and Summers (1989) Virology 170: 31-39).

В еще одном варианте осуществления нуклеиновую кислоту согласно изобретению экспрессируют в клетках млекопитающего с использованием вектора для экспрессии в млекопитающем. Примеры векторов для экспрессии в млекопитающем включают pCDM8 (Seed (1987) Nature 329: 840) и pMT2PC (Kaufman et al. (1987) EMBO J. 6: 187-195). При использовании клеток млекопитающего функции контроля в экспрессирующих векторах часто обеспечиваются вирусными регуляторными элементами. Например, обычно используемыми промоторами являются промоторы, происходящие из полиомы, аденовируса 2, цитомегаловируса и вируса 40 обезьяны. В отношении других подходящих систем экспрессии как в прокариотических клетках, так и в эукариотических клетках смотри главы 16 и 17 Sambrook и др.,

выше.

В другом варианте осуществления согласно изобретению рекомбинантный вектор для экспрессии в клетках млекопитающего способен направлять экспрессию нуклеиновой кислоты предпочтительно в специфическом типе клеток, таком как клетки лимфомы (например, клетки миеломы мыши). В специфических типах клеток используют тканеспецифические регуляторные элементы для экспрессии нуклеиновой кислоты. Тканеспецифические регуляторные элементы известны в данной области. Неограничивающие примеры подходящих тканеспецифических промоторов включают промотор альбумина (специфичный в отношении печени; Pinkert et al. (1987) *Genes Dev.* 1: 268-277), промоторы, специфичные в отношении лимфоидной ткани (Calame and Eaton (1998) *Adv. Immunol.* 43: 235-275), в частности промоторы рецепторов Т-клеток (Winoto and Baltimore (1989) *EMBO J.* 8: 729-733) и иммуноглобулинов (Banerji et al. (1983) *Cell* 33: 729-740; Queen and Baltimore (1983) *Cell* 33: 741-748), промоторы, специфичные в отношении нервных клеток (например, промоторы нейрофиламента; Byrne and Ruddle (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5473-5477); промоторы, специфичные в отношении поджелудочной железы (Edlund et al. (1985) *Science* 230: 912-916), и промоторы, специфичные в отношении молочной железы (например, промотор молочной сыворотки; патент США № 4873316 и Европейский патент № 264166). Регулируемые в процессе развития промоторы также охватываются, например, крысиным гомеобокс промотором (Kessel and Gruss (1990) *Science* 249: 374-379) и промотором  $\alpha$ -фетопротеина (Campes and Tilghman (1989) *Genes Dev.* 3: 537-546).

Кроме того, изобретением обеспечивается рекомбинантный экспрессирующий вектор, включающий в себя ДНК-молекулу, клонированную в экспрессирующий вектор в антисмысловой ориентации. Т.е. ДНК-молекула функционально связана с регуляторной последовательностью таким образом, который делает возможной экспрессию (посредством транскрипции ДНК-молекулы) РНК-молекулы, которая является антисмысловой относительно кодирующей полипептид мРНК. Можно выбрать регуляторные последовательности, функционально связанные с клонированной в антисмысловой ориентации нуклеиновой кислотой, которые направляют непрерывную экспрессию антисмысловой РНК-молекулы в различных типах клеток. Например, можно выбрать вирусные промоторы и/или энхансеры или регуляторные последовательности, которые направляют конститутивную специфичную в отношении ткани или типа клеток экспрессию антисмысловой РНК. Антисмысловой экспрессирующий вектор может быть в форме рекомбинантной плазмиды, фагемиды или ослабленного в своей вирулентности вируса, в которой антисмысловые нуклеиновые кислоты продуцируются под контролем высокоэффективного регуляторного района, активность которого может определяться типом клетки, в которую вводят вектор. В отношении обсуждения регуляции генной экспрессии при использовании антисмысловых генов, смотри Weintraub et al. (*Reviews-Trends in Genetics*, Vol. 1(1) 1986). Клонирование и экспрессия в клетках миеломы. Наблюдали, что химерное мышь/человек моноклональное антитело IgG1k против CD4 человека, известное как СМ-Т412 (EP 0511308, полностью включенный сюда посредством ссылки), экспрессируется на высоких уровнях в трансфицированных клетках миеломы мыши (Looney et al. 1992. *Hum Antibodies Hybridomas* 3(4): 191-200). Без большого усилия оптимизировать условия культивирования в Centocor, Inc. Malvern в 1990 легко получили уровни продукции, составляющие >500 мг/л (специфическая продуктивность, измеряемая в пг/клетку/день, не известна). На основе компонентов этих экспрессирующих векторов разработали векторы для клонирования антител, полезные для клонирования НС и LC, которые включают промотор гена/последовательности нуклеиновой кислоты инициации транскрипции; 5'-нетранслируемые последовательности и последовательности нуклеиновых кислот инициации трансляции, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие сигнальную последовательность, интрон/экзон сплайсинговую донорскую последовательность для сигнального интрона и J-C-интрона и последовательности нуклеиновых кислот энхансера J-C-интрона. Плазмида p139, плазмида pUC19, содержит геномный EcoRI-EcoRI-фрагмент размером 5,8 т.п.о., клонированный из гибридных клеток C123, секретирующих полностью мышинное Ат М-Т412; фрагмент содержит промотор и часть V-области гена НС сМ-Т412. Исходным материалом для получения методами инженерии вектора, включающего V-область гена LC, послужила плазмида p39, плазмида pUC, которая содержит геномный HindIII-HindIII-фрагмент размером 3 т.п.о., клонированный из гибридных клеток C123; этот фрагмент содержит промотор и часть V-области гена LC сМ-Т412. Сконструировали методами инженерии векторы, происходящие из p139 и p39, делающие возможной подходящую сборку генов НС или LC, пригодных для экспрессии в клетках-хозяевах млекопитающего, в двухэтапном процессе, который включает (1) клонирование ДНК, кодирующую представляющую интерес последовательность, между специально приготовленными рестрикционными сайтами в векторе V-области, посредством чего кодирующая V-область последовательность располагается тотчас же 3' от кодируемой вектором сигнальной последовательности, а также 3' от части или всего промотора гена; и (2) перенос фрагмента, включающего вставленную последовательность, из вектора V-области в вектор С-области в правильной ориентации, посредством чего получающаяся в результате плазмида образует конечную экспрессирующую плазмиду, подходящую для экспрессии в клетках (Scallan et al. 1995 *Cytokine* 7(8): 759-769).

### Клонирование и экспрессия в клетках СНО

Плазмида pC4 является производной плазмиды pSV2-dhfr (ATCC номер доступа 37146). Эта плазмида содержит ген DHFR мыши под контролем раннего промотора SV40. Трансфицированные этими плазмидами клетки яичника китайского хомячка или другие клетки без дигидрофолатной активности можно отобрать путем выращивания клеток в селективной среде (например, альфа минус MEM, Life Technologies, Gaithersburg, MD), дополненной химиотерапевтическим агентом метотрексатом. Об амплификации генов DHFR в устойчивых к метотрексату (MTX) клетках сообщалось (см., например, F. W. Alt, et al., J. Biol. Chem. 253: 1357-1370 (1978); J.L. Hamlin and C. Ma, Biochem. et Biophys. Acta 1097: 107-143 (1990); and M.J. Page and M. A. Sydenham, Biotechnology 9: 64-68 (1991)). У клеток, выращиваемых при увеличивающихся концентрациях MTX, развивается устойчивость к лекарственному средству посредством сверхпродукции целевого фермента, DHFR, являющейся результатом амплификации гена DHFR.

Если с геном DHFR связать второй ген, он, как правило, совместно амплифицируется и сверхэкспрессируется. В данной области известно, что этот подход можно использовать для разработки клеточных линий, несущих более 1000 копий амплифицированного(ых) гена(ов). Впоследствии, когда метотрексат удаляют, получают клеточные линии, содержащие амплифицированный ген, интегрированный в одну или несколько хромосом клетки-хозяина.

Плазмида pC4 для экспрессии представляющего интерес гена содержит сильный промотор длинного концевой повтора (LTR) вируса саркомы Пауза (Cullen, et al., Molec. Cell Biol. 5: 438-447 (1985)) плюс фрагмент, изолированный из энхансера немедленного раннего гена цитомегаловируса человека (CMV) (Boshard et al., Cell 41: 521-530 (1985)). 3' от промотора находятся сайты расщепления рестрикционными ферментами BamHI, XbaI и Asp718, делающие возможной интеграцию генов. Ниже этих сайтов для клонирования плазмида содержит 3'-интрон и сайт полиаденилирования гена препроинсулина крысы. Для экспрессии можно также использовать другие высокоэффективные промоторы, например промотор  $\beta$ -актина человека, ранний или поздний промоторы SV40 или длинные концевые повторы из других ретровирусов, например HIV и HTLV. Для экспрессии антитела против MCP-1 в клетках млекопитающего регулируемым способом можно применять системы Clontech для экспрессии генов с использованием Tet-депрессии и Tet-репрессии (M. Gossen, and H. Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547-5551 (1992)). Для полиаденилирования мРНК можно также использовать другие сигналы, например, из генов гормона роста человека или глобина.

#### 4. Клетки-хозяева для продукции антител

По меньшей мере одно антитело против MCP-1 согласно изобретению можно необязательно продуцировать с использованием клеточной линии, смешанной клеточной линии, иммортализованной клетки или клоновой популяции иммортализованных клеток, хорошо известных в данной области. Смотри, например, Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2004); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1994-2004); Colligan et al., eds., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY (1997-2004); все из которых полностью включены сюда посредством ссылки.

Для того чтобы продуцировать биофармацевтические продукты, требуется продуцирующая клеточная линия, способная к эффективной и репродуцируемой экспрессии рекомбинантного(ых) полипептида(ов). Клеточная линия является стабильной и поддерживаемой. Для этой цели можно использовать различные линии клеток-хозяев. По мере понимания сложности того, каким образом структура клетки влияет на конечное количество и состав биотерапевтического продукта, становится более очевидным выбор линии клеток-хозяев, которые будут сообщать продукции и составу продукта требуемые свойства.

В отличие от большинства генов, транскрибируемых с непрерывных геномных ДНК-последовательностей, гены антител собираются из генных сегментов, которые могут быть значительно разделены в зародышевой линии. В частности, гены тяжелой цепи образуются путем рекомбинации трех геномных сегментов, кодирующих вариабельную область (V), область, вносящую дополнительный вклад в разнообразие антител, (D) и соединительную (J)/константную (C) область антитела.

Функциональные гены легкой цепи образуются соединением двух генных сегментов; один кодирует V-область, а другой кодирует J/C-область. Оба локуса тяжелой цепи и легкой цепи каппа содержат много генных сегментов V-области (оценки варьируют между 100 и 1000), которые протягиваются на 1000 т.п.о. Локус лямбда, напротив, много меньше и протягивается на приблизительно 300 т.п.о. на хромосоме 16 у мыши. Он состоит из двух генных сегментов вариабельной области и четырех генных сегментов соединительной/константной (J/C) области. Для образования функционального гена требуется рекомбинация между V- и J/C-элементами.

В В-клетке, в которой антитело продуцируется в природе, контроль транскрипции обоих реаранжированных генов тяжелой цепи и легкой цепи каппа зависит от активности тканеспецифического промотора 5' от V-области и тканеспецифического энхансера, расположенного в J-C-интроне. Эти элементы действуют синергически. Кроме того, второй специфичный в отношении В-клеток энхансер идентифицирован в локусе легкой цепи каппа. Этот дополнительный энхансер расположен на расстоянии 9 т.п.о. 3'

от С<sub>каппа</sub>. Следовательно, в гибридном способе иммортализации экспрессирующих антитела генов используются эндогенные последовательности промотора и энхансера родительской В-клеточной линии. В альтернативном случае нуклеиновые кислоты согласно изобретению можно экспрессировать в клетке-хозяине с помощью ее индукции (с помощью манипуляции) в клетке-хозяине, которая содержит эндогенную ДНК, кодирующую антитело согласно изобретению. Такие способы хорошо известны в данной области, например, способы, описанные в патентах США №№ 5580734, 5641670, 5733746 и 5733761, которые полностью включены сюда посредством ссылки.

Другим способом создания клетки-хозяина, способной экспрессировать антитела, является клонирование геномной ДНК антитела в искусственном векторе. Впрочем, экспрессия моноклональных антител под контролем сильного промотора увеличивает возможность идентификации высокопродуктивных клеточных линий и получения высоких выходов моноклональных антител. Антитела согласно изобретению можно продуцировать в клетке-хозяине в виде трансфектомы с использованием, например, комбинации методов рекомбинантных ДНК и методов трансфекции генов, хорошо известных в данной области (например, Morrison, S. (1985) Science 229: 1202).

Системы клонирования и экспрессии биофармацевтических препаратов, в том числе антител, в ряде различных клеток-хозяев хорошо известны. Подходящие клетки-хозяева включают бактерии, клетки млекопитающих, клетки растений, дрожжи и бакуловирусные системы и трансгенные растения и животные. Имеющиеся в данной области линии клеток млекопитающих для экспрессии гетерологичных полипептидов в виде интактных гликозилированных белков включают клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки HeLa, клетки почки детеныша хомячка (BHK), клетки меланомы мыши NSO и производные клеточные линии, например, SP2/0, YB2/0 (ATC CRL-1662), клетки миеломы крысы, эмбриональные почечные клетки человека (HEK), эмбриональные клетки сетчатки человека, клетки PerC.6, клетки her G2, BSC-1 (например, ATCC CRL-26) и многие другие, доступные, например, из американской коллекции типовых культур, Manassas, Va (www.atcc.org). Частным предпочтительным бактериальным хозяином является E.coli.

Для стабильной экспрессии гетерологичных генов часто использовали такие клетки млекопитающих, как клетки CHO, миеломные клетки, клетки HEK293, клетки BHK (BHK21, ATCC CRL-10), клетки Ltk мыши и клетки NIH3T3. Напротив, для временной экспрессии рекомбинантных белков в заведенном порядке используют такие клеточные линии, как Cos (COS-1 ATCC CRL-1650; COS-7 ATCC CRL-1651) и HEK293.

Предпочтительные клетки-хозяева, являющиеся млекопитающими, для экспрессии рекомбинантных антител согласно изобретению включают миеломные клетки, такие как Sp2/0, YB2/0 (ATCC CRL-1662), NSO и P3X63.Ag8.653 (например, SP2/0-Ag14), из-за их высокой скорости экспрессии. В частности, при использовании миеломных клеток NSO другой предпочтительной экспрессирующей системой является система экспрессии гена GS, раскрытая в WO 87/04462, WO 89/01036 и EP 338841. Когда в клетки-хозяев, являющихся млекопитающими, вводят рекомбинантные экспрессирующие векторы, при культивировании клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного для того, чтобы сделать возможной экспрессию антитела в клетке-хозяине или, более предпочтительно, секрецию антитела в культуральную среду, в которой выращивают клетки-хозяев, продуцируются антитела. Из культуральной среды антитела можно извлечь с использованием стандартных способов очистки белков.

Иллюстрацией клеточных культур, используемых для продуцирования антител, их точно определенных частей или вариантов, являются клетки млекопитающих. Системы клеток млекопитающих часто находятся в форме монослоев клеток, хотя можно также использовать суспензии клеток млекопитающих.

В данной области разработан ряд подходящих линий клеток-хозяев, способных экспрессировать интактные гликозилированные белки, которые включают клеточные линии COS-1 (например, ATCC CRL-1650), COS-7 (например, ATCC CRL-1651), HEK293, BHK21 (например, ATCC CRL-10), CHO (например, ATCC CRL-1610) и BSC-1 (например, ATCC CRL-26), клетки Cos-7, клетки CHO, клетки her G2, P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14, клетки 293, клетки HeLa и т.п., которые легко доступны, например, из американской коллекции типовых культур, Manassas, Va (www.atcc.org). Предпочтительные клетки-хозяева включают клетки лимфоидного происхождения, такие как клетки миеломы и лимфомы. Особенно предпочтительными клетками-хозяевами являются клетки P3X63Ag8.653 (номер доступа в ATCC - CRL-1580) и SP2/0-Ag14 (номер доступа в ATCC - CRL-1851).

Для продукции белка на высоком уровне используют клетки CHO-K1 и DHFR-CHO DG44 и DUK-B11 (G. Urlaub, L.A. Chasin, 1980. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 4216-4220), поскольку амплификация представляющих интерес генов становится возможной при включении селективного, амплифицируемого маркера, DHFR, с использованием, например, лекарственного средства метотрексата (MTX) (R.J. Kaufman, 1990. Methods Enzymol. 185: 537-566). Для продукции рекомбинантных мАт на высоком уровне можно с успехом использовать клетки DHFR-CHO. Клетки DHFR-CHO могут продуцировать антитела против MCP-1 со скоростью, составляющей 80-110 мг 10<sup>6</sup> клеток<sup>-1</sup> день<sup>-1</sup> и более чем 200 мг 10<sup>6</sup> клеток<sup>-1</sup> день<sup>-1</sup>. Для достижения экспрессии Н- и L-цепей в клетках CHO можно использовать ряд промоторов, например промотор β-актина, промотор CMV MIE человека, главный поздний промотор (MLP) вируса Ad, промотор RSV и LTR вируса крысиного лейкоза. В литературе для экспрессии мАт описывается ряд век-

торов, в которых две различные плазмиды с независимыми селективными/амплифицируемыми маркерами несут две цепи Ig. Для получения до 180 мг гуманизированных мАт л<sup>-1</sup> 7 дней<sup>-1</sup> в центрифужных станках можно использовать векторы, содержащие одну цепь антитела, например, Н-цепь, связанную с маркером DHFR, и экспрессирующую L-цепь кассету с маркером Neo<sup>r</sup>, или наоборот. Используемые для первоначального отбора и последующей амплификации способы могут варьировать, и они хорошо известны квалифицированным в данной области специалистам. Как правило, экспрессию мАт на высоком уровне можно получить, используя следующие стадии: первоначальный отбор и последующая амплификация клонов-кандидатов, совместный отбор (например, в случаях, когда оба вектора, экспрессирующие Н-цепь и L-цепь, несут экспрессирующую DHFR единицу) и амплификация, совместная амплификация с использованием различных амплифицируемых маркеров, и первоначальный отбор и амплификация в культуральной массе с последующим разведением клонов для идентификации индивидуальных клонов с высокой экспрессией. Поскольку на эффективность экспрессии Н-цепи и L-цепи и общую экспрессию мАт могут оказывать влияние сайты интеграции, создали единичные векторы, в которых две экспрессирующие Ig-цепи единицы располагаются в tandem. Эти векторы также несут доминантный селективный маркер, такой как Neo<sup>r</sup> и экспрессирующая DHFR кассета. Для обзора см. Ganguly, S. and A. Shatzman. Expression Systems, mammalian cells IN: Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation. 1999 by John Wiley & Sons, Inc.

Для экспрессии на высоком уровне гетерологичных генов в клетках CHO Cockett и др. (1990. Bio/Technology 8, 662-667) разработали GS-системы. Для получения клонов, экспрессирующих антитела согласно изобретению с выходами, сопоставимыми с выходами систем DHFR-CHO, можно использовать трансфекцию экспрессирующего вектора, содержащего кДНК (под транскрипционным контролем промотора hCMV) и миниген GS (под контролем позднего промотора SV40), в клетки CHO-K1 (с последующим отбором с использованием от 20 mM до 500 mM MSX). GS-системы обсуждаются в целом или отчасти в связи с Европейскими патентами №№ 021684 6, 0256055 и 0323997 и заявкой на Европейский патент № 8 9303964.

В качестве неограничивающего примера для получения больших количеств рекомбинантных белков, например с использованием индуцибельного промотора, использовали листья трансгенного табака, экспрессирующего рекомбинантные белки. См., например, Cramer et al., Curr. Top. Microbol. Immunol. 240: 95-118 (1999) и приведенные там ссылки. Также использовали трансгенную кукурузу для экспрессии белков млекопитающих на уровнях коммерческой продукции, с биологическими активностями, эквивалентными активностям белков, продуцированных в других рекомбинантных системах или очищенных из природных источников.

См., например, Hood et al., Adv. Exp. Med. Biol. 464: 127-147 (1999) и приведенные там ссылки. Антитела, в том числе фрагменты антител, такие как одноцепочечные антитела (scFv), продуцировали в больших количествах из семян трансгенных растений, в том числе семян табака и клубней картофеля. См., например, Conrad et al., Plant. Mol. Biol. 38: 101-109 (1998) и приведенные там ссылки. Таким образом, антитела согласно изобретению можно также получить с использованием трансгенных растений в соответствии с известными способами. См. также, например, Fischer et al., Biotechnol. Appl. Biochem. 30: 99-108 (Oct., 1999), Ma et al., Trends Biotechnol. 13: 522-7 (1995); Ma et al., Plant Physiol. 109: 341-6 (1995); Whitlam et al., Biochem. Soc. Trans. 22: 940-944 (1994) и приведенные там ссылки. См. также в общем в отношении экспрессии антител в растениях, без ограничения, патент США № 5959177. Все вышеуказанные ссылки полностью включены сюда посредством ссылки.

##### 5. Очистка антитела

Антитело против MCP-1 можно извлечь и очистить из культур рекомбинантных клеток с помощью хорошо известных способов, включающих, но не ограничивающихся перечисленными, очистку с использованием белка А, преципитацию с использованием сульфата аммония или этанола, экстракцию кислотой, анион- или катионообменную хроматографию, хроматографию с использованием фосфоцеллюлозы, хроматографию на основе гидробных взаимодействий, аффинную хроматографию, хроматографию с использованием гидроксипатита и хроматографию с использованием лектина. Для очистки можно также использовать жидкостную хроматографию высокого разрешения (HPLC). См. например, Colligan, Current Protocols in Immunology, или Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY (1997-2001), например главы 1, 4, 6, 8, 9, 10, все из которых полностью включены сюда посредством ссылки.

Антитела согласно изобретению включают встречающиеся в природе очищенные продукты, продукты методик проведения химического синтеза и продукты, полученными рекомбинантными методами из эукариотических хозяев, включающих, например, дрожжи, высшие растения, насекомых и клетки млекопитающих. В зависимости от используемого в процедуре рекомбинантной продукции хозяина антитело согласно изобретению может быть гликозилированным или негликозилированным, и гликозилированное антитело является предпочтительным. Такие методы описаны во многих стандартных лабораторных руководствах, таких как Sambrook, выше, параграфы 17.37-17.42; Ausubel, выше, главы 10, 12, 13, 16, 18 и 20, Colligan, Protein Science, выше, главы 12-14, все из которых полностью включены сюда посредством ссылки.

## 6. Антитела согласно изобретению

Антитела против MCP-1 (также называемые антителами против CCL-2 или MCP-1-антитела), применимые в способах и композициях согласно изобретению, необязательно характеризуются связыванием с высокой аффинностью с MCP-1, связыванием с высокой специфичностью с MCP-1, способностью ингибировать одну или несколько биологических активностей, ассоциированных с MCP-1, и необязательно и предпочтительно наличием низкой токсичности.

Антитела согласно изобретению могут связываться с MCP-1 человека с аффинностями ( $K_D$ ) в широком диапазоне. В предпочтительном варианте осуществления по меньшей мере одно мАТ человека согласно изобретению может необязательно связываться с MCP-1 человека с высокой аффинностью. Например, мАТ человека может связываться с MCP-1 человека с  $K_D$ , равной или меньшей, чем приблизительно  $10^{-7}$  М, такой как, без ограничения,  $0,1-9,9$  (или любой диапазон или величина в пределах указанного диапазона)  $\times 10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-13}$ , или любой диапазон или величина в пределах указанного диапазона.

Аффинность, или сродство, или avidность антитела к антигену можно определить экспериментально с помощью любого подходящего способа (Смотри, например, Berzofsky, et al., "Antibody-Antigen Interactions", In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, NY (1994); Kubly, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company: New York, NY (1992); и описанные здесь способы). Измеренная аффинность конкретного взаимодействия антитело-антиген может варьировать при измерении в различных условиях (например, концентрации соли, pH). Следовательно, измерения аффинности и других антигенсвязывающих параметров (например,  $K_D$ ,  $K_a$ ,  $K_d$ ) предпочтительно проводить с использованием стандартизованных растворов антитела и антигена и стандартизованного буфера, такого как стандартные растворы и буферы, описанные здесь.

Выделенные антитела согласно изобретению включают раскрытые здесь аминокислотные последовательности антител, кодируемые любым подходящим полинуклеотидом, или любое выделенное или приготовленное антитело. Предпочтительно антитело человека или антигенсвязывающий фрагмент связывается с MCP-1 человека и, таким образом, частично или существенно нейтрализует по меньшей мере одну биологическую активность белка. Антитело или его точно определенная часть или вариант, которые частично или предпочтительно существенно нейтрализуют по меньшей мере одну биологическую активность по меньшей мере одного белка MCP-1 или фрагмента, могут связываться с белком или фрагментом и, таким образом, ингибируют активности, опосредуемые через связывание MCP-1 с рецептором MCP-1 или через другие MCP-1-зависимые и MCP-1-опосредуемые механизмы. Используемый здесь термин "нейтрализующее антитело" относится к антителу, которое может ингибировать MCP-1-зависимую активность на приблизительно 20-120%, предпочтительно на по меньшей мере приблизительно 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% или более в зависимости от анализа. Способность антитела против MCP-1 ингибировать MCP-1-зависимую активность предпочтительно оценивают с помощью по меньшей мере одного подходящего анализа белка или рецептора MCP-1, описанного здесь и/или известного в данной области. Антитело человека согласно изобретению может быть любого класса (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD и т.п.) или изотипа и может включать в себя легкую цепь каппа или лямбда. В одном варианте осуществления согласно изобретению антитело человека включает тяжелую цепь IgG или точно определенный фрагмент, например, по меньшей мере одного из изотипов, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Антитела этого типа можно получить с использованием трансгенной мыши или другого трансгенного не являющегося человеком млекопитающего, включающего по меньшей мере один трансген легкой цепи человека (например IgG, IgA и IgM (например,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ ,  $\gamma 4$ )), описанный здесь и/или известный в данной области. В другом варианте осуществления согласно изобретению антитело против MCP-1 человека включает тяжелую цепь IgG1 и легкую цепь IgG1.

По меньшей мере одно антитело согласно изобретению связывается с по меньшей мере одним точно определенным эпитопом, специфичным в отношении по меньшей мере одного белка MCP-1, его фрагмента, части или любой их комбинации. По меньшей мере один эпитоп может включать в себя по меньшей мере одну антитело-связывающую область, которая включает по меньшей мере одну часть белка, а предпочтительно эпитоп состоит из по меньшей мере 1-3 аминокислот целой точно определенной части смежных аминокислот SEQ ID NO: 1.

Как правило, антитело человека или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению содержит антигенсвязывающую область, которая включает по меньшей мере один определяющий комплементарность участок человека (CDR1, CDR2 и CDR3) или вариант по меньшей мере одной вариабельной области тяжелой цепи и по меньшей мере один определяющий комплементарность участок человека (CDR1, CDR2 и CDR3) или вариант по меньшей мере одной вариабельной области легкой цепи. Неограничивающим примером является антитело или антигенсвязывающая часть или вариант, которые содержат по меньшей мере один CDR3 тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или 12, и/или CDR3 легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15-17, 20 или 21. В конкретном варианте осуществления согласно изобретению антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут иметь антигенсвязывающую область, которая содержит по меньшей мере часть по меньшей мере одного CDR тяжелой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и/или CDR3), имеющего аминокислотную

последовательность, соответствующую CDR1, 2 и/или 3 (например, SEQ ID NO: 6-12 и/или 22, 23 и 26). В другом конкретном варианте осуществления согласно изобретению антитело или антигенсвязывающая часть или вариант могут иметь антигенсвязывающую область, которая содержит по меньшей мере часть по меньшей мере одного CDR легкой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и/или CDR3), имеющего аминокислотную последовательность, соответствующую CDR1, 2 и/или 3 (например, SEQ ID NO: 13-21 и/или 24 и 25). В предпочтительном варианте осуществления согласно изобретению три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента произошли из соответствующих CDR по меньшей мере одного Fab MOR0336, MOR03464, MOR03468, MOR03470, MOR03471, MOR03473, MOR03548, описанных здесь, каркасные области тяжелой цепи произошли из антитела с VH3 (SEQ ID NO: 2), и каркасные области легкой цепи произошли из антитела каппа-типа (SEQ ID NO: 4). Такие антитела можно приготовить путем химического соединения вместе различных частей (CDR и каркасных областей) антитела, используя традиционные методы, путем получения и экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело, используя традиционные методы технологии рекомбинантной ДНК или с помощью любого другого подходящего метода.

Антитело против MCP-1 может включать в себя по меньшей мере одну переменную область тяжелой или легкой цепи, имеющую определенную аминокислотную последовательность, в каркасных областях. Например, в предпочтительном варианте осуществления согласно изобретению антитело против MCP-1 включает по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, необязательно имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или 3, и/или по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, необязательно имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или 5.

Класс антитела или изотип (IgA, IgD, IgE, IgG или IgM) зависит от константных областей, которые кодируются генами константных областей тяжелой цепи. В классе IgG человека существует четыре подкласса или подтипа: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, названных в порядке их природного относительного содержания в сыворотке, начиная от наибольшего к наименьшему. Антитела IgA обнаруживают в виде двух подклассов: IgA1 и IgA2. Используемый здесь термин "переключение изотипа" также относится к изменению между подклассами или подтипами IgG.

Изобретение также относится к антителам, антигенсвязывающим фрагментам, цепям иммуноглобулинов и CDR, содержащим аминокислотную последовательность, которая является по существу той же самой, что и описанная здесь аминокислотная последовательность. Предпочтительно такие антитела или антигенсвязывающий фрагмент и антитела, содержащие такие цепи или CDR, могут связываться с MCP-1 человека с высокой аффинностью (например,  $K_D$ , меньшей или равной приблизительно  $10^{-9}$  М). Аминокислотные последовательности, которые являются по существу теми же самыми, что и описанные здесь последовательности, включают последовательности, включающие консервативные замены аминокислот, а также делеции и/или вставки аминокислот. Консервативные замены аминокислот относятся к замещению первой аминокислоты второй аминокислотой, которая имеет химические и/или физические свойства (например, заряд, структуру, полярность, гидрофобность/гидрофильность), схожие со свойствами первой аминокислоты. Консервативные замены включают замещение одной аминокислоты другой аминокислотой в пределах следующих групп: лизин (K), аргинин (R) и гистидин (H)/ аспартат (D) и глутамат (E); аспарагин (N), глутамин (Q), серин (S), треонин (T), тирозин (Y), K, R, H, D и E; аланин (A), валин (V), лейцин (L), изолейцин (I), пролин (P), фенилаланин (F), триптофан (W), метионин (M), цистеин (C) и глицин (G); F, W и Y; C, S и T.

Антитело против MCP-1 согласно изобретению может включать в себя одну или несколько аминокислотных замен, делеций или вставок, или в результате природных мутаций, или манипуляций человека, как отмечается здесь или говорится у Knappik и др. (патент США № 6828422) в отношении переменных областей, происходящих из последовательностей генов зародышевой линии человека и классифицированных на основе схожести последовательностей в семейства, обозначенные VH1A, VH1B, VH2 и т.п., и на основе легких цепей в виде подгрупп каппа или лямбда. Эти последовательности и другие последовательности, которые можно использовать в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются перечисленными, конфигурации, представленные в табл. 1, которые, кроме того, описываются на фиг. 1-42 РСТ-заявки WO 05/005604 и заявки US 10/872932, поданной 21 июня 2004, полностью включенных сюда посредством ссылки, причем упоминаемые в качестве ссылки фиг. 1-42 демонстрируют примеры последовательностей переменных и константных доменов тяжелой и легкой цепей, каркасных областей, субдоменов, областей и замен, часть из которых можно использовать в происходящих из Ig белках согласно изобретению, как здесь говорится.



Таблица 1. Конфигурации антител человека

		Области						
		FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
Вариабельная область тяжелой цепи								
Вариабельная область легкой цепи								
IgA1, IgA2, IgD, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4	Константные области	CH1	Шарнирная область 1-4	CH2	CH3			
IgA, IgM		CH1	Шарнирная область 1-4	CH2	CH3	J-цепь		
IgE		CH1		CH2	CH3	CH4		

Число аминокислотных замен, которые мог бы осуществить квалифицированный специалист, зависит от многих факторов, в том числе тех, которые описаны выше. Вообще говоря, число аминокислотных замен, вставок или делеций для любого данного антитела против MCP-1, фрагмента или варианта будет не более 40, 30, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, как, например, 1-30 или любой диапазон или величины в пределах указанного диапазона, как здесь отмечено.

Существенные для функционирования аминокислоты в антителе против MCP-1 согласно изобретению можно идентифицировать с помощью известных в данной области способов, таких как сайт-направленный мутагенез или аланин-сканирующий мутагенез (например, Ausubel, выше, главы 8, 15; Cunningham and Wells, Science 244: 1081-1085 (1989)). При аланин-сканирующем мутагенезе вводят мутации в виде только аланина в каждый остаток молекулы. Получающиеся в результате мутантные молекулы затем проверяют на биологическую активность, такую как, без ограничения, по меньшей мере одна нейтрализующая MCP-1 активность. Сайты, являющиеся критическими для связывания антитела, можно также идентифицировать с помощью структурного анализа, такого как кристаллизация, ядерно-магнитный резонанс или фотоаффинное мечение (Smith, et al., J. Mol. Biol. 224: 899-904 (1992); и de Vos, et al., Science 255: 306-312 (1992)).

Антитела против MCP-1 согласно изобретению могут включать в себя, без ограничения, по меньшей мере одну часть, последовательность или комбинацию, выбранную из от 5 до всех смежных аминокислот по меньшей мере одной из SEQ ID NO: 2-5 и 27-28.

Кроме того, антитело против MCP-1 может необязательно включать в себя полипептид по меньшей мере одной из SEQ ID NO: 27 и 28. В одном варианте осуществления изобретению аминокислотная последовательность иммуноглобулиновой цепи или ее части идентична приблизительно на 100% аминокислотной последовательности соответствующей цепи по меньшей мере одной из SEQ ID NO: 27 и 28, за исключением консервативных замен, которые не изменяют специфичность связывания антитела против MCP-1. Например, аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи можно сопоставить с последовательностью SEQ ID NO: 4 или 5, или аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи можно сопоставить с последовательностью SEQ ID NO: 2 или 3. Предпочтительно, идентичность аминокислот определяют с использованием подходящего компьютерного метода, известного в данной области.

Как понятно квалифицированным специалистам, настоящее изобретение включает по меньшей мере одно биологически активное антитело согласно изобретению. Биологически активные антитела имеют специфическую активность на уровне по меньшей мере 20, 30 или 40% и предпочтительно по меньшей мере 50, 60 или 70%, и более предпочтительно по меньшей мере 80, 90 или 95-100% активности встречающегося в природе (не синтетического), эндогенного или родственного и известного антитела. Способы анализа и количественного определения ферментативной активности и субстратной специфичности хорошо известны квалифицированным в данной области специалистам и описываются здесь.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к антителам человека и антигенсвязывающим фрагментам, описанным здесь, модифицированным с помощью ковалентного присоединения органической составляющей. С помощью такой модификации можно продуцировать антитело или антигенсвязывающий фрагмент с улучшенными фармакокинетическими свойствами (например, увеличенным *in vivo* временем полужизни в сыворотке). Органической составляющей может быть линейная или разветвленная гидрофильная полимерная группа, группа жирной кислоты или группа сложного эфира жирной кислоты. В конкретном варианте осуществления согласно изобретению гидрофильная полимерная группа может иметь молекулярную массу, составляющую от приблизительно 800 до приблизительно 120000 Да,

и может представлять собой полиалкангликоль (например, полиэтиленгликоль (PEG), полипропиленгликоль (PPG)), углеводородный полимер, аминокислотный полимер или поливинилпирролидон, а группа жирной кислоты или группа сложного эфира жирной кислоты может включать в себя от приблизительно восьми до приблизительно сорока атомов углерода. Модифицированные антитела и антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению могут включать в себя одну или несколько органических составляющих, которые ковалентно связаны, напрямую или опосредовано, с антителом. Каждая органическая составляющая, которая связана с антителом и антигенсвязывающим фрагментом согласно изобретению, может независимо представлять собой гидрофильную полимерную группу, группу жирной кислоты или группу сложного эфира жирной кислоты. Используемый здесь термин "жирная кислота" охватывает монокарбоксильные кислоты и дикарбоксильные кислоты. В качестве используемого здесь термина "гидрофильная полимерная группа" относится к органическому полимеру, который больше растворим в воде, чем в октане. Например, полилизин больше растворим в воде, чем в октане. Следовательно, антитело, модифицированное путем ковалентного присоединения полилизина, охватывается настоящим изобретением. Гидрофильные полимеры, пригодные для модификации антител согласно изобретению, могут быть линейными или разветвленными и включают, например, полиалкангликоли (например, PEG, монометоксиполиэтиленгликоль (mPEG), PPG и т.п.), углеводороды (например, декстран, целлюлозу, олигосахариды, полисахариды и т.п.), полимеры гидрофильных аминокислот (например, полилизин, полиаргинин, полиаспарат и т.п.), полиалканоксиды (например, полиэтиленоксид, полипропиленоксид и т.п.) и поливинилпирролидон. Предпочтительно гидрофильный полимер, модифицирующий антитело согласно изобретению, имеет молекулярную массу от приблизительно 800 до приблизительно 150000 Да в виде отдельной молекулярной частицы. Например, можно использовать PEG<sub>5000</sub> и PEG<sub>20000</sub>, где субскрипт представляет собой среднюю молекулярную массу полимера в дальтонах. Гидрофильная полимерная группа может быть замещена от одной до приблизительно шести алкильными группами, группами жирной кислоты или сложного эфира жирной кислоты. Гидрофильный полимер, замещенный группой жирной кислоты или сложного эфира жирной кислоты, можно приготовить, используя подходящие способы. Например, полимер, включающий в себя аминокислотную группу, можно связать с карбоксилатом жирной кислоты или сложного эфира жирной кислоты, а активированный карбоксилат (например, активированный с использованием N,N-карбонилдиимидазола) жирной кислоты или сложного эфира жирной кислоты можно связать с гидроксильной группой полимера.

Жирные кислоты или сложные эфиры жирных кислот, подходящие для модификации антител согласно изобретению, могут быть насыщенными или могут содержать одну или несколько ненасыщенных единиц. Жирные кислоты, подходящие для модификации антител согласно изобретению, включают, например, N-додеканоат (C<sub>12</sub>, лаурат), N-тетрадеканоат (C<sub>14</sub>, мирилат), N-октадеканоат (C<sub>18</sub>, стеарат), N-эйкозаноат (C<sub>20</sub>, арахидат), N-докозаноат (C<sub>22</sub>, бегенат), N-триактаноат (C<sub>30</sub>), N-тетрактаноат (C<sub>40</sub>), цис-Δ<sup>9</sup>-октадеканоат (C<sub>18</sub>, олеат), все цис-Δ<sup>5,8,11,14</sup>-эйкозатетраеноат (C<sub>20</sub>, арахидонат), октандионовую кислоту, тетрадекандионовую кислоту, октадекандионовую кислоту, докозандионовую кислоту и т.п. Подходящие сложные эфиры жирных кислот включают моноэфиры дикарбоксильных кислот, которые включают группу линейного или разветвленного низшего алкила. Группа низшего алкила может включать в себя от одного до приблизительно двенадцати, предпочтительно от одного до приблизительно шести атомов углерода.

Модифицированные антитела человека и антигенсвязывающие фрагменты можно получить с помощью подходящих способов, таких как реакция с одним или несколькими модифицирующими агентами. Используемый здесь термин "модифицирующий агент" относится к подходящей органической группе (например, гидрофильному полимеру, жирной кислоте, эфиру жирной кислоты), которая включает активирующую группу. "Активирующая группа" представляет собой химическую составляющую или функциональную группу, которая может при соответствующих условиях взаимодействовать со второй химической группой, таким образом образуя ковалентную связь между модифицирующим агентом и второй химической группой. Например, реакционноспособные в отношении аминов активирующие группы включают электрофильные группы, такие как тозилат, мезилат, галоген (хлор, бром, фтор, йод), N-гидроксисукцинимидиловые эфиры (NHS) и т.п. Активирующие группы, которые могут взаимодействовать с тиолами, включают, например, имид малеиновой кислоты, йодацетил, акрилоил, пиридилдисульфиды, тиозфир 5-тиол-2-нитробензойной кислоты (TNB-тиол) и т.п. Функциональную группу альдегидов можно связать с амино- или гидразид-содержащими молекулами, а азидная группа может взаимодействовать с трехвалентной фосфористой группой с образованием связей в виде фосфорамидата или имида фосфористой кислоты. Подходящие способы введения активирующих групп в молекулы известны в данной области (смотри, например, Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press: San Diego, CA (1996)). Активирующая группа может быть связана напрямую с органической группой (например, гидрофильным полимером, жирной кислотой, сложным эфиром жирной кислоты) или через линкерную составляющую, например двухвалентную C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-группу, где один или несколько атомов углерода могут быть замещены гетероатомом, таким как кислород, азот или сера. Подходящие линкерные составляющие включают, например, тетраэтиленгликоль, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH- и -CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-NH-. Модифицирующие агенты, включающие линкерную составляющую,

можно получить, например, с результате взаимодействия моно-Вос-алкилдиамин (например, моно-Вос-этилендиамина, моно-Вос-диаминогексана) с жирной кислотой в присутствии 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида (EDC) с образованием амидной связи между свободным амином и карбоксилатом жирной кислоты. Вос-защитную группу можно удалить из продукта путем обработки трифторуксусной кислотой (TFA) с оставлением незащищенным первичного амина, который может связаться с другим карбоксилатом, как описано, или может взаимодействовать с малеиновым ангидридом, и образующийся в результате продукт подвергают циклизации с получением активированного производного жирной кислоты в виде имида малеиновой кислоты (смотри, например, Thompson, et al., WO 92/16221, полное описание которой включено сюда посредством ссылки).

Модифицированные антитела согласно изобретению можно получить при взаимодействии антитела человека или антигенсвязывающего фрагмента с модифицирующим агентом. Например, органические составляющие можно связать с антителом не являющимся сайт-специфическим способом, применяя реакционноспособный в отношении аминов модифицирующий агент, например, NHS-эфир PEG. Модифицированные антитела человека или антигенсвязывающие фрагменты можно также получить путем восстановления дисульфидных связей (например, внутрицепочечных дисульфидных связей) антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Восстановленное антитело или антигенсвязывающий фрагмент можно затем привести во взаимодействие с реакционноспособным в отношении тиолов модифицирующим агентом с получением модифицированного антитела согласно изобретению. Модифицированные антитела человека или антигенсвязывающие фрагменты, включающие органическую составляющую, которая связана со специфическими сайтами антитела согласно изобретению, можно получить с использованием подходящих способов, таких как обратный протеолиз (Fisch et al., *Bioconjugate Chem.*, 3: 147-153 (1992); Werlen et al., *Bioconjugate Chem.*, 5: 411-417 (1994); Kumaran et al., *Protein Sci.* 6(10): 2233-2241 (1997); Itoh et al., *Bioorg. Chem.*, 24(1): 59-68 (1996); Capellas et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 56(4): 456-463 (1997)), и способов, описанных у Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996).

#### **7. Антиидиотипические антитела против анти-MCP-1-антител**

Помимо моноклональных или химерных антител против MCP-1 настоящее изобретение также направлено на антиидиотипические (анти-Id) антитела, специфичные в отношении таких антител согласно изобретению. Анти-Id-антитело представляет собой антитело, узнающее уникальные детерминанты, обычно ассоциируемые с антигенсвязывающей областью другого антитела. Анти-Id-антитела можно получить путем иммунизации животного того же самого вида и генетического типа (например, линии мышей), что и источник Id-антител, антителами или содержащимся в них CDR-районом. Иммунизированные животные будут узнавать идиотипические детерминанты используемых для иммунизации антител и отвечать на них, и вырабатывать анти-Id-антитело. анти-Id-антитело можно также использовать в качестве "иммуногена" для индукции иммунного ответа в организме еще одного животного, с получением так называемых анти-анти-Id-антител.

#### **8. Композиции антител, дополнительно содержащие терапевтически активные ингредиенты**

Композиции могут необязательно дополнительно содержать эффективное количество по меньшей мере одного соединения или белка, выбранного из по меньшей мере одного дерматологического средства, противовоспалительного средства, анальгезирующего средства, средства для заболеваний почки (например, антагониста или блокатора рецептора ангиотензина (ARB)), противоинфекционного средства, средства от заболеваний сердечно-сосудистой системы (CV), средства от заболеваний центральной нервной системы (CNS), средства от заболеваний вегетативной нервной системы (ANS), средства от заболеваний дыхательных путей, средства от заболеваний желудочно-кишечного тракта (GI), гормонального средства, средства для водно-солевого баланса, гематологического средства, противоопухолевого средства, средства для иммуномодуляции, средства от заболеваний глаз, уха или носа, средства для местного применения, связанного с питанием средства и т.п. В данной области хорошо известны такие лекарственные средства, в том числе составы, показания, дозирование и назначение для каждого представленного здесь заболевания (см., например, *Nursing 2001 Handbook of Drugs*, 21<sup>st</sup> edition, Springhouse Corp., Springhouse, PA, 2001; *Health Professional's Drug Guide 2001*, ed., Shannon, Wilson, Stang, Prentice-Hall, Inc, Upper Saddle River, NJ; *Pharmacotherapy Handbook*, Wells et al., ed., Appleton & Lange, Stamford, CT, все из которых полностью включены сюда посредством ссылки).

Содержащие антитело против MCP-1 композиции согласно изобретению могут дополнительно содержать по меньшей мере одно подходящее и эффективное в отношении клетки, ткани, органа, животного или пациента, нуждающихся в такой модуляции, обработке или лечении, количество композиции или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно антитело против MCP-1, необязательно дополнительно содержащей по меньшей мере один агент, выбранный из по меньшей мере одного антагониста TNF (например, без ограничения, химического или белкового антагониста TNF, моноклонального или поликлонального антитела против TNF или фрагмента, растворимого TNF-рецептора (например, p55, p70 или p85) или фрагмента, их слитых белков или антагониста TNF в виде небольших молекул, например, TNF-связывающего белка I или II (TBP-I или TBP-II), нерелимонмаба, инфликсимаба, энтерасепта, CDP-571, CDP-870, афелимомаба, ленерцепта и т.п.), противоревматического средства (например, метотрексата, ауранофина, ауротиоглюкозы, азатиоприна, этанерцепта, золота натрия тиомалата,

гидроксихлорохина сульфата, лефлуномида, сульфасалзина), миорелаксанта, наркотического средства, нестероидного противовоспалительного средства (NSAID), анальгезирующего средства, анестезирующего средства, седативного, местного анестетика, нервно-мышечного блокатора, противомикробного средства (например, аминогликозида, противогрибкового средства, антипаразитарного средства, противовирусного средства, карбапенема, цефалоспорины, фторхинолона, макролида, пенициллина, сульфонамида, тетрациклина, другого противомикробного средства), антипсориазного средства, кортикостероида, анаболического стероида, связанного с диабетом средства, минерала, связанного с питанием средства, средства от заболеваний щитовидной железы, витамина, связанного с кальцием гормона, антидиарейного средства, средства против кашля, средства против рвоты, противоязвенного средства, слабительного средства, антикоагулянта, эритропоэтина (например, эпоэтина альфа), филграстима (например, G-CSF, нейروجена), сарграмостима (GM-CSF, лейкина), агента от хронических обструктивных легочных заболеваний (COPD), антифиброзного агента, агента для иммунизации, иммуноглобулина, иммунодепрессанта (например, базиликсимаба, циклоспорины, даклизумаба), гормона роста, замещающего гормон средства, модулятора рецептора эстрогена, мидриатического средства, средства от паралича аккомодации, алкилирующего агента, антимиетаболита, митотического ингибитора, радиофармацевтического средства, антидепрессанта, антимианкального агента, антипсихотического средства, транквилизатора, снотворного средства, симпатомиметического средства, возбуждающего средства, донепезила, такрина, средства от астмы, бета агониста, стероида для ингаляции, ингибитора локотриена, метилксантина, кромолина, эпинефрина или аналога, дорназы альфа (пульмозима), цитокина или антагониста цитокина. Неограничивающие примеры таких цитокинов включают, но не ограничиваются перечисленными, любой из IL-1-IL-29. Подходящие дозировки хорошо известны в данной области. См. например, Wells et al., eds., *Pharmacotherapy Handbook* 2<sup>nd</sup> Edition, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000); *PDR Pharmacopoeia*, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000), все из которых полностью включены сюда посредством ссылки.

Такие противораковые или противои инфекционные агенты могут также включать в себя молекулы токсина, которые ассоциируются, связаны, совместно образуют состав или совместно назначаются с по меньшей мере одним антителом согласно изобретению. Действие токсина может необязательно быть направлено на селективное уничтожение патологической клетки или ткани. Патологической клеткой может быть раковая клетка или другая клетка. Такие токсины могут быть, без ограничения, очищенным или рекомбинантным токсином или фрагментом токсина, включающим по меньшей мере один функциональный цитотоксический домен токсина, например, выбранного из по меньшей мере одного из рицина, дифтерийного токсина, токсина яда или бактериального токсина. Термин токсин также включает и эндотоксины, и экзотоксины, продуцируемые любыми встречающимися в природе, мутантными или рекомбинантными бактериями или вирусами, которые могут вызывать какое-либо патологическое состояние у людей и других млекопитающих, в том числе токсический шок, который может привести к смерти. Такие токсины могут включать в себя, без ограничения, неустойчивый к нагреванию энтеротоксин (LT) энтеротоксикогенной *E.coli*, устойчивый к нагреванию энтеротоксин (ST), цитотоксин *Shigella*, энтеротоксины *Aeromonas*, токсин-1 синдрома токсического шока (TSST-1), стафилококковый энтеротоксин A (SEA), B (SEB) или C (SEC), стрептококковые энтеротоксины и т.п. Такие бактерии включают, но не ограничиваются перечисленными, штаммы видов энтеротоксикогенной *E.coli* (ETEC), энтерогеморрагической *E.coli* (например, штаммы серотипа 0157:H7), виды *Staphylococcus* (например, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes*), виды *Shigella* (например, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* и *Shigella sonnei*), виды *Salmonella* (например, *Salmonella typhi*, *Salmonella cholerae-suis*, *Salmonella enteritidis*), виды *Clostridium* (например, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum*), виды *Campylobacter* (например, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter fetus*), виды *Helicobacter* (например, *Helicobacter pylori*), виды *Aeromonas* (например, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*), *Plesiomonas shigelloides*, *Yersinia enterocolitica*, виды *Vibrios* (например, *Vibrios cholerae*, *Vibrios parahemolyticus*), виды *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa* и виды *Streptococci*. См. например, Stein, ed., *INTERNAL MEDICINE*, 3<sup>rd</sup> ed., pp 1-13, Little, Brown and Co., Boston, (1990); Evans et al., eds., *Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control*, 2d. Ed., pp 239-254, Plenum Medical Book Co., New York (1991); Mandell et al., *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 3d. Ed., Churchill Livingstone, New York (1990); Berkow et al., eds., *The Merck Manual*, 16<sup>th</sup> edition, Merck and Co., Rahway, N.J., 1992; Wood et al., *FEMS Microbiology Immunology*, 76: 121-134 (1991); Marrack et al., *Science*, 248: 706-711 (1990), содержание которых полностью включено сюда посредством ссылки.

Содержащие антитело против MCP-1 соединения, композиции или комбинации согласно изобретению могут дополнительно содержать по меньшей мере один любой подходящий дополнительный агент, такой как, без ограничения, разбавитель, связующее вещество, стабилизатор, буферы, соли, липофильные растворители, консервант, адъювант и т.п. Предпочтительными являются фармацевтически приемлемые дополнительные агенты. В данной области хорошо известны их неограничивающие примеры и способы приготовления таких стерильных растворов, такие как, без ограничения, у Gennaro, Ed., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18<sup>th</sup> Edition, Mack Publishing Co. (Easton, PA) 1990. В заведенном порядке можно отобрать фармацевтически приемлемые носители, подходящие в отношении способа введения,

растворимости и/или стабильности антитела против МСР-1, фрагмента или вариантной композиции, хорошо известных в данной области и описанных здесь.

Фармацевтические наполнители и добавки, применимые в композициях согласно изобретению, включают, но не ограничиваются перечисленными, белки, пептиды, аминокислоты, липиды и углеводороды (например, сахара, включающие моносахариды, ди-, три-, тетра- и олигосахариды; дериватизированные сахара, такие как альдиты, альдоновые кислоты, эстерифицированные сахара и т.п.; и полисахариды или сахарные полимеры), которые могут быть представлены отдельно или в комбинации, составляющие по отдельности или в комбинации 1-99,99% по весу или объему. Примеры белковых наполнителей включают сывороточный альбумин, как, например, сывороточный альбумин человека (HSA), рекомбинантный альбумин человека (гНА), желатин, казеин и т.п. Представители компонентов в виде аминокислот/антител, которые могут также функционировать в буферной емкости, включают аланин, глицин, аргинин, бетаин, гистидин, глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, цистеин, лизин, лейцин, изолейцин, валин, метионин, фенилаланин, аспартам и т.п. Одной из предпочтительных аминокислот является глицин.

Углеводородные наполнители, подходящие для использования в настоящем изобретении, включают, например, моносахариды, такие как фруктоза, мальтоза, галактоза, глюкоза, D-манноза, сорбоза и т.п.; дисахариды, такие как лактоза, сахароза, трегалоза, целлобиоза и т.п.; полисахариды, такие как рафиноза, мелецитоза, мальтодекстрины, декстраны, крахмалы и т.п.; и альдиты, такие как маннит, ксилит, мальтит, лактит, ксилит, сорбит (глюцит), миоинозит и т.п. Предпочтительными углеводородными наполнителями для использования в настоящем изобретении являются маннит, трегалоза и рафиноза.

Содержащие антитело против МСР-1 композиции могут также включать в себя буфер или pH-регулирующий агент; как правило, буфером является соль, приготовленная из органической кислоты и основания. Представители буферов включают соли органических кислот, такие как соли лимонной кислоты, аскорбиновой кислоты, глюконовой кислоты, угольной кислоты, тартаровой кислоты, янтарной кислоты, уксусной кислоты или фталевой кислоты; трометамин гидрохлорид или фосфатные буферы. Предпочтительными буферами для использования в настоящем изобретении являются соли органических кислот, такие как цитрат.

Кроме того, содержащие антитело против МСР-1 композиции могут включать в себя полимерные наполнители/добавки, такие как поливинилпирролидоны, фиколлы (полимерные сахара), декстраты (например, циклодекстрины, такие как 2-гидроксипропил-β-циклодекстрин), полиэтиленгликоли, корригенты, противомикробные агенты, подсластители, антиоксиданты, антистатические агенты, поверхностно-активные вещества (например, полисорбаты, такие как "твин-20" и "твин-80"), липиды (например, фосфолипиды, жирные кислоты), стероиды (например, холестерин) и хелатирующие агенты (например, EDTA).

Эти и другие известные фармацевтические наполнители и/или добавки, подходящие для использования для антитела против МСР-1, части или вариантных композиций в соответствии с настоящим изобретением известны в данной области, например, те, которые перечислены в "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19<sup>th</sup> ed., Williams & Williams, (1995) и в "Physician's Desk Reference", 52<sup>nd</sup> ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998), содержание которых полностью включено сюда посредством ссылки. Предпочтительными материалами носителей или наполнителей являются углеводороды (например, сахара и альдиты) и буферы (например, цитратный) или полимерные агенты.

## 9. Композиции

Как отмечено выше, настоящим изобретением обеспечиваются стабильные композиции, пригодные для фармацевтического или ветеринарного использования, включающие по меньшей мере одно антитело против МСР-1 в фармацевтически приемлемой композиции.

Как отмечено выше, настоящим изобретением обеспечивается изделие производства, включающее в себя упаковочный материал и по меньшей мере один флакон, содержащий раствор по меньшей мере одного антитела против МСР-1 с прописанными буферами и/или консервантами необязательно в водном разбавителе, причем указанный упаковочный материал включает этикетку, в которой указывается на то, что такой раствор можно держать на протяжении периода, составляющего 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 40, 48, 54, 60, 66, 72 ч или больше. Кроме того, настоящее изобретение включает изделие производства, включающее в себя упаковочный материал, первый флакон, содержащий лиофилизированное по меньшей мере одно антитело против МСР-1, и второй флакон, содержащий водный разбавитель прописанного буфера или консерванта, причем указанный упаковочный материал включает этикетку, в которой приводится инструкция для пациента по воссозданию по меньшей мере одного антитела против МСР-1 в водном разбавителе с формированием раствора, который можно держать на протяжении периода, составляющего двадцать четыре часа или больше.

Диапазон по меньшей мере одного антитела против МСР-1 в продукте согласно изобретению включает количества, дающие при воссоздании, если присутствует в сырой/сухой системе, концентрации от приблизительно 1 мкг/мл до приблизительно 1000 мкг/мл, хотя более низкие и более высокие концентрации являются операбельными и зависят от носителя для предполагаемой доставки, например, композиции в виде раствора будут отличаться от пластыря для трансдермальной доставки, легочной, чрессли-

зистой или осмотической или микронасосной системы.

Водные разбавители необязательно дополнительно включают фармацевтически приемлемые консерванты. Предпочтительные консерванты включают те, которые выбирают из группы, состоящей из фенола, мета-крезола, папа-крезола, орто-крезола, хлоркрезола, бензилового спирта, алкилпарабена (метил-, этил-, пропил-, бутил- и т.п.), бензалькония хлорида, бензетония хлорида, натрия дегидроацетата и тимеросала или их смесей. Концентрация консерванта, используемого в композиции, представляет собой концентрацию, достаточную для получения противомикробного действия. Такие концентрации зависят от выбранного консерванта и без труда определяются квалифицированным специалистом.

Другие наполнители, например, изотонические агенты, буферы, антиоксиданты, усилители консервантов можно необязательно и предпочтительно добавить к разбавителю. Изотонические агенты, такие как глицерин, обычно используют при известных концентрациях. Физиологически допустимые буферы предпочтительно добавляют для обеспечения улучшенного контроля pH. Композиции могут находиться в широком диапазоне pH, таком как от приблизительно 4 до приблизительно 10, а предпочтительные диапазоны - от приблизительно 5 до приблизительно 9, и более предпочтительные диапазоны - от приблизительно 6 до приблизительно 8. Предпочтительно, композиции согласно изобретению имеют pH между приблизительно 6,8 и приблизительно 7,8. Предпочтительные буферы включают фосфатные буферы, наиболее предпочтительно натрия фосфат, особенно забуференный фосфатом раствор (PBS).

Для уменьшения агрегации к составам или композициям можно необязательно добавить другие добавки, такие как фармацевтически приемлемые солюбилизаторы, напоминающие твин 20 (полиоксиэтилен(20) сорбитан монолаурат), твин 40 (полиоксиэтилен(20) сорбитан монопальмитат), твин 80 (полиоксиэтилен(20) сорбитан моноолеат), плуроник F68 (блоксополимеры полиоксиэтилена и полиоксипропилен) и PEG (полиэтиленгликоль), или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбат 20 или 80, или полочсамер 184, или 188, Pluronic® polyols, другие блоксополимеры, и хелатообразующие вещества, такие как EDTA и EGTA. Эти добавки особенно полезны, если для введения композиции используют насос или пластмассовый контейнер. Присутствие фармацевтически приемлемых поверхностно-активных веществ уменьшает склонность белка к агрегации.

Композиции согласно изобретению можно приготовить способом, который включает смешивание по меньшей мере одного антитела против MCP-1 и забуференного раствора в количествах, достаточных для получения требуемых концентраций белка. Специалисту со средней квалификацией в данной области известны вариации этого способа. Например, порядок, в котором добавляют компоненты, если используются дополнительные добавки, температура и pH, при которых готовят композицию, являются всеми теми факторами, которые можно оптимизировать в отношении используемой концентрации и способа введения.

Заявленные композиции можно предоставить пациенту в виде растворов или в виде двух флаконов, включающих флакон с лиофилизированным по меньшей мере одним антителом против MCP-1, которое воссоздают с помощью второго флакона, содержащего воду, консервант и/или наполнители, предпочтительно фосфатный буфер и/или солевой раствор и выбранную соль, в водном разбавителе. Или единственный флакон с раствором, или два флакона, требующие воссоздания, можно вновь использовать много раз, и их может быть достаточно для единичного или множественных циклов лечения пациента, и, следовательно, они могут обеспечить более удобную схему лечения по сравнению с той, которая имеется в распоряжении в настоящее время.

Заявленные в настоящем изобретении изделия производства применяются для введения на протяжении периода, составляющего от тотчас же до двадцати четырех часов или больше. Соответственно, заявленные в настоящем изобретении изделия производства приносят значительную пользу пациенту. Композиции согласно изобретению можно необязательно благополучно хранить при температуре от приблизительно 2 до приблизительно 40°C, и они сохраняют биологическую активность белка в течение длительных периодов времени, что, следовательно, делает возможной этикетку упаковки, указывающую на то, что раствор можно держать и/или использовать на протяжении периода, составляющего 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 или 96 ч или больше. Если используют разбавитель с консервантом, такая этикетка может включать в себя указание на возможность использования до 1-12 месяцев, полугод, полутора и/или двух лет.

Заявленные продукты можно предоставить пациенту непрямо путем предоставления в аптеки, клиники и другие подобные учреждения и отделения прозрачных растворов или двух флаконов, включающих флакон с лиофилизированным по меньшей мере одним антителом против MCP-1, которое воссоздают с помощью второго флакона, содержащего водный разбавитель. Прозрачного раствора в этом случае может быть до одного литра или даже больше по объему, что обеспечивает большой резервуар, из которого более мелкие порции раствора по меньшей мере одного антитела могут извлекаться один или много раз для переноса в меньшие флаконы и предоставляться аптеками или клиникой покупателям и/или пациентам.

Признанные устройства, включающие эти системы в виде единственного флакона, включают устройства в виде ручки-инжектора для доставки раствора, такие как BD Pens, BD Autojector®, Humaject®,

NovoPen®, B-D®Pen, AutoPen®, OptiPen®, GenotropinPen®, Genotronorm Pen®, Humatro Pen®, Reco-Pen®, Roferon Pen®, Biojector®, Iject®, J-tip Needle-Free Injector®, Intraject®, Medi-Ject®, например, производимые или разработанные Becton Dickenson (Franklin Lakes, NJ, [www.bentondickenson.com](http://www.bentondickenson.com)), Disetronic (Burgdorf, Switzerland, [www.disetronic.com](http://www.disetronic.com)); Bioject, Portland, Oregon ([www.bioject.com](http://www.bioject.com)); National Medical Products, Weston Medical (Peterborough, UK, [www.weston-medical.com](http://www.weston-medical.com)); Medi-Ject Corp. (Minneapolis, MN, [www.mediject.com](http://www.mediject.com)). Признанные устройства, включающие систему в виде двух флаконов, включают системы в виде ручки-инжектора для воссоздания лиофилизированного лекарственного средства в картридже для доставки восстановленного раствора, такие как Humatro Pen®.

Заявленные здесь продукты включают упаковочный материал. Помимо информации, требуемой регулирующими агентствами, упаковочным материалом предоставляются условия, при которых можно использовать продукт. Упаковочный материал согласно изобретению предоставляет инструкции для пациента в отношении воссоздания по меньшей мере одного антитела против MCP-1 в водном разбавителе с образованием раствора и в отношении использования раствора на протяжении периода, составляющего 2-24 ч или больше, в случае продукта в виде двух флаконов (влажный/сухой). В случае продукта в виде раствора в единственном флаконе этикетка указывает на то, что такой раствор можно использовать на протяжении периода, составляющего 2-24 ч или больше. Заявленные здесь продукты применимы для фармацевтического использования продукта для человека.

Другие составы или способы стабилизации антитела против MCP-1 могут привести к композициям, отличным от прозрачного раствора лиофилизированного порошка, включающего указанное антитело. Среди непрозрачных растворов находятся композиции, включающие суспензии частиц, при этом указанные частицы представляют собой содержащую антитело против MCP-1 композицию различного размера по строению и известны по-разному как микросфера, микрочастица, наночастица, наносфера или липосома. Такие содержащие активный ингредиент, относительно гомогенные композиции в виде по существу сферических частиц могут быть образованы путем приведения в контакт водной фазы, содержащей активный ингредиент и полимер, с неводной фазой с последующим испарением неводной фазы для того, чтобы вызвать коалесценцию частиц из водной фазы, как говорится в патенте США № 4589330. Пористые микрочастицы можно приготовить с использованием первой фазы, содержащей активный ингредиент и полимер, диспергированный в постоянном растворителе, и удалением указанного растворителя из суспензии с помощью замораживания-сушки или разведения-экстракции-осаждения, как говорится в патенте США № 4818542. Предпочтительными полимерами для таких лекарственных средств являются встречающиеся в природе или синтетические сополимеры или полимеры, выбранные из группы, состоящей из желатинового агара, арабиногалактана, альбумина, коллагена, полигликолевой кислоты, полимолочной кислоты, гликолид-L-лактида, поли(эпсилон-капролактона), поли(эпсилон-капролактон-СО-молочной кислоты), поли(эпсилон-капролактон-СО-гликолевой кислоты), поли(р-гидроксibuтировой кислоты), полиэтиленоксида, полиэтилена, поли(алкил-2-цианоакрилата), поли(гидроксиэтилметакрилата), полиамидов, поли(аминокислот), поли(2-гидроксиэтил-DL-аспартамида), поли(эфира карбамида), поли(L-фенилаланина/этиленгликоля/1,6-диизоцианатгексана) и поли(метилметакрилата). Особенно предпочтительными полимерами являются полиэфиры, такие как полигликолевая кислота, полимолочная кислота, гликолид-L-лактид, поли(эпсилон-капролактон), поли(эпсилон-капролактон-СО-молочная кислота) и поли(эпсилон-капролактон-СО-гликолевая кислота). Растворители, применимые для растворения полимера и/или активного агента, включают воду, гексафторизопропанол, метилхлорид, тетрагидрофуран, гексан, бензол или гексафторацетон полутонный гидрат. Способ диспергирования содержащей активный агент фазы со второй фазой может включать в себя пропускание под давлением указанной первой фазы через сопло, чтобы повлиять на образование капелек.

Композиции в виде сухого порошка можно получить при использовании способов, отличных от лиофилизации, таких как распылительная сушка или экстракция растворителем, с помощью испарения или осаждения кристаллической композиции с последующими одной или несколькими стадиями для удаления водного или неводного растворителя. О приготовлении препарата антитела с помощью распылительной сушки говорится в патенте США № 6019968. Композиции на основе антител в виде сухого порошка можно получить с помощью распылительной сушки растворов или суспензий антител и, необязательно, наполнителей в растворе в условиях, обеспечивающих пригодный для вдыхания сухой порошок. Растворители могут включать в себя полярные соединения, такие как вода или этанол, которые можно легко высушить. Стабильность антител можно увеличить путем выполнения способов распылительной сушки в отсутствие кислорода, таких как под азотным слоем или с использованием азота в качестве осушающего газа. Другой относительно сухой композицией является дисперсия множества перфорированных микроструктур, диспергированных в суспензионной среде, обычно включающей диспергатор в виде гидрофторалкана, как говорится в заявке WO 9916419. Стабилизированные дисперсии можно вводить в легкое пациента с помощью ингалятора с отмеренными дозами. Оборудование, используемое при коммерческом производстве лекарственных средств с помощью распылительной сушки, производится Buchi Ltd. или Niri Corp.

По крайней мере одно антитело против MCP-1 или в стабильных или законсервированных компо-

зициях или растворах, описанных здесь, можно вводить пациенту в соответствии с настоящим изобретением с помощью различных способов доставки, включающих подкожную или внутримышечную инъекцию, трансдермальный, легочный, чресслизистый способ, имплантацию, осмотический нанос, картридж, микронанос или другие способы, известные квалифицированным специалистам, а также известные в данной области.

#### **10. Терапевтические применения**

Настоящим изобретением также обеспечивается способ модуляции или лечения по меньшей мере одного связанного с MCP-1 заболевания в клетке, ткани, органе, у животного или пациента, известного в данной области или описанного здесь, с использованием по меньшей мере одного антитела против MCP-1 согласно изобретению. Настоящим изобретением также обеспечивается способ модуляции или лечения по меньшей мере одного связанного с MCP-1 заболевания в клетке, ткани, органе, у животного или пациента, в том числе, без ограничения, по меньшей мере одного из злокачественного заболевания, метаболического заболевания, иммунного или родственного воспалительного заболевания, сердечно-сосудистого заболевания, инфекционного заболевания или неврологического заболевания.

Такие состояния выбирают, без ограничения, из заболеваний или состояний, опосредуемых адгезий клеток и/или развитием кровеносных сосудов. Такие заболевания или состояния включают иммунное нарушение или заболевание, сердечно-сосудистое нарушение или заболевание, инфекционное, злокачественное и/или неврологическое нарушение или заболевание и другие известные или определенные связанные с MCP-1 состояния. В частности, антитела применимы для лечения заболеваний, в которые вовлечено развитие кровеносных сосудов, таких как заболевание глаз и опухолевое заболевание, реконструкция тканей, такая как рестеноз, и пролиферация определенных типов клеток, в частности, эпителиальные и чешуйчатоклеточные карциномы. Конкретные показания включают применение для лечения атеросклероза, рестеноза, раковых метастазов, ревматоидного артрита, диабетической ретинопатии и дегенерации желтого пятна. Нейтрализующие антитела согласно изобретению также применимы для профилактики или лечения нежелательной резорбции или деградации кости, например, что обнаружено при остеопорозе или является результатом сверхэкспрессии RТНгР некоторыми опухолями. Антитела также применимы для лечения различных фиброзных заболеваний, таких как идиопатический фиброз легкого, диабетическая нефропатия, гепатит и цирроз.

Таким образом, настоящим изобретением также обеспечивается способ модуляции или лечения по меньшей мере одного связанного с MCP-1 заболевания клетки, ткани, органа, животного или пациента, известного в данной области или описанного здесь, с использованием по меньшей мере одного антитела против MCP-1 согласно изобретению. Конкретные показания обсуждаются ниже.

##### **Легочное заболевание**

Настоящим изобретением также обеспечивается способ модуляции или лечения по меньшей мере одного легочного заболевания в клетке, ткани, органе, у животного или пациента, в том числе, без ограничения, по меньшей мере одного из следующих: пневмонии; абсцесса легкого; профессиональных заболеваний легких, вызванных агентами в форме пыли, газов или аэрозолей; астмы; бронхолита фиброзного облитерирующего, дыхательной недостаточности; аллергических заболеваний легких, включающих аллергический пневмонит (экзогенный аллергический альвеолит); аллергический бронхолегочный аспергиллез и реакции на лекарственные средства; респираторного дистресс-синдрома у взрослых (ARDS); синдрома Гудпасчера; хронических обструктивных заболеваний легких (COPD); идиопатических интерстициальных заболеваний легких, таких как идиопатический легочный фиброз и саркоидоз; десквамативной интерстициальной пневмонии; острой интерстициальной пневмонии; респираторного ассоциированного с бронхолитом интерстициального заболевания легких, идиопатического бронхолита, облитерирующего с организуемой пневмонией; лимфоцитарного интерстициального пневмонита; гранулематоза из клеток Лангерганса; идиопатического гемосидероза легкого; острого бронхита; альвеолярного диспротеиноза легкого; бронхоэктаза; плевральных нарушений; ателектаза; кистозного фиброза; опухолей легкого и легочной эмболии.

##### **Злокачественное заболевание**

Настоящим изобретением также обеспечивается способ модуляции или лечения по меньшей мере одного злокачественного заболевания в клетке, ткани, органе, у животного или пациента, в том числе, без ограничения, по меньшей мере одного из следующих: лейкоза, острого лейкоза, острого лимфобластного лейкоза (ALL), В-клеточного, Т-клеточного или FAB ALL, острого миелоидного лейкоза (AML), хронического миелоцитарного лейкоза (CML), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), волосатоклеточного лейкоза, миелодиспластического синдрома (MDS), лимфомы, болезни Ходжкина, злокачественной лимфомы, неходжкинской лимфомы, лимфомы Беркитта, множественной миеломы, саркомы Капоши, карциномы толстой и прямой кишок, карциномы поджелудочной железы, почечноклеточной карциномы, рака молочной железы, носоглоточной карциномы, злокачественного гистиоцитоза, преднеопластического синдрома/гиперкальциемии злокачественного развития, солидных опухолей, аденокарцином, чешуйчатоклеточных карцином, сарком, злокачественной меланомы, особенно метастатической меланомы, гемангиомы, метастатического заболевания, связанной с раком резорбции кости, связанной с раком боли в кости и т.п.



### **Иммунное или родственное воспалительное заболевание**

Настоящим изобретением также обеспечивается способ модуляции или лечения по меньшей мере одного иммунного или родственного воспалительного заболевания в клетке, ткани, органе, у животного или пациента, в том числе, без ограничения, по меньшей мере одного из следующих: ревматоидного артрита, болезни Стилла, ювенильного ревматоидного артрита с системным началом, псориазического артрита, болезни Бехтерева, язвы желудка, серонегативной артропатии, остеоартрита, воспалительного заболевания кишечника, неспецифического язвенного колита, системной красной волчанки, антифосфолипидного синдрома, иридоциклита/увеита/ретробульбарного неврита, идиопатического фиброза легкого, системного васкулита/гранулематоза Вегенера, саркоидоза, орхита/способов реверсирования вазэктомии, аллергических/атопических заболеваний, астмы, аллергического ринита, экземы, аллергического контактного дерматита, аллергического конъюнктивита, аллергического пневмонита, трансплантатов, отторжения трансплантированного органа, заболевания трансплантат против хозяина, синдрома системной воспалительной реакции, синдрома сепсиса, сепсиса, вызванного грамположительными бактериями, сепсиса, вызванного грамотрицательными бактериями, негативного по культуре сепсиса, грибкового сепсиса, нейтропенической лихорадки, уросепсиса, менингококкемии, травмы/кровотечения, ожогов, воздействия ионизирующей радиации, острого панкреатита, респираторного дистресс-синдрома у взрослых, ревматоидного артрита, индуцированного алкоглем гепатита, хронических воспалительных болезней, саркоидоза, болезни Крона, серповидноклеточной анемии, диабета, нефроза, атопических болезней, реакций гиперчувствительности, аллергического ринита, сенной лихорадки, перенниального ринита, конъюнктивита, эндометриоза, астмы, крапивницы, системной анафилаксии, дерматита, пернициозной анемии, гемолитического заболевания, тромбоцитопении, отторжения трансплантата любого органа или ткани, отторжения трансплантированной почки, отторжения трансплантированного сердца, отторжения трансплантированной печени, отторжения трансплантированной поджелудочной железы, отторжения трансплантированного легкого, отторжения трансплантированного костного мозга (ВМТ), отторжения аллотрансплантата кожи, отторжения трансплантированного хряща, отторжения трансплантированной кости, отторжения трансплантированной тонкой кишки, отторжения имплантированного эмбрионального тимуса, отторжения трансплантированной паразитовидной железы, отторжения ксенотрансплантата любого органа или ткани, отторжения аллотрансплантата, антирецепторных аллергических реакций, болезни Грейвса, болезни Рейно, инсулинрезистентного диабета типа В, астмы, миастении тяжелой опосредованной антителами цитотоксичности, реакций гиперчувствительности типа III, системной красной волчанки, синдрома POEMS (полиневропатии, органомегалии, эндокринопатии, моноклональной гаммопатии и синдрома измененной кожи), полиневропатии, органомегалии, эндокринопатии, моноклональной гаммопатии, синдрома измененной кожи, антифосфолипидного синдрома, пузырчатки, склеродермы, смешанного заболевания соединительной ткани, идиопатической болезни Аддисона, сахарного диабета, хронического острого гепатита, первичного билиарного цирроза печени, витилиго, васкулита, пост-МІ-кардиотомического синдрома, гиперчувствительности типа IV, контактного дерматита, аллергического пневмонита, отторжения аллотрансплантата, гранулемы вследствие внутриклеточных организмов, чувствительности к лекарственному средству, метаболического/идиопатического нарушения, болезни Вильсона, гемохроматоза, недостатка альфа-1-антитрипсина, диабетической ретинопатии, зоба Хасимото, остеопороза, экспертизы системы гипоталамус-гипофиз-надпочечники, первичного билиарного цирроза печени, тиреоидита, энцефаломиелита, кахексии, фиброза мочевого пузыря, неонатального хронического заболевания легкого, хронического обструктивного заболевания легкого (COPD), семейного гематофагоцитарного лимфогистиоцитоза, дерматологических состояний, псориаза, алопеции, нефротического синдрома, нефрита, гломерулярного нефрита, острой почечной недостаточности, гемодиализа, уремии, токсичности, преэклампсии, терапии ОКТЗ, анти-CD3 терапии, терапии цитокинами, химиотерапии, терапии облучением (в том числе, без ограничения, астении, анемии, кахексии и т.п.), хронической интоксикации салицилатами и т.п. Смотри, например, the Merck Manual, 12<sup>th</sup>-17<sup>th</sup> Editions, Merck & Company, Rahway, NJ (1972, 1977, 1982, 1987, 1992, 1999), Pharmacotherapy Handbook, Wells et al., eds., Second Edition, Appleton and Lange, Stamford, Conn. (1998, 2000), все из которых полностью включены посредством ссылки.

### **Сердечно-сосудистое заболевание**

Настоящим изобретением также обеспечивается способ модуляции или лечения по меньшей мере одного сердечно-сосудистого заболевания в клетке, ткани, органе, у животного или пациента, в том числе, без ограничения, по меньшей мере одного из следующих: синдрома остановки сердца, инфаркта миокарда, застойной сердечной недостаточности, удара, ишемического приступа, кровотечения, артериосклероза, атеросклероза, рестеноза, диабетической артериосклеротической болезни, гипертензии, артериальной гипертензии, вазоренальной гипертензии, обморока, шока, сифилиса сердечно-сосудистой системы, сердечной недостаточности, легочного сердца, первичной легочной гипертензии, сердечной аритмии, предсердных эктопических систол, трепетания предсердия, мерцания предсердия (непрерывного или пароксизмального), постперфузионного синдрома, воспалительной реакции на аппарат искусственного кровообращения, хаотической или многоочаговой предсердной тахикардии, тахикардии с регулярными узкими комплексами QRS, специфических аритмий, фибрилляции желудочков, связанных с пуч-

ком Гиса аритмий, предсердно-желудочковой блокады, межжелудочковой блокады, ишемических повреждений миокарда, заболевания коронарных артерий, стенокардии, инфаркта миокарда, кардиомиопатии, распространяющейся застойной кардиомиопатии, рестриктивной кардиомиопатии, болезней сердечных клапанов, эндокардита, болезни перикарда, опухолей сердца, аневризмы аорты, периферической аневризмы, расслоения аорты, воспаления аорты, окклюзии брюшной аорты и ее ветвей, заболеваний периферических сосудов, обтурирующих артериальных нарушений, периферического атеросклеротического заболевания, тромбангита облитерирующего, функциональных нарушений периферических артерий, симптома и болезни Рейно, акроцианоза, эритромелалгии, болезней вен, тромбоза вен, варикозного расширения вен, артериовенозного свища, лимфедермы, липедемы, нестабильной стенокардии, нарушения реперфузии, синдрома отсоединения от аппарата искусственного кровообращения, ишемии-нарушения реперфузии и т.п. Такой способ может необязательно включать в себя введение эффективного количества композиции или фармацевтической композиции, включающей по меньшей мере одно антитело против MCP-1, в клетку, ткань, орган, животному или пациенту, нуждающихся в такой модуляции, обработке или лечении.

### **Неврологическое заболевание**

Настоящим изобретением также обеспечивается способ модуляции или лечения по меньшей мере одного неврологического заболевания в клетке, ткани, органе, у животного или пациента, в том числе, без ограничения, по меньшей мере одного из следующих: нейродегенеративных заболеваний; рассеянного склероза; мигрени; сложной деменции AIDS; болезней

демиелинизации, таких как рассеянный склероз и острый поперечный миелит; экстрапирамидальных и мозжечковых нарушений, таких как повреждения кортикоспинальной системы; нарушений базальных ядер или мозжечковых нарушений; гиперкинезов, таких как хорей Гентингтона и сенильная хорей; индуцированных лекарственным средством нарушений движения, таких как те, которые индуцируются лекарственными средствами, которые блокируют допаминовые рецепторы центральной нервной системы; гиперкинезов, такие как болезнь Паркинсона; прогрессивного супрануклеарного паралича; структурных повреждений мозжечка, спинномозжечковых дегенерации, таких как спинальная атаксия, атаксия Фридрейха, мозжечковые кортикальные дегенерации, дегенерации множества систем (болезни Менцель, болезни Дежерина-Тома, синдрома Шая-Дрейджера и болезни Мачадо-Джозефа); системных нарушений (болезни Рефсума, абеталипопротеинемии, атаксии, телеангиэктазии и митохондриальных многосистемных нарушений); основных нарушений в виде демиелинизации, таких как рассеянный склероз, острый поперечный миелит; и нарушений моторной функции, таких как нейрогенная мышечная атрофия (дегенерация передних корешков клетки, такая как боковой амиотрофический склероз, младенческая спинальная мышечная атрофия и ювенильная спинальная мышечная атрофия); болезни Альцгеймера; болезни Дауна в среднем возрасте; диффузного заболевания организма Леви; сенильной деменции организма типа Леви; синдрома Вернике-Корсакова; хронического алкоголизма; болезни Крейтцфельда-Якоба, подострого склерозирующего лейкоэнцефалита; болезни Галлервордена-Шпатца и деменции боксеров и т.п. Такие способы могут необязательно включать в себя введение эффективного количества композиции или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно антитело против TNF или точно определенную часть или вариант, в клетку, ткань, орган, животному или пациенту, нуждающемуся в такой модуляции, обработке или лечении. См. например, Merck Manual, 16<sup>th</sup> Edition, Merck & Company, Rahway, NJ (1992).

### **Фиброзные состояния**

Помимо вышеуказанных состояний и болезней настоящим изобретением также обеспечивается способ модуляции или лечения фиброзных состояний различных этиологий, таких как фиброз печени (в том числе, без ограничения, индуцированный алкоголем цирроз, индуцированный вирусом цирроз, аутоиммунный индуцированный гепатит); фиброз легкого (в том числе, без ограничения, склеродерма, идиопатический фиброз легкого); фиброз почки (в том числе, без ограничения, склеродерма, диабетический нефрит, гломерулярный нефрит, волчаночный нефрит); фиброз кожи (в том числе, без ограничения, склеродерма, гипертрофическое и келоидное рубцевание, ожоги); миелофиброз; нейрофиброматоз; фиброма; фиброз кишечника и фиброзное заживление, являющееся результатом хирургических процедур.

Настоящим изобретением также обеспечивается способ модуляции или лечения по меньшей мере одной раны, травмы или повреждения ткани или хронического состояния, являющегося результатом указанного выше или связанного с указанным выше, в клетке, ткани, органе, у животного или пациента, в том числе, без ограничения, по меньшей мере одного из следующих: повреждения организма или травмы, связанной с хирургическим вмешательством, включающим торакальную, абдоминальную, краниальную или оральную хирургию; или указанный способ, при котором рану выбирают из группы, состоящей из асептических ран, ушибленных ран, резаных ран, рваных ран, непроникающих ранений, открытых ран, проникающих ранений, сквозных ранений, колотых ран, септических ран, инфарктов и поверхностных ран; или указанный способ, при котором рану выбирают из группы, состоящей из ишемических язв, пролежней, свищей, серьезных укусов, термальных ожогов и связанных с донорским участком ран; или указанный способ, при котором рана представляет собой афты, травматическую рану и связанную с вирусом герпеса рану. Связанными с донорским участком ранами являются раны, которые, например,

имеют место в связи с переносом твердой ткани из одной части тела в другую часть тела, например, при трансплантации. Являющиеся результатом таких операций раны являются очень болезненными и, следовательно, наиболее ценным является улучшенное заживление. Фиброз раны также поддается лечению с использованием антител против MCP-1, поскольку первыми клетками, внедряющимися в раневую область, являются нейтрофилы, за которыми следуют моноциты, которые активируются макрофагами. Считают, что макрофаги необходимы для эффективного заживления раны, поскольку они также ответственны за фагоцитоз патогенных организмов и удаление тканевого дебриса. Кроме того, они высвобождают ряд факторов, вовлеченных в последующие события процесса заживления. Макрофаги вызывают аттракцию фибробластов, которые начинают продуцировать коллаген. Почти все процессы восстановления ткани включают раннее образование соединительной ткани, стимуляция этого процесса и последующих процессов приводит к улучшению восстановления ткани, однако сверхпродукция соединительной ткани и коллагена может привести к образованию фиброзной ткани, являющейся неэластичной и гипоксичной. Антитела против MCP-1 согласно изобретению можно использовать в способах модуляции, лечения или профилактики таких результатов заживления раны.

Антитела согласно изобретению можно также использовать в способах модуляции или лечения по меньшей мере одного симптома хронического отторжения трансплантированного органа, ткани или клетки, как, например, трансплантированного сердца.

### **Другие терапевтические применения антител против MCP-1**

Настоящим изобретением также обеспечивается способ модуляции или лечения по меньшей мере одного инфекционного заболевания в клетке, ткани, органе, у животного или пациента, в том числе, без ограничения, по меньшей мере одного из следующих: острой или хронической бактериальной инфекции, острых или хронических паразитарных или инфекционных процессов, в том числе бактериальных, вирусных или грибковых инфекций, HIV инфекции/HIV нейропатии, менингита, гепатита (А, В или С и т.п.), септического артрита, перитонита, пневмонии, эпиглоттита, E.coli 0157:n7, гемолитического уремического синдрома/тромбоцитопенического акроангиотромбоза, малярии, геморрагической лихорадки Денге, лейшманиоза, проказы, синдрома токсического шока, стрептококкового миозита, газовой гангрены, вызванного микобактериями туберкулеза, микобактерий птиц внутриклеточных, пневмоцитарной пневмонии килля, воспалительного заболевания таза, орхита/эпидидимита, легионелл, болезни Лима, гриппа, вируса Эпштейна-Барра, связанного с жизнью гемафагоцитарного синдрома, витального энцефалита/асептического менингита и т.п.

Любой способ согласно изобретению может включать в себя введение эффективного количества композиции или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно антитело против MCP-1, в клетку, ткань, орган, животному или пациенту, нуждающемуся в такой модуляции, обработке или лечении. Такой способ может необязательно дополнительно включать в себя введение по меньшей мере одного агента, выбранного из по меньшей мере одного антагониста TNF (например, без ограничения, антитела против TNF или фрагмента, растворимого TNF-рецептора или фрагмента, их слитых белков или антагониста TNF в виде небольших молекул), противоревматического средства (например, метотрексата, ауранофина, ауротиоглюкозы, азатиоприна, этанерцепта, золота натрия тиомалата, гидроксихлорохина сульфата, лефлуномида, сульфасалзина), миорелаксанта, наркотического средства, нестероидного противовоспалительного средства (NSAID), анальгезирующего средства, анестезирующего средства, седативного, местного анестетика, нервно-мышечного блокатора, противомикробного средства (например, аминогликозида, противогрибкового средства, антипаразитарного средства, антивирусного средства, карбапенема, цефалоспорины, фторхинолона, макролида, пенициллина, сульфонида, тетрациклина, другого противомикробного средства), антипсориазного средства, кортикостероида (дексаметазона), анаболического стероида (тестостерона), связанного с диабетом средства, минерала, связанного с питанием средства, средства для заболеваний щитовидной железы, витамина, связанного с кальцием гормона, антидиарейного средства, средства против кашля, средства против рвоты, противоязвенного средства, слабительного средства, антикоагулянта, эритропоэтина (например, эпоэтина альфа), филграстима (например, G-CSF, нейрогена), сарграмостима (GM-CSF, лейкина), агента для иммунизации, иммуноглобулина (ритуксимаба), иммунодепрессанта (например, базиликсимаба, циклоспорина, даклизумаба), гормона роста, антагониста гормона, антагониста полового гормона (флутамида, нулитамида), модулятора высвобождения гормона (лейпролида, гозерелина), замещающего гормон средства, модулятора рецептора эстрогена (тамоксифена), ретиноида (третиноина), ингибитора топоизомеразы (этопозид, иринотекана), цитоксина (доксорубицина), мидриатического средства, средства для паралича аккомодации, алкилирующего агента (карбоплатина), нитрогена мустарда (мелфалена, хлорабуцила), нитрозомочевины (кармустина, эстрамустина), антиметаболита (метотрексата, цитарабина, фторурацила), митотического ингибитора (винкристина, таксола), радиофармацевтического средства (йод<sup>131</sup>-госитумомаба), радиосенсибилизатора (мизонидазола, тирапазамина), антидепрессанта, антимианкального агента, антипсихотического средства, транквилизатора, снотворного средства, симпатомиметического средства, возбуждающего средства, донепезила, такрина, средства от астмы, бета агониста, стероида для ингаляции, ингибитора лекотриена, метилксантина, кромолина, эпинефрина или аналога, дорназы альфа (пульмозима), цитокина (интерферона альфа-2, IL-2) или антагониста цитокина (инфликсимаба). Подходящие дозиров-

ки известны в данной области. См., например, Wells et al., eds., *Pharmacotherapy Handbook*, 2<sup>nd</sup> Edition, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000); *PDR Pharmacopoeia*, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000), все из которых полностью включены сюда посредством ссылки.

Конкретные комбинации для лечения опухолевых заболеваний включают совместное введение или комбинированную терапию при введении (до, в одно и то же время и/или после) противоопухолевого агента, такого как алкилирующий агент, нитроген мустард, нитрозомочевина, антибиотик, антиметаболит, агонист или антагонист гормона, иммуномодулятор и т.п. При использовании для лечения метастатической меланомы и других опухолевых заболеваний предпочтительной комбинацией является совместное введение антитела с дакарбазином, интерфероном альфа, интерлейкином-2, темозоломидом, цисплатином, винбластином, иматиниба месилатомом, кармустином, паклитакселем и т.п. Для метастатической меланомы предпочтительным является дакарбазин.

#### 11. Дозировки и способы введения

Способ согласно изобретению может включать в себя способ лечения опосредуемого MCP-1 нарушения, включающий в себя введение эффективного количества композиции или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно антитело против MCP-1, в клетку, ткань, орган, животному или пациенту, нуждающемуся в такой модуляции, обработке или лечении. Для лечения таких заболеваний или нарушений такой способ может необязательно дополнительно включать в себя совместное введение или комбинированную терапию, причем введение указанного по меньшей мере одного антитела против MCP-1, его точно определенной части или варианта дополнительно включает введение (до, в одно и то же время и/или после) по меньшей мере одного агента, выбранного из средства от заболеваний почки, дерматологического средства, средства против развития кровеносных сосудов, противоинфекционного средства, средства от заболеваний сердечно-сосудистой системы, средства от заболеваний центральной нервной системы, средства от заболеваний вегетативной нервной системы, средства от заболеваний дыхательных путей, средства от заболеваний желудочно-кишечного тракта, гормонального средства, средства для водно-солевого баланса, гематологического средства, противоопухолевого средства, средства для иммуномодуляции, средства от заболеваний глаз, уха или носа, средства для местного применения, связанного с питанием средства и т.п., по меньшей мере одного антагониста TNF (например, без ограничения, антитела против TNF или фрагмента, растворимого TNF-рецептора или фрагмента, их слитых белков или антагониста TNF в виде небольших молекул), противоревматического средства (например, метотрексата, ауранофина, ауротиоглюкозы, азатиоприна, этанерцепта, золота натрия тиомалата, гидроксихлорохина сульфата, лефлуномида, сульфасалзина), миорелаксанта, наркотического средства, нестероидного противовоспалительного средства (NSAID), анальгезирующего средства, анестезирующего средства, седативного, местного анестетика, нервно-мышечного блокатора, противомикробного средства (например, аминогликозида, противогрибкового средства, антипаразитарного средства, антивирусного средства, карбапенема, цефалоспорины, фторхинолона, макролида, пенициллина, сульфонамида, тетрациклина, другого противомикробного средства), антипсориазного средства, кортикостероида, анаболического стероида, связанного с диабетом средства, минерала, связанного с питанием средства, средства от заболеваний щитовидной железы, витаминов, связанного с кальцием гормона, антидиарейного средства, средства против кашля, средства против рвоты, противоязвенного средства, слабительного средства, антикоагулянта, эритропоэтина (например, эпоэтина альфа), филграстима (например, G-CSF, нейрогена), сарграмостима (GM-CSF, лейкина), агента для иммунизации, иммуноглобулина, иммунодепрессанта (например, базиликсимаба, циклоспорины, даклизумаба), гормона роста, замещающего гормон средства, модулятора рецептора эстрогена, мидриатического средства, средства от паралича аккомодации, алкилирующего агента, антиметаболита, митотического ингибитора, радиофармацевтического средства, антидепрессанта, антимианкального агента, антипсихотического средства, транквилизатора, снотворного средства, симпатомиметического средства, возбуждающего средства, донепезила, такрина, средства от астмы, бета агониста, стероида для ингаляции, ингибитора лейкотриена, метилксантина, кромолина, эпинефрина или аналога, дорназы альфа (пульмозима), цитокина или антагониста цитокина. Такие лекарственные средства, в том числе для каждого из них композиции, показания, дозировки и введение, хорошо известны в данной области (см., например, *Nursing 2001 Handbook of Drugs*, 21<sup>st</sup> edition, Springhouse Corp., Springhouse, PA, 2001; *Health Professional's Drug Guide 2001*, ed., Shannon, Wilson, Stang, Prentice-Hall, Inc, Upper Saddle River, NJ; *Pharmacotherapy Handbook*, Wells et al., ed., Appleton & Lange, Stamford, CT, все из которых полностью включены сюда посредством ссылки).

Как правило, лечение патологического состояния осуществляют с помощью введения эффективного количества дозировки, содержащей по меньшей мере одно антитело против MCP-1 композиции, которое в итоге, в среднем, находится в диапазоне от по меньшей мере приблизительно 0,01 до 500 мг по меньшей мере одного антитела против MCP-1 на килограмм веса пациента на дозу, и предпочтительно от по меньшей мере приблизительно 0,1 до 100 мг антитела на килограмм веса пациента на однократное или многократное введение, в зависимости от специфической активности содержащегося в композиции антитела. В альтернативном случае эффективная концентрация в сыворотке может включать в себя 0,1-5000 мкг/мл на однократное и многократное введение. Подходящие дозировки известны практикующим

врачам и, конечно, зависят от состояния конкретного заболевания, специфической активности вводимой композиции и конкретного пациента, подвергаемого лечению. В некоторых случаях для достижения требуемого терапевтического количества может быть необходимым обеспечение повторного введения, т.е. индивидуальных повторных введений особенно контролируемой или отмеренной дозы, причем индивидуальные введения повторяют до тех пор, пока не будет достигнута требуемая суточная доза или эффект.

Предпочтительные дозы могут необязательно включать в себя 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 и/или 100-500 мг/кг/введение или любой диапазон, величину или долю указанных величин или достигать концентрации в сыворотке, составляющей 0,1, 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,5, 1,9, 2,0, 2,5, 2,9, 3,0, 3,5, 3,9, 4,0, 4,5, 4,9, 5,0, 5,5, 5,9, 6,0, 6,5, 6,9, 7,0, 7,5, 7,9, 8,0, 8,5, 8,9, 9,0, 9,5, 9,9, 10, 10,5, 10,9, 11, 11,5, 11,9, 12, 12,5, 12,9, 13, 13,5, 13,9, 14,0, 14,5, 14,9, 15, 15,5, 15,9, 16, 16,5, 16,9, 17, 17,5, 17,9, 18, 18,5, 18,9, 19, 19,5, 19,9, 20, 20,5, 20,9, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 96, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 и/или 5000 мкг/мл на однократное или многократное введение или любой диапазон, величину или долю указанных величин.

В альтернативном случае вводимые дозы могут варьировать в зависимости от известных факторов, таких как фармакодинамические характеристики конкретного агента и способ и путь его введения; возраст, состояние здоровья и вес реципиента; природа и продолжительность симптомов, вид сопутствующего лечения, частота лечения и требуемый эффект. Обычно дозы активного ингредиента могут составлять приблизительно от 0,1 до 100 мг/кг веса тела. Обычно от 0,1 до 50, и предпочтительно от 0,1 до 10 мг/кг на введение или в форме с непрерывным высвобождением являются эффективными для получения желаемых результатов.

Неограничивающим примером является лечение людей или животных, которое можно предоставить в виде однократной или периодической дозы по меньшей мере одного антитела согласно изобретению, составляющей от 0,1 до 100 мг/кг, такой как 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/кг в день, в по меньшей мере один из следующих дней: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40, или альтернативно или дополнительно на по меньшей мере одной из следующих недель: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 или 52, или альтернативно или дополнительно на по меньшей мере один из следующего: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 год, или в любой их комбинации, используя единичные, повторные дозы или инфузию.

Дозированные формы (композиции), подходящие для внутреннего применения, обычно содержат от приблизительно 0,001 мг до приблизительно 500 мг активного ингредиента на единицу или контейнер. В этих фармацевтических композициях активный ингредиент обычно присутствует в количестве приблизительно 0,5-99,999% (в весовом отношении) в расчете на общий вес композиции.

Для парентерального введения антитело можно приготовить в виде раствора, суспензии, эмульсии, частицы, порошка или лиофилизированного порошка, предоставляемых отдельно или вместе с фармацевтически приемлемым парентеральным носителем. Примерами таких носителей являются вода, солевой раствор, раствор Рингера, раствор декстрозы и 1-10% сывороточного альбумина человека. Можно также использовать липосомы и неводные носители, такие как фиксированные масла. Носитель или лиофилизированный порошок могут содержать добавки, которые поддерживают изотоничность (например, натрия хлорид, маннит) и химическую стабильность (например, буферы и консерванты). Композицию стерилизуют с помощью известных или подходящих способов. Подходящие фармацевтические носители описаны в самом последнем выпуске Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol, стандартном ссылочном тексте в данной области.

#### **Альтернативное введение**

Многие известные и разработанные способы могут быть использованы в соответствии с настоящим изобретением для введения фармацевтически эффективных количеств по меньшей мере одного антитела против МСР-1 согласно изобретению. Несмотря на то, что в последующем описании применяется легочное введение, можно использовать другие способы введения в соответствии с настоящим изобретением с получением подходящих результатов. Антитела против МСР-1 согласно изобретению можно доставить в носитель, в виде раствора, эмульсии, коллоидного раствора или суспензии или в виде сухого порошка, используя любое из множества устройств и способов, подходящих для введения путем ингаляции или других способов, описанных здесь или известных в данной области.

#### **Парентеральные композиции и введение**

Композиции для парентерального введения могут содержать в качестве обычных наполнителей стерильную воду или солевой раствор, полиалкиленгликоли, такие как полиэтиленгликоль, масла растительного происхождения, гидрогенизированные нафталины и т.п. Суспензии в воде или масле для инъ-

екции можно приготовить с использованием соответствующего эмульгатора или увлажнителя и агента для суспендирования в соответствии с известными способами. Агенты для инъекции могут быть нетоксичными, не орально вводимыми разбавляемыми агентами, такими как водный раствор или стерильный инъектируемый раствор, или суспензия в растворителе. В качестве применимого носителя или растворителя разрешается вода, раствор Рингера, изотонический солевой раствор и т.п.; в качестве обычного растворителя или растворителя для суспендирования можно использовать стерильное нелетучее масло. Для этих целей можно использовать любую разновидность нелетучего масла и жирной кислоты, в том числе природные или синтетические, или полусинтетические жирные масла или жирные кислоты; природные или синтетические, или полусинтетические моно- или ди- или триглицериды. Парентеральное введение известно в данной области и включает, без ограничения, традиционные способы инъекций, безыгольное инъекционное устройство со сжатым газом или устройство в виде лазерного перфоратора, хорошо известные в данной области (например, без ограничения, материалы и методы, раскрытые в патенте США № 5851198 и патенте США № 5839446, полностью включенные сюда посредством ссылки).

#### **Альтернативная доставка**

Кроме того, настоящее изобретение относится к введению по меньшей мере одного антитела против МСР-1 следующим способом: парентеральным, подкожным, внутримышечным, внутривенным, интраартикулярным, эндобронхиальным, интраабдоминальным, интракапсулярным, внутрихрящевым, внутриполостным, внутрибрюшным, внутримозжечковым, интрацеребровентрикулярным, в толстую кишку, интрацервикальным, внутрижелудочным, внутрипеченочным, интрамиокардиальным, внутрикостным, в почечную лоханку, интраперикардиальным, интраперитонеальным, интраплевральным, в предстательную железу, внутрилегочным, интра ректальным, внутрипочечным, интра ретинальным, интраспинальным, внутрисуставным, интраторакальным, внутриматочным, внутрипузырным, внутрь повреждения, с использованием болюса, вагинальным, ректальным, трансбуккальным, подъязычным, интраназальным или трансдермальным. Содержащую по меньшей мере одно антитело против МСР-1 композицию можно приготовить для парентерального (подкожного, внутримышечного или внутривенного) введения или для любого другого введения, в частности, в форме жидких растворов или суспензий; для вагинального или ректального введения - в частности, в полужидких формах, таких как, без ограничения, кремы и суппозитории; для трансбуккального или подъязычного применения - в частности, в форме таблеток или капсул; или для интраназального применения, в частности, в форме порошков, капель для носа или аэрозолей или определенных агентов; или для трансдермального введения, в частности, в форме геля, мази, лосьона, суспензии или системы доставки в виде пластыря с химическими усилителями, как, например, диметилсульфоксид, для или модификации структуры кожи, или для увеличения концентрации лекарственного вещества в пластыре для трансдермального применения (Junginger, et al. In "Drug Permeation Enhancement; Hsieh, D.S., Eds., pp. 59-60; Marcel Dekker, Inc. New York 1994; полностью включенный сюда посредством ссылки), или с окислителями, делающими возможным применение композиций, содержащих белки и пептиды, на кожу (WO 98/53847), или применения электрических полей для создания преходящих транспортных путей, как, например, электропорации, или для увеличения подвижности заряженных лекарственных веществ через кожу, как, например, ионофореза, или применение ультразвука, как, например, ультразвукового фореза (патенты США №№ 4309989 и 4767402) (при этом все публикации и патенты полностью включены сюда посредством ссылки).

#### **Легочное/назальное введение**

Для легочного введения композицию, содержащую по меньшей мере одно антитело против МСР-1, предпочтительно доставляют с размером частиц, эффективным для достижения нижних дыхательных путей или синусов. В соответствии с настоящим изобретением по меньшей мере одно антитело против МСР-1 можно доставить с помощью любого из множества ингаляционных или назальных устройств, известных в данной области для введения терапевтического агента с помощью ингаляции. Эти устройства, способные доставлять композиции в виде аэрозолей в синусовую полость или альвеолы пациента, включают ингаляторы с отмеренными дозами, распылители, генераторы сухого порошка, пульверизаторы и т.п. Другие устройства, пригодные для легочного или назального введения антител, хорошо известны в данной области. Во всех таких устройствах могут использоваться композиции, пригодные для распределения антитела в аэрозольной форме. Такие аэрозоли могут состоять из или растворов (и водных, и неводных), или твердых частиц. В ингаляторах с отмеренными дозами, похожих на ингалятор с отмеренными дозами Ventolin®, обычно используется газ в качестве диспергатора, и для них требуется приведение в действие во время вдыхания (смотри, например, WO 94/16979, WO 98/35888). Для ингаляторов в виде сухого порошка, похожих на Turbuhaler™ (Astra), Rotahaler® (Glaxo), Diskus® (Glaxo), ингалятор Spiros™ (Dura), устройства, поставляемые на рынок Inhale Therapeutics, и порошковый ингалятор Spinhaler® (Fisons), требуется приведение в действие при дыхании смешанного порошка (US 4668218 Astra, EP 237507 Astra, WO 97/25086 Glaxo, WO 94/08552 Dura, US 5458135 Inhale, WO 94/06496 Fisons, которые полностью включены сюда посредством ссылки). Ингаляторы, похожие на AERx™ Aradigm, ингалятор Ultravent® (Mallinckrodt) и ингалятор Acorn II® (Marquest Medical Products) (US 5404871 Aradigm, WO 97/22376), все из вышеуказанных ссылок полностью включены сюда посредством ссылки, образуют

аэрозоли из растворов, в то время как ингаляторы с отмеренными дозами, ингаляторы в виде сухого порошка и т.п. образуют аэрозоли из небольших частиц. Подразумевается, что эти конкретные примеры коммерчески доступных ингаляторных устройств являются образцами конкретных устройств, пригодных для осуществления на практике согласно изобретению, и не ограничивают объем согласно изобретению. Предпочтительно, композиция, содержащая по меньшей мере одно антитело против MCP-1, доставляется с помощью ингалятора в виде сухого порошка или пульверизатора. Ингаляторное устройство для введения по меньшей мере одного антитела согласно изобретению обладает несколькими желаемыми особенностями. Например, выгодно, чтобы доставка с помощью ингаляторного устройства была надежной, воспроизводимой и точной. С помощью ингаляторного устройства можно необязательно доставлять небольшие сухие частицы, например, меньше, чем приблизительно 10 мкм, предпочтительно приблизительно 1-5 мкм, для лучшей вдыхаемости.

Пример 1. Генерирование специфичных в отношении MCP-1-антител с использованием фагового дисплея в качестве неограничивающего примера

Авторы согласно изобретению ранее продемонстрировали желаемые терапевтические характеристики крысиного антитела против MCP-1 человека, обозначенного C775 и описанного в находящейся в процессе одновременного рассмотрения заявке авторов настоящего изобретения на патент США с серийным № 11/170453 (SEQ ID NO: 7 и 8 этой заявки для вариабельных областей тяжелой и легкой цепей, соответственно) и подачах родственных заявок. Целью настоящих усилий была идентификация по меньшей мере одного антитела человека из HuCAL GOLD®, которое нейтрализует биологическую активность хемокина MCP-1 человека и проявляет схожие свойства. Свойства антитела C775 и, следовательно, желаемого антитела человека против MCP-1 определяли с помощью критериев успеха, обрисованных ниже.

Критерии успеха для по меньшей мере одного терапевтического антитела:

Связывается с MCP-1 человека в твердофазном формате;

Обладает специфичностью, определяемой по отсутствию связывания с гомологичными белками человека MCP-2, 3, 4 и эотаксином 1, 2 и 3 при 100 нМ;

Ингибирует связывание MCP-1 человека с его рецептором CCR2 человека на клетках Thp-1, и значение  $IC_{50}$  меньше, чем для эталонного Fab C775;

Ингибирует опосредуемый MCP-1 человека хемотаксис клеток Thp-1, и значение  $IC_{50}$  меньше, чем для эталонного Fab C775;

Ингибирует опосредуемую MCP-1 человека активность во второстепенном биологическом анализе (например, мобилизацию  $Ca^{2+}$  или индуцируемую CCL-2 интернализацию рецептора), оцениваемую в виде качественного критерия да/нет, или с силой, сравнимой с эталонным Fab C775, в количественном анализе;

Связывается с MCP-1 человека с  $K_d < 0,5$  нМ;

Связывается с MCP-1 яванской макаки с  $K_D < 20$  нМ, и предпочтительно  $< 10$  нМ;

Ингибирует биологическую активность встречающегося в природе MCP-1 человека и химически синтезированного MCP-1 человека со сравнимой силой;

Сохраняет критерии 1-8 после реконструкции Fab в виде IgG и основанные на полноразмерной форме IgG C775 в качестве сравнимого продукта.

#### **Краткое изложение способа отбора**

Осуществили десять различных пэнингов с использованием HuCAL GOLD® и скринировали 17856 клонов, что привело к получению 1104 первично положительных клонов. В конце концов, идентифицировали 26 уникальных Fab, связывающихся с синтетическим MCP-1 человека в ELISA. Из них отобрали 7 различных Fab для созревания аффинности в соответствии с аффинностью, биологической активностью, специфичностью и связыванием со встречающимся в природе MCP-1 человека и яванской макаки. Аффинности родительских Fab находились в диапазоне, составляющем от 10 до 400 нМ, а значения  $IC_{50}$  в анализе связывания меченного радиоактивными изотопами лиганда составляли от 10 до 600 нМ.

#### **Материалы и методы**

ДНК-рестрикционные и модифицирующие ферменты, а также полимеразы покупали у Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), New England Biolabs (Beverly, MA, USA), Roche Diagnostics (Mannheim, Germany) и MBI Fermentas (Vilnius, Lithuania). Козье антитело против IgG человека, специфичное в отношении F(ab')<sub>2</sub> фрагмента, POD-конъюгированное поставлялось Jacksons (West Grove, PA, USA), овечье антитело против IgG человека, специфичное в отношении Fd-фрагмента, антитело по сайту связывания (Birmingham, UK) и конъюгированный с щелочной фосфатазой стрептавидин (сорта ZyMax™) поставлялись Zymed Laboratories (San Francisco, CA, USA). Рекомбинантные хемокины человека: MCP-1, 2, 3, 4 и эотаксин 1, 2 и 3 человека (R&D systems). Реагенты, лиганды и антитела: mAt 279, специфичное в отношении MCP-1 человека (R&D systems); синтетическое MCP-1 человека (Bachem); мышинное mAt1 против CCR2 человека биотинилированное (R&D systems); гамма-глобулин человека (Jackson Immuno Research); гамма-глобулин мыши (Jackson Immuno Research); mAt изотипа MlgG2b контрольное биотинилирован-

ное (R&D systems); стрептавидин-PE (BD Pharmingen); версен (этилендиаминтетрауксусная кислота) (Invitrogen); PBS (Invitrogen); FCS (фетальная телячья сыворотка) (PAN); планшеты с лунками с V-образным дном (Greiner) и планшеты с лунками с U-образным дном (Nunc).

Получение полипептида и аналогов MCP-1. Поэтапный твердофазный пептидный синтез и аффинную очистку с обеспечением выделенного, полноразмерного, зрелого (76 аминокислот) и с правильной укладкой и необязательно модифицированного MCP-1 человека и вариантов с биологической активностью осуществляли, как описано в находящейся в процессе одновременного рассмотрения заявке на патент США с серийным № 60/682620 авторов настоящей заявки и у Kruszynski et al. 2006, J. Peptide Sci. 12: 25-32. Варианты, предназначенные для представления природной топологии поверхности и структуры пептидного остова, включают A40S, V41I и F43Y. Химическим синтезом также обеспечивался способ сайт-специфического биотинилирования MCP-1 человека с использованием эpsilon-аминогрупп лизина, не вовлеченных в связывание с рецептором или поверхностную активность, в положении K69 и K75 неорганизованной структуры (заявка на патент США с серийным № 60/682620 и Kruszynski et al. 2006, J. Peptide Sci. 12: 354-360). Гидрофильный спейсер из четырех единиц этиленокси (PEG4) вставили между биотином и s-аминогруппой остатка лизина. Длина цепи от амида биотина до концевой карбонильной группы составляет 19,2 Å. Спейсер был выбран для увеличения растворимости и обеспечения достаточной пространственной длины для связывания конъюгатов со стрептавидином. Последовательность MCP-1 и вариантов представлена SEQ ID NO: 1. Варианты, как было определено, сохраняют способность индуцировать мобилизацию  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках Thp-1. Биотин-Lys<sup>69</sup> и биотин-Lys<sup>75</sup> MCP-1 сравнивали наряду при скрининге, подтверждении и определении аффинности, и значительных различий не наблюдали. Используя Biotac, 35 оптимизированных Fab проанализировали параллельно в отношении MCP-1 He<sup>41</sup>, Lys(биотин-PEG<sub>4</sub>)<sup>69</sup> и MPP-1 He<sup>41</sup>, Lys(биотин-PEG<sub>4</sub>)<sup>75</sup>, иммобилизованных на чипах со стрептавидином. Как правило, аффинности, определенные в отношении MCP-1 K69 и K75, были сравнимыми.

Фаговая Fab-библиотека. Фагмидная библиотека основана на концепции HuCaL® (Knappik et al., 2000) и использует CysDisplay™-технологии представления Fab на поверхности фагов (Lohning, 2001). Библиотека кодирует приблизительно  $10^{10}$  уникальных Fab, представленных на бактериофаге M13 в виде белков, слитых с минорным оболочечным белком, pIII. С целью отбора антитела-фаги HuCaL GOLD® разделили на три группы, содержащие различные VH-гены-хозяев. Кроме того, всю библиотеку использовали в одной совокупности (VH1-6).  $2 \times 10^{13}$  фагов HuCaL GOLD® на входе использовали для каждого пэннинга. Использовали 4 различных стратегии пэннинга, в том числе 3 цикла пэннинга в отношении аналога-1 (V41I, He<sup>41</sup>) и аналога-2 (F43Y, Tg<sup>43</sup>) MCP-1 человека, соответственно, и два альтернативных пэннинга в отношении аналогов в порядке 1-2-1 и 2-1-2.

Твердофазный пэннинг. Лунки Maxisorp® (Nalgen Nunc, Rochester, NY) непосредственно покрывали 100 мкл-аликвотами аналога-1 (V41I) или аналога-2 (F43Y) MCP-1 человека при 50 мкг/мл в PBS, pH 7,4, в течение ночи при 4°C. Покрываемые лунки промывали и блокировали 5% MPBS (PBS, 5% порошка молока низкой жирности). Добавляли на 2 ч при комнатной температуре 100 мкл подвергнутых блокировке фагов HuCaL GOLD®. После нескольких стадий промывок связанные фаги элюировали 100 мкл 20 mM DTT в 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, инкубированного при комнатной температуре в течение 10 мин. Элюат использовали для инфицирования E.coli TG1 (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands) в середине логарифмического роста, и фагемиды амплифицировали, как описано (Krebs et al., 2001).

Пэннинг в полурастворе с использованием аналога-1 (V41I) и аналога-2 (F43Y) MCP-1 человека, приводящий к нейтрализующим Fab-молекулам. Пэннинг в полурастворе проводили путем инкубирования двух биотинилированных производных MCP-1 человека, V41I, K69-PEG-биотин или V41I, K75-PEG-биотин (SEQ ID NO: 1), с фагами HuCaL GOLD® в растворе с последующим захватом комплексов фаг-антиген на покрытые нейтравидином участки микротитрационного планшета из полистирола Reacti-Bind (RERBIO). Для пэннинга 1,5-мл пробирки Eppendorf блокировали Chemiblocker (Chemicon International), разведенным 1:1 PBS, в течение ночи при 4°C. На следующий день участки микротитрационного планшета Bind™ NeutrAvidin™ (Pierce, Rockford, IL, USA) (связывающая способность - 25 пмоль биотина/лунку; RERBIO) промывали дважды 300 мкл PBS, что необходимо для того, чтобы уменьшить количество связывающих веществ в виде нейтравидина во время 2 стадий предадсорбции.  $2 \times 10^{13}$  фагов из библиотеки HuCaL GOLD® в 100 мкл 50% Chemiblocker (Chemicon), 0,05% твин-20 (Sigma) добавляли в каждую лунку и блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре, осторожно покачивая. Для второй стадии предадсорбции раствор фагов переносили на новые покрытые нейтравидином участки микротитрационного планшета из полистирола Reacti-Bind и инкубировали течение 1 ч при комнатной температуре, осторожно покачивая. Затем предадсорбированные фаги и биотинилированные антигены (для биотинилирования отношение биотин:антиген - 3:1; конечная концентрация - 200 нМ) добавляли в предварительно подвергнутые блокировке 1,5-мл пробирки Eppendorf и инкубировали течение 1 ч при комнатной температуре на вращающемся колесе. Параллельно дополнительные покрытые нейтравидином участки микротитрационного планшета из полистирола Reacti-Bind промывали дважды 300 мкл PBS, блокировали 300 мкл Chemiblocker, разведенного 1:1 PBS, в течение 1 ч и промывали один раз 300 мкл PBS. 100 мкл/лунку комплекса биотин-антиген-фаг переносили пипеткой на участки микротитрационно-



го планшета и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, осторожно покачивая. После нескольких промывочных стадий связанные фаги элюировали 110 мкл 20 mM DTT в 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, инкубированного при комнатной температуре в течение 10 мин. Элюат использовали для инфицирования *E. coli* TG1 (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands) в середине логарифмического роста, и фагемиды амплифицировали, как описано (Krebs et al., 2001).

Субклонирование и микроэкспрессия отобранных Fab-фрагментов. Для облегчения быстрой экспрессии растворимых Fab кодирующие Fab вставки отобранных фагов HuCaL GOLD® субклонировали в экспрессирующий вектор pMORPH®X9\_FH с использованием XbaI и EcoRI. Fab-фрагменты несут C-концевой маркер FLAG™ (Prickett et al., 1989) и в качестве второго C-концевого маркера 6× His-маркер (Chen et al., 1994). После трансформации TG1-F<sup>-</sup> экспрессию единичных клонов и приготовление периплазматических экстрактов, содержащих HuCaL®-Fab-фрагменты, проводили, как ранее описано (Rauchenberger et al., 2003).

Анализ связывания в твердофазном формате с использованием аналога-1 (V41I) MCP-1 человека проводили, как описано выше. После блокировки добавляли периплазматические экстракты. Обнаружение Fab-фрагментов осуществляли с помощью инкубации с козым антителом против IgG человека, специфичным в отношении F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента.

Скрининг с использованием иммобилизованного, биотинилированного V41I MCP-1 человека проводили с использованием 384-луночных планшетов Reacti-Bind™ NeutrAvidin™ (Pierce, Rockford, IL, USA), покрытых 20 мкл 0,5 мкл/мл биотинилированного аналога-1 (V41I) или аналога-2 (F43Y) MCP-1 человека, разведенного в PBS, pH 7,4, в течение 16 ч при 4°C. После блокировки 1% BSA в TBS, 0,05% твин-20 (Sigma, St. Louis, MO, USA) в течение 1 ч при комнатной температуре добавляли периплазматические экстракты. Обнаружение Fab-фрагментов осуществляли с помощью инкубации с козым антителом против IgG человека, специфичным в отношении F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента.

Скрининг в растворе с использованием биотинилированного аналога-1 (V41I) MCP-1 человека проводили с использованием 384-луночных планшетов Maxisorp (Nunc, Rochester, NY, USA), покрытых 20 мкл овечьего антитела против IgG человека, специфичного в отношении Fd-фрагмента, разведенного 1:1000 в PBS, pH 7,4, в течение 16 ч при 4°C. После блокировки 3% BSA в TBS, 0,05% твин-20 (Sigma, St. Louis, MO, USA) в течение 2 ч при комнатной температуре добавляли периплазматические экстракты. Впоследствии захваченным HuCaL®-Fab-фрагментам предоставляли возможность связаться с 0,2 мкг/мл биотинилированного аналога-1 (V41I) MCP-1 человека в TBS, который обнаруживали с помощью инкубации с конъюгированным с щелочной фосфатазой стрептавидином с последующим добавлением флуоресцентного субстрата AttoPhos (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Эмиссию флуоресценции при 535 нм регистрировали при возбуждении при 430 нм.

#### **Анализ биологической активности**

##### **Клеточная культура**

Все клетки культивировали в стандартизованных условиях при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в увлажненном инкубаторе. Экспрессирующие CCR2 клетки выращивали в стандартной среде. Кроме того, клетки Thp-1 (клетки острого моноцитарного лейкоза человека) культивировали в RPMI, содержащей 2 mM L-глутамина, 1,5 г/л натрия бикарбоната, 4,5 г/л глюкозы, 10 mM HEPES и 1,0 mM натрия пирувата, 90%; 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS; Vitacell RPMI 20-2001, ATCC, Manassas, VA) при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> при плотности 4-8×10<sup>5</sup> клеток/мл.

Анализ связывания меченного радиоактивными изотопами лиганда. Конкурентные анализы проводили в планшетах с фильтрами Millipore (Millipore, Bedford, MA). 1×10<sup>6</sup> клеток Thp-1/лунку инкубировали с <sup>125</sup>I-MCP-1 (1 нг/мл; Perkin Elmer Life Science, Boston, MA) вместе с различными концентрациями рекомбинантных MCP-1 человека (279-MC, R&D Systems, Minneapolis, MN) или синтетических белков MCP-1. Все реагенты разводили в буфере для связывания, состоящем из среды RPMI 1640 (Invitrogen Corp., Grand Island, NY) и 0,1% BSA. Конкуренции позволяли продолжаться в течение 1 ч при комнатной температуре, и лунки промывали 3 раза 150 мкл/лунку буфером для промывки (буфер для связывания + 1M NaCl). Радиоактивность на фильтрах подсчитывали с помощью автоматического гамма-счетчика Wallac Wizard 1470 (Perkin Elmer Life Sciences Inc., Boston, MA). Рассчитывали процент ингибирования связывания <sup>125</sup>I-MCP-1 с CCR2 различными дозами или рекомбинантного, или синтетического MCP-1. Значения процента ингибирования затем вносили в программу Graphpad Prism и строили график зависимости в виде сигмоидной кривой доза-ответ с различными спадами и постоянными величинами внизу = 0 и наверху = 100.

##### **Анализ мобилизации кальция**

Анализ мобилизации Ca<sup>2+</sup> проводили в 96-луночном формате, используя набор FLEXstation™ Ca<sup>2+</sup> Plus Assay Kit (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), следуя протоколу производителя для неприкрепленных клеток, и FLEXstation™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Для анализа максимальные величины RFU вносили в программу Graphpad Prism.

FACS (клеточный сортер с возбуждением флуоресценции) - анализ индуцируемой MCP-1 интернализации рецептора CCR2. После оптимизации концентрации лиганда (EC50 синтетического MCP-1 ~100

нг/мл) или времени инкубации (после 1 ч большинство интернализации имело место) определяли  $IC_{50}$ , добавляя различные концентрации антител. Культивируемые экспрессирующие CCR2 клетки отмывали PBS и отделяли с помощью версена (Invitrogen) в течение 10 мин при 37°C. Все стадии центрифугирования клеток проводили при приблизительно 200×g. Клетки отмывали дважды буфером для FACS (PBS/3% FCS), подсчитывали и проверяли на жизнеспособность (с использованием трипанового синего). Планшеты с 96 лунками с V-образным дном (Greiner) заполняли  $\sim 2,5 \times 10^5$  клеток в 100 мкл на лунку и помещали на лед. В планшетах с 96 лунками с U-образным дном (Nunc) антитела разводили в среде для культивирования клеток (MEME) с получением приблизительно от 200 мкг/мл вниз до 0,001 мкг/мл для образцов в трех повторах. Антитела в различных концентрациях предварительно инкубировали с синтетическим MCP-1 (Bachem) с конечной концентрацией 100 нг/мл в течение 10 мин при комнатной температуре. Клетки ресуспендировали с использованием 100 мкл предварительно проинкубированной смеси MCP-1/антитело и инкубировали в течение 1 ч при 37°C в инкубаторе для интернализации рецептора. После интернализации клетки отмывали один раз 180 мкл холодного буфера для FACS, и планшеты необходимо было держать на льду для всех последующих стадий с целью предотвращения дальнейшей интернализации. Биотинилированные мышинные мАТ против CCR2 человека (R&D Systems) разводили 1:10 в буфере для FACS. В качестве контроля биотинилированные мышинные мАТ изотипа IgG2b (R&D Systems) также разводили 1:10 в буфере для FACS. Для блокировки Fc-рецепторов и к антителам против CCR2 человека, и к контрольным мАТ добавляли смесь 1:1 гамма-глобулинов человека и мыши (Jackson Immuno Research) в конечной концентрации 10 мкг/мл. Клетки ресуспендировали в 50 мкл смеси анти-CCR2/гамма-глобулин (или смеси контрольное IgG2b/гамма-глобулин) и инкубировали в течение 1 ч на льду. Клетки отмывали дважды 180 мкл буфера для FACS, ресуспендировали в 50 мкл разведенного 1:400 стрептавидина-PE (BD Pharmingen) и инкубировали в течение 1 ч при 4°C на льду в темноте. Клетки отмывали дважды 180 мкл буфера для FACS, ресуспендировали в 100 мкл 2% PFA/PBS и хранили в течение ночи при 4°C для фиксации (в альтернативном случае возможно прямое измерение без фиксации PFA). Для измерения FACS клетки ресуспендировали в 200 мкл буфера для FACS, и подсчитывали приблизительно 5000 клеток для каждого образца.

#### Анализ аффинности

Метод титрования до равновесия в растворе (SET) для определения  $K_D$  и исследования перекрестной реактивности с использованием BioVeris. Определение аффинности в растворе в своей основе проводилось, как описано в литературе (Friguet et al., 1985). Для улучшения чувствительности и точности метода SET его проводили с использованием вместо классического ELISA ECL-основанной технологии BioVeris (Haenel et al., 2005, принята для публикации в *Analytical Biochemistry*). 1 мг/мл козьего антитела против (Fab)<sub>2</sub> человека или козьего антитела против IgG мыши, специфичного в отношении Fc-фрагмента (Jackson Immuno Research), метили BV-tag<sup>TM</sup> NHS-Ester (Bioveris Europe, Witney, Oxfordshire, UK) в соответствии с инструкциями изготовителя. Эксперименты проводили в микротитрационных планшетах из полипропилена и в PBS, pH 7,4, с 0,5% BSA и 0,002% твин-20 в качестве буфера для анализа. Немеченый антиген разводили в 4<sup>н</sup> рядах: для MCP-1 человека и яванской макаки диапазон концентраций выбирали от 10 пМ до 40 нМ, для контролей перекрестной реактивности (зотаксина и MCP-2) диапазон концентраций выбирали от 40 пМ до 160 нМ. Лунки без антигена использовали для определения значений Smax. После добавления 100 пМ Fab или IgG (конечная концентрация в конечном объеме 75 мкл) смесь инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Впоследствии в каждую лунку добавляли смесь 25 мкл динабусин (0,4 мг/мл стрептавидина M-280, DYNAL, Hamburg), покрытых 0,25 мкг/мл биотинилированного MCP-1 (K69), и меченного BV-маркером антитела для детекции в конечном разведении 1:4000 для антитела против Fab человека или 1:2000 для антитела против IgG мыши. После инкубации в течение 30 мин на качалке Eppendorf (700 об./мин) при комнатной температуре сигналы электрохемилюминесценции обнаруживали с использованием рабочей станции M-384 SERIES® (Biovens Europe). Данные оценивали с помощью программы с адресом начала программы 5 (Microcal), используя изготовленные по техническим условиям заказчика модели подгонок (для Fab: Haenel et al., 2005, статья принята для публикации в *Analytical Biochemistry*; для IgG: в соответствии с Pehler et al., 1997).

Biacore-определение  $K_D$  с использованием непосредственно нанесенного слоя антигена. Кинетические константы (скорости ассоциации и скорости диссоциации) определяли с использованием серийных разведений соответствующих Fab, связывающихся с ковалентно иммобилизованным MCP-1, используя прибор Biacore 3000 (Biacore, Uppsala, Sweden). Для ковалентной иммобилизации антигена использовали стандартную химию связывания амина EDC-NHS. Кинетические измерения проводили в PBS (136 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) при скорости потока 20 мкл/мин, используя диапазон концентраций Fab от 1,5 до 500 нМ. Для каждой концентрации время введения составляло 1 мин с последующей 3-минутной фазой диссоциации. Для регенерации использовали 5 мкл 10 mM HCl. Все сенсограммы подгоняли с использованием программы для оценки BIA 3.1 (Biacore).

Biacore-определение  $K_D$  с использованием биотин-K69-MCP-1 человека и MCP-1 яванской макаки. Поверхность чипов со стрептавидином покрывали слоем биотин-K69-MCP-1 человека и биотинилированного MCP-1 яванской макаки, а чипы CM5 покрывали непосредственно MCP-1 яванской макаки. Свя-

зывание Fab определяли с использованием стандартных способов.

Biacore-определение  $K_D$  способом захвата антител. Fab в концентрации 500 нМ захватывали с помощью анти-Fab человека на чипе CM5 (s. 3.15) (скорость потока 5 мкл/мин), вводили раствор каждого аналога (MCP-1, 2, 3, 4 и эотаксина 1, эотаксина 2 и 3). Все цитокины были свободны от носителя и использовались в диапазоне концентраций от 15 до 500 нМ (для родительских Fab до оптимизации) в качестве анализируемых веществ для определения аффинности. Сенсограммы анализировали с использованием программы для оценки BIA. Biacore-определение аффинности к MCP-1 способом захвата антител было невозможно для оптимизированных связующих веществ, поскольку достигли пределов определения Biacore.

Для анализа специфичности Fab использовали резонанс поверхностных плазмонов (Biacore 3000, Uppsala, Sweden), используя способ захвата. Fab захватывали, и использовали различные белки (MCP-2, 3, 4 и эотаксин-1, 2 и 3) в качестве анализируемых веществ. Чипы CM5 (Biacore, Sweden) покрывали 6500-8000 крысиными единицами анти-P(ab)<sub>2</sub> (Dianova, аффинно-очищенного козьего антитела против IgG человека, специфичного в отношении F(ab) 2-фрагмента; 10 mM ацетатного буфера, pH 4,5) для всех 4 проточных ячеек, используя стандартную химию связывания амина EDC-NHS. В проточные ячейки 2-4 были захвачены специфичные в отношении MCP-1 Fab (20 мкл 500 нМ Fab при скорости потока 10 мкл/мл, полученная в результате плотность захвата - 300-400 крысиных единиц). После захвата Fab вводили хемокины (20 мкл, скорость потока 20 мкл/мин, PBS, pH 7,7) в концентрации 100 нМ. Хемокины хранили в небольших аликвотах и для измерений использовали только недавно размороженный материал с максимум одним циклом замораживания-оттаивания. Во избежание комбинации скоростей диссоциации, протекающей из скоростей диссоциации специфического взаимодействия MCP-1/Fab и взаимодействия анти-Fab/Fab, вводили буфер для определения диссоциации взаимодействия анти-Fab/Fab. Из специфической сенсограммы вычитали сенсограмму, полученную с буфером. Единицы ответа нормализовали с использованием количества захваченного антитела на поверхности.

#### **Связывание со встречающимся в природе MCP-1 в способе захвата антител**

Использовали способ, описанный выше. Встречающийся в природе MCP-1 очищали из супернатанта PANC1 и использовали для анализа связывания. Связывание со встречающимся в природе MCP-1 в способе захвата антител было намного выше порога определения, однако, измерение подлинной аффинности было невозможным вследствие примесей в экстракте, делающих неясной правильную концентрацию встречающегося в природе MCP-1.

#### **Превращение в IgG**

Для экспрессии полноразмерного IgG фрагменты вариабельных доменов тяжелой (VH) и легкой (VL) цепей субклонировали из экспрессирующих Fab векторов в соответствующие векторы pMorph\_hlg для IgG1 человека, IgG4 человека, химерного человек/мышь IgG1 и IgG2a. Рестрикционные ферменты EcoRI, MfeI, BlnI использовали для субклонирования фрагмента VH-домена в pMorph\_hlgG1.1, pMorph\_hlgG4.1, pMorph\_mlgG1.1 или pMorph\_mlgG2a.1, и EcoRI, BsiWI использовали для субклонирования фрагмента VL-домена в векторы pMorph\_hlgK\_1, pMorph\_hlg\_1, pMorph\_mlgK\_1 или pMorph\_mlg\_1, соответственно. Полученные в результате IgG-конструкции экспрессировали в CNTO.

#### **Результаты**

Твердофазный пэннинг провели с использованием MCP-1 человека (411) и MCP-1 человека (43Y), непосредственно покрытых слоем на планшеты Maxisorp. Использовали четыре различных пэннинга, каждый из которых включал три цикла отбора. После субклонирования в экспрессирующий вектор pMORPHx9 Fab\_FH провели твердофазный скрининг с использованием непосредственно нанесенного слоем MCP-1 человека (411) и в отношении биотинилированного MCP-1 человека. В общем, проанализировали 8832 клонов в первичном скрининге и получили 983 первично положительных клонов. В конце концов, идентифицировали 5 уникальных Fab, но не все 5 Fab нейтрализовали MCP-1 в клеточных анализах, что указывает на то, что прямое покрытие планшетов Maxisorp могло нанести ущерб конформации или, по меньшей мере, доступности нейтрализующих эпитопов.

Пэннинг в полурастворе провели, инкубируя биотинилированный аналог-1 (V41I) и аналог-2 (F43Y) MCP-1 человека с фагами HuCaL GOLD® в растворе с последующим захватом комплексов фаг-антиген, как описано. Использовали две различные основные стратегии пэннинга, включающие 3 цикла пэннинга с использованием биотинилированного аналога-1 (V41I) и аналога-2 (F43Y) MCP-1 человека, соответственно, (без альтернативного пэннинга). В общем, проанализировали 9024 клонов в первичном скрининге и получили 121 первично положительных клонов, и, в конце концов, обнаружили 18 уникальных связующих веществ. Lumipex-основанный повторный скрининг 192 клонов из пэннинга с использованием биотинилированного аналога-1 (V41I) MCP-1 человека привел к 9 дополнительным первично положительным клонам и 3 дополнительным уникальным связующим веществам, что демонстрирует то, что Lumipex-скрининг является подходящим методом скрининга, альтернативным по отношению к скринингу способом захвата. В общем, идентифицировали 21 уникальных связующих веществ при пэннинге в полурастворе, и 14 из этих связующих веществ продемонстрировали нейтрализующую активность. Все нейтрализующие Fab из HuCaL GOLD® происходили из этого пэннинга.

### Характеристика Fab HuCaL GOLD®

Уникальные Fab экспрессировали и очищали для дальнейшей характеристики. Аффинность связывания с MCP-1 человека определяли с помощью BIAcore, и Fab были охарактеризованы в следующих анализах: 1) ингибирования связывания  $^{125}\text{I}$ -CCL-2 с клетками Thp-1 и 2) ингибирования индуцируемой MCP-1 человека мобилизации  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках Thp-1. Fab, которые демонстрировали нейтрализующую активность в основанных на клетках анализах, далее проверяли на 1) связывание с синтетическим MCP-1 яванской макаки; 2) связывание с хемокинами человека, родственными семейству MCP-1 человека, для определения специфичности связывания (т.е. с MCP-2, 3, 4 и эотаксином 1, 2, 3); 3) связывание со встречающимся в природе MCP-1 человека, чтобы гарантировать, что Fab, отобранные с использованием синтетического пептида MCP-1 человека, узнают встречающийся в природе MCP-1 человека. Семь Fab с наиболее оптимальными свойствами выбрали для дальнейшего созревания аффинности. Свойства Fab, отобранных для созревания аффинности, суммированы в табл. 2. Семь Fab, отобранных для созревания аффинности, распределили по 3 группам для клонирования библиотек и отбора. Оптимизацию L-CDR3 и H-CDR2 проводили параллельно. Параллельная оптимизация переменных областей легких и тяжелых цепей создала возможность объединения улучшенных тяжелой и легкой цепей посредством перекрестного клонирования для создания даже далее улучшенных антител.

Таблица 2. Краткое изложение Fab-кандидатов, отобранных для созревания аффинности

Fab Название	Группа	Kd MCP-1 (нМ);	Связывание с радиолигандом IC <sub>50</sub> (нМ)	Мобилизация $\text{Ca}^{2+}$ IC <sub>50</sub> (нМ)	Специфичность	Kd MCP-1 яванской макаки (нМ)	Связывание с природным MCP-1	Группа последовательностей H-цепь L-цепь
MOR 03336	1	60±33	114	526	MCP-1	170±42	да	VH3/VL-λ3
MOR 03464	1	75±50	105	1340	MCP-1, 2	175±49	да	VH3/VL-λ3
MOR 03468	1	н.о.	255	2000	MCP-1	550±14	н.о.	VH1B/VL-λ3
MOR 03470	1	46±1	645	2100	MCP-1	145±92	да	VH1B/VL-λ3
MOR 03471	2	94±6	180	1256	MCP-1	465±106	да	VH1A/VL-κ3
MOR 03473	2	175±20	184	2900	MCP-1	478±95	да	VH1A/VL-κ3
MOR 03548	3	42	11	124	MCP-1, эотаксин	54±8	да	VH3/VL-λ3

#### Пример 2. Оценка специфичных в отношении MCP-1-антител с высокой аффинностью из FAB

Как отмечено, отбор кандидатов для созревания аффинности провели на кандидатах в свободной форме Fab. Критериями отбора были активность в анализе связывания меченного радиоактивными изотопами лиганда, активность в анализе мобилизации  $\text{Ca}^{2+}$ , аффинность к MCP-1 человека, измеренная с помощью BIAcore, специфичность в отношении MCP-1 человека, аффинность к MCP-1 яванской макаки и связывание со встречающимся в природе MCP-1, определенные в BIAcore. Дополнительными критериями для группирования родительских Fab были конкуренция с C775 в ELISA и на основе семейства каркасных областей переменных областей тяжелой и легкой цепей. Характеристику кандидатов на созревание в виде IgG, особенно в анализе хемотаксиса, осуществляли параллельно с процессом отбора на созревание.

Семь Fab, отобранных для созревания аффинности, разделили на 3 класса с различными последовательностями. В одном классе (группа 1, табл. 2) Fab 03336, 03464, 03468 и 03470 имели каркасные области VL3 легкой цепи с одной из двух различных каркасных областей тяжелой цепи. Fab 03336 и 03464 имели каркасные области VH3 тяжелой цепи, а Fab 03468 и 03470 имели каркасные области VH1B тяжелой цепи. Во втором классе (группа 2, табл. 2) Fab 03471 и 03473 имели каркасные области VH1A тяжелой цепи и каркасные области VK3 легкой цепи. Fab 03548 имел те же самые каркасные области тяжелой и легкой цепей, что и два Fab в первом классе (VH3, VL3), но его держали отдельно (группа 3, табл. 2), поскольку он имел исключительно сильную биологическую активность и перекрестную реактивность связывания с эотаксином. В отношении полного описания классификации последовательностей переменных областей, использованной здесь, смотри патент США № 6828422, полностью включенный посредством ссылки. Целью последнего созревания было улучшение аффинности 03548 к CCR-2 с увеличением специфичности.

До созревания способом захвата Fab BIAcore определили только связывание с MCP-1 яванской макаки и встречающимся в природе MCP-1 человека, но не аффинность к ним. Все 7 родительских Fab продемонстрировали связывание и с MCP-1 яванской макаки, и со встречающимся в природе MCP-1 человека, что было необходимо в качестве условия созревания.

### Специфичность связывания родительских IgG

После превращения всех 7 родительских Fab в IgG, для форм IgG повторили исследования перекрестной реактивности. Эотаксин-3 связывался неспецифически с декстрановой поверхностью на чипах-датчиках, и это неспецифическое связывание можно было конкурентно исключить добавлением карбоксиметилдекстрана. Поскольку неспецифическое связывание других хемокинов с декстрановой поверхностью было также возможным, карбоксиметилдекстран добавляли во все анализы специфичности Biacore. В противоположность Fab два IgG не продемонстрировали значительного связывания с MCP-1 человека, интересно, что все 4 конечных связывающих веществ, которые удовлетворяли всем критериям успеха, произошли от одного родительского Fab.

Сигнал связывания MCP-1 (единицы ответа) нормализовали с использованием количества захваченного антитела на поверхности. Молярное отношение связывания = (крысиные единицы связанного антигена/М.м. антигена) × (М.м. мАт/крысиные единицы мАт, захваченного на поверхности антигена), и предполагали, что молярное отношение связывания ниже 0,5 не является значительным. Четыре IgG продемонстрировали отношение нормализованного связывания с MCP-1 > 0,5 и со всеми гомологичными хемокинами <0,5 и были названы специфичными на уровне IgG. Один IgG также продемонстрировал некоторое связывание с MCP-2 и эотаксином, которое уже определялось на уровне Fab, но эта перекрестная реактивность была ниже на уровне IgG. Данные по IgG MOR034 68 не представлены.

### Ингибирование связывания <sup>125</sup>I-MCP-1 с клетками Thp-1 (CNTO)

Нейтрализующую активность родительских связывающих веществ в форме IgG сначала проверили в анализе связывания меченого радиоактивными изотопами лиганда. После блокировки Fc-рецепторов на клетках Thp-1 путем добавления неродственных IgG1 человека определяли ингибирование связывания MCP-1 для всех родительских IgG. Четыре IgG продемонстрировали ингибирование связывания меченого радиоактивными изотопами MCP-1 человека с клетками Thp-1 со значениями IC<sub>50</sub> в диапазоне эталонного IgG C775.

### Ингибирование мобилизации кальция (CNTO)

Все родительские IgG ингибировали индуцируемую MCP-1 мобилизацию кальция в клетках Thp-1. Четыре IgG продемонстрировали ингибирование индуцируемой MCP-1 мобилизации кальция при более высокой концентрации антитела по сравнению с эталонным IgG C775.

### Ингибирование индуцируемого MCP-1 хемотаксиса (CNTO)

Все родительские Fab не могли быть проверены в анализе хемотаксиса, ингибирование индуцируемого MCP-1 хемотаксиса проверили у форм IgG. Все проверенные родительские IgG были активны в анализе хемотаксиса, и четыре IgG продемонстрировали ингибирование индуцируемого MCP-1 хемотаксиса при более высоких концентрациях антител по сравнению с эталонным IgG C775.

Пример 3. Созревание аффинности отобранных FAB с помощью параллельной замены кассет L-CDR3/H-CDR2

### Краткое изложение процесса созревания аффинности

В первом цикле созревания параллельно провели оптимизацию L-CDR3 и оптимизацию H-CDR2. Для конструирования библиотеки для созревания объединили ДНК каждого класса Fab. Первоначальные последовательности CDR2 тяжелой цепи и CDR3 легкой цепи заменили рандомизированными последовательностями для каждого ДНК-пула, что привело к получению 6 новых библиотек: 3-х библиотек рандомизированных H-CDR2 и 3-х библиотек рандомизированных L-CDR3. Разнообразие каждой из 6 библиотек было больше 10<sup>8</sup> уникальных Fab. Для пэннинга в растворе или пэннинга с использованием биотин-пептида, захватываемого на покрытые нейтравидином пластиковые лунки, использовали синтетический <sup>41</sup>I-биотин-K69 пептид CCL-2. Для обогащения Fab с медленными скоростями диссоциации каждую из 6 библиотек помещали в различные условия (т.е. удлиненной промывки, уменьшенной концентрации антигена). Провели 36 параллельных пэннингов, в том числе пэннинг в растворе и в полурастворе.

Уменьшение концентрации антигена, отбор скоростей диссоциации и удлиненные промывки привели к строгим условиям пэннинга. Скрининг на аффинность проводили с помощью основанной на электрохемилюминесценции (ECL) платформе BioVeris (прежде IGEN), что сделало возможным высокомасштабное распределение по аффинности и идентификацию молекул Fab с улучшенной аффинностью.

Библиотеки для созревания аффинности. Поскольку библиотеки H-CDR2 тяжелой цепи H1A и H1B клонировали отдельно, клонировали 7 различных библиотек для варьируемых областей. После объединения до отбора две библиотеки H1A и H1B, получив 6 библиотек для отбора. Размеры библиотек находились в диапазоне от 10<sup>8</sup> до 8×10<sup>9</sup>. Все теоретическое разнообразие покрывалось для всех библиотек, за исключением библиотеки для λ3 L-CDR3 MOR03548, которая покрывала тем не менее 0,625× теоретического разнообразия. Контроль качества библиотек осуществляли с помощью секвенирования случайно отобранных клонов. 71 из 75 (95%) последовательностей были правильными и разными, в то время как у 4 из 75 последовательностей обнаружили сдвиги рамок считывания. В соответствующих библиотеках обнаружили производные всех родительских Fab.

Для увеличения аффинности и биологической активности отобранных фрагментов антител участки L-CDR3 и H-CDR2 оптимизировали параллельно с помощью кассетного мутагенеза с использованием

тринуклеотид-направленного мутагенеза (Virnekas et al, 1994), в то время как каркасные области сохраняли постоянными. До клонирования для созревания аффинности все фрагменты родительских Fab перенесли из соответствующих клонирующих векторов (pMORPH®X9\_FH) в CysDisplay™-BeKTop pMORPH®25\_LHC с использованием XbaI/EcoRI. pMORPH®25\_LHC создали из HuCAL GOLD®-BeKТора для дисплея pMORPH®23\_LHC удалением одного сайта BssHII, мешающего клонированию библиотеки для оптимизации H-CDR2. Для оптимизации L-CDR3 пула родительских Fab-фрагментов L-CDR3, каркасную область 4 и константную область легкой цепи (405 п.о.) пула связывающих веществ удалили с помощью BpiI/SphI и заменили набором разнообразных L-CDR3 вместе с каркасной областью 4 и константным доменом. Конструирование, синтез и клонирование L-CDR3-кассеты будет описано еще где-нибудь (рукопись в процессе подготовки). 5 мкг вектора для пула связывающих веществ лигировали с молярным избытком на 3 порядка фрагмента вставки, несущим разнообразные L-CDR3. Во втором наборе библиотек разнообразным был H-CDR2 (XhoI/BssHII), в то время как соединяющие каркасные области оставались постоянными. Для контроля эффективности клонирования родительские H-CDR2 заменили подделкой до того, как клонировали кассету с разнообразными H-CDR2. Смесь для лигирования 7 различных библиотек вводили с помощью электропорации в 4 мл клеток E.coli TOP10F (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), что дало в результате от  $1 \times 10^8$  до  $8 \times 10^9$  независимых колоний. Размер библиотеки гарантировал покрытие теоретического разнообразия. Амплификацию библиотеки проводили, как описано ранее (Rauchenberger et al., 2003). Для контроля качества случайно отбирали отдельные клоны, и их секвенировали (SequiServe, Vaterstetten, Germany).

Пэннинг в полурастворе с использованием биотин-K69 MCP-1 человека (V41I) для созревания аффинности.  $1 \times 10^{13}$  фагов, освобожденных из библиотек для оптимизации, дважды предсорбировали на покрытые нейтравидином участки микротитрационного планшета из полистирола и затем блокировали Chemiblocker (Chemicon, Temecula, CA, USA). Предсорбированные фаги и различные концентрации биотин-K69 MCP-1 (0,02-50 нМ) инкубировали в течение 1,5 ч при 22°C в растворе с последующим захватом комплексов фаг-антиген на покрытые нейтравидином участки микротитрационного планшета из полистирола Reacti-Bind (RERBIO). Стадии промывок при 22°C удлинители до 12 ч. Элюцию 20 мМ DTT в 10 мМ Tris/HCl, pH 8,0 и амплификацию фагемид между каждым циклом пэннинга проводили, как описано выше.

Пэннинг в растворе с использованием биотин-K69 MCP-1 человека (V41I) для созревания аффинности.  $1 \times 10^{13}$  фагов, освобожденных из библиотек для созревания аффинности, как описано выше, блокировали Chemiblocker (Chemicon, Temecula, CA, USA), 0,05% твин-20 (Sigma, St.Louis, MO, USA) и предсорбировали дважды на динабусины® со стрептавидином M-280 (DynaI Biotech, Oslo, Norway), подвергнутых блокировке Chemiblocker без твина-20. Во время трех циклов пэннинга применяли уменьшение антигена, и концентрация биотин-K69 MCP-1 находилась в диапазоне от 0,01 вплоть до 5 нМ. Для захвата фагов, связанных с биотинилированным антигеном, использовали подвергнутые блокировке динабусины® и магнитный сепаратор частиц MPC-E (DynaI Biotech, Oslo, Norway). Стадии промывок (Rauchenberger et al., 2003), элюцию 20 мМ DTT в 10 мМ Tris/HCl, pH 8,0 и амплификацию фагемид между каждым циклом пэннинга проводили, как описано выше. Кроме того, строгость пэннинга была дополнительно усилена с помощью отбора скорости диссоциации (Hawkins et., 1992) и удлинения стадий промывок (вплоть до 6 ч).

Скринировали 3312 клонов и идентифицировали 85 оптимизированных Fab, происходящих из 4 из 7 родительских Fab. Идентифицировали Fab, оптимизированные и в отношении L-CDR3, и в отношении H-CDR2, и перекрестное клонирование улучшенных легкой и тяжелой цепей выполнили для производных 2 различных родительских клонов, что привело к дальнейшему улучшению аффинности ( $K_D$ ) на до 100 порядков. Связывающие вещества, находящиеся наверху выстроенного ряда, (приблизительно 100) с рассчитанной  $K_D$ , составляющей ~1-10 нМ, секвенировали, что привело к идентификации 41 уникальных улучшенных Fab. Большинство улучшенных связывающих веществ происходили из группы III (03548). Дополнительный скрининг провели в группах I и II, чтобы идентифицировать больше улучшенных Fab в этих группах созревания. Идентифицировали двадцать девять дополнительных связывающих веществ группы I и II. Всего в процессе созревания идентифицировали 87 уникальных групп Fab, происходящих из пяти из семи родительских Fab. В табл. 3 суммированы результаты пэннинга на созревание.

Таблица 3. Краткое изложение отбора Fab с улучшенным связыванием с MCP-1

Группа	Родительский клон	Улучшенный L-CDR3	Улучшенный H-CDR2	
1	03336	–	14	
1	03470	–	2	
1	03464	–	1	
1	03468	–	–	
2	03471	23	1	
2	03473	–	–	
3	03548	11	35	
	Всего улучшенных Fab	34	63	87

Аминокислотные замены в зрелых Fab располагались или в H-CDR2, или в L-CDR3 родительских клонов 03741 и 03548. В попытке генерировать Fab с еще большей аффинностью выполнили перекрестное клонирование наиболее улучшенного CDR2 тяжелой цепи с лучшим CDR3 легкой цепи Fab. Генерировали приблизительно 36 перекрестных клонов. Все последовательности уникальных Fab также скринировали на предсказываемые N-связанные сайты гликозилирования. Идентифицировали несколько Fab с NIS-консенсусной последовательностью для гликозилирования в CDR2 тяжелой цепи. Эти Fab исключили из дальнейшей характеристики. В итоге 84 Fab экспрессировали и очистили в Morphosys и направили в Centocor для биологической характеристики.

Порог чувствительности измерения аффинности с использованием Biacore был достигнут с оптимизированными Fab. Поэтому значения аффинности определяли с помощью ECL-основанного титрования до равновесия в растворе (SET) (Haenel et al., 2004, подана для публикации в Analytical Biochemistry). После созревания аффинности достигли  $K_D$  приблизительно 10 пМ, и значение подтвердили с использованием KinexA. Связывание Fab в анализе связывания с меченым радиоактивными изотопами лигандом достигало  $IC_{50}$ , составляющей 110 пМ. Следовательно, и аффинность к MCP-1, и кинетики связывания улучшились на до 1000 порядков по сравнению с родительскими Fab. Четыре оптимизированных Fab удовлетворяли всем 9 критериям успеха. Два Fab были Fab, оптимизированными в отношении L-CDR3, и два были кросс-клонами, состоящими из цепей, оптимизированных в отношении L-CDR3 и H-CDR2. Все четыре Fab были превращены в IgG1, и они сохраняли активность во всех используемых анализах с наилучшей  $K_D$ , составляющей 10 пМ, и наилучшей  $IC_{50}$ , составляющей 20 пМ в анализе связывания меченого радиоактивными изотопами лиганда. Один дополнительный кросс-клон MOR03899 удовлетворял всем критериям успеха в форме IgG1, но не в форме Fab. Все связывающие вещества, удовлетворяющие критериям успеха, происходили из родительского Fab MOR034 71 (SEQ ID NO: 2,4). Уникальный Fab, MOR03790, был выбран для продуцирования IgG, высокомасштабной промышленной разработки, а *in vivo* оценка на моделях животных основывалась на MOR03471 и включающих вариабельные области тяжелой и легкой цепей последовательностях, представленных в табл. 4D и SEQ ID NO: 6, 7, 9, 13, 14 и 16.

#### **BioVeris-скрининг во время созревания аффинности**

Улучшенные в отношении аффинности Fab-клоны идентифицировали с помощью ECL-основанного высокомасштабного скрининг-анализа аффинности BioVeris. После отбора первично положительных клонов 4 субклона подтвердили с использованием того же самого метода.

#### **Пэннинговая стратегия для созревания аффинности**

В итоге выполнили 36 различных пэннингов, в том числе 18 пэннингов в растворе с использованием биотин-K69 MCP-1 (V411) с захватом комплексов фаг-антиген на бусины со стрептавидином. Строгость во время процесса отбора увеличивали с помощью уменьшения концентрации антигена, отбора скорости диссоциации и удлиненных промывок. Кроме того, выполнили 18 пэннингов в полурастворе с использованием биотин-K69 MCP-1 с захватом комплексов фаг-антиген на планшеты, покрытые нейтравидином. В этих пэннингах строгость увеличивали с помощью уменьшения концентрации антигена и длинных промывок.

#### **BioVeris-скрининг на созревание аффинности**

В пэннинге на созревание, а также для BioVeris-основанного скрининга использовали антиген биотин-K69 MCP-1 411. Для идентификации улучшенных связывающих веществ скрининг работал очень эффективно. Для каждого из 36 условий пэннинга скринировали 92 клон, что дало в результате 3312 скринированных клонов. В итоге идентифицировали 85 различных уникальных оптимизированных связывающих веществ. Обнаружили оптимизированные Fab из всех 3 групп. Кроме того, могли быть идентифицированы Fab, оптимизированные в отношении L-CDR3 и H-CDR2, что делало возможным перекрестное клонирование производных Fab, обозначенных MOR03471 и MOR03548. 46 оптимизированных Fab происходили из MOR03548, результатом оптимизации в отношении H-CDR2 явились 35 Fab, проявляющие более высокую аффинность и активность по сравнению с 11 оптимизированными в отношении L-CDR3 Fab. Но только родительский MOR034 71 был очень успешно оптимизирован при этом созревании с 23

Fab, оптимизированными в отношении L-CDR3, и одним Fab, оптимизированным в отношении H-CDR2. Улучшенные Fab происходили из 4 из 7 родительских Fab, что указывает на то, что каждое родительское связующее вещество имело различный потенциал к оптимизации. В конце концов, 4 Fab, удовлетворяющие критериям успеха, происходили из MOR03471, два из них были оптимизированы только в отношении L-CDR3, а два других, являющиеся результатом перекрестного клонирования, были оптимизированы в отношении L-CDR3 и H-CDR2.

Перекрестное клонирование оптимизированных молекул Fab. Модульное устройство HuCAL®-технологии делает возможным быстрое перекрестное клонирование оптимизированных легкой и тяжелой цепей оптимизированных Fab, происходящих из одного и того же родительского клона, просто объединяя две оптимизированные цепи на стадии клонирования. Перекрестное клонирование является быстрым методом с возможностью получения дополнительно улучшенных антител без дополнительных циклов созревания. С одной стороны, 2 оптимизированных в отношении L-CDR3 производных MOR0354 8 перекрестно клонировали с 6 оптимизированными в отношении H-CDR2 MOR0354 8, что привело к 12 кросс-клонам. С другой стороны, 22 оптимизированных в отношении L-CDR3 производных MOR03471 перекрестно клонировали с одним имеющимся оптимизированным в отношении H-CDR2 клоном MOR03471. В этом проекте перекрестное клонирование было успешным, приведя к двум различным происходящим из MOR034 71 кросс-клонам,

MOR03850 и MOR03878, которые в конце концов удовлетворили всем критериям успеха.

Детальная характеристика 16-ти предварительно отобранных антител 85 оптимизированных Fab, идентифицированных во время скрининга на аффинность, и дополнительные 34 кросс-клона (см. выше) составили в итоге 119 различных уникальных оптимизированных Fab, которые не все были охарактеризованы с помощью всех имеющихся анализов. Поэтому предварительно отобрали 16 оптимизированных Fab в соответствии с их  $IC_{50}$  в анализе ингибирования связывания с меченным радиоактивными изотопами лигандом, активностью в анализе высвобождения кальция, отсутствием сайтов N-гликозилирования в CDR (табл. 4А и 4В) и аффинностью. Дальнейшая детальная характеристика включала проверку специфичности, связывания со встречающимся в природе MCP-1 и нейтрализации встречающегося в природе MCP-1, аффинности к MCP-1 человека и яванской макаки, активности в анализе хемотаксиса и характеристику всех превращенных IgG1.

Клоны, представляющие оптимизированные Fab, представлены последовательностями, приведенными в табл. 4А-С, в которых родительский Fab клона MOR03471 имеет каркасные области VH3 × каппа3, а MOR03548 имеет каркасные области VH1A × лямбда3. 17 отобранных Fab с требуемыми физико-химическими свойствами (отсутствием сайтов N-гликозилирования в CDR) и оптимизированными свойствами аффинности и биологической активности имеют уверенно чередующиеся уникальные последовательности CDR и образцы консенсусных последовательностей среди последовательностей CDR2 тяжелой цепи и CDR3 легкой цепи в пределах используемых каркасных областей (VH3 и VH1A), а также, более обычно, консенсус среди всех CDR1 тяжелой цепи. Эти консенсусные последовательности представлены в табл. 4С-4Е и SEQ ID NO: 2-26.



Таблица 4А. Последовательности CDR тяжелой цепи (VH) 17-ти отобранных связующих веществ

Родительский	MOR #	VH ТИП	HCDR1	HCDR2	HCDR3
MOR03471 производное (L-CDR3)	3781	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGGIIPFGTANYAQKFG	YDGIYGELDF
MOR03471 производное (L-CDR3)	3790	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGGIIPFGTANYAQKFG	YDGIYGELDF
MOR03471 производное (L-CDR3)	3791	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGGIIPFGTANYAQKFG	YDGIYGELDF
MOR03471 х клон (3822х3797)	3849	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGAINPLAGHTHYAQKFG	YDGIYGELDF
MOR03471 х клон (3822х3819)	3850	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGAINPLAGHTHYAQKFG	YDGIYGELDF
MOR03471 х клон (3822х3794)	3878	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGAINPLAGHTHYAQKFG	YDGIYGELDF
MOR03471 х клон (3822х3788)	3885	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGAINPLAGHTHYAQKFG	YDGIYGELDF
MOR03471 х клон (3822х3876)	3899	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGAINPLAGHTHYAQKFG	YDGIYGELDF
MOR03548 производное (L-CDR3)	3744	VH3	GTFFRSYGMS	WVSNIRSDGSYTYADSVKG	FEFTPWTYDF
MOR03548 производное (L-CDR3)	3747	VH3	GTFFRSYGMS	WVSNIRSDGSYTYADSVKG	FEFTPWTYDF
MOR03548 производное (H-CDR2)	3753	VH3	GTFFRSYGMS	WVSSIEHKWSGYTTSYAASVKG	FEFTPWTYDF
MOR03548 производное (H-CDR2)	3754	VH3	GTFFRSYGMS	WVSSIEHKWSGYATTYAASVKG	FEFTPWTYDF
MOR03548 производное (H-CDR2)	3755	VH3	GTFFRSYGMS	WVSSIEHKWSGYATGYAASVKG	FEFTPWTYDF
MOR03548 производное (H-CDR2)	3757	VH3	GTFFRSYGMS	WVSSIEHKWTNYATSYAASVKG	FEFTPWTYDF
MOR03548 производное (H-CDR2)	3758	VH3	GTFFRSYGMS	WVSSIEHKWTGYATSYAASVKG	FEFTPWTYDF
MOR03548 производное (H-CDR2)	3832	VH3	GTFFRSYGMS	WVSSIEHKWSNYATSYAAGVKG	FEFTPWTYDF
MOR03548 производное (H-CDR2)	3836	VH3	GTFFRSYGMS	WVSSIEHKWSGYATGYAASVKG	FEFTPWTYDF

Таблица 4В. Последовательности CDR легкой цепи (LH) 17-ти отобранных связующих веществ

Родительский	MOR #	VL ТИП	LCDR1	LCDR2	LCDR3
MOR03471 производное (L-CDR3)	3781	VL-κ3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	HQYIELWSF
MOR03471 производное (L-CDR3)	3790	VL-κ3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	HQYIQLHSF
MOR03471 производное (L-CDR3)	3791	VL-κ3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	QQYIDISPM
MOR03471 х клон (3822х3797)	3849	VL-κ3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	QQYISHPQ
MOR03471 х клон (3822х3819)	3850	VL-κ3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	QQYITYPPF
MOR03471 х клон (3822х3794)	3878	VL-κ3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	QQYISFPA
MOR03471 х клон (3822х3788)	3885	VL-κ3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	QQYISQPV
MOR03471 х клон (3822х3876)	3899	VL-κ3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	HQYIFYPN
MOR03548 производное (L-CDR3)	3744	VL-λ3	SGDNLGKKYVY	LVIYDDNRPS	QTYDRFSSTA
MOR03548 производное (L-CDR3)	3747	VL-λ3	SGDNLGKKYVY	LVIYDDNRPS	QSYDRFSSTG
MOR03548 производное (H-CDR2)	3753	VL-λ3	SGDNLGKKYVY	LVIYDDNRPS	QSYTAQSSAS
MOR03548 производное (H-CDR2)	3754	VL-λ3	SGDNLGKKYVY	LVIYDDNRPS	QSYTAQSSAS
MOR03548 производное (H-CDR2)	3755	VL-λ3	SGDNLGKKYVY	LVIYDDNRPS	QSYTAQSSAS
MOR03548 производное (H-CDR2)	3757	VL-λ3	SGDNLGKKYVY	LVIYDDNRPS	QSYTAQSSAS
MOR03548 производное (H-CDR2)	3758	VL-λ3	SGDNLGKKYVY	LVIYDDNRPS	QSYTAQSSAS
MOR03548 производное (H-CDR2)	3832	VL-λ3	SGDNLGKKYVY	LVIYDDNRPS	QSYTAQSSAS
MOR03548 производное (H-CDR2)	3836	VL-λ3	SGDNLGKKYVY	LVIYDDNRPS	QSYTAQSSAS

Таблица 4С. Консенсусные последовательности для V-областей анти-MCP-1

SEQ ID NO:	V-область	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
2	VH1A	QVELVQ SGAE VKKPGS SVKV SCKAS	<u>GGTFSSY</u> <u>GIS</u>	WVRQAPG QGLE	<u>WMGXIXPKXG</u> <u>XXXYAQKFQG</u>	RVTITADEST STAYMELSSL RSEDТАVYYC AR	<u>YDGIYGELDF</u>	WGQGTЛVTVSS
3	VH3	QVQLVQ SGGG LVQPFG SLRL SCAAS	<u>GFTFRSY</u> <u>GMS</u>	WVRQAPG KGLE	<u>WVSNIRSDGS</u> <u>YTYADSVKG</u>	RFTISRDNK NTLYLQMNEL RAEDТАVYYC AR	<u>FEFTPWTYFD</u> <u>F</u>	WGQGTЛVTVSS
4	каппа3	DIVLTQ SPAT LSLSPG ERAT LSC	<u>RASQSVS</u> <u>DAYLA</u>	WYQKPG QAPR	<u>LLIYDASSRA</u> <u>T</u>	GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YC	<u>HQYIQLHSF</u>	FTFGQGTKVEI K
5	лямбда3	DIELTQ PPSV SVAPGQ TARI SC	<u>SGDNLGK</u> <u>KYV Y</u>	WYQKPG QAPV	<u>LVIYDDNRP</u> <u>S</u>	GIPERPSGSN SGNTATLTIS GTQAEDEADY YC	<u>QYXXXXSSX</u>	FGGGTKLTVL

Таблица 4D. Уникальные CDR анти-MCP-1

V-область	CDR	SEQ ID NO:	FAV обозначение	Последовательность
VH1A	CDR1	6	Все MOR03471	GGTFSSYGIS
VH1A	CDR2	7	3781, 3790, CNTO 888	WMGGIPIFGTANYAQKFQG
VH1A	CDR2	8	3899	WMGAINPLAGHTHYAQKFQG
VH1A	CDR3	9	Все MOR03471	YDGIYGELDF
VH3	CDR1	10	Все MOR03548	GFTFRSYGMS
VH3	CDR2	11	3744, 3747	WVSNIRSDGS YTYADSVKG
VH3	CDR3	12	Все MOR03548	FEFTPWTYFD F
каппа3	CDR1	13	Все MOR03471	RASQSVSDAYLA
Каппа3	CDR2	14	Все MOR03471	LLIYDASSRA T
каппа3	CDR3	15	3781	HQYIELWSF
каппа3	CDR3	16	3790, CNTO888	HQYIQLHSF
каппа3	CDR3	17	3899	HQYIFYPN
лямбда3	CDR1	18	Все MOR03548	SGDNLGKKYV Y
лямбда3	CDR2	19	Все MOR03548	LVIYDDNRP S
лямбда3	CDR3	20	3744	QTYDRFSSTA
лямбда3	CDR3	21	3747	QSYDRFSSTG

Таблица 4Е. Консенсусные последовательности участков CDR анти-MCP-1

CDR	SEQ ID NO:	Последовательность	Варианты
VH1A-CDR2	22	WMGXIXRXXG XXXYAQKFQG	X4 = A, G X6 = I, N X8 = I, L X9 = A, F X11 = H, T X12 = A, T X13 = H, N
VH3-CDR2	23	WVSSIEHKWX XYXTXYAAXV KG	X10 = S, T X11 = G, N X13 = A, T X15 = G, S, T X19 = G, S
Lk-CDR3	24	XQYIXXXX	X1 = H, Q X5 = D, E, F, Q, S, T X6 = Q, L, I, H, T, F X7 = W, H, S, P X8 = A, N, Q, V, P-F, P-M, S-F
LA-CDR3	25	QXYXXXSSXX	X2 = S, T X4 = D, T X5 = A, R X6 = F, Q X9 = A, T X10 = A, G, S
HC-CDR1	26	GXTFXSYGXS	X2 = F, G X5 = S, R X9 = I, M

Таблица 5. Краткое изложение аффинности отобранных антител

$K_D$ [нМ]	<u>MOR3757</u>	<u>MOR3781</u>	<u>MOR3790</u>	<u>MOR3850</u>	<u>MOR3878</u>	<u>MOR3899</u>
<u>Fab BioVeris</u> рекомбинантный MCP-1 человека n=2	0.008 / 0.02	0.03 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.32 ± 0.14	0.81 ± 0.18
<u>Fab BioVeris</u> MCP-1 яванской макаки n=2	0.01 / 0.07	0.004 / 0.01	0.06 ± 0.02	0.04	0.32 ± 0.04	0.49 ± 0.04
<u>Fab KinexA</u> биотин-K-69 MCP-1 человека (CNTO)	0.0067	0.0089	0.075	0.02	н.д.	н.д.
<u>IgG1 BioVeris</u> рекомбинантный MCP-1 человека n=2	н.о.	0.02	0.07 ± 0.03 n=3	0.011 ± 0.005 n=3	0.27 ± 0.06	0.34 ± 0.05
<u>IgG1 BioVeris</u> MCP-1 яванской макаки n=2	н.о.	0.016 ± 0.008	0.06 ± 0.01 n=3	0.021 ± 0.015 n=3	0.23 ± 0.02	0.36 ± 0.06

Связывание со встречающимся в природе MCP-1, определенное с помощью Bioscore. Связывание со встречающимся в природе MCP-1 проверяли методом захвата Fab Bioscore, и все отобранные Fab продемонстрировали связывание со встречающимся в природе MCP-1. Специально, поскольку с оптимизированными Fab был достигнут порог обнаружения для определения  $K_D$ , использовали альтернативные способы определения аффинности и подтверждения специфичности.

#### Превращения в IgG

Все оптимизированные Fab, отобранные для детальной характеристики, превратили в форму IgG1, кроме того, 4 Fab субклонировали в форму IgG4. В различных анализах данные по экспрессии и активности проверенных IgG4 человека были настолько же хороши, как и соответствующих IgG1.

Титрование до равновесия в растворе с использованием BioVeris. В качестве альтернативного метода чувствительного определения  $K_D$  выполнили титрование до равновесия в растворе (SET) с использо-

ванием BioVeris. Константы моновалентной диссоциации рассчитывали при помощи моделей соответствующих подгонок для Fab и IgG. Этот метод пригоден для измерения аффинности и исследований перекрестной реактивности. Все 16 отобранных связующих веществ анализировали с помощью титрования до равновесия в растворе (SET) с использованием BioVeris (табл. 5 и табл. 6), и эти значения аффинности считали конечными значениями аффинности. Несколько связующих веществ, включающих MOR03757, MOR03781, MOR03790, MOR03850, MOR03878 в виде Fab и IgG и MOR03899 в виде IgG, удовлетворяли критериям успешной аффинности к MCP-1 человека, составляющим  $<0,5$  нМ, и к MCP-1 яванской макаки, составляющим  $<20$  нМ. Лучшие аффинности к MCP-1 человека составляли от 20 до 40 пМ на уровне Fab и от 10 до 29 пМ на уровне IgG (табл. 5). Лучшие аффинности к MCP-1 яванской макаки составляли от 10 до 40 пМ на уровне Fab и 20 пМ на уровне IgG (табл. 6).

#### Проверка специфичности с использованием BioVeris

Наряду с аффинностью также анализировали специфичность, особенно перекрестную реактивность с зотаксинами и MCP-2, с помощью титрования до равновесия в растворе (SET) с использованием BioVeris. Ни для одного из отобранных и проверенных 16 Fab и 15 IgG (одного из 16 отобранных IgG не было в наличии) не обнаружили перекрестную реактивность с MCP-2 человека. Как и MCP-1 человека MCP-2 человека связывается главным образом с рецептором CCR2, в то время как зотаксин человека преимущественно связывается с рецептором CCR3. Перекрестной реактивности с зотаксинами человека не обнаружено для Fab и IgG MOR03744, MOR03747, MOR03790 и MOR03781, в то время как 12 отобранных связующих веществ, в том числе MOR03850, в форме Fab или IgG продемонстрировали некоторую перекрестную реактивность с зотаксинами (данные не показаны).

Специфичность оптимизированных антител в способе захвата антител Biotac (CINTO). Оценку специфичности выполняли с использованием отобранных IgG. В Biotac 100 нМ MCP-1 человека, MCP-2, 3, 4 человека и зотаксина 1, 2 и 3 человека добавляли к захваченным оптимизированным антителам. IgG MOR03790, MOR03791, MOR03747, MOR03850, MOR03744, MOR03849, MOR03878, MOR03885, MOR03899 и MOR03781 не продемонстрировали значительного сигнала связывания с гомологичными хемокинами и удовлетворили критериям успешной специфичности (табл. 6).

Связывание Fab с MCP-2 не ингибирует связывание  $^{125}\text{I}$  MCP-2 с клетками Thp-1 (CINTO). Чтобы проанализировать, преобразуется ли активность связывания Fab с MCP-2 и зотаксинами, определенная в Biotac, в нейтрализующую активность, в Centocor разработали анализы связывания меченного радиоактивными изотопами лиганда с целыми клетками.  $^{125}\text{I}$  MCP-2 продемонстрировал точное связывание с клетками Thp-1, и связывание ингибировалось добавлением немеченого MCP-2, но не добавлением специфичного в отношении MCP-1 эталонного антитела C775. Эти результаты обеспечили важный функциональный анализ для проверки специфичности связывания/нейтрализации. В анализе связывания с рецептором использовали 1 нг/мл MCP-1, тогда как в этом анализе требовалось приблизительно 100 нг/мл MCP-2, поскольку мечение MCP-1 могло вызвать потерю активности. MOR03754 не продемонстрировал значительного ингибирования связывания меченного  $^{125}\text{I}$  MCP-2 с рецептором CCR2 на клетках Thp-1 ( $\text{IC}_{50} \geq 2$  мкМ).

Зрелые Fab сильно ингибируют связывание  $^{125}\text{I}$  MCP-1 с клетками Thp-1 (CINTO). Из-за низкого требуемого количества MCP-1, составляющего 1 нг/мл, этот анализ был наиболее чувствительным анализом в этом проекте с пороговой  $\text{IC}_{50}$  в анализе, составляющей приблизительно 100 пМ для Fab и даже 20 пМ для IgG (табл. 5). После оптимизации Fab ингибировали связывание MCP-1 человека с его рецептором CCR2 на клетках Thp-1 с  $\text{IC}_{50}$  ниже эталонного Fab C775. Fab родительского MOR03471 продемонстрировал  $\text{IC}_{50}$ , составляющую 180 нМ, и оптимизированные Fab производных MOR03471 (MOR03781 с 180 пМ, MOR03790 с 260 пМ, MOR03850 с 160 пМ, MOR03878 с 110 пМ и MOR03899 с 130 пМ) продемонстрировали общее улучшение активности во время оптимизации до коэффициента, составляющего 1000×. Хотя этот анализ был наиболее чувствительным биологическим анализом, имеющимся в этом проекте, даже в этом анализе оптимизированные связующие вещества, по-видимому, достигали порогов анализа.

Зрелые IgG сильно ингибируют связывание  $^{125}\text{I}$  MCP-1 с клетками Thp-1 (CINTO). Для анализов связывания меченного радиоактивными изотопами лиганда и мобилизации кальция было важно блокировать сайты связывания Fc-рецептора путем добавления несвязанного человеческого IgG1. Все проверенные IgG1 сохраняли активность в анализе связывания меченного радиоактивными изотопами лиганда. Значение  $\text{IC}_{50}$  оптимизированного MOR03781 составляло 20 пМ, MOR03790 - 30 пМ, MOR03850 - 50 пМ, MOR03878 - 30 пМ и MOR03899 - 50 пМ.

Разработка FACS-анализа ингибирования индуцируемой MCP-1 интернализации рецептора CCR2. Анализы интернализации рецептора выполняли с использованием экспрессирующих CCR2 клеток, которые показали большую экспрессию CCR2, чем клетки Thp-1, что приводило к лучшему отношению сигнал/фон. Для определения значения  $\text{EC}_{50}$  сначала в этом анализе титровали синтетический MCP-1 человека. Обнаружено, что значение  $\text{EC}_{50}$  для MCP-1 составляет 116 нг/мл. Поэтому для дальнейших FACS-анализов было выбрано 110 нг/мл (-11 нМ) MCP-1. Кроме того, оптимальное время инкубации для получения полной интернализации оценивалось при 37°C. Больше всего интернализация происходила в пре-

делах первых 30 мин. Поэтому во всех последующих анализах использовали время инкубации 1 ч. Анализ успешно разработали для того, чтобы сделать возможным определение  $IC_{50}$ . Измеряли активность и распределение при использовании 0,001-200 мкг/мл Fab или IgG для ингибирования индуцируемой MCP-1 интернализации рецептора. Отобранные оптимизированные связующие вещества продемонстрировали хорошее ингибирование индуцируемой MCP-1 интернализации рецептора (данные не показаны). Две различные партии Fab проверили параллельно с доказанной воспроизводимостью.

В анализе интернализации с использованием Fab для MOR03790 определили  $IC_{50}$ , составляющую 5 нМ, для MOR038 50 - 4 нМ, для MOR03781 - 7 нМ, MOR03878 - 5,3 нМ и для MOR03899 - 3,3 нМ (табл. 6). IgG1 MOR03781 также продемонстрировал  $IC_{50}$ , составляющую 7 нМ, что указывает на то, что после превращения в IgG активность сохраняется.

Ингибирование мобилизации кальция (CNTO). MCP-1 индуцирует мобилизации кальция в клетках Thp-1, которую можно обнаружить с помощью флуорофора. Оптимизированные антитела продемонстрировали сильное ингибирование мобилизации кальция. Fab 4-х конечных кандидатов MOR03781, MOR03790, MOR03850 и MOR03878 продемонстрировали значения  $IC_{50}$ , составляющие от 18 до 28 нМ. Соответствующие IgG снова сохраняли активность и продемонстрировали даже немного лучшие значения  $IC_{50}$ , составляющие от приблизительно 6 до 10 нМ, благодаря их способности нейтрализовать 2 молекулы MCP-1 на IgG. Снова порога анализа, по-видимому, достигли при приблизительно 10 нМ.

#### Ингибирование индуцируемой встречающимся в природе MCP-1 мобилизации кальция

Встречающийся в природе MCP-1 очищали из супернатанта PANC1 и использовали для индукции высвобождения кальция. Оптимизированные Fab продемонстрировали ингибирование индуцируемой встречающимся в природе MCP-1 мобилизации кальция с большей активностью по сравнению с эталонным антителом C775. Снова порога анализа, по-видимому, достигли при приблизительно 10-20 нМ встречающегося в природе MCP-1.

#### Ингибирование хемотаксиса

Вследствие сильных неспецифических эффектов родительские Fab нельзя было проверить в анализе хемотаксиса, но после созревания все проверенные оптимизированные Fab специфически ингибировали хемотаксис, что могло быть следствием увеличения активности. Все проверенные оптимизированные Fab были активны в анализе хемотаксиса. Поскольку анализ был полуколичественный, нельзя было определить правильные значения  $IC_{50}$ .

Конкурентное связывание с эталонным антителом C775. Все происходящие из MOR03548 предварительно отобранные Fab полностью ингибировали связывание C775 с MCP-1 в конкурентном твердофазном формате. Все 7 происходящих из MOR03471 предварительно отобранных Fab продемонстрировали частичную (~60%) конкуренцию в этом анализе.

#### Краткое изложение данных

Таблица 6. Профили антител, которые удовлетворили критериям успеха

Критерии успеха	Эталонный Fab IgG	MOR3790k Fab IgG	MOR3850k Fab IgG	MOR3781k Fab IgG	MOR3878k Fab IgG	MOR3899k Fab IgG
# 1, 6 MCP-1 $K_d < 0,5$ нМ IGEN	65, -	0,12, 0,07	0,04, 0,01	0,03, 0,02	0,32 0,27	(0,81) 0,34
# 2 Специфичность в отношении MCP-1 BIAcore (IgG)	нисколько, нисколько	(MCP-2/эотаксин), нисколько	(MCP-2/эотаксин), нисколько	(MCP-2/эотаксин), нисколько	(MCP-2/эотаксин), нисколько	(MCP-2/эотаксин), нисколько
# 3 Ингибирование связывания <sup>125</sup> I MCP-1 $IC_{50} < C775$	35,6, 25,6	0,26, 0,03	0,16, 0,05	0,18, 0,02	0,11, 0,03	0,13, 0,05
# 4 Ингибирование хемотаксиса	да, да	да, н.о	да, н.о.	да, н.о.	да, н.о.	да, н.о.
# 5 Ингибирование мобилизации $Ca^{2+}$ $IC_{50} < C775$	71,5, 62,3	25,02, 4,26	28,42, 9,47	21,8, 10,9	20,24, 6,7	17,54, 5,85
# 7 MCP-1 яванской макаки $K_d < 10$ нМ	н.о., н.о.	0,06, 0,06	0,04, 0,01	0,01, 0,02	0,32, 0,23	0,49, 0,36

#8 Ингибирование индуцируемой природным MCP-1 мобилизации Ca <sup>2+</sup>	да, н.о.	да, н.о.	да, н.о.	да, н.о.	да, н.о.	да, н.о.
Продолженное измерение-1 Конкуренция с C775	да, да	частичная, н.о.	частичная, н.о.	частичная, н.о.	частичная, н.о.	частичная, н.о.
Продолженное измерение-2 Ингибирование интернализации CCR2	65, н.о.	5, н.о.	4, н.о.	7, 7	5,3, н.о.	3,3, н.о.

#### Пример 4. Отбор терапевтических кандидатов

##### Отбор и генерирование конечных терапевтических кандидатов, CNTO888

Два моноклональных антитела, 3781 и 3790, отличающихся только последовательностями CDR легкой цепи (табл. 4B и D, SEQ ID NO: 15 и 16), продемонстрировали почти идентичную биологическую активность в анализах. Выполнили анализ иммуногенности *in silico* для идентификации потенциальных связывающих пептидов класса II HLA (главного комплекса гистосовместимости человека) и определения, отличаются ли кандидаты значительно с точки зрения HLA-эпитопов связывания. Анализ предсказывал, что мАт 3790 имеет более низкий потенциал для иммуногенности, чем мАт 3781. На основе этого и других биохимических и биологических анализов, представленных в табл. 6, в качестве конечного терапевтического мАт выбрали мАт 3790, включающее в себя каркасные области VH1A тяжелой цепи (SEQ ID NO: 2) и SDR-участки тяжелой цепи (SEQ ID NO: 6, 7 и 9); и каркасную область (SEQ ID NO: 4) и SDR-участки (SEQ ID NO: 13, 14 и 15) легкой цепи каппа3.

Вследствие аминокислотных замен, введенных во время клонирования, N-концевая последовательность мАт 3790 имеет некоторые отклонения от последовательностей зародышевой линии человека. Кроме того, неоднозначность кодонов для аминокислот (т.е. ДНК-последовательность) не позволяет достичь максимальной экспрессии в прокариотических клетках. ДНК мАт ресинтезировали для исправления несовершенного N-концевого выравнивания с последовательностью зародышевой линии и изменения неоднозначных кодонов теми, которые благоприятствуют высокой экспрессии белков человека. Модифицированную последовательность мАт 3790, включающую последовательности SEQ ID NO: 27 и 28 переменных областей тяжелой и легкой цепей, соответственно, и ниже (с подчеркнутыми SDR), где N-концевыми остатками тяжелой цепи являются QVQ (Gln-Val-Gln), и N-концевыми остатками легкой цепи являются EIV (Glu-Ile-Val), обозначают CNTO888.

Последовательность переменной области тяжелой цепи CNTO888 (SEQ ID NO: 27)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYGISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTA  
NYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYDGIYGELDFWGGQTLTVSS

Последовательность переменной области легкой цепи CNTO888 (SEQ ID NO: 28)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSDAYLAWYQKPGQAPRLIYDASSRATG  
VPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCHQYIQLHSFTFGQGTKVEIK

##### Биохимическая и биофизическая характеристики CNTO888

CNTO888 представляет собой полноразмерное антитело человека IgG1 каппа. В последовательности нет предсказываемых сайтов N-связанного гликозилирования. Биохимические и биофизические свойства CNTO888 (временно экспрессированного в клетках HEK293 и очищенного с помощью аффинной хроматографии с использованием белка А) были охарактеризованы с помощью электрофореза в SDS-ПААГ, гель-хроматографии, масс-спектрального анализа и BIAcore, в отношении аффинности связывания (Kd) и специфичности. При электрофорезе в SDS-ПААГ нативный CNTO888 мигрирует в виде единичной полосы в положении приблизительно 150 кДа. Восстановленный/алкализованный IgG мигрирует в виде двух полос в положении приблизительно 60 и 33 кДа. Гель-хроматография CNTO888 показала, что IgG элюирует в виде единичного пика в том же самом объеме элюции, что и объем, определенный для контрольного IgG Remicade (данные не показаны). Наконец, масс-спектральный анализ показал, что CNTO888 имеет массу, составляющую 147000 Да (данные не показаны). BIAcore-анализ показал, что аффинность связывания (Kd) CNTO888 с CCL-2 человека и яванской макаки составляет 30 и 10 пМ, соответственно. CNTO888 не продемонстрировал значительного связывания в BIAcore с CCL-2 родственными хемокинами, т.е. MCP-2, 3, 4 и эотаксином 1, 2 и 3.

##### In vitro характеристика CNTO888

Биологические активности CNTO888 оценивались во множестве основанных на клетках анализах. Временно экспрессированный CNTO888, оцененный по критериям успеха во всех анализах, имел активности, которые были неотличимы от активностей родительского мАт 3790 (табл. 5).

##### Пример 5. Клонирование и экспрессия антитела против MCP-1

Аликвоты E.coli с плазмидами для CNTO888, p2844 и p2882, содержат тяжелую и легкую цепи антитела, соответственно. Плазмида p2844 содержит кодирующую оптимизированную тяжелую цепь последовательность кодирующих CNTO888 районов под контролем промотора тяжелой цепи анти-CD4, а

плазмиды p2882 содержит кодирующую оптимизированную легкую цепь последовательность кодирующих CNO888 районов под контролем промотора легкой цепи анти-СО4. Обе конструкции включают ген селективного маркера *gpt* для придания химической устойчивости к МНХ (микофеноловой кислоте, гипоксантину и ксантину). Каждую плазмиду очищали, характеризовали, количественно определяли и секвенировали.

Клетки экспоненциальной культуры клеточной линии-хозяина C463A, производного Sp2/0, адаптированного к росту в химически охарактеризованных средах (CD-гибридом), подвергали совместной электропорации линейаризованных p2844 и p2882. Через 48 ч клетки подвергали воздействию 1×МНХ (0,5 мг/л микрофеноловой кислоты, 2,5 мг/л гипоксантина и 50 мг/л ксантина). Через три дня после отбора жизнеспособность клеток уменьшилась менее чем на 13%, и в это время ~90000 жизнеспособных клеток поместили в метилцеллюлозу. Клетки инкубировали, не перемешивая, в течение восьми-тринадцати дней, затем скринировали и переносили в 24-луночные планшеты с использованием Halo-метода. Культуры размножали и получали титры сверхроста в 24-луночных планшетах.

Наибольший титр сверхроста в 24-луночных планшетах, составляющий 70 мг/л, и титр в колбах с перемешиванием (в средах для CD-гибридом, составляющий 108,5 мг/л, имела родительская клеточная линия (1C4). Эту родительскую клеточную линию, C1262A, выбрали для дальнейшей оценки в колбах с перемешиванием. C1262A передали в Отдел формирования банка клеток для генерирования банка клеток для разработки. Клетки этого банка, обозначенные C1262A:DCB; 02SEP04, при проверке были негативными в отношении микоплазмы и стерильными. При продуцировании CNO888 для поддержания дальнейших исследований из клеток C1262A в колбах с перемешиванием (без добавления соевого пептона) достигали титра, составляющего 230 мг/л, и выход очищенного CNO888 из 2 л культуры составлял 366 мг. Параллельно, в дополнительных 9 л культуры клеток C12 62A продуцировали ~2 г сырого материала CNO888 для скорейшей очистки и разработки композиций.

Родительскую клеточную линию, C1262A, субклонировали с использованием Halo-метода и получили пять высокопродуцирующих субклональных клеточных линий. Лучшая субклональная клеточная линия (4CD5) имела титр сверхроста в 24-луночных планшетах, составляющий 150,5 мг/л, и титр в колбах с перемешиванием (в средах для CD-гибридом), составляющий 167 мг/л. Эта субклональная клеточная линия имела код C1262B.

#### Пример 6. Лечение опухолей поджелудочной железы человека с помощью CNO888

В этом исследовании изучается, подавляет ли рост опухоли в крысиных ксенотрансплантатах блокировка опухолевого MCP-1 (продуцируемого происходящими из опухоли человека клетками). Для определения роли опухолевого MCP-1, а также гомолога MCP-1 хозяина, JE, в развитии и прогрессии злокачественного заболевания проверили и антитело против MCP-1 человека, и антитело против JE мыши на способность подавлять рост опухолей предстательной железы *in vivo*.

Мышей с опухолями предстательной железы BxPC-3 лечили антителом человека против MCP-1 человека, обозначенным CNO888, которое включает последовательности переменных областей (SEQ ID NO: 27 и 28), слитые с константными областями IgG1 человека. Для сравнения *in vivo* активности CNO888 с активностью ранее проверенного антитела крысиных, для которого было обнаружено, что оно наиболее эффективно ингибирует наблюдаемые у хозяина эффекты, и CNO888 и антитело крысиных против MCP-1 человека (C775) вводили в комбинации с антителом против JE мыши (C1142). Основываясь на конечном определении веса опухолей, и мАТ человека против MCP-1 человека (CNO888) и мАТ крысиных против MCP-1 человека (C775) значительно ингибируют рост опухоли.

#### Материалы и методы

BxPC-3 представляют собой происходящие из опухоли предстательной железы человека клетки. Matrigel™, приготовленный из опухоли Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), получали от Becton Dickinson (0,2 ЕД/мг, Bedford, MA). C775 представляет собой мышиное мАТ против MCP-1 человека, а C1142 представляет собой химерное крыса/мышь антитело против JE мыши с переменной областью крысы и константной областью мыши, оба вышеуказанных антитела описаны в находящейся в процессе одновременного рассмотрения заявке авторов настоящего изобретения на патент США с серийным № 11/170453 и подачах родственных заявок. Контрольное антитело cVaM представляет собой химерный крыса/мышь IgG<sub>2a</sub>k, состоящий из переменной области крысы и константной области мыши, который служит в качестве контроля изотипа для C1142 и C775. IgG человека для клинического применения получали из аптеки и медицинской помощи на дому Beckett, Inc, Sharon Hill, PA, и он служил в качестве контроля для CNO888.

В этом исследовании использовали самок-мышей SCID (возрастом 6-8 недель), полученных от Charles River (Raleigh, NC). Мышей поселяли группами в покрытые фильтрами пластиковые клетки и снабжали стерилизованным давлением пищей и водой.

Клетки BxPC-3 культивировали в среде RPMI 1640, содержащей 10% FBS, (полной среде). За сорок восемь часов до начала исследования клетки разводили 1:3. В день исследования клетки подвергали обработке трипсином для образования суспензии единичных клеток, и клеточную суспензию промывали 10 объемами полной среды для нейтрализации трипсина. Клетки осаждали центрифугированием и ресу-

пендировали в свободной от сыворотки RPMI. Matrigel™ оттаивали при 4°C в течение ночи. Суспензию Matrigel™-опухолевые клетки готовили смешиванием равных объемов раствора Matrigel™ и клеток ВхРС-3. Конечная концентрация суспензии раковых клеток составляла  $5 \times 10^6$  клеток/мл в 5 мг/мл Matrigel™.

В нулевой день 80 самкам-мышам SCID имплантировали подкожно 0,2 мл суспензии клеток ВхРС-3. В 0,2 мл суспензии клеток содержалось  $1 \times 10^6$  клеток ВхРС-3 и 1 мг Matrigel™. Во избежание полимеризации Matrigel™ использовали холодные шприцы.

Таблица 7. Проект противоопухолевого исследования

Номер группы	Животных на группу	Лечение (внутрибрюшинно)
1	10	PBS
2	10	cVaM + IgG человека (20 мг/кг каждого антитела)
3	10	C775 + C1142 (20 мг/кг каждого антитела)
4	10	CNT0888 + C1142 (2 мг/кг каждого антитела)
5	10	CNT0888 + C1142 (20 мг/кг каждого антитела)

Всех животных взвешивали в начале исследования и раз в неделю в ходе исследования. Наблюдая рост опухоли (3 мм<sup>3</sup>), опухоли измеряли с помощью кронциркулей в двух измерениях (длина и ширина) в миллиметрах (мм). Рост опухолей у мышей контролировали, и рассчитывали объем опухоли (мм<sup>3</sup>) на основе формулы [длина × ширина × ширина]/2.

На 14 день после имплантации опухолевых клеток мышей со средним объемом опухоли, составляющим приблизительно 50 мм<sup>3</sup>, разделили слепым методом на пять групп (n=10/группу). Лечение (табл. 7) начинали на 14 день, и лечение назначали дважды в неделю в течение оставшегося времени исследования (52 дней после начала лечения на 14 день). Опухоли измеряли один раз в неделю в течение оставшегося времени исследования. В конце исследования мышей подвергали эвтаназии с помощью асфикции CO<sub>2</sub>.

Опухоли анатомировали, взвешивали на электронных весах и фиксировали. Опухоли фотографировали с использованием цифровых камер. На 50 день одна мышь в группе 3 имела опухоль размером, превышающим предел, приемлемый в соответствии с директивой исследования, и была умерщвлена. Объем и вес этого животного включили в окончательный анализ.

Данные, касающиеся веса опухолей, анализировали с помощью стандартной линейной модели и дисперсионного анализа (ANOVA). Р-величины меньше 0,05 для всех тестов и сравнений считали значительными, если не указано иное. Использовали логарифмический масштаб, поскольку лучше выполнялись лежащее в основе допущение равной дисперсии и форма нормального распределения. Величины с полдюжиной нулей, для мышей без опухоли, заменили небольшой величиной интерполяционного сплайна (0,007240538), которая облегчала статистический анализ в логарифмическом масштабе без искажения структуры данных.

Для объема опухолей модель повторных измерений подогнали к данным, принимающим автокорреляционную кодисперсионную структуру первого порядка. Естественные сплайны использовали для гибкого моделирования искривления тенденций во времени. В каждый момент времени осуществляли попарные сравнения среди групп.

### Результаты

Группы отрицательного контроля и PBS, и cVaM/IgG человека продемонстрировали сходный рост опухолей, достигающий ~350 мм<sup>3</sup> после 51 дня. Это указывает на то, что лечение нерелевантными антителами не ингибирует роста опухолей. Рост опухолей в трех проверяемых группах (C775/C1142 и CNT0888/C1142) был медленнее, чем в группах отрицательного контроля, что указывает на то, что при лечении анти-CCl/анти-JE рост опухолей уменьшается. В группах C775/C1142 и CNT0888/C1142 (2 мг/кг) продемонстрировано значительное ингибирование опухолей по сравнению с группой контроля PBS, определенное по объему опухолей, начиная с 18 дня и до конца исследования. В группе CNT0888/C1142 (20 мг/кг) продемонстрировано значительное ингибирование на 18-39 дни по сравнению с группой контроля PBS.

Вес опухолей определяли в конце исследования на 51 день (табл. 8). В PBS-группе 1 была 1 мышь без опухоли, в группе 3 C775/C1142 - 3 мыши без опухолей и в группе 4 CNT0888/C1142 - 2 мыши без опухолей. При сравнении веса опухолей проверяемая группа CNT0888 продемонстрировала значитель-



ное снижение веса опухолей по сравнению с группой контроля PBS (табл. 8). Процент ингибирования в группе CNT0888/C1142, которой назначали дозу 2 мг/кг, составлял 80% ( $P=0,006$ ), в то время как в группе CNT0888/C1142, которой назначали дозу 20 мг/кг, ингибирование составило 68% ( $P=0,046$ ). Группа C775/C1142 не продемонстрировала значительного ингибирования роста опухолей ( $P=0,004$ ). Различия, наблюдаемые при статистической интерпретации результатов объема опухоли в сравнении с весом опухоли, скорее всего, обусловлены неточностью измерения объема опухоли с помощью кронциркулей, по сравнению с точностью взвешивания опухолей, извлеченных из животного.

Таблица 8. Вес конечных опухолей

Животное #	PBS	cVaM + IgG человека	C775+C1142	CNT0888+C1142*	CNT0888+C1142
1	0	0,142	0	0,089	0,116
2	0,34	0,349	0,075	0	0,13
3	0,368	0,302	0	0,04	0,028
4	0,239	0,667	0,032	0,123	0,13
5	0,386	0,268	0,273	0,198	0,453
6	0,222	0,178	0,018	0,065	0,059
7	0,926	0,531	0,044	0,196	0,058
8	0,484	0,485	0,307	0,128	0,029
9	0,564	0,302	0	0	0,024
10	0,459	0,28	1,328	0,031	0,356
Средний вес опухолей (г)	0,399	0,350	0,208	0,087	0,138
Средне- квадратическое отклонение	0,244	0,163	0,410	0,073	0,148

В общем, эти результаты указывают на то, что в установленной модели BxPC-3 блокировка MCP-1 и JE мыши значительно ингибирует рост опухоли, и что CNT0888 имеет противоопухолевую активность.

Понятно, что настоящее изобретение можно осуществить на практике иначе, чем описано, в частности, в предшествующем описании и примерах.

Многочисленные модификации и вариации согласно изобретению возможны в свете отмеченной выше доктрины, и, следовательно, они находятся в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

#### Ссылки

Abraham R., Buxbaum, S. Link, J., Smith, R., Venti. C., Darsley, M. (1996). Determination of Binding Constants of Diabodies directed against Prostate-specific Antigen using Electrochemiluminescence-based Immunoassays. *J. Mol. Recognit.* 9(5-6):456-61.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl. K., (1998) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, New York, USA.

Belperio J.A., Keane M.P., Burdick M.D., Lynch J.P. 3rd. Xue Y.Y. Berlin A, Ross D.J., Kunkel S.L., Charo I.F., Strieter R.M. (2001). Critical role for the chemokine MCP-1/CCR2 in the pathogenesis of bronchiolitis obliterans syndrome. *J Clin Invest.* 108(4):547-56.

Boder, E. T., Midelfort, K. S., Wittrup, K. D. (2000). Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *PNAS* 97, 20, 10701-10705

Carnevale K.A., Cathcart M.K. (2003). Protein kinase C beta is required for human monocyte chemotaxis to MCP-1. *J Biol Chem.* 278 (28):25317-22.

Chen Y., Halebeck J.M. Ruetzler C., Bol D., Thomas K., Berman N.E. Vogel S.N. (2003). Overexpression of monocyte chemoattractant protein 1 in the brain exacerbates ischemic brain injury and is associated with recruitment of inflammatory cells. *J. Cereb Blood Flow Metab.* 23(6):748-55.

Chen B.P., Hai, T. Expression vectors for affinity purification and radiolabeling of proteins using *Escherichia coli* as host, *Gene* 139, 73-75, 1994.

Chen Y., Wiesmann, C., Fuh, G., Li, B., Christinger. H. W., McKay, P., de Vos. A. M., Lowman, H. B. (1999). Selection and analysis of an optimized anti-VEGF antibody: crystal structure of an affinity-matured Fab in complex with antigen. *J. Mol. Biol.* 293, 865-881.

Conti P., DiGioacchino M. (2001). MCP-1 and RANTES are mediators of acute and chronic inflammation. *Allergy Asthma Proc.* 22(3):133-7.

Dawson J., Miltz W., Mir A.K, Wiessner C. (2003). Targeting monocyte chemoattractant protein-1 signaling in disease. *Expert Opin Ther Targets.* 7(1)35-48.

- Ernst C.A., Zhang Y.J., Hancock P.R., Rutledge B.J., Corless C.L., Rollins B.J. (1994). Biochemical and biologic characterization of murine monocyte chemoattractant protein-1. Identification of two functional domains. *J. Immunol* 152(7):3541-9.
- Friguet B., Chaffotte A. F., Djavadi-Ohanian L., & Goldberg M.E. (1985). Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Meth.* 77, 305-319.
- Frisch, C., Brocks, B., Ostendorp, R., Hoess, A., von Ruden, T., and Kretzschmar, T. (2003). From EST to IHC: human antibody pipeline for target research. *J Immunol Methods* 275, 203-212.
- Gosling J., Slaymaker S., Gu L., Tseng S., Zlot C.H., Young S.G., Rollins B.J., Charo I.F. (1999). MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J. Clin Invest.* 103(6):773-8.
- Haenel C., Satzger M., Delia Ducata D., Ostendorp R. and Brocks B. (2005). Characterization of High Affinity Antibodies by Electrochemiluminescence-Based Equilibrium Titration (accepted for publication in *Analytical Biochemistry*).
- Hemmerich S., Paavola C., Bloom A., Bhakta S., Freedman R., Grunberger D., Krstenansky J., Lee S., McCarley D., Mulkms M., Wong B., Pease J., Mizoue L., Mirzadegan T., Polsky I., Thompson K., Handel TM, Jarnagin K. (1999). Identification of residues in the monocyte chemotactic protein-1 that contact the MCP-1 receptor, CCR2. *Biochemistry* 38(40):13013-25.
- Hughes P.M., Allegrini P.R., Rudin M., Perry V.H., Mir A.K., Wiessner C. (2002) Monocyte chemoattractant protein-1 deficiency is protective in a murine stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab.* 22(3):308-17.
- Jarnagin K., Grunberger D., Mulkins M., Wong B., Hemmerich S., Paavola C., Bloom A., Bhakta S., Diehl F., Freedman R., McCarley D., Polsky I., Ping-Tsou A., Kosaka A., Handel T.M. (1999), Identification of surface residues of the monocyte chemotactic protein 1 that affect signaling through the receptor CCR2. *Biochemistry.* 38(49):16167-77.
- Jimenez-Sainz M.C., Fast B., Mayor F Jr, Aragay A.M. (2003). Signaling pathways for monocyte chemoattractant protein 1-mediated extracellular signal-regulated kinase activation. *Mol. Pharmacol.* 64(3):773-82.
- Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M. Wellnhofer, G., Hoess, A., Wolle, J., Pluckthun, A., and Virnekas, B (2000). Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J Mol Biol* 296, 57-86.
- Krebs, B., Rauchenberger, R., Reiffert, S., Rothe, C., Tesar. M., Thomassen. E., Cao, M., Dreier, T., Fischer, D., Hoss, A., Inge, L., Knappik, A., Marget, M., Pack, P., Meng, X.Q., Schier.R., Sohlmann. P., Winter, J., Wolle, J., and Kretzschmar, T. (2001). High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies. *J Immunol Methods* 254, 67-84.
- Kretzschmar, T. and von Ruden, T. (2002). Antibody discovery: phage display. *Curr Opin Biotechnol* 13:598-602.
- Leonard EJ, Yoshimiura T. (1990). Human monocyte chemoattractant protein-1. *Immunol Today.*, 11:97-101.
- Löhning, C. (2001). Novel methods for displacing (poly)peptides/proteins on bacteriophage particles via disulfide bonds. WO 01/05950.
- Losy J., Zaremba J. (2001). Monocyte chemoattractant protein-1 is increased in the cerebrospinal fluid of patients with ischemic stroke. *Stroke.* 32 (11) : 2695-6.
- Low, N. M., Holliger, P., Winter, G. (1996). Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. *J. Mol. Biol.* 260, 359-368.
- Mahad D.J., Ransohoff R.M. (2003). The role of MCP-1 (CCL2) and CCR2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Semin Immunol.* 15(1):23-32.
- McManus C., Berman, J.W., Brett F.M., Staunton H., Farrell M., Brosnan C.F. (1998). MCP-1, MCP-2 and MCP-3 expression in multiple sclerosis lesions: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Neuroimmunol.* 86(1):20-9.
- Nagy Z.A., Hubner B., Löhning C., Rauchenberger R., Reiffert S., Thomassen-Wolf E., Zahn S. Leyer S., Schier E.M., Zahradnik A., Brunner C., Lobenwein K., Rattel B., Stanglmaier M., Hallek M., Wing M., Anderson S., Dunn M., Kretzschmar T., Tesar M. (2002). Fully human, HLA-DR-specific monoclonal antibodies efficiently induce programmed death of malignant lymphoid cells. *Nat Med.* 8(8): 801-7.
- Nakamura M., Kyo S., Kanaya T., Yatabe N., Maida Y., Tanaka M., Ishida Y., Fujii C., Kondo T., Inoue M., Mukaida N. (2004). hTERT-promoter-based tumor-specific expression of MCP-1 effectively sensitizes cervical cancer cells to a low dose of cisplatin. *Cancer Gene Ther.* 11(1):1-7.
- Neumark E., Sagi-Assif O., Shalmon B., Ben-Baruch A., Witz I.P. (2003). Progression of mouse mammary tumors: MCP-1-TNF $\alpha$  cross-regulatory pathway and clonal expression of promalignancy and antimalignancy factors. *Int J. Cancer.* 106(6):879-86.
- Ni W., Kitamoto S., Ishibashi M., Usui M., Inoue S., Hiasa K., Zhao Q., Nishida K., Takeshita A., Egashira K. (2004). Monocyte chemoattractant protein-1 is an essential inflammatory mediator in angiotensin II-induced progression of established atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24(3):534-9.

- Nokihara H., Yanagawa H., Nishioka Y., Yano S., Mukaida N., Matsushima K., Sone S. (2000). Natural killer cell-dependent suppression of systemic spread of human lung adenocarcinoma cells by monocyte chemoattractant protein-1 gene transfection in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res.* 15; 60(24):7002-7.
- Ohta M., Kitadai Y., Tanaka S., Yoshihara M., Yasui W., Mukaida N., Haruma K., Chayama K. (2003). Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with macrophage infiltration and tumor vascularity in human gastric carcinomas. *Int J Oncol.* 22(4) :773-8.
- Piehl J., Brecht A., Giersch T., Hock B., Gauglitz G. (1997). Assessment of affinity constants by rapid solid phase detection of equilibrium binding in a flow system. *J. Immunol. Meth.* 201, 189-206.
- Prickett K.S., Amberg D.C., Hopp T.P., (1989). A calcium-dependent antibody for identification and purification of recombinant proteins. *Biotechniques.* 7(6):580-9.
- Rauchenberger, R., Borges, E., Thomassen-Wolf, E., Rom E., Adar R., Yaniv Y., Malka M., Chumakov I., Kotzer S., Resnitzky D., Knappik A., Reiffert S., Prassler J., Jury K., Waldherr D., Bauer S., Kretzschmar, T., Yayon, A., and Rothe, C. (2003). Human combinatorial Fab Library yielding specific and functional antibodies against the human fibroblast growth factor receptor 3. *J Biol Chem.* 278(40):38194-38205.
- Ren G., Dewald O., Frangogiannis N.G. (2003). Inflammatory mechanisms in myocardial infarction. *Curr. Drug Targets Inflamm Allergy.* 2(3):242-56.
- Rose C.E Jr, Sung S.S, Fu S.M. (2003). Significant involvement of CCL2 (MCP-1) in inflammatory disorders of the lung. *Microcirculation.* 10 (3-4):273-88.
- Salcedo R., Ponce M.L., Young H.A., Wasserman K., Ward J.M., Kleinman H.K., Oppenheim J.J., Murphy W.J. (2000). Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood.* 96(1):34-40.
- Sarau H.M., Rush JA, Foley J.J, Brawner M.E, Schmidt D.B., White J.R., Barnette M.S. (1997). Characterization of functional chemokine receptors (CCR1 and CCR2) on EoL-3 cells: a model system to examine the role of chemokines in cell function. *J. Pharmacol Exp Ther.* 283 (1):411-8.
- Sartipy P., Loskutoff D.J. (2003), Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100(12):7265-70.
- Schier R., Bye J., Apell G., Mc Call A., Adams G. P., Malmqvist, M., Weiner, L. M. Weiner, Marks, J. D. (1996a). Isolation of high-affinity monomeric human anti-c-erbB-2 single chain Fv using affinity-driven selection. *J. Mol. Biol.* 255, 28-43.
- Schier R., McCall A., Adams G. P., Marshall, K. W., Merritt, H., Yim, M., Crawford, R. S., Werner, L.M., Marks, C, Marks, J.D. (1996b). Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site. *J. Mol. Biol.* 263, 551-567.
- Schmidt T. G.M., Koepke, J., Frank, R. and Skeira, A. (1996). Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target streptavidin. *J. Mol. Biol.* 255, 753-766.
- Seli E., Selam B., Mor G., Kayisli U.A., Pehliwan T., Arici A. (2001). Estradiol regulates monocyte chemotactic protein-1 in human coronary artery smooth muscle cells: a mechanism for its antiatherogenic effect. *Menopause.* 8(4): 296-301.
- Sung F.L., Zhu T.Y., Au-Yeung K.K., Siow Y.L., O. K. (2002). Enhanced MCP-1 expression during ischemia/reperfusion injury is mediated by oxidative stress and NF-kappaB. *Kidney Int.* 62(4): 1160-70.
- Szalai C., Kozma G.T., Nagy A., Bojszko A., Krikovszky D., Szabo T., Falus A. (2001). Polymorphism in the gene regulatory region of MCP-1 is associated with asthma susceptibility and severity. *J Allergy Clin Immunol.* 108(3) 2375-81.
- Takahashi K., Mizuarai S., Araki H., Mashiko S., Ishihara A., Kanatani A., Itadani H., Kotani H. (2003). Adiposity elevates plasma MCP-1 levels leading to the increased CD11b-positive monocytes in mice. *J Biol Chem.* 278 (47): 46654-60.
- Tonouchi H., Miki C., Ohmori Y., Kobayashi M., Mohri Y. Tanaka K., Konishi N., Kusunoki M. (2004). Serum monocyte chemoattractant protein-1 in patients with postoperative infectious complications from gastrointestinal surgery for cancer. *World J Surg.* 28(2):130-6.
- Van Der Voorn P., Tekstra J., Beelen R.H., Tensen C.P., Van Der Valk P, De Groot C.J. (1999). Expression of MCP-1 by reactive astrocytes in demyelinating multiple sclerosis lesions. *Am J Pathol.* 154(1):45-51.
- Voss S and Skerra A. (1997). Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng.* 10:975-982.
- Yamada M., Kim S., Egashira K., Takeya M., Ikeda T., Mimura O., Iwao H. (2003). Molecular mechanism and role of endothelial monocyte chemoattractant protein-1 induction by vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23(11):1996-2001.
- Yang W., Green K., Pinz-Sweeney, S., Briones A.T., Burton D.R., Barbas III, C.F.(1995). CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into the picomolar range. *J. Mol. Biol.* 254: 392:403.
- Yoshimura T., Leonard E.J. (1999). Identification of high affinity receptors for human monocyte chemoattractant protein-1 on human monocytes. *J. Immunol.*, 145(1): 292-7.
- Zhu B.Q., Heeschen C., Sievers R.E., Karliner J.S., Parmley W.W., Glantz S.A., Cooke J.P. (2003). Sec-

ond hand smoke stimulates tumor angiogenesis and growth. Cancer Cell. 4(3):191-6.

# Список последовательностей

<110> DAS, Anuk; SWEET, Ray; TSUI, Ping; BARDROFF, Michael

<120> АНТИТЕЛА ПРОТИВ МСР-1, КОМПОЗИЦИИ, СПОСОБЫ И ПРИМЕНЕНИЯ

<130> CEN5098 PSP

<160> 57

<170> Патент в версии 3.3

<210> 1

<211> 125

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu  
50 55 60

Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa  
65 70 75 80

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Lys Gly  
85 90 95

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly  
100 105 110

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro  
115 120 125

<210> 2

<211> 124

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Xaa Trp  
20 25 30

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

Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr  
50 55 60

Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Trp  
65 70 75 80

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Pro Thr Ser Pro  
85 90 95

Lys Val Phe Pro Leu Ser Leu Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr  
100 105 110

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro  
115 120

<210> 3  
<211> 100  
<212> Белок  
<213> Homo sapiens  
<400> 3

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Xaa  
20 25 30

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

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met  
50 55 60

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa  
65 70 75 80

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Lys Ala  
85 90 95

Pro Ser Val Phe  
100

<210> 4  
<211> 102  
<212> Белок  
<213> Homo sapiens  
<400> 4

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Trp  
20 25 30

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

Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn  
50 55 60

Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr Xaa Trp  
65 70 75 80

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
85 90 95

Ser Val Phe Pro Leu Ala  
100

<210> 5

<211> 101  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 5

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Xaa Trp  
 20 25 30  
 Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Xaa Arg Phe  
 35 40 45  
 Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile Ala Tyr Leu Gln Met Asn  
 50 55 60  
 Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Asn Xaa  
 65 70 75 80  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Lys Gly  
 85 90 95  
 Pro Ser Val Leu Pro  
 100

<210> 6  
 <211> 108  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 6

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ser Ile Ser Ser  
 20 25 30  
 Ser Xaa Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 35 40 45  
 Xaa Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
 50 55 60  
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 65 70 75 80  
 Arg Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Pro Thr  
 85 90 95  
 Lys Ala Pro Asp Val Phe Pro Ile Ile Ser Gly Cys  
 100 105

<210> 7  
 <211> 132  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 7

Glu Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Xaa  
 20 25 30

Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Xaa Gln  
                   35                  40                  45  
 Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Trp  
           50                  55                  60  
 Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa  
   65                  70                  75                  80  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Ala  
                   85                  90                  95  
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro Ser Asp Thr  
                   100                  105                  110  
 Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe Leu Pro Asp Ser  
           115                  120                  125  
 Ile Thr Phe Ser  
           130

<210> 8  
 <211> 125  
 <212> Бeлoк  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 8

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
   1                  5                  10                  15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Xaa Trp  
           20                  25                  30  
 Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Xaa Arg Ile  
           35                  40                  45  
 Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn  
           50                  55                  60  
 Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Trp  
   65                  70                  75                  80  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro  
                   85                  90                  95  
 Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro Ser Asp Thr Ser  
                   100                  105                  110  
 Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe Leu Pro  
           115                  120                  125

<210> 9  
 <211> 91  
 <212> Бeлoк  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 9

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala  
   1                  5                  10                  15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Xaa Trp  
           20                  25                  30  
 Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Xaa Arg Phe  
           35                  40                  45  
 Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser  
           50                  55                  60  
 Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Trp  
   65                  70                  75                  80  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ser  
                   85                  90

<210> 10  
 <211> 93  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 10

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Arg Val Thr Ile Thr Cys Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
           20           25           30
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
           35           40           45
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
           50           55           60
Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Phe Gly Gln Gly Thr Lys
65           70           75           80
Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
           85           90

```

<210> 11  
 <211> 92  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 11

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1           5           10           15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Xaa Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
           20           25           30
Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Xaa Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
           35           40           45
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala
           50           55           60
Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Xaa Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
65           70           75           80
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
           85           90

```

<210> 12  
 <211> 91  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 12

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1           5           10           15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
           20           25           30
Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Xaa Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
           35           40           45
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
           50           55           60
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Xaa Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
65           70           75           80
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
           85           90

```

<210> 13  
 <211> 85  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 13

```

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly
1           5           10           15
Asp Lys Val Asn Ile Ser Cys Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu
           20           25           30

```



Ala Ala Ile Phe Ile Ile Gln Xaa Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly  
                   35                  40                  45  
 Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser  
           50                  55                  60  
 Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Xaa Leu Arg His Phe Trp Pro Gly  
 65                  70                  75                  80  
 Asp Gln Ala Ala Gly  
                   85

<210> 14  
 <211> 79  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 14

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Val Asn Leu Ser Met Ser Ala Gly  
 1                  5                  10                  15  
 Glu Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Phe Ile  
                   20                  25                  30  
 Tyr Xaa Gly Ile Ser Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
                   35                  40                  45  
 Phe Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr  
           50                  55                  60  
 Tyr Cys Xaa Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys Arg Thr  
 65                  70                  75

<210> 15  
 <211> 77  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 15

Glu Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Xaa  
 1                  5                  10                  15  
 Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Val Ile His Xaa  
                   20                  25                  30  
 Gly Ile Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
                   35                  40                  45  
 Leu Thr Ile Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys  
           50                  55                  60  
 Xaa Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Asp Phe Lys Arg Thr  
 65                  70                  75

<210> 16  
 <211> 98  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 16

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln  
 1                  5                  10                  15  
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Xaa Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala  
                   20                  25                  30  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser  
                   35                  40                  45  
 Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu  
           50                  55                  60  
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Xaa Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr  
 65                  70                  75                  80  
 Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro  
                   85                  90                  95  
 Ser Ser

<210> 17  
 <211> 99  
 <212> Белок

<213> Homo sapiens  
<400> 17

```

Ala Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly
1      5      10      15
Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Xaa Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr
20      25      30
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
35      40      45
Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln Thr
50      55      60
Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Xaa Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
65      70      75      80
Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
85      90      95

Pro Ser Ser

```

<210> 18  
<211> 99  
<212> Белок  
<213> Homo sapiens  
<400> 18

```

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1      5      10      15
Ser Ile Thr Ile Ser Cys Xaa Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala
20      25      30
Pro Lys Leu Met Ile Tyr Xaa Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser
35      40      45
Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu
50      55      60
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Xaa Phe Gly Gly Gly Thr Thr Lys Leu
65      70      75      80
Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
85      90      95

Pro Ser Ser

```

<210> 19  
<211> 107  
<212> Белок  
<213> Homo sapiens  
<400> 19

```

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1      5      10      15
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
20      25      30
Pro Val Leu Val Ile Tyr Xaa Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
35      40      45
Ser Ser Gly Thr Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
50      55      60
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Xaa Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
65      70      75      80
Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro
85      90      95

Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr
100      105

```

<210> 20  
<211> 93  
<212> Белок  
<213> Homo sapiens  
<400> 20

```

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln

```

```

1           5           10           15
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
                20           25           30
Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Xaa Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly
                35           40           45
Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala
                50           55           60
Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Xaa Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
65           70           75           80
Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Thr Val Thr
                85           90
<210> 21
<211> 98
<212> Бeлoк
<213> Homo sapiens
<400> 21

```

```

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1           5           10           15
Thr Ala Ser Ile Thr Cys Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
                20           25           30
Pro Val Leu Val Ile Tyr Xaa Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
                35           40           45
Asn Ser Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
                50           55           60
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Xaa Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
65           70           75           80
Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Arg Ser Leu Cys Pro Pro
                85           90           95
Pro Pro
<210> 22
<211> 98
<212> Бeлoк
<213> Homo sapiens
<400> 22

```

```

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1           5           10           15
Thr Val Arg Ile Thr Cys Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
                20           25           30
Pro Val Leu Val Ile Tyr Xaa Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
                35           40           45
Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
                50           55           60
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Xaa Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
65           70           75           80
Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro
                85           90           95
Ser Ser
<210> 23
<211> 94
<212> Бeлoк
<213> Homo sapiens
<400> 23

```

```

Gln Pro Val Leu Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ser
1           5           10           15
Ser Val Lys Leu Thr Cys Xaa Trp His Gln Gln Gln Pro Gly Lys Ala
                20           25           30
Pro Arg Tyr Leu Met Lys Xaa Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
                35           40           45
Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Ser Glu

```

```

      50              55              60
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Xaa Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
65              70              75              80
Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe
      85              90

```

```

<210> 24
<211> 95
<212> Белок
<213> Homo sapiens
<400> 24

```

```

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
1              5              10              15
Ser Val Lys Leu Thr Cys Xaa Trp His Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly
      20              25              30
Pro Arg Tyr Leu Met Lys Xaa Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
      35              40              45
Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu
      50              55              60
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Xaa Phe Gly Gly Ile Gly Gly Gly Thr
65              70              75              80
Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Ser
      85              90              95

```

```

<210> 25
<211> 88
<212> Белок
<213> Homo sapiens
<400> 25

```

```

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala
1              5              10              15
Ser Ala Ser Leu Thr Cys Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro
      20              25              30
Pro Gln Tyr Leu Leu Arg Tyr Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      35              40              45
Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile Leu Leu Ile Ser Gly Leu
      50              55              60
Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Xaa Phe Gly Gly Gly Thr
65              70              75              80
Lys Leu Thr Val Leu Ser Gln Pro
      85

```

```

<210> 26
<211> 101
<212> Белок
<213> Homo sapiens
<400> 26

```

```

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1              5              10              15
Thr Val Thr Ile Ser Cys Xaa Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala
      20              25              30
Pro Thr Thr Val Ile Tyr Xaa Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
      35              40              45
Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Lys
      50              55              60
Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Xaa Phe Gly Gly Gly Thr Lys
65              70              75              80
Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe
      85              90              95
Pro Pro Ser Ser Ser
      100

```

```

<210> 27
<211> 89
<212> Белок

```

<213> Homo sapiens  
<400> 27

```

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1          5          10          15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Xaa Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
          20          25          30
Pro Arg Ala Leu Ile Tyr Xaa Trp Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
          35          40          45
Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu
          50          55          60
Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Xaa Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
65          70          75          80
Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro
          85

```

<210> 28  
<211> 89  
<212> Белок  
<213> Homo sapiens  
<400> 28

```

Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
1          5          10          15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Xaa Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala
          20          25          30
Pro Arg Thr Leu Ile Tyr Xaa Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
          35          40          45
Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Asp
          50          55          60
Asp Glu Ser Asp Tyr Tyr Cys Xaa Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
65          70          75          80
Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro
          85

```

<210> 29  
<211> 91  
<212> Белок  
<213> Homo sapiens  
<400> 29

```

Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
1          5          10          15
Ser Val Thr Leu Thr Cys Xaa Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Gly
          20          25          30
Pro Arg Phe Val Met Arg Xaa Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Val Leu
          35          40          45
Gly Ser Gly Leu Asn Arg Tyr Leu Thr Ile Lys Asn Ile Gln Glu Glu
          50          55          60
Asp Glu Ser Asp Tyr His Cys Xaa Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
65          70          75          80
Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val
          85          90

```

<210> 30  
<211> 87  
<212> Белок  
<213> Homo sapiens  
<400> 30

```

Gln Ala Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Lys Gly Leu Arg Gln
1          5          10          15
Thr Ala Thr Leu Thr Cys Xaa Trp Leu Gln Gln His Gln Gly His Pro
          20          25          30
Pro Lys Leu Leu Ser Tyr Xaa Gly Ile Ser Glu Arg Phe Ser Ala Ser
          35          40          45
Arg Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Glu

```

50                      55                      60  
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Xaa Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr  
 65                      70                      75                      80  
 Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala  
                                  85  
 <210> 31  
 <211> 354  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 31

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

<210> 32  
 <211> 340  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 32

Ala Ser Pro Thr Ser Pro Lys Val Phe Pro Leu Ser Leu Asp Ser Thr

```

1           5           10           15
Pro Gln Asp Gly Asn Val Val Val Ala Cys Leu Val Gln Gly Phe Phe
20           25           30
Pro Gln Glu Pro Leu Ser Val Thr Trp Ser Glu Ser Gly Gln Asn Val
35           40           45
Thr Ala Arg Asn Phe Pro Pro Ser Gln Asp Ala Ser Gly Asp Leu Tyr
50           55           60
Thr Thr Ser Ser Gln Leu Thr Leu Pro Ala Thr Gln Cys Pro Asp Gly
65           70           75           80
Lys Ser Val Thr Cys His Val Lys His Tyr Thr Asn Pro Ser Gln Asp
85           90           95
Val Thr Val Pro Cys Pro Val Pro Pro Pro Pro Cys Cys His Pro
100          105          110
Arg Leu Ser Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu Leu Leu Gly Ser
115          120          125
Glu Ala Asn Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg Asp Ala Ser Gly
130          135          140
Ala Thr Phe Thr Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Ser Ala Val Gln Gly
145          150          155          160
Pro Pro Glu Arg Asp Leu Cys Gly Cys Tyr Ser Val Ser Ser Val Leu
165          170          175
Pro Gly Cys Ala Gln Pro Trp Asn His Gly Glu Thr Phe Thr Cys Thr
180          185          190
Ala Ala His Pro Glu Leu Lys Thr Pro Leu Thr Ala Asn Ile Thr Lys
195          200          205
Ser Gly Asn Thr Phe Arg Pro Glu Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser
210          215          220
Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Arg
225          230          235          240
Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu Gln Gly Ser Gln
245          250          255
Glu Leu Pro Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser Arg Gln Glu Pro
260          265          270
Ser Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile Leu Arg Val Ala
275          280          285
Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met Val Gly His
290          295          300
Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp Arg Leu Ala
305          310          315          320
Gly Lys Pro Thr His Val Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp
325          330          335
Gly Thr Cys Tyr
340
<210> 33
<211> 384
<212> Белок
<213> Homo sapiens
<400> 33

```

```

Ala Pro Thr Lys Ala Pro Asp Val Phe Pro Ile Ile Ser Gly Cys Arg
1           5           10           15
His Pro Lys Asp Asn Ser Pro Val Val Leu Ala Cys Leu Ile Thr Gly
20           25           30
Tyr His Pro Thr Ser Val Thr Val Thr Trp Tyr Met Gly Thr Gln Ser
35           40           45
Gln Pro Gln Arg Thr Phe Pro Glu Ile Gln Arg Arg Asp Ser Tyr Tyr
50           55           60
Met Thr Ser Ser Gln Leu Ser Thr Pro Leu Gln Gln Trp Arg Gln Gly
65           70           75           80
Glu Tyr Lys Cys Val Val Gln His Thr Ala Ser Lys Ser Lys Lys Glu
85           90           95
Ile Phe Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro
100          105          110
Thr Ala Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala

```

115 120 125  
 Pro Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys  
 130 135 140  
 Glu Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu  
 145 150 155 160  
 Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Tyr Leu Leu Thr Pro Ala  
 165 170 175  
 Val Gln Asp Leu Trp Leu Arg Asp Lys Ala Thr Phe Thr Cys Phe Val  
 180 185 190  
 Val Gly Ser Asp Leu Lys Asp Ala His Leu Thr Trp Glu Val Ala Gly  
 195 200 205  
 Lys Val Pro Thr Gly Gly Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Arg His Ser  
 210 215 220  
 Asn Gly Ser Gln Ser Gln His Ser Arg Leu Thr Leu Pro Arg Ser Leu  
 225 230 235 240  
 Trp Asn Ala Gly Thr Ser Val Thr Cys Thr Leu Asn His Pro Ser Leu  
 245 250 255  
 Pro Pro Gln Arg Leu Met Ala Leu Arg Glu Pro Ala Ala Gln Ala Pro  
 260 265 270  
 Val Lys Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp Pro Pro Glu Ala  
 275 280 285  
 Ala Ser Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe Ser Pro Pro Asn Ile  
 290 295 300  
 Leu Leu Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val Asn Thr Ser Gly Phe  
 305 310 315 320  
 Ala Pro Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Arg Ser Thr Thr Phe Trp Ala  
 325 330 335  
 Trp Ser Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr  
 340 345 350  
 Tyr Thr Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala  
 355 360 365  
 Ser Arg Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp His Gly Pro Met Lys  
 370 375 380  
 <210> 34  
 <211> 497  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 34

Ala Ser Thr Gln Ser Pro Ser Val Phe Pro Leu Thr Arg Cys Cys Lys  
 1 5 10 15  
 Asn Ile Pro Ser Asn Ala Thr Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Ala Thr  
 20 25 30  
 Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Met Val Thr Trp Asp Thr Gly Ser Leu  
 35 40 45  
 Asn Gly Thr Thr Met Thr Leu Pro Ala Thr Thr Leu Thr Leu Ser Gly  
 50 55 60  
 His Tyr Ala Thr Ile Ser Leu Leu Thr Val Ser Gly Ala Trp Ala Lys  
 65 70 75 80  
 Gln Met Phe Thr Cys Arg Val Ala His Thr Pro Ser Ser Thr Asp Trp  
 85 90 95  
 Val Asp Asn Lys Thr Phe Ser Val Cys Ser Arg Asp Phe Thr Pro Pro  
 100 105 110  
 Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser Ser Cys Asp Gly Gly Gly His Phe Pro  
 115 120 125  
 Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr  
 130 135 140  
 Ile Asn Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu  
 145 150 155 160  
 Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser  
 165 170 175  
 Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr  
 180 185 190  
 Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys



195 200 205  
 Cys Ala Asp Ser Asn Pro Arg Gly Val Ser Ala Tyr Leu Ser Arg Pro  
 210 215 220  
 Ser Pro Phe Asp Leu Phe Ile Arg Lys Ser Pro Thr Ile Thr Cys Leu  
 225 230 235 240  
 Val Val Asp Leu Ala Pro Ser Lys Gly Thr Val Asn Leu Thr Trp Ser  
 245 250 255  
 Arg Ala Ser Gly Lys Pro Val Asn His Ser Thr Arg Lys Glu Glu Lys  
 260 265 270  
 Gln Arg Asn Gly Thr Leu Thr Val Thr Ser Thr Leu Pro Val Gly Thr  
 275 280 285  
 Arg Asp Trp Ile Glu Gly Glu Thr Tyr Gln Cys Arg Val Thr His Pro  
 290 295 300  
 His Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Thr Ser Gly Pro  
 305 310 315 320  
 Val Gly Pro Arg Ala Ala Pro Glu Val Tyr Ala Phe Ala Thr Pro Glu  
 325 330 335  
 Trp Pro Gly Ser Arg Asp Lys Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ile Gln Asn  
 340 345 350  
 Phe Met Pro Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu His Asn Glu Val Gln  
 355 360 365  
 Leu Pro Asp Ala Arg His Ser Thr Thr Gln Pro Arg Lys Thr Lys Gly  
 370 375 380  
 Ser Gly Phe Phe Val Phe Ser Arg Leu Glu Val Thr Arg Ala Glu Trp  
 385 390 395 400  
 Glu Gln Lys Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val His Glu Ala Ala Ser  
 405 410 415  
 Pro Ser Gln Thr Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn Pro Gly Lys Asp  
 420 425 430  
 Val Cys Val Glu Glu Ala Glu Gly Glu Ala Pro Trp Thr Trp Thr Gly  
 435 440 445  
 Leu Cys Ile Phe Ala Ala Leu Phe Leu Leu Ser Val Ser Tyr Ser Ala  
 450 455 460  
 Ala Leu Thr Leu Leu Met Val Gln Arg Phe Leu Ser Ala Thr Arg Gln  
 465 470 475 480  
 Gly Arg Pro Gln Thr Ser Leu Asp Tyr Thr Asn Val Leu Gln Pro His  
 485 490 495  
 Ala

<210> 35  
 <211> 339  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 35

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80  
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110  
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225 230 235 240  
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asx Asn Gly Gln Pro Glu  
 260 265 270  
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
 275 280 285  
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
 290 295 300  
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr  
 305 310 315 320  
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Thr His Thr Cys Pro  
 325 330 335  
 Pro Cys Pro

<210> 36  
 <211> 326  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 36

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80  
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110  
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 115 120 125  
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 130 135 140  
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 145 150 155 160  
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn  
 165 170 175  
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp  
 180 185 190  
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro  
 195 200 205  
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 210 215 220  
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
 225 230 235 240  
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 245 250 255  
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr

260 265 270  
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 275 280 285  
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 290 295 300  
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 305 310 315 320  
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325  
 <210> 37  
 <211> 377  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 37  
  
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80  
 Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro  
 100 105 110  
 Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg  
 115 120 125  
 Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys  
 130 135 140  
 Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro  
 145 150 155 160  
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
 165 170 175  
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 180 185 190  
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr  
 195 200 205  
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
 210 215 220  
 Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 225 230 235 240  
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 245 250 255  
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln  
 260 265 270  
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
 275 280 285  
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 290 295 300  
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 305 310 315 320  
 Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 325 330 335  
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile  
 340 345 350  
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln  
 355 360 365  
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 370 375  
 <210> 38

<211> 327  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 38

```

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

```

<210> 39  
 <211> 476  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 39

```

Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn
1      5      10      15
Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp
20      25      30
Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser
35      40      45
Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys
50      55      60
Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln
65      70      75      80
Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn

```

85 90 95  
 Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys  
 100 105 110  
 Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg  
 115 120 125  
 Ser Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln  
 130 135 140  
 Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val  
 145 150 155 160  
 Thr Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr  
 165 170 175  
 Tyr Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser  
 180 185 190  
 Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln  
 195 200 205  
 Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg  
 210 215 220  
 Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser  
 225 230 235 240  
 Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val  
 245 250 255  
 Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr  
 260 265 270  
 Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu  
 275 280 285  
 Ala Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys  
 290 295 300  
 Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser  
 305 310 315 320  
 Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro  
 325 330 335  
 Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys  
 340 345 350  
 Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Gln Met  
 355 360 365  
 Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro  
 370 375 380  
 Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu  
 385 390 395 400  
 Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val  
 405 410 415  
 Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp  
 420 425 430  
 Lys Ser Thr Gly Lys Pro Thr Ser Ala Asp Glu Glu Gly Phe Glu Asn  
 435 440 445  
 Leu Trp Ala Thr Ala Ser Thr Phe Ile Val Leu Tyr Asn Val Ser Leu  
 450 455 460  
 Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr Val Lys  
 465 470 475  
 <210> 40  
 <211> 107  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 40

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 1 5 10 15  
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 20 25 30  
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 35 40 45  
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 50 55 60  
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

```

65          70          75          80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
      85          90          95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      100         105

```

```

<210> 41
<211> 107
<212> Белок
<213> Homo sapiens
<400> 41

```

```

Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
1          5          10          15
Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
      20          25          30
Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
      35          40          45
Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
      50          55          60
Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
65          70          75          80
Ser His Arg Lys Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr
      85          90          95
Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
      100         105

```

```

<210> 42
<211> 10
<212> Белок
<213> Homo sapiens
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(10)
<223> определяющий комплементарность участок (CDR) 1 тяжелой цепи (HC)

```

```

<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Хаа представляет собой Gly или Phe

<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Хаа представляет собой Ser или Arg

```

```

<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Хаа представляет собой Ile или Met

```

```

<400> 42

```

```

Gly Xaa Thr Phe Xaa Ser Tyr Gly Xaa Ser
1          5          10

```

```

<210> 43
<211> 20
<212> Белок
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(20)
<223> HC CDR 2

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)

```

<223> Хаа представляет собой Gly или Ala

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Хаа представляет собой Ile или Asn

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Хаа представляет собой Phe или Ala

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Хаа представляет собой Thr или His

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Хаа представляет собой Ala или Thr

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Хаа представляет собой Asn или His

<400> 43

Trp Met Gly Xaa Ile Xaa Pro Ile Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Ala Gln  
1 5 10 15

Lys Phe Gln Gly  
20

<210> 44

<211> 10

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(10)

<223> HC CDR 3

<400> 44

Tyr Asp Gly Ile Tyr Gly Glu Leu Asp Phe  
1 5 10

<210> 45

<211> 12

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(12)

<223> определяющий комплементарность участок (CDR) 1 легкой цепи (LC)

<400> 45

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asp Ala Tyr Leu Ala  
1 5 10

<210> 46  
 <211> 11  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(?)  
 <223> LC CDR 2

<400> 46

Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
 1 5 10

<210> 47  
 <211> 8  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(8)  
 <223> LC CDR 3

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Хаа представляет собой His или Asp

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Хаа представляет собой Glu, Asp, D, Ser, Thr или Phe

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Хаа представляет собой Leu, Ile, His, Tyr, Phe или Asp

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Хаа представляет собой Trp, His, Ser или Pro

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Хаа представляет собой Ser, Pro, Asp, Val, Asn, Pro-Phe, Pro-Asn, Pro-Met или Ser-Phe

<400> 47

Хаа Gln Tyr Ile Хаа Хаа Хаа Хаа  
 1 5

<210> 48  
 <211> 119  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens



<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(119)  
 <223> Вариабельная область тяжелой цепи (HC)  
 <400> 48  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Tyr Asp Gly Ile Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 49  
 <211> 109  
 <212> Велок  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(109)  
 <223> Вариабельная область легкой цепи (LC)  
 <400> 49

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asp Ala  
 20 25 30  
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
 35 40 45  
 Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu  
 65 70 75  
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ile Gln Leu His  
 85 90 95  
 Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

```

<210> 50
<211> 76
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(76)
<223> репрезентативная последовательность белкового антигена MCP-1/CCL-2
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (40)..(40)
<223> Хаа может быть Ala или Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (41)..(41)
<223> Хаа может быть Val или Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (43)..(43)
<223> Хаа может быть Phe или Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (69)..(69)
<223> Lys необязательно может быть биотинилирован

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (75)..(75)
<223> Lys необязательно может быть биотинилирован

<400> 50

Gln Pro Asp Ala Ile Asn Ala Pro Val Thr Cys Cys Tyr Asn Phe Thr
1          5          10          15

Asn Arg Lys Ile Ser Val Gln Arg Leu Ala Ser Tyr Arg Arg Ile Thr
20          25          30

Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Xaa Ile Xaa Lys Thr Ile Val Ala
35          40          45

Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln Lys Trp Val Gln Asp Ser Met
50          55          60

Asp His Leu Asp Lys Gln Thr Gln Thr Pro Lys Thr
65          70          75

<210> 51
<211> 10
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(10)
<223> определяющий комплементарность участок (CDR) 1 тяжелой цепи (HC)

<400> 51

```

Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr Gly Met Ser  
 1 5 10

<210> 52  
 <211> 20  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(20)  
 <223> HC CDR 2

<400> 43

Trp Val Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln  
 1 5 10 15

Lys Phe Gln Gly  
 20

<210> 53  
 <211> 22  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(22)  
 <223> HC CDR 2

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa представляет собой Ser или Thr

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Xaa представляет собой Gly или Asn

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Xaa представляет собой Ala или Thr

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (15)..(15)  
 <223> Xaa представляет собой Ser, Thr или Gly

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (19)..(19)  
 <223> Xaa представляет собой Ser или Gly

<400> 53 .

Trp Val Ser Ser Ile Glu His Lys Asp Xaa Xaa Tyr Xaa Thr Xaa  
 1 5 10 15

Tyr Ala Xaa Val Lys Gly  
 20

<210> 54  
 <211> 11  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(11)  
 <223> HC CDR 3

<400> 54

Phe Glu Phe Thr Pro Trp Thr Tyr Phe Asp Phe  
 1 5 10

<210> 55  
 <211> 11  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(11)  
 <223> определяющий комплементарность участок (CDR) 1 легкой цепи (LC)

<400> 55

Ser Gly Glu Asn Leu Gly Lys Lys Tyr Val Tyr  
 1 5 10

<210> 56  
 <211> 11  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(11)  
 <223> LC CDR 2

<400> 56

Leu Val Ile Tyr Asp Asp Asp Asn Arg Pro Ser  
 1 5 10

<210> 57  
 <211> 10  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(10)  
 <223> LC CDR 3

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Хаа представляет собой Ser или Thr

<220>

```

<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa представляет собой Thr или Asp

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa представляет собой Ala или Arg

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa представляет собой Gln или Phe

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa представляет собой Thr или Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Xaa представляет собой Ala, Gly или Ser

<400> 57

Gln Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Ser
1          5          10

```

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело, которое связывает моноцитарный хемоаттрактантный белок-1 (MCP-1), содержащее вариабельную область тяжелой цепи и легкой цепи, при этом указанная тяжелая цепь включает последовательность SEQ ID NO: 27, а легкая цепь включает последовательность SEQ ID NO: 28.

2. Выделенное антитело, которое связывает MCP-1, содержащее вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, при этом указанная вариабельная область тяжелой цепи включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 9 определяющих комплементарность участков (CDR) и аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13, 14 и 16 CDR легкой цепи.

3. Антитело, которое конкурирует за связывание с MCP-1 со специфическим антителом против MCP-1, содержащее вариабельную область тяжелой цепи и легкой цепи, при этом указанная тяжелая цепь включает последовательность SEQ ID NO: 27, а указанная легкая цепь включает последовательность SEQ ID NO: 28.

4. Антитело, которое конкурирует за связывание с MCP-1 со специфическим антителом против MCP-1, содержащее вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, при этом указанная вариабельная область тяжелой цепи включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 9 определяющих комплементарность участков (CDR) тяжелой цепи и аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13, 14 и 16 CDR легкой цепи.

5. Выделенное специфическое антитело против MCP-1, которое связывается с тем же самым эпитопом полипептида MCP-1, что и антитело, содержащее аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 9 определяющих комплементарность участков (CDR) тяжелой цепи и аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13, 14 и 16 CDR легкой цепи.

6. Антитело против MCP-1 по любому из пп.1-5, где указанное антитело связывается с MCP-1 с аффинностью связывания по меньшей мере  $10^{-9}$  M.

7. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по любому из пп.1-5.

8. Выделенный НК-вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п.7.

9. Клетка-хозяин, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту по п.7.

10. Клетка-хозяин по п.9, где указанная клетка выбрана из COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2/0, 293, HeLa, YB2/0, клетки миеломы или лимфомы или их любой производной, иммортализованной или трансформированной клетки.

11. Способ получения антитела против MCP-1, включающий обеспечение трансляции нуклеиновой кислоты по п.7 в таких условиях, при которых антитело против MCP-1 экспрессируется в определяемых или выделяемых количествах.

12. Композиция, содержащая выделенное антитело млекопитающего против MCP-1 по любому из пп.1-5 и один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

13. Композиция по п.12, дополнительно содержащая соединение или полипептид, выбранный из определяемой метки, антагониста TNF, противоинфекционного средства, средства от заболеваний сер-

14. Медицинское устройство, включающее антигело против МСР-1 по любому из пп.1-5, причем указанное устройство пригодно для приведения в контакт или введения указанного антигела против МСР-1 способом, выбранным из парентерального, подкожного, внутримышечного, внутривенного, интраартикулярного, эндобронхиального, интраабдоминального, интракапсульного, внутривисцерального, внутриполосного, внутрибрюшного, внутримозжечкового, интрацеребровентрикулярного способа, введения в толстую кишку, интрацервикального, внутрижелудочного, внутривисцерального, интрамиокардиального, внутрикостного способа, введения в почечную лоханку, интраперикардиального, интраперитонеального, интраплеврального способа, введения в предстательную железу, внутривисцерального, интраартикулярного, внутримышечного, интраартериального, интраспинального, внутрисуставного, интраторакального, внутриматочного, внутримышечного способа, введения в полость влагалища, болюса, вагинального, ректального, трансбуккального, подъязычного, интраназального и трансдермального способа.