



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **115964** (13) **C2**  
(51) МПК (2017.01)**C07K 16/24** (2006.01)**C12P 21/08** (2006.01)**C07K 14/00****A61K 39/395** (2006.01)**C12N 15/13** (2006.01)**A61P 37/00**МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2013 02560</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Ву Ченбін (US),</b> <b>Діксон Річард В. (US),</b> <b>Белк Джонатан П. (US),</b> <b>Ін Хуа (US),</b> <b>Арджирадї Марія А. (US),</b> <b>Кафф Керолін А. (US),</b> <b>Хінтон Пол Р. (US),</b> <b>Кумар Шанкар (US),</b> <b>Мелім Террі Л. (US),</b> <b>Чень Янь (US)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>07.09.2007</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>Е66Ві Айрленд Анлімітед Компані,</b> c/o Codan Services Limited, Clarendon House, 2 Church Street, Hamilton, HM11, Bermuda (BM)
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>25.01.2018</b>	<b>(74)</b> Представник: <b>Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр.</b> <b>№115</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>60/843,249</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2005062967 A2, 14.07.2005 US 2006140948 A1, 29.06.2006 US 20060063228 A1, 23.03.2006 US 20040096452 A1, 20.03.2004 US 20030175261 A1, 18.09.2003 US 2005147610 A1, 07.07.2005 US 20050065327 A1, 24.03.2005
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>08.09.2006</b>	
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>US</b>	
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку: <b>12.08.2013, Бюл.№ 15</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.01.2018, Бюл.№ 2</b>	
<b>(62)</b> Номер та дата подання попередньої заявки, з якої виділено заявку, позначену кодом (21): <b>а2009 03345, 07.09.2007</b>	

**(54) ІНТЕРЛЕЙКІН-13-ЗВ'ЯЗУВАЛЬНИЙ БІЛОК****(57) Реферат:**

Винахід належить до рекомбінантного антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, які зв'язують IL-13 людини, блокує зв'язування IL-13 з IL-13R $\alpha$ 1 і з IL-13R $\alpha$ 2, виділеної нуклеїнової кислоти, що кодує вказане антитіло, вектора, клітини-хазяїна, способу одержання, фармацевтичної композиції та способу лікування суб'єкта від розладу, при якому активність IL-13 є шкідливою.

UA 115964 C2



Перехресне посилання на споріднені заявки

За даною заявкою вимагається пріоритет попередньої заявки США № 60/843249, поданої 8 вересня 2006 року.

Галузь винаходу

5 Дана заявка належить до IL-13-зв'язувальних білків і, зокрема, їх застосування для профілактики і/або лікування різних захворювань, включаючи астму, алергію, COPD (ХОХЛ), фіброз і рак.

Посилання на угоду про спільне дослідження

10 Зміст даної заявки знаходиться під захистом угоди про спільне дослідження, укладеної між Protein Design Labs, Inc. і Abbott Laboratories 14 грудня 2005 року, і стосується рекомбінантно сконструйованих антитіл проти IL-13.

Рівень техніки

15 IL-13 людини є глікопротеїном з розміром 17 кДа, клонованим з активованих Т-клітин (Zurawski and de Vries 1994 Immunol Today 15 19-26) і продукованим активованими Т-клітинами лінії Th2, хоча IL-13 також продукують Т-клітини Th0 і Th1 CD4+, Т-клітини CD8+ і деякі не-Т-клітинні популяції, такі як мастоцити (Zurawski and de Vries 1994 Immunol Today 15 19-26). Функція IL-13 включає переключення ізотипу імунoglobulinу на IgE у В-клітинах людини (Punnonen, Aversa et al. 1993, Proc Natl Acad Sci USA 90 3730-4) і супресію продукції запальних цитокінів як у людини, так і у миші (de Waal Malefyt, Figdor et al. 1993, J Immunol 151 6370-81; Doherty, Kastelein et al. 1993, J Immunol 151 7151-60). IL-13 зв'язується з рецепторами на поверхні клітин, IL-13R $\alpha$ 1 і IL-13R $\alpha$ 2. IL-13R $\alpha$ 1 взаємодіє з IL-13 з низькою афінністю (KD~10 нМ), з наступним рекрутингом IL-4R $\alpha$  з утворенням сигнального гетеродимерного рецепторного комплексу з високою афінністю (KD~0,4 нМ) (Aman, Tayebi et al. 1996, J Biol Chem 271 29265-70; Hilton, Zhang et al. 1996, Proc Natl Acad Sci USA 93 497-501). Цей комплекс IL-4R/IL-13R $\alpha$ 1 експресується на багатьох типах клітин, таких як В-клітини, моноцити/макрофаги, дендритні клітини, еозинофіли, базофіли, фібробласти, ендотеліальні клітини, епітеліальні клітини дихальних шляхів і гладком'язові клітини дихальних шляхів (Grabner, Gretener et al. 1998, Eur J Immunol 28 4286-98; Murata, Husain et al. 1998, Int Immunol 10 1103-10; Akaiwa, Yu et al. 2001, Cytokine 13 75-84). Лігування рецепторного комплексу IL-13R $\alpha$ 1/IL-4R приводить до активації різних шляхів передачі сигналу, включаючи шляхи передачі сигналу й активатора транскрипції (STAT6) і шляхи субстрату рецептора-2 інсуліну (IRS-2) (Wang, Michieli et al. 1995, Blood 86 4218-27; Takeda, Kamanaka et al. 1996, J Immunol 157 3220-2). Сам по собі ланцюг IL-13R $\alpha$ 2 має високу афінність (KD~0,25-0,4 нМ) відносно IL-13 і функціонує як "рецептор-пастка", що негативно регулює зв'язування IL-13 (Donaldson, Whitters et al. 1998, J Immunol 161 2317-24), і як рецептор передачі сигналу, що індукуює синтез TGF- $\beta$  і фіброз через Ap-1-шлях у макрофагах і, можливо, інших типах клітин (Fichtner-Feigl, Strober et al. 2006, Nat Med 12 99-106).

20 Декілька досліджень, проведених на преклінічних моделях астми тварин, показують, що IL-13 відіграє важливу роль в астмі. Ці дані включають стійкість до астми у мишей з нокаутом IL-13, а також інгібування фенотипу астми антагоністами IL-13 (розчинними рецепторами IL-13, анти-IL-13-mAb і т. д.) у різних мишачих моделях (Sela 1999, Harefuah 137 317-9; Wills-Karp and Chiamonte 2003, Curr Opin Pulm Med 9 21-7; Wills-Karp 2004, Immunol Rev 202 175-90). Численні дослідження продемонстрували, що фармакологічне введення рекомбінантного IL-13 в легені мишей, а також морських свинок індукуює гіперсекрецію слизу дихальних шляхів, еозинофілію і AHR (Grunig, Warnock et al. 1998, Science 282 2261-3; Wills-Karp, Luyimbazi et al. 1998, Science 282 2258-61; Kibe, Inoue et al. 2003, Am J Respir Crit Care Med 167 50-6; Vargaftig and Singer 2003, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 284 L260-9; Vargaftig and Singer 2003, Am J Respir Cell Mol Biol 28 410-9). Ці ефекти IL-13 відтворюються в системах трансгенних мишей з конститутивною або індукованою експресією IL-13 (Zhu, Homer et al. 1999, J Clin Invest 103 779-88; Zhu, Lee et al. 2001, Am J Respir Crit Care Med 164 S67-70; Lanone, Zheng et al. 2002, J Clin Invest 110 463-74). Постійна трансгенна надекспресія IL-13 індукуює субепітеліальний фіброз і емфізему. Миші, дефектні по IL-13 (і IL-4) і молекулі передачі сигналу STAT6, нездатні розвивати індуковане алергенами AHR і надпродукцію слизу (Kuperman, Huang et al. 2002, Nat Med 8 885-9). Дослідження з використанням розчинного злитого білка рецептора IL-13 (sIL-13R $\alpha$ 2Fc) продемонстрували центральну роль цього цитокіну в експериментальному захворюванні дихальних шляхів, індукованому алергеном овальбуміном (OVA) (Grunig, Warnock et al. 1998, Science 282 2261-3; Wills-Karp, Luyimbazi et al. 1998, Science 282 2258-61; Taube, Duez et al. 2002, J Immunol 168 6482-9). Ефективність лікування з використанням анти-IL-13 також була продемонстрована в моделі хронічної астми мишей. Крім прояву ознак гіперсекреції слизу і AHR, ця модель хронічної астми демонструє декілька відмітних ознак захворювання людини, які відсутні в моделях гострої форми захворювання. До них належать еозинофілія

тканини легенів, локалізованої в міжепітеліальних просторах, а також фіброз гладких м'язів, як виміряно по збільшенню відкладення колагену. Цю модель хронічної астми індукують повторюваними аерозольними введеннями OVA у чутливих до OVA мишей 1 раз на тиждень протягом 4 тижнів у цілому. Анти-IL-13-антитіло, що вводиться протягом останніх 2 тижнів

5 введень OVA (з дня 36 з реєстраціями ефективності, оцінюваними на день 53 дослідження), значущо інгібувало AHR, легеневе запалення, гіперплазію бокалоподібних клітин, гіперсекрецію слизу і фіброз дихальних шляхів (Yang, Li et al. 2005, J Pharmacol Exp Ther). Крім того, було також продемонстровано, що терапевтична дія антагоніста IL-13 інгібує AHR у моделі астми приматів [Abstract, American Thoracic Society 2005].

10 Передбачається, що IL-13 бере участь у патогенезі астми людини, оскільки в легенях астматичних пацієнтів були виявлені підвищені рівні мРНК і білка IL-13, які корелюють з тяжкістю цього захворювання (Huang, Xiao et al. 1995 J Immunol 155 2688-94). Крім того, були ідентифіковані генетичні поліморфізми IL-13 людини, які приводять до підвищених рівнів IL-13, що зв'язані з астмою й atopією (Heinzmann, Mao et al. 2000, Hum Mol Genet 9 549-59; Hoerauf, Kruse et al. 2002, Microbes Infect 4 37-42; Vercelli 2002, Curr Opin Allergy Clin Immunol 2 389-93; Heinzmann, Jerkic et al. 2003, J Allergy Clin Immunol 112 735-9; Chen, Ericksen et al. 2004, J Allergy Clin Immunol 114 553-60; Vladich, Brazille et al. 2005, J Clin Invest), і підвищені рівні IL-13 були детектовані в легенях пацієнтів з астмою (Huang, Xiao et al. 1995, J Immunol 155 2688-94; Arima, Umeshita-Suyama et al. 2002, J Allergy Clin Immunol 109 980-7; Berry, Parker et al. 2004, J Allergy Clin Immunol 114 1106-9). Генетичне зчеплення між IL-13 і астмою було також продемонстроване, оскільки індивідууми з поліморфізмом у гені IL-13, який викликає більш високі рівні IL-13 плазми, мають збільшений ризик atopії й астми (Wills-Karp 2000, Respir Res 1 19-23).

Внаслідок цієї ролі IL-13 людини при різних порушеннях людини, були створені терапевтичні підходи для інгібування активності IL-13 або протидії активності IL-13. Зокрема, проводилися пошуки антитіл, які зв'язуються з IL-13 і нейтралізують IL-13, як засобу інгібування активності IL-13. Однак у даній галузі існує потреба в поліпшених антитілах, здатних зв'язувати IL-13. Переважно, такі антитіла зв'язують IL-13 людини. Переважно, ці антитіла здатні нейтралізувати IL-13 людини. Даний винахід стосується нового сімейства зв'язувальних білків, CDR-трансплантованих антитіл, гуманізованих антитіл, і їх фрагментів, здатних зв'язувати IL-13 людини, що зв'язуються з високої афінністю і зв'язують і нейтралізують IL-13 людини.

Суть винаходу

Даний винахід стосується IL-13-зв'язувальних білків. Зв'язувальні білки згідно з винаходом включають, але не обмежуються ними, антитіла, антигензв'язувальні частини й інші антигензв'язувальні білки, здатні зв'язувати IL-13 людини. Крім того, винахід стосується способів одержання і застосування IL-13-зв'язувальних білків.

В одному з аспектів даний винахід стосується зв'язувального білка, здатного зв'язувати IL-13. У переважному варіанті здійснення зв'язувальний білок зв'язує IL-13 людини. Переважно, зв'язувальний білок здатний модулювати біологічну функцію IL-13. Більш переважно, зв'язувальний білок здатний нейтралізувати IL-13.

В одному з аспектів винаходу зв'язувальний білок здатний зв'язувати IL-13 і запобігати зв'язуванню IL-13 з IL-13 $\alpha$ 1-рецептором. В іншому аспекті винаходу зв'язувальний білок здатний зв'язувати IL-13 і запобігати зв'язуванню IL-13 з IL-13 $\alpha$ 2-рецептором. У переважному варіанті здійснення зв'язувальний білок здатний зв'язувати IL-13 і запобігати зв'язуванню IL-13 як з IL-13 $\alpha$ 1-рецептором, так і з IL-13 $\alpha$ 2-рецептором.

Один варіант винаходу стосується виділеного антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, в якому зазначене антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент зв'язує IL-13 людини і інгібує зв'язування зазначеного IL-13 з IL-13 $\alpha$ 2-рецептором в аналізі зв'язування рецептора на основі клітинної поверхні з IC<sub>50</sub>, вибраною з групи, що складається з приблизно 1,5 $\times 10^{-8}$ -1 $\times 10^{-8}$  М, 1 $\times 10^{-8}$ -1 $\times 10^{-9}$  М, 10<sup>-9</sup>-10<sup>-10</sup> М і 10<sup>-10</sup>-10<sup>-11</sup> М, або в аналізі зв'язування рецептора на основі ELISA з IC<sub>50</sub>, вибраною з групи, що складається з приблизно 1,8 $\times 10^{-8}$ -1 $\times 10^{-8}$  М, 1 $\times 10^{-8}$ -1 $\times 10^{-9}$  М, 10<sup>-9</sup>-10<sup>-10</sup> М і 10<sup>-10</sup>-10<sup>-11</sup> М. Переважно, це антитіло зв'язує IL-13 людини і інгібує зв'язування зазначеного IL-13 з IL-13 $\alpha$ 2-рецептором в аналізі зв'язування рецептора на клітинній поверхні з IC<sub>50</sub> 2,7 $\times 10^{-9}$  М і в аналізі зв'язування рецептора на основі ELISA IC<sub>50</sub> 1,1 $\times 10^{-9}$  М. Переважно, антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент зв'язує IL-13 людини і інгібує зв'язування зазначеного IL-13 з його IL-13 $\alpha$ 2-рецептором в аналізі зв'язування рецептора на основі клітинної поверхні або в аналізі зв'язування рецептора на основі ELISA приблизно на 70-100 % при концентрації 100 нМ. Переважно, цим антитілом є антитіло 13C5.5. Більш переважно, це антитіло не є антитілом BAK502G9, mAb13.2 або MJ2-7.

В іншому аспекті винахід стосується виділеного антитіла, або його антигензв'язувального фрагмента, де зазначене антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, зв'язує IL-13 людини і інгібує AHR приблизно на 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % або 100 % на моделі астми людини, індукованої IL-13. Переважно, антитіло інгібує AHR більше ніж на 86 % у моделі астми людини, індукованої IL-13. В іншому варіанті здійснення виділене антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, зв'язує IL-13 людини і інгібує AHR приблизно на 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % або 100 % і інгібує продукцію слизу приблизно на 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % 90 % або 100 % у моделі астми людини, індукованої IL-13. Переважно, антитілом є антитіло 13C5.5. Більш переважно, антитіло не є антитілом BAK502G9, mAb13.2 або MJ2-7.

В одному з варіантів здійснення зв'язувальний білок згідно з винаходом має константу швидкості асоціації ( $k_{on}$ ) відносно IL-13 щонайменше приблизно  $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; щонайменше приблизно  $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; щонайменше приблизно  $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ; щонайменше приблизно  $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  або щонайменше приблизно  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , при вимірюванні за допомогою резонансу поверхневих плазмонів. Переважно, зв'язувальний білок згідно з винаходом має константу швидкості асоціації ( $k_{on}$ ) відносно IL-13, що дорівнює  $10^2$ - $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ;  $10^3$ - $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ;  $10^4$ - $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  або  $10^5$ - $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , при вимірюванні за допомогою резонансу поверхневих плазмонів.

В іншому варіанті здійснення зв'язувальний білок згідно з винаходом має константу швидкості дисоціації ( $k_{off}$ ) відносно IL-13 максимально приблизно  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ; максимально приблизно  $10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ; максимально приблизно  $10^{-5} \text{ s}^{-1}$  або максимально приблизно  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ , при вимірюванні за допомогою резонансу поверхневих плазмонів. Переважно, зв'язувальний білок згідно з винаходом має константу швидкості дисоціації ( $k_{off}$ ) відносно IL-13  $10^{-3}$ - $10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ;  $10^{-4}$ - $10^{-5} \text{ s}^{-1}$  або  $10^{-5}$ - $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ , при вимірюванні за допомогою резонансу поверхневих плазмонів.

В іншому варіанті здійснення зв'язувальний білок згідно з винаходом має константу дисоціації ( $K_D$ ) відносно IL-13 максимально приблизно  $10^{-7} \text{ M}$ ; максимально приблизно  $10^{-8} \text{ M}$ ; максимально приблизно  $10^{-9} \text{ M}$ ; максимально приблизно  $10^{-10} \text{ M}$ ; максимально приблизно  $10^{-11} \text{ M}$ ; максимально приблизно  $10^{-12} \text{ M}$  або максимально приблизно  $10^{-13} \text{ M}$ . Переважно, зв'язувальний білок згідно з винаходом має константу дисоціації ( $K_D$ ) відносно IL-13  $10^{-7}$ - $10^{-8} \text{ M}$ ;  $10^{-8}$ - $10^{-9} \text{ M}$ ;  $10^{-9}$ - $10^{-10} \text{ M}$ ;  $10^{-10}$ - $10^{-11} \text{ M}$ ;  $10^{-11}$ - $10^{-12} \text{ M}$  або  $10^{-12}$ - $10^{-13} \text{ M}$ .

Переважно, антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, зв'язує IL-13 з характеристиками зв'язування, вибраними з групи, що складається з: а) константи швидкості асоціації ( $k_{on}$ ), що дорівнює приблизно  $10^5$ - $10^6 \text{ M}^{-1}\text{сек}^{-1}$  або приблизно  $10^6$ - $10^7 \text{ M}^{-1}\text{сек}^{-1}$ , або б) константи швидкості дисоціації ( $k_{off}$ ), що дорівнює приблизно  $10^{-4}$ - $10^{-5} \text{ s}^{-1}$  або приблизно  $10^{-5}$ - $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ , при вимірюванні за допомогою резонансу поверхневих плазмонів, або с) константи дисоціації ( $K_D$ ), що дорівнює приблизно  $1,5 \times 10^{-10}$ - $1 \times 10^{-10} \text{ M}$  або приблизно  $10^{-10}$ - $10^{-11} \text{ M}$ . Переважно, антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, має константу швидкості асоціації ( $k_{on}$ ) відносно IL-13, вибрану з групи, що складається з:  $6,68 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $7,86 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $8,35 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $8,69 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $9,15 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $1,26 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $1,7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  і  $2,51 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Переважно, антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, має константу швидкості дисоціації ( $k_{off}$ ) відносно IL-13, вибрану з групи, що складається з:  $1,23 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ;  $1,76 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ;  $4,74 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ;  $1,91 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ;  $2,14 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ;  $3,82 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ;  $8,81 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ; і  $9,65 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ , при вимірюванні по резонансу поверхневих плазмонів. Переважно, антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, має константу дисоціації ( $K_D$ ) відносно IL-13, вибрану з групи, що складається з:  $1,05 \times 10^{-10} \text{ M}$ ;  $7,10 \times 10^{-10} \text{ M}$ ;  $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ ;  $2,20 \times 10^{-11} \text{ M}$ ;  $2,72 \times 10^{-11} \text{ M}$ ;  $4,17 \times 10^{-11} \text{ M}$ ;  $5,68 \times 10^{-11} \text{ M}$ ;  $7,01 \times 10^{-11} \text{ M}$ ;  $7,10 \times 10^{-11} \text{ M}$  і  $9,79 \times 10^{-11} \text{ M}$ .

Один з аспектів даного винаходу стосується зв'язувальних білків, здатних зв'язувати специфічний епітоп на IL-13. Переважно, специфічний епітоп містить область С-кінцевої спіралі D IL-13 людини. Більш переважно, цей специфічний епітоп містить амінокислотну послідовність VRDTK IEVAQ FVKDL LL HLK KLFRE GR, що відповідає амінокислотам 104-130 послідовності SEQ ID NO:1. В іншому аспекті антитіло, або його антигензв'язувальна частина, зв'язує епітоп, що містить область С-кінцевої спіралі D і область N-кінцевої спіралі A IL-13 людини. Переважно, антитіло, або його антигензв'язувальна частина, зв'язує IL-13 людини, щоб IL-13 із зазначеним антитілом, або його антигензв'язувальним фрагментом, зв'язаним з епітопом, що визначається топографічними областями Ser26-Thr27-Ala28-Leu29-Arg30-Glu31-Leu32-Ile33-Glu34-Glu35-Leu36-Val37-Asn38 і Lys123-Lys124-Leu125-Phe126-Arg127-Glu128-Gly129-Arg130 послідовності SEQ ID NO:1, був інгібований для зв'язування з IL-13-рецептором. Переважно, це антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, зв'язує IL-13 людини, щоб IL-13 із зазначеним антитілом, або його антигензв'язувальним фрагментом, зв'язаним з епітопом, що визначається топографічними областями Arg30-Glu31-Leu32-Ile33-Glu34-Glu35-Leu36-Val37-Asn38 і Lys123-Lys124-Leu125-Phe126-Arg127 послідовності SEQ ID NO:1, був інгібований для зв'язування з IL-13-рецептором. Переважно, антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, зв'язує IL-13

людини, щоб IL-13 із зазначеним антитілом, або його антигензв'язувальним фрагментом, зв'язаним з епітопом, що визначається топографічними областями Ser26-Thr27-Ala28-Leu29-Arg30-Glu31-Leu32-Ile33-Glu34-Glu35-Leu36-Val37-Asn38 і Lys123-Lys124-Leu125-Phe126-Arg127-Glu128-Gly129-Arg130 послідовності SEQ ID NO:1, був інгібований для зв'язування з IL-13 $\alpha$ 2-рецептором. Більш переважно, антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, зв'язує IL-13 людини, щоб IL-13 із зазначеним антитілом, або його антигензв'язувальним фрагментом, зв'язаним з епітопом, що визначається топографічними областями Ser26-Thr27-Ala28-Leu29-Arg30-Glu31-Leu32-Ile33-Glu34-Glu35-Leu36-Val37-Asn38 і Lys123-Lys124-Leu125-Phe126-Arg127-Glu128-Gly129-Arg130 послідовності SEQ ID NO:1, був інгібований для зв'язування з IL-13 $\alpha$ 2-рецептором, за умови, що зазначене антитіло не є антитілом BAK502G9 або MJ2-7. Найбільше переважно, цим антитілом є антитіло 13C5.5.

В одному з аспектів виділене антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, зв'язує IL-13 і запобігає зв'язуванню IL-13 з IL-13 $\alpha$ 2-рецептором з характеристиками зв'язування, вибраними з групи, що складається зі зв'язування з епітопом на IL-13, що включає спіралі A і D; константи швидкості асоціації ( $k_{on}$ ) приблизно  $10^5$ - $10^6$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> або приблизно  $10^6$ - $10^7$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>; константи швидкості дисоціації ( $k_{off}$ ) приблизно  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  с<sup>-1</sup> або приблизно  $10^{-5}$ - $10^{-6}$  с<sup>-1</sup>, при вимірюванні за допомогою резонансу поверхневих плазмонів; і константи дисоціації ( $K_D$ ) приблизно  $1,5 \times 10^{-10}$ - $1 \times 10^{-10}$  M або приблизно  $10^{-10}$ - $10^{-11}$  M. В іншому аспекті виділене антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, зв'язує IL-13 і запобігає зв'язуванню IL-13 з IL-13 $\alpha$ 2-рецептором з характеристиками зв'язування, вибраними з групи, що складається зі зв'язування з епітопом на IL-13, що включає спіралі A і D; константи швидкості асоціації ( $k_{on}$ ) приблизно  $10^5$ - $10^6$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> або приблизно  $10^6$ - $10^7$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>; константи швидкості дисоціації ( $k_{off}$ ) приблизно  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  с<sup>-1</sup> або приблизно  $10^{-5}$ - $10^{-6}$  с<sup>-1</sup>, при вимірюванні за допомогою резонансу поверхневих плазмонів; і константи дисоціації ( $K_D$ ) приблизно  $1,5 \times 10^{-10}$ - $1 \times 10^{-10}$  M або приблизно  $10^{-10}$ - $10^{-11}$  M.

В одному з аспектів винахід стосується зв'язувального білка, здатного зв'язувати IL-13, причому зазначений антигензв'язувальний домен містить щонайменше один CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з:

CDR-H1. X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub> (SEQ ID NO:64), де:

X<sub>1</sub> означає T, D, G або S;

X<sub>2</sub> означає S;

X<sub>3</sub> означає D;

X<sub>4</sub> означає M, S, Y, L або H;

X<sub>5</sub> означає G, W, Y, A, S або N;

X<sub>6</sub> означає V, I або M; і

X<sub>7</sub> означає D, H, S, Y, N або G;

CDR-H2. X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub>-X<sub>11</sub>-X<sub>12</sub>-X<sub>13</sub>-X<sub>14</sub>-X<sub>15</sub>-X<sub>16</sub>-X<sub>17</sub> (SEQ ID NO:65), де:

X<sub>1</sub> означає M, E, H, R, S, G або L;

X<sub>2</sub> означає I або не присутній;

X<sub>3</sub> означає H, Y, A, D, S або W;

X<sub>4</sub> означає P, S, W або G;

X<sub>5</sub> означає S, G, E або D;

X<sub>6</sub> означає D, G, S, E або N;

X<sub>7</sub> означає S, Y або G;

X<sub>8</sub> означає E, N, Y, V або R;

X<sub>9</sub> означає T, I або K;

X<sub>10</sub> означає R, Y, I, D або A;

X<sub>11</sub> означає L, Y, D або F;

X<sub>12</sub> означає N, P, S або D;

X<sub>13</sub> означає Q, E, D, P або S;

X<sub>14</sub> означає K, M, S, T, A або V;

X<sub>15</sub> означає F, L, V або M;

X<sub>16</sub> означає K, R або Q; і

X<sub>17</sub> означає D, G або S;

CDR-H3. X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-X<sub>10</sub>-X<sub>11</sub>-X<sub>12</sub>-X<sub>13</sub>-X<sub>14</sub> (SEQ ID NO:66), де:

X<sub>1</sub> означає W, T, G, Y, D або I;

X<sub>2</sub> означає R, A, S, G або V;

X<sub>3</sub> означає T, F, Y або S;

X<sub>4</sub> означає S, T або Y;

X<sub>5</sub> означає Y, F або G;

X<sub>6</sub> означає F або Y;

- $X_7$  означає S, Y, I або F;  
 $X_8$  означає D, L, Y або P;  
 $X_9$  означає Y;  
 $X_{10}$  означає G;  
5  $X_{11}$  означає Y, A, P або E;  
 $X_{12}$  означає F, M, S, L або I;  
 $X_{13}$  означає D, V, N або K; i  
 $X_{14}$  означає Y або F;  
10 CDR-L1.  $X_1$ - $X_2$ - $X_3$ - $X_4$ - $X_5$ - $X_6$ - $X_7$ - $X_8$ - $X_9$ - $X_{10}$ - $X_{11}$ - $X_{12}$ - $X_{13}$ - $X_{14}$ - $X_{15}$ - $X_{16}$ - $X_{17}$  (SEQ ID NO:67), де:  
 $X_1$  означає K або R;  
 $X_2$  означає S або A;  
 $X_3$  означає S або T;  
 $X_4$  означає Q, K або I;  
 $X_5$  означає N, S, T, G або E;  
15  $X_6$  означає L, T або S;  
 $X_7$  означає L, Q або V;  
 $X_8$  означає Y, N, H, D або T;  
 $X_9$  означає S, I або T;  
 $X_{10}$  означає S, D, N, H або Y;  
20  $X_{11}$  означає N або G;  
 $X_{12}$  означає Q;  
 $X_{13}$  означає K, F, N, E або S;  
 $X_{14}$  означає N, T або S;  
 $X_{15}$  означає Y або F;  
25  $X_{16}$  означає L, A або M; i  
 $X_{17}$  означає A, D, E, H або N;  
CDR-L2.  $X_1$ - $X_2$ - $X_3$ - $X_4$ - $X_5$ - $X_6$ - $X_7$  (SEQ ID NO:68), де:  
 $X_1$  означає L, S, K, T, W або Y;  
 $X_2$  означає V, T або A;  
30  $X_3$  означає S або N;  
 $X_4$  означає N, K, T, M або R;  
 $X_5$  означає R, K або L;  
 $X_6$  означає F, D, E, H, P або A; i  
 $X_7$  означає S, R або P; i  
35 CDR-L3.  $X_1$ - $X_2$ - $X_3$ - $X_4$ - $X_5$ - $X_6$ - $X_7$ - $X_8$ - $X_9$  (SEQ ID NO:69), де:  
 $X_1$  означає F, W, Q або A;  
 $X_2$  означає Q або L;  
 $X_3$  означає H, G, Y, W або N;  
 $X_4$  означає N, S, T, L або Y;  
40  $X_5$  означає Y, T, S, E або H;  
 $X_6$  означає L, V, F, Y, N, G, P або D;  
 $X_7$  означає P або H;  
 $X_8$  означає L, F, Y, W або R; i  
 $X_9$  означає T або V.  
45 Переважно, антигензв'язувальний домен містить щонайменше один CDR, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з:

залишки	31-35 SEQ ID NO:32;	залишки	31-35 SEQ ID NO:41;
залишки	50-66 SEQ ID NO:32;	залишки	50-66 SEQ ID NO:41;
залишки	99-105 SEQ ID NO:32;	залишки	99-112 SEQ ID NO:41;
залишки	24-39 SEQ ID NO:33;	залишки	31-35 SEQ ID NO:42;
залишки	55-61 SEQ ID NO:33;	залишки	50-66 SEQ ID NO:42;
залишки	94-102 SEQ ID NO:33;	залишки	99-100 SEQ ID NO:42;
залишки	31-35 SEQ ID NO:34;	залишки	24-39 SEQ ID NO:43;
залишки	50-66 SEQ ID NO:34;	залишки	55-61 SEQ ID NO:43;
залишки	99-105 SEQ ID NO:34;	залишки	94-102 SEQ ID NO:43;
залишки	24-39 SEQ ID NO:35;	залишки	31-35 SEQ ID NO:44;
залишки	55-61 SEQ ID NO:35;	залишки	50-65 SEQ ID NO:44;
залишки	94-102 SEQ ID NO:35;	залишки	98-106 SEQ ID NO:44;
залишки	31-35 SEQ ID NO:36;	залишки	24-40 SEQ ID NO:45;

залишки	50-66 SEQ ID NO:36;	залишки	56-62 SEQ ID NO:45;
залишки	99-109 SEQ ID NO:36;	залишки	95-103 SEQ ID NO:45;
залишки	24-39 SEQ ID NO:37;	залишки	32-38 SEQ ID NO:46;
залишки	55-61 SEQ ID NO:37;	залишки	52-67 SEQ ID NO:46;
залишки	94-102 SEQ ID NO:37;	залишки	100-112 SEQ ID NO:46;
залишки	31-35 SEQ ID NO:38;	залишки	24-34 SEQ ID NO:47;
залишки	50-66 SEQ ID NO:38;	залишки	50-56 SEQ ID NO:47;
залишки	99-109 SEQ ID NO:38;	залишки	89-97 SEQ ID NO:47;
залишки	31-35 SEQ ID NO:39;	залишки	31-37 SEQ ID NO:48;
залишки	50-66 SEQ ID NO:39;	залишки	52-67 SEQ ID NO:48;
залишки	99-112 SEQ ID NO:39;	залишки	100-112 SEQ ID NO:48;
залишки	24-39 SEQ ID NO:40;	залишки	24-34 SEQ ID NO:49;
залишки	55-61 SEQ ID NO:40;	залишки	50-56 SEQ ID NO:49;
залишки	94-102 SEQ ID NO:40;	залишки	89-97 SEQ ID NO:49;
залишки	31-37 SEQ ID NO:50;	залишки	24-38 SEQ ID NO:57;
залишки	52-67 SEQ ID NO:50;	залишки	54-60 SEQ ID NO:57;
залишки	100-112 SEQ ID NO:50;	залишки	93-101 SEQ ID NO:57;
залишки	24-34 SEQ ID NO:51;	залишки	31-35 SEQ ID NO:58;
залишки	60-66 SEQ ID NO:51;	залишки	50-65 SEQ ID NO:58;
залишки	89-97 SEQ ID NO:51;	залишки	98-107 SEQ ID NO:58;
залишки	31-35 SEQ ID NO:52;	залишки	24-38 SEQ ID NO:59;
залишки	50-66 SEQ ID NO:52;	залишки	54-60 SEQ ID NO:59;
залишки	99-107 SEQ ID NO:52;	залишки	93-101 SEQ ID NO:59;
залишки	23-36 SEQ ID NO:53;	залишки	31-35 SEQ ID NO:60;
залишки	52-58 SEQ ID NO:53;	залишки	50-65 SEQ ID NO:60;
залишки	91-99 SEQ ID NO:53;	залишки	98-107 SEQ ID NO:60;
залишки	31-35 SEQ ID NO:54;	залишки	24-38 SEQ ID NO:61;
залишки	50-65 SEQ ID NO:54;	залишки	54-60 SEQ ID NO:61;
залишки	98-107 SEQ ID NO:54;	залишки	93-101 SEQ ID NO:61;
залишки	24-38 SEQ ID NO:55;	залишки	31-35 SEQ ID NO:62;
залишки	54-60 SEQ ID NO:55;	залишки	50-65 SEQ ID NO:62;
залишки	93-101 SEQ ID NO:55;	залишки	98-107 SEQ ID NO:62;
залишки	31-35 SEQ ID NO:56;	залишки	24-38 SEQ ID NO:63;
залишки	50-65 SEQ ID NO:56;	залишки	54-60 SEQ ID NO:63; i
залишки	98-107 SEQ ID NO:56;	залишки	93-101 SEQ ID NO:63.

У переважному варіанті здійснення цей зв'язувальний блок містить щонайменше 3 CDR, вибраних з набору CDR варіабельного домену, що складається з:

5

Набір CDR VH 25C8	
VH 25C8 CDR-H1	Залишки 31-35 SEQ ID NO:32
VH 25C8 CDR-H2	Залишки 50-66 SEQ ID NO:32
VH 25C8 CDR-H3	Залишки 99-105 SEQ ID NO:32
Набір CDR VL 25C8	
VL 25C8CDR-L1	Залишки 24-39 SEQ ID NO:33
VL 25C8 CDR-L2	Залишки 55-61 SEQ ID NO:33
VL 25C8 CDR-L3	Залишки 94-102 SEQ ID NO:33
Набір CDR VH 9C11	
VH 9C11 CDR-H1	Залишки 31-35 SEQ ID NO:34
VH 9C11 CDR-H2	Залишки 50-56 SEQ ID NO:34
VH 9C11 CDR-H3	Залишки 99-105 SEQ ID NO:34
Набір CDR VL9C11	
VL 9C11 CDR-L1	Залишки 24-39 SEQ ID NO:35
VL 9C11CDR-L2	Залишки 55-61 SEQ ID NO:35
VL 9C11 CDR-L3	Залишки 94-102 SEQ ID NO:35
Набір CDR VH 21D9	
VH 21D9 CDR-H1	Залишки 31-35 SEQ ID NO:36



VH 21D9 CDR-H2	Залишки 50-66 SEQ ID NO:36
VH 21D9 CDR-H3	Залишки 99-109 SEQ ID NO:36
Набір CDR VL21D9	
VL 21D9 CDR-L1	Залишки 24-39 SEQ ID NO:37
VL 21D9 CDR-L2	Залишки 55-61 SEQ ID NO:37
VL 21D9 CDR-L3	Залишки 94-102 SEQ ID NO:37
Набір CDR VH 22D10	
VH 22D10 CDR-H1	Залишки 31-35 SEQ ID NO:38
VH 22D10 CDR-H2	Залишки 50-66 SEQ ID NO:38
VH 22D10 CDR-H3	Залишки 99-109 SEQ ID NO:38
Набір CDR VL22D10	
VL 22D10 CDR-L1	Залишки 24-39 SEQ ID NO:37
VL 22D10 CDR-L2	Залишки 55-61 SEQ ID NO:37
VL 22D10 CDR-L3	Залишки 94-102 SEQ ID NO:37
Набір CDR VH5F1	
VH 5F1 CDR-H1	Залишки 31-35 SEQ ID NO:39
VH 5F1 CDR-H2	Залишки 50-66 SEQ ID NO:39
VH 5F1 CDR-H3	Залишки 99-112 SEQ ID NO:39
Набір CDR VL 5F1	
VL SF1 CDR-L1	Залишки 24-39 SEQ ID NO:40
VL SF1 CDR-L2	Залишки 55-61 SEQ ID NO:40
VL SF1 CDR-L3	Залишки 94-102 SEQ ID NO:40
Набір CDR VH 5G1	
VH 5G1 CDR-H1	Залишки 31-35 SEQ ID NO:41
VH 5G1 CDR-H2	Залишки 50-66 SEQ ID NO:41
VH5G1 CDR-H3	Залишки 99-112 SEQ ID NO:41
Набір CDR VL 5G1	
VL 5G1 CDR-L1	Залишки 24-39 SEQ ID NO:40
VL 5G1 CDR-L2	Залишки 55-61 SEQ ID NO:40
VL 5G1 CDR-L3	Залишки 94-102 SEQ ID NO:40
Набір CDR VH 3H7	
VH 3H7 CDR-H1	Залишки 31-35 SEQ ID NO:42
VH 3H7 CDR-H2	Залишки 50-66 SEQ ID NO:42
VH 3H7 CDR-H3	Залишки 99-100 SEQ ID NO:42
Набір CDR VL 3H7	
VL 3H7 CDR-L1	Залишки 24-39 SEQ ID NO:43
VL 3H7 CDR-L2	Залишки 55-61 SEQ ID NO:43
VL 3H7 CDR-L3	Залишки 94-102 SEQ ID NO:43
Набір CDR VH14B2	
VH 14B2 CDR-H1	Залишки 31-35 SEQ ID NO:44
VH 14B2 CDR-H2	Залишки 50-65 SEQ ID NO:44
VH 14B2 CDR-H3	Залишки 98-106 SEQ ID NO:44
Набір CDR VL14B2	
VL 14B2 CDR-L1	Залишки 24-40 SEQ ID NO:45
VL 14B2 CDR-L2	Залишки 56-62 SEQ ID NO:45
VL 14B2 CDR-L3	Залишки 95-103 SEQ ID NO:45
Набір CDR VH 13C5	
VH 13C5 CDR-H1	Залишки 32-38 SEQ ID NO:46
VH 13C5 CDR-H2	Залишки 52-67 SEQ ID NO:46
VH 13C5 CDR-H3	Залишки 100-112 SEQ ID NO:46
Набір CDR VL13C5	
VL 13C5 CDR-L1	Залишки 24-34 SEQ ID NO:47
VL 13C5 CDR-L2	Залишки 50-56 SEQ ID NO:47
VL 13C5 CDR-L3	Залишки 89-97 SEQ ID NO:47
Набір CDR VH 29G5	
VH 29G5 CDR-H1	Залишки 31-37 SEQ ID NO:48
VH 29G5 CDR-H2	Залишки 52-67 SEQ ID NO:48
VH 29G5 CDR-H3	Залишки 100-112 SEQ ID NO:48

Набір CDR VL 29G5	
VL 29G5 CDR-L1	Залишки 24-34 SEQ ID NO:49
VL 29G5 CDR-L2	Залишки 50-56 SEQ ID NO:49
VL 29G5 CDR-L3	Залишки 89-97 SEQ ID NO:49
Набір CDR VH 33C3	
VH 33C3 CDR-H1	Залишки 31-37 SEQ ID NO:50
VH 33C3 CDR-H2	Залишки 52-67 SEQ ID NO:50
VH 33C3 CDR-H3	Залишки 100-112 SEQ ID NO:50
Набір CDR VL 33C3	
VL 33C3 CDR-L1	Залишки 24-34 SEQ ID NO:51
VL 33C3 CDR-L2	Залишки 60-66 SEQ ID NO:51
VL 33C3 CDR-L3	Залишки 89-97 SEQ ID NO:51
Набір CDR VH 4A8	
VH 4A8 CDR-H1	Залишки 31-35 SEQ ID NO:52
VH 4A8 CDR-H2	Залишки 50-66 SEQ ID NO:52
VH 4A8 CDR-H3	Залишки 99-107 SEQ ID NO:52
Набір CDR VL 4A8	
VL 4A8 CDR-L1	Залишки 23-36 SEQ ID NO:53
VL 4A8 CDR-L2	Залишки 52-58 SEQ ID NO:53
VL 4A8 CDR-L3	Залишки 91-99 SEQ ID NO:53
Набір CDR VH 1B6	
VH 1B6 CDR-H1	Залишки 31-35 SEQ ID NO:54
VH 1B6 CDR-H2	Залишки 50-65 SEQ ID NO:54
VH 1B6 CDR-H3	Залишки 98-107 SEQ ID NO:54
Набір CDR VL 1B6	
VL 1B6 CDR-L1	Залишки 24-38 SEQ ID NO:55
VL 1B6 CDR-L2	Залишки 54-60 SEQ ID NO:55
VL 1B6 CDR-L3	Залишки 93-101 SEQ ID NO:55
Набір CDR VH 3E5	
VH 3E5 CDR-H1	Залишки 31-35 SEQ ID NO:56
VH 3E5 CDR-H2	Залишки 50-65 SEQ ID NO:56
VH 3E5 CDR-H3	Залишки 98-107 SEQ ID NO:56
Набір CDR VL 3E5	
VL3E5CDR-L1	Залишки 24-38 SEQ ID NO:57
VL 3E5 CDR-L2	Залишки 54-60 SEQ ID NO:57
VL 3E5 CDR-L3	Залишки 93-101 SEQ ID NO:57
Набір CDR VH 6C8	
VH 6C8 CDR-H1	Залишки 31-35 SEQ ID NO:58
VH 6C8 CDR-H2	Залишки 50-65 SEQ ID NO:58
VH 6C8 CDR-H3	Залишки 98-107 SEQ ID NO:58
Набір CDR VL 6C8	
VL 6C8 CDR-L1	Залишки 24-38 SEQ ID NO:59
VL 6C8 CDR-L2	Залишки 54-60 SEQ ID NO:59
VL 6C8 CDR-L3	Залишки 93-101 SEQ ID NO:59
Набір CDR VH 5D3	
VH 5D3 CDR-H1	Залишки 31-35 SEQ ID NO:60
VH 5D3 CDR-H2	Залишки 50-65 SEQ ID NO:60
VH 5D3 CDR-H3	Залишки 98-107 SEQ ID NO:60
Набір CDR VL 5D3	
VL 5D3 CDR-L1	Залишки 24-38 SEQ ID NO:61
VL 5D3 CDR-L2	Залишки 54-60 SEQ ID NO:61
VL 5D3 CDR-L3	Залишки 93-101 SEQ ID NO:61
Набір CDR VH 8B6	
VH 8B6 CDR-H1	Залишки 31-35 SEQ ID NO:62
VH 8B6 CDR-H2	Залишки 50-65 SEQ ID NO:62
VH 8B6 CDR-H3	Залишки 98-107 SEQ ID NO:62
Набір CDR VL 8B6	
VL 8B6 CDR-L1	Залишки 24-38 SEQ ID NO:63

VL 8B6 CDR-L2	Залишки 54-60 SEQ ID NO:63
VL 8B6 CDR-L3	Залишки 93-101 SEQ ID NO:63

Переважно, зв'язувальний білок містить щонайменше два набори CDR варіабельних доменів. Переважно, щонайменше два набори CDR варіабельних доменів вибрані з групи, що складається з:

- 5 набір CDR VH 25C8 і набір CDR VL 25C8;  
набір CDR VH 9C11 і набір CDR VL 9C11;  
набір CDR VH 21D9 і набір CDR VL 21D9;  
набір CDR VH 22D10 і набір CDR VL 22D10;  
набір CDR VH 5F1 і набір CDR VL 5F1;
- 10 набір CDR VH 5G1 і набір CDR VL 5G1;  
набір CDR VH 3H7 і набір CDR VL 3H7;  
набір CDR VH 14B2 і набір CDR VL 14B2;  
набір CDR VH 13C5 і набір CDR VL 13C5;  
набір CDR VH 29G5 і набір CDR VL 29G5;
- 15 набір CDR VH 33C3 і набір CDR VL 33C3;  
набір CDR VH 4A8 і набір CDR VL 4A8;  
набір CDR VH 1B6 і набір CDR VL 1B6;  
набір CDR VH 3E5 і набір CDR VL 3E5;  
набір CDR VH 6C8 і набір CDR VL 6C8;
- 20 набір CDR VH 5D3 і набір CDR VL 5D3; і  
набір CDR VH 8B6 і набір CDR VL 8B6.

В іншому варіанті здійснення описаний вище зв'язувальний білок додатково містить акцепторний каркас людини. Переважно, акцепторний каркас людини містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з:

SEQ ID NO:6,	SEQ ID NO:15,	SEQ ID NO:24,
SEQ ID NO:7,	SEQ ID NO:16,	SEQ ID NO:25,
SEQ ID NO:8,	SEQ ID NO:17,	SEQ ID NO:26,
SEQ ID NO:9,	SEQ ID NO:18,	SEQ ID NO:27,
SEQ ID NO:10,	SEQ ID NO:19,	SEQ ID NO:28,
SEQ ID NO:11,	SEQ ID NO:20,	SEQ ID NO:29,
SEQ ID NO:12,	SEQ ID NO:21,	SEQ ID NO:30 і
SEQ ID NO:13,	SEQ ID NO:22,	SEQ ID NO:31.
SEQ ID NO:14,	SEQ ID NO:23,	

- 25 У переважному варіанті здійснення зв'язувальним білком є CDR-трансплантоване антитіло або його антигензв'язувальна частина, здатне зв'язувати IL-13. Переважно, CDR-трансплантоване антитіло, або його антигензв'язувальна частина, містить один або декілька вищеописаних CDR. Переважно, це CDR-трансплантоване антитіло або його антигензв'язувальна частина, містить акцепторний каркас людини. Більш переважно,
- 30 акцепторним каркасом людини є будь-який з акцепторних каркасів людини, описаних вище.

- У переважному варіанті здійснення зв'язувальним білком є гуманізоване антитіло або його антигензв'язувальна частина, здатне зв'язувати IL-13. Переважно, гуманізоване антитіло або його антигензв'язувальна частина, містить один або декілька вищеописаних CDR, включених у варіабельний домен антитіла людини акцепторного каркаса людини. Переважно, варіабельний домен антитіла людини є консенсусним варіабельним доменом людини. Більш переважно,
- 35 акцепторний каркас людини містить щонайменше одну амінокислотну заміну каркасної ділянки як ключовий залишок, причому ключовий залишок вибраний із групи, що складається з залишку, суміжного з CDR; залишку сайту глікозилювання; незвичайного залишку; залишку, здатного взаємодіяти з IL-13 людини; залишку, здатного взаємодіяти з CDR; канонічного залишку;
- 40 контактного залишку між варіабельною областю важкого ланцюга і варіабельною областю легкого ланцюга; залишку в зоні Верньєра і залишку в ділянці, яка перекривається між CDR1 варіабельного важкого ланцюга по визначенню Хотіа і першим каркасом важкого ланцюга по визначенню Кабата. Переважно, акцепторний каркас людини містить щонайменше одну амінокислотну заміну каркасної ділянки, причому амінокислотна послідовність даного каркаса є
- 45 щонайменше на 65 % ідентичною послідовності зазначеного акцепторного каркаса людини і містить щонайменше 70 амінокислотних залишків, ідентичних зазначеному акцепторному каркасу людини. Переважно, ця амінокислотна заміна в ключовому залишку вибрана з групи, що складається з 2L, 15L, 22L, 41L, 42L, 44L, 49L, 50L, 51L, 62L, 71L, 73L, 10H, 44H, 46H, 48H, 67H, 68H, 70H, 72H, 74H, 76H, 83H, 84H, 86H, 87H і 97H.

У переважному варіанті здійснення зв'язувальним білком є гуманізоване антитіло або його антигензв'язувальна частина, здатні зв'язувати IL-13. Переважно, гуманізоване антитіло, або його антигензв'язувальна частина, містить один або декілька CDR, описаних вище. Більш переважно, гуманізоване антитіло, або його антигензв'язувальна частина, містить три або

5 більше CDR, описаних вище. Найбільш переважно, гуманізоване антитіло, або його антигензв'язувальна частина, містить шість CDR, описаних вище.

В іншому варіанті здійснення винаходу гуманізоване антитіло, або його антигензв'язувальна частина, містить щонайменше один варіабельний домен, що має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з:

SEQ ID NO:70,	SEQ ID NO:77,	SEQ ID NO:84,
SEQ ID NO:71,	SEQ ID NO:78,	SEQ ID NO:85,
SEQ ID NO:72,	SEQ ID NO:79,	SEQ ID NO:92,
SEQ ID NO:73,	SEQ ID NO:80,	SEQ ID NO:93 і
SEQ ID NO:74,	SEQ ID NO:81,	SEQ ID NO:94.
SEQ ID NO:75,	SEQ ID NO:82,	
SEQ ID NO:76,	SEQ ID NO:83,	

10 Більш переважно гуманізоване антитіло, або його антигензв'язувальна частина, містить два варіабельних домени, вибраних з вищеописаної групи. Більш переважно, зв'язувальний білок містить два варіабельних домени, причому зазначені два варіабельних домени мають амінокислотні послідовності, вибрані з групи, що складається з:

SEQ ID NO:70 і SEQ ID NO:71,  
 15 SEQ ID NO:72 і SEQ ID NO:73,  
 SEQ ID NO:74 і SEQ ID NO:75,  
 SEQ ID NO:76 і SEQ ID NO:77,  
 SEQ ID NO:78 і SEQ ID NO:79,  
 SEQ ID NO:80 і SEQ ID NO:81,  
 20 SEQ ID NO:82 і SEQ ID NO:83,  
 SEQ ID NO:84 і SEQ ID NO:85,  
 SEQ ID NO:80 і SEQ ID NO:92,  
 SEQ ID NO:80 і SEQ ID NO:93,  
 SEQ ID NO:80 і SEQ ID NO:94.

25 Один з варіантів здійснення винаходу стосується конструкції антитіла, яка містить будь-який з вищеописаних зв'язувальних білків і лінкерний поліпептид або імуноглобулін. У переважному варіанті здійснення конструкція антитіла вибрана з групи, що складається з молекули імуноглобуліну, моноклонального антитіла, химерного антитіла, CDR-трансплантованого антитіла, гуманізованого антитіла, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, дисульфідзв'язаного Fv, scFv, 30 однокломенного антитіла, діатіла, мультиспецифічного антитіла, антитіла з подвійною специфічністю і біспецифічного антитіла. У переважному варіанті здійснення ця конструкція антитіла містить константний домен важкого ланцюга імуноглобуліну, вибраний із групи, що складається з константного домену IgM людини, константного домену IgG1 людини, константного домену IgG2 людини, константного домену IgG3 людини, константного домену 35 IgG4 людини, константного домену IgE людини і константного домену IgA людини. Більш переважно, ця конструкція антитіла містить SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4 і SEQ ID NO:5. В іншому варіанті здійснення винахід стосується кон'югата антитіла, що містить вищеописану конструкцію й агент, вибраний із групи, що складається з молекули імуноадгезії, агента візуалізації, терапевтичного агента і цитотоксичного засобу. У переважному варіанті здійснення агент візуалізації вибраний із групи, що складається з радіоактивної мітки, ферменту, флуоресцентної мітки, люмінесцентної мітки, біолюмінесцентної мітки, магнітної мітки і біотину. Більш переважно агент візуалізації є радіоактивною міткою, вибраною з групи, що складається з <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>35</sup>S, <sup>90</sup>Y, <sup>99</sup>Tc, <sup>111</sup>In, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>177</sup>Lu, <sup>166</sup>Ho і <sup>153</sup>Sm. У переважному варіанті здійснення терапевтичний або цитотоксичний засіб вибраний із групи, що складається з 45 антиметаболіту, алкілувального агента, антибіотика, фактора росту, цитокину, антиангіогенного засобу, антимітотичного засобу, антрацикліну, токсину й апоптотичного засобу.

В іншому варіанті здійснення конструкція антитіла є глікозилованою. Переважно, глікозилювання має характер глікозилювання людини.

В іншому варіанті здійснення зв'язувальний білок, конструкція антитіла або кон'югат антитіла, описані вище, знаходиться у вигляді кристала. Переважно, кристал являє собою фармацевтичний кристал з регульованим вивільненням, що не має носія. У переважному варіанті здійснення кристалізований зв'язувальний білок, кристалізована конструкція антитіла або кристалізований кон'югат антитіла має більш високий час напівжиття in vivo, ніж їх розчинна

копія. В іншому переважному варіанті здійснення кристалізований зв'язувальний білок, кристалізована конструкція антитіла або кристалізований кон'югат антитіла зберігає біологічну активність після кристалізації.

Один з аспектів даного винаходу стосується DVD-зв'язувального білка, що містить зв'язувальні білки, здатні зв'язувати IL-13. Переважно, DVD-зв'язувальний білок здатний зв'язувати IL-13 і другу мішень. Ця друга мішень вибрана з групи, що складається з CSF1 (MCSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (GCSF), FGF2, IFN $\alpha$ 1, IFN $\beta$ 1, IFN $\gamma$ , гістаміну і рецепторів гістаміну, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12 $\alpha$ , IL-12 $\beta$ , IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, KITLG, PDGFB, IL-2R $\alpha$ , IL-4R, IL-5R $\alpha$ , IL-8R $\alpha$ , IL-8R $\beta$ , IL-12R $\beta$ 1, IL-12R $\beta$ 2, IL-13R $\alpha$ 1, IL-13R $\alpha$ 2, IL-18R1, TSLP, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL13, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL22, CCL24, CX3CL1, CXCL1, CXCL2, CXCL3, XCL1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CX3CR1, GPR2, XCR1, FOS, GATA3, JAK1, JAK3, STAT6, TBX21, TGFB1, TNFSF6, YY1, CYSLTR1, FCER1A, FCER2, LTB4R, LTBR і хітази. Більш переважно, DVD-білок здатний розпізнавати IL-13 і IL-1 $\beta$ , IL-13 і IL-9; IL-13 і IL-4; IL-13 і IL-5; IL-13 і IL-25; IL-13 і TARC; IL-13 і MDC; IL-13 і MIF; IL-13 і TGF- $\beta$ ; IL-13 і агоніст LHR; IL-13 і CL25; IL-13 і SPRR2a; IL-13 і SPRR2b або IL-13 і ADAM8. Найбільш переважно, DVD-білок здатний зв'язувати IL-13 і TNF $\alpha$ .

Один з аспектів даного винаходу стосується виділеної нуклеїнової кислоти, яка кодує зв'язувальний білок або конструкцію антитіла, або кон'югат антитіла, описані вище. Інший варіант здійснення стосується вектора, що містить виділену нуклеїнову кислоту, описану вище, причому зазначений вектор вибраний із групи, що складається з pcDNA; pTT (Durocher et al., Nucleic Acids Research 2002, Vo 30, No. 2); pTT3 (pTT з додатковим сайтом множинного клонування); pEFBOS (Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) Nucleic acids Research Vol 18, No. 17); pBV; pJV і pBJ.

В іншому аспекті клітину-хазяїна трансформують вищеописаним вектором. Переважно, клітина-хазяїн є прокаріотичною клітиною. Більш переважно, клітина-хазяїн є *E. coli*. В іншому варіанті здійснення клітина-хазяїн є еукаріотичною клітиною. Переважно, еукаріотична клітина вибрана з групи, що складається з клітини протестів (одноклітинні організми), клітини тварини, клітини рослини і грибною клітини. Більш переважно, клітина-хазяїн є клітиною ссавця, у тому числі, але не тільки, CHO і COS; або грибною клітиною, такою як *Saccharomyces cerevisiae*; або клітиною комахи, такою як Sf9.

Інший аспект винаходу включає спосіб одержання зв'язувального білка, що зв'язує IL-13, який включає культивування вищеописаних клітин-хазяїнів у культуральному середовищі при умовах, достатніх для продукування зв'язувального білка, який зв'язує IL-13. Інший варіант здійснення стосується зв'язувального білка, одержаного відповідно до описаного вище способу.

Один з варіантів здійснення стосується композиції для вивільнення зв'язувального білка, причому ця композиція містить готову форму, яка, у свою чергу, містить кристалізований зв'язувальний білок, кристалізовану конструкцію антитіла або кристалізований кон'югат антитіла, описані вище, і інгредієнт; і щонайменше один полімерний носій. Переважно, полімерний носій вибраний з одного або декількох із групи, що складається з: полі(акрилової кислоти), полі(ціаноакрилатів), полі(амінокислот), полі(ангідридів), полі(депсипептидів), полі(ефірів), полі(молочної кислоти), полі(співполімеру молочної кислоти і гліколевої кислоти) або PLGA, полі( $\beta$ -гідроксибутирату), полі(капролактону), полі(діоксанону); полі(етиленгліколю), полі((гідроксипропіл)метакриламід), полі((органо)фосфацену), полі(ортоефірів), полівінілового спирту), полі(вінілпіролідону), співполімерів малеїнового ангідриду й алкілвінілового ефіру, поліолів плуроніків, альбуміну, альгілату, целюлози і похідних целюлози, колагену, фібрину, желатину, гіалуронової кислоти, олігосахаридів, глікаміногліканів, сульфатованих полісахаридів, їх сумішей і співполімерів. Переважно, цей інгредієнт вибраний із групи, що складається з альбуміну, сахарози, трегалози, лактату, желатину, гідроксипропіл- $\beta$ -циклодекстрину, метокси поліетиленгліколю і поліетиленгліколю. Інший варіант здійснення стосується способу лікування ссавця, який включає стадію введення ссавцю ефективної кількості вищеописаної композиції.

Винахід також стосується фармацевтичної композиції, яка містить зв'язувальний білок, конструкцію антитіла або кон'югат антитіла, описані вище, і фармацевтично прийнятний носій. У ще одному варіанті здійснення фармацевтична композиція містить щонайменше один додатковий терапевтичний засіб для лікування порушення, в якому активність IL-13 впливає на здоров'я. Переважно, додатковий засіб вибраний із групи, що складається з терапевтичного засобу, агента візуалізації, цитотоксичного агента, інгібіторів ангиогенезу (у тому числі, але не тільки, анти-VeGF-антитіл або VEGF-пастки); інгібіторів кіназ (у тому числі, але не тільки, KDR- і TIE-2-інгібіторів); блокаторів костимулюючих молекул (у тому числі, але не тільки, анти-B7.1,

анти-B7.2, CTLA4-Ig, анти-CD20); блокаторів адгезійних молекул (у тому числі, але не тільки, анти-LFA-1-Ab, анти-E/L-селектин-Ab, інгібіторів з малою молекулою); анти-цитокін-антитіла або його функціонального фрагмента (у тому числі, але не тільки, антитіл анти-IL-18, анти-TNF, анти-IL-6/рецептор цитокіну); метотрексату; циклоспорину; рапаміцину; FK506; детектованої мітки або репортера; антагоніста TNF; протиревматичного засобу; міорелаксantu, наркотичного агента, нестероїдного протизапального засобу (NSAID), анальгезуючого засобу, анестетика, седативного засобу, місцевого анестетика, нейром'язового блокатора, протимікробного засобу, антипсоріатичного засобу, кортикостероїду, анаболічного стероїду, еритропоетину, імунізуючого агента, імуноглобуліну, імуносупресуючого засобу, гормону росту, гормонозаміщувального лікарського засобу, радіофармацевтичного засобу, антидепресанту, антипсихотичного засобу (нейролептика), стимулятора, лікарського засобу для астми, бета-агоніста, інгальованого стероїду, епінефрину або аналога епінефрину, цитокіну й антагоніста цитокіну.

В іншому аспекті винахід стосується способу інгібування активності IL-13, який включає контактування IL-13 людини з вищеописаним зв'язувальним білком, при якому інгібується активність IL-13. В іншому аспекті винахід стосується способу інгібування активності IL-13 людини у індивіда-людини, що страждає від порушення, пов'язаного з активністю IL-13, який включає введення цьому індивіду вищеописаного зв'язувального білка, при цьому активність IL-13 людини у індивіда інгібується, і відбувається лікування.

В іншому аспекті винахід стосується способу лікування (наприклад, лікування, супресії, ослаблення, затримки або профілактики появи або запобігання повторюваності або рецидиву) або профілактики IL-13-опосередкованого порушення у індивіда. Спосіб передбачає введення індивіду IL-13-зв'язувального агента (зокрема, антагоніста); наприклад, анти-IL-13-антитіл а або його фрагмента, описаних у даному описі, у кількості, достатній для лікування або попередження IL-13-опосередкованого порушення. Цей антагоніст IL-13, наприклад, анти-IL-13-антитіло або його фрагмент, може бути введений цьому індивіду окремо або в комбінації з іншими терапевтичними схемами, як описано в даному описі.

В одному з варіантів здійснення індивідом є свавець, наприклад людина, що страждає одним або декількома IL-13 порушеннями, які включають, наприклад, респіраторні порушення, наприклад астму (наприклад алергічну і неалергічну астму), хронічну обструктивну хворобу легенів (COPD, ХОХЛ) і інші стани, що включають запалення дихальних шляхів, еозинофілію, фіброз і надлишкове продукування слизу; atopічні порушення (наприклад, atopічний дерматит і алергійний риніт); запальні і/або аутоімунні стани шкіри, шлунково-кишкових органів (наприклад, запальних захворювань травного тракту (IBD), таких як виразковий коліт і/або хвороба Крона), і печінки (наприклад, цирозу, фіброзу); склеродермії; пухлини або ракові пухлини, наприклад лімфому Ходжкіна, як описано в даному описі. Таким чином, винахід стосується застосування IL-13-зв'язувального агента (такого як анти-IL-13-антитіло або його фрагмент, описані в даному описі) для описаного лікування і застосування IL-13-зв'язувального агента (такого як анти-IL-13-антитіло або його фрагмент, описані в даному описі) для одержання лікарського засобу для описаного лікування. Приклади IL-13-опосередкованих захворювань включають, але не обмежуються ними, порушення, вибране з одного або декількох з: респіраторних порушень (наприклад астми (наприклад алергічної і неалергічної астми (наприклад астми внаслідок інфікування, наприклад, респіраторним синцитіальним вірусом (RSV), наприклад, у дітей малого віку)), хронічної обструктивної хвороби легенів (COPD, ХОХЛ) і інших станів, що включають запалення дихальних шляхів, еозинофілію, фіброз і надлишкове продукування слизу, наприклад, муковісцидоз і пневмофіброз; atopічних порушень, наприклад, які походять зі збільшеної чутливості до IL-13 (наприклад, atopічного дерматиту, кропивниці, екземи, алергійного риніту й алергійного ентерогастриту); запальних і/або аутоімунних станів шкіри (наприклад, atopічного дерматиту), шлунково-кишкових органів (наприклад, запальних захворювань травного тракту (IBD), таких як виразковий коліт і/або хвороба Крона), печінки (наприклад, цирозу, гепатоцелюлярної карциноми) і склеродермії; пухлин або ракових пухлин (наприклад, м'якої тканини або солідних пухлин), таких як лейкоз, гліобластома і лімфома, наприклад, лімфома Ходжкіна; вірусних інфекцій (наприклад, з HTLV-1); фіброзу інших органів, наприклад, фіброзу печінки (наприклад, фіброзу, викликаного вірусом гепатиту В і/або С); і супресії прояву імунних реакцій захисного типу 1 (наприклад, під час вакцинації), як описано в даному описі.

В інших варіантах здійснення винахід стосується способу лікування (тобто зменшення, ослаблення) або профілактики одного або декількох симптомів, пов'язаних з респіраторним порушенням, наприклад, астмою (наприклад, алергічною і неалергічною астмою); алергіями; хронічною обструктивною хворобою легенів (COPD, ХОХЛ); станом, що включає запалення дихальних шляхів, еозинофілію, фіброз і надлишкове продукування слизу, наприклад,

муковісцидозом і пневмофіброзом. Наприклад, симптоми астми включають, але не обмежуються ними, подих, що свистить, задишку, бронхостеноз, гіперреактивність дихальних шляхів, зменшену ємність легенів, фіброз, запалення дихальних шляхів і продукування слизу. Спосіб включає введення цьому індивіду антагоніста IL-13, наприклад, IL-13-антитіла або його

5 фрагмента, у кількості, достатній для лікування (наприклад, зменшення, ослаблення) або профілактики одного або декількох симптомів. IL-13-антитіло можна вводити терапевтично або профілактично або обома способами. Антагоніст IL-13, наприклад, анти-IL-13-антитіло або його фрагмент, можна вводити індивіду окремо або в поєднанні з іншими терапевтичними режимами, як описано в даному описі. Переважно, індивідом є ссавець, наприклад людина, що

10 страждає IL-13-опосередкованим порушенням, описаним у даному описі.

В іншому аспекті винахід стосується способу детекції IL-13 у пробі *in vitro* (наприклад, біологічній пробі, такій як сироватка, плазма, тканина, біопсія). Розглянутий спосіб може бути використаний для діагностики порушення, наприклад, пов'язаного з імунними клітинами порушення. Спосіб передбачає: (i) контактування проби або контрольної проби з анти-IL-13-антитілом або його фрагментом, описаними в даному описі; і (ii) детектування утворення

15 комплексу між анти-IL-13-антитілом або його фрагментом і пробю, або контрольною пробю, причому статистично значуща зміна в утворенні комплексу в пробі відносно контрольної проби є показником наявності IL-13 у цій пробі.

Ще в одному аспекті винахід стосується способу детекції IL-13 *in vivo* (наприклад, візуалізації *in vivo* в індивіді). Розглянутий спосіб може бути використаний для діагностики порушення, наприклад, IL-13-опосередкованого порушення. Спосіб включає: (i) введення анти-IL-13-антитіла або його фрагмента, описаних у даному описі, індивіду або контрольному індивіду в умовах, при яких можливе зв'язування антитіла або фрагмента з IL-13; і (ii) детектування комплексу між анти-IL-13-антитілом або його фрагментом і IL-13, причому

20 статистично значуща зміна в утворенні комплексу в індивіда відносно контрольного індивіда є показником наявності IL-13.

В іншому аспекті зв'язувальні білки винаходу можна використовувати для лікування порушення, вибраного з групи, яка складається з артриту, остеоартриту, ювенільного хронічного артриту, септичного артриту, артриту Лайма, псоріатичного артриту, реактивного артриту, спондилоартропатії, системного червоного вовчака, хвороби Крона, виразкового коліту, запального захворювання травного тракту, інсулінозалежного цукрового діабету, тиреоїдиту, астми, алергійних захворювань, псоріазу, дерматиту, склеродермії, реакції трансплантат проти хазяїна, відторгнення трансплантованого органа, гострого або хронічного імунного захворювання, пов'язаного з трансплантацією органа, саркоїдозу, атеросклерозу,

30 дисемінованого внутрішньосудинного згортання, хвороби Кавасакі, хвороби Грейвса, нефротичного синдрому, синдрому хронічної втоми, гранулематозу Вегенера, пурпури Шенлейна-Геноха, мікроскопічного васкуліту нирок, хронічного активного гепатиту, увеїту, септичного шоку, синдрому токсичного шоку, синдрому сепсису, кахексії, інфекційних захворювань, паразитарних захворювань, синдрому набутого імунodefіциту, гострого поперечного мієліту, хореї Хантінгтона, хвороби Паркінсона, хвороби Альцгеймера, інсульту, первинного біліарного цирозу, гемолітичної анемії, злоякісностей, серцевої недостатності, хвороби Адісона, спорадичної, пльюригландулярної недостатності типу I і пльюригландулярної недостатності типу II, синдрому Шмітта, (гострого) дистрес-синдрому дорослих, алопеції, гніздової (осередкової) алопеції, серонегативної артропатії, артропатії, хвороби Рейтера, псоріатичної артропатії, пов'язаної з виразковим колітом артропатії, ентеропатичного синовіту, пов'язаної з хламідією, ієрсинією і сальмонелюю артропатії, спондилоартропатії, атероматозного захворювання/артеріосклерозу, атонічної алергії, аутоімунного бульозного захворювання, звичайної пухирчатки, листовидної пухирчатки, лінійного IgA-захворювання, аутоімунної гемолітичної анемії, Кумбс-позитивної гемолітичної анемії, набутої пеніційозної

45 анемії, ювенільної пеніційозної анемії, міалгічного енцефаліту/британського міалгічного енцефаліту, кандидозу, що уражає шкіру і слизові оболонки, гігантоклітинного артеріїту, первинного склерозуючого гепатиту, криптогенного аутоімунного гепатиту, набутого синдрому імунodefіциту, родинних захворювань набутого імунodefіциту, гепатиту В, гепатиту С, варіабельного некласифікованого імунodefіциту (варіабельної некласифікованої гіпогаммаглобулінемії), дилатаційної (застійної) кардіоміопатії, жіночої безплідності, порушення функції яєчників, передчасного порушення функції яєчників, фібротичного захворювання легенів, криптогенного фіброзуючого альвеоліту, постзапального інтерстиціального захворювання легенів, інтерстиціального пневмоніту, пов'язаного з захворюванням сполучної тканини інтерстиціального легеневого захворювання, пов'язаного з ревматоїдним артритом

60 інтерстиціального легеневого захворювання, пов'язаного із системним червоним вовчаком

інтерстиціального легеневого захворювання, пов'язаного з дерматоміозитом/поліміозитом легеневого захворювання, пов'язаного з хворобою Шегрена легеневого захворювання, пов'язаного з анкілозуючим спондилітом легеневого захворювання, васкулітного дифузійного легеневого захворювання, пов'язаного з гемосидерозом легеневого захворювання, індукованого лікарським засобом інтерстиціального легеневого захворювання, фіброзу, променевого фіброзу, облітеруючого (констриктивного) бронхіоліту, хронічної еозинофільної пневмонії, лімфоцитарного інфільтративного легеневого захворювання, постінфекційного інтерстиціального легеневого захворювання, подагричного артриту, аутоімунного гепатиту, аутоімунного гепатиту типу 1 (класичного аутоімунного або вовчакового гепатиту), аутоімунного гепатиту типу 2 (гепатиту з анти-LKM-антитілом), аутоімунно опосередкованої гіпоглікемії, інсулінорезистентності типу В з чорним акантозом, гіпопаратиреоїдизму, гострого імунного захворювання, пов'язаного з трансплантацією органів, хронічного імунного захворювання, пов'язаного з трансплантацією органів, остеоартрозу, первинного склерозуючого холангіту, псоріазу типу 1, псоріазу типу 2, ідіопатичної лейкопенії, аутоімунної нейтропенії, ренального захворювання NOS (БДУ), гломерулонефриту, мікроскопічного васкуліту нирок, хвороби Дайма, дискоїдного червоного вовчака, чоловічої безплідності, ідіопатичного або NOS (БДУ), аутоімунності сперми, розсіяного склерозу (усіх типів), симпатичної офтальмії, легеневої гіпертензії, вторинної відносно захворювання сполучної тканини, синдрому Гудпасчера, легеневої маніфестації нодозного поліартеріїту, гострої ревматичної лихоманки, ревматоїдного спондиліту, хвороби Стілла, системного склерозу, синдрому Шегрена, хвороби Такаюсу/артеріїту, аутоімунної тромбоцитопенії, ідіопатичної тромбоцитопенії, аутоімунного тиреоїдного захворювання, гіпертиреозу, зобного аутоімунного гіпотиреозу (хвороби Хашімото), атрофічного аутоімунного гіпотиреозу, первинної мікседеми, факоантигенного увеїту, первинного васкуліту, захворювання печінки з осередковою пігментацією шкіри (вітиліго), хронічних захворювань печінки, алкогольного цирозу, індукованого алкоголем ушкодження печінки, холеостеатозу, ідіосинкратичного захворювання печінки, індукованого лікарським засобом гепатиту, неалкогольного стеатогепатиту, алергії й астми, інфекції стрептококів групи В (GBS), психічних порушень (наприклад, депресії і шизофренії), опосередкованих Th2 і Th1 захворювань, гострого і хронічного болю (різних форм болю) і ракових захворювань, таких як рак легенів, молочної залози, шлунка, сечового міхура, ободової кишки, підшлункової залози, яєчника, передміхурової залози, ректального раку і гематопоетичних злоякісностей (лейкозу і лімфоми), абеталіпопротеїнемії, акроціанозу, гострих і хронічних паразитарних або інфекційних процесів, гострого лейкозу, гострого лімфобластного лейкозу (ALL), гострого мієлобластного лейкозу (AML), гострої або хронічної бактеріальної інфекції, гострого панкреатиту, гострої ниркової недостатності, аденокарцином, атріального ектопічного ритму, комплексу СНІД-деменції, індукованого алкоголем гепатиту, алергійного кон'юнктивіту, алергійного контактного дерматиту, алергійного риніту, відторгнення трансплантата, недостатності альфа-1-антитрипсину, аміотрофічного бічного склерозу, анемії, стенокардії, дегенерації клітин переднього рога, анти-CD3-терапії, антифосфоліпідного синдрому, реакцій гіперчутливості проти рецептора, аневризм аорти і периферичних аневризм, розшаровуючої аневризми аорти, артеріальної гіпертензії, артеріосклерозу, артеріовенозного свища, атаксії, мерехтливої аритмії (атріальної фібриляції) (підтримуваної або пароксизмальної), тріпотіння передсердь, атривентрикулярної блокади, В-клітинної лімфоми, відторгнення кісткового трансплантата, відторгнення трансплантата кісткового мозку (BMT), блокади ніжки пучка Гіса, лімфоми Беркїтта, опіків, серцевих аритмій, синдрому тимчасової зупинки серця, пухлин серця, кардіоміопатії, запальної реакції при екстракорпоральному кровообігу, відторгнення трансплантата хряща, мозочкових кортикальних дегенерацій, мозочкових порушень, хаотичної або багатоосередкової передсердної тахікардії, пов'язаних з хіміотерапією порушень, хронічного мієлоцитарного лейкозу (CML), хронічного алкоголізму, хронічних запальних патологій, хронічного лімфоцитарного лейкозу (CLL), хронічної обструктивної хвороби легенів (COPD, ХОХЛ), хронічної інтоксикації саліцилатом, колоректальної карциноми, застійної серцевої недостатності, кон'юнктивіту, контактного дерматиту, легеневого серця (cor pulmonale), захворювання коронарної артерії, хвороби Крейтцфельдта-Якоба, культура-негативного сепсису, муковісцидозу, пов'язаних з терапією цитокінами порушень, деменції боксерів, демієлінізуючих захворювань, геморагічної лихоманки Денге, дерматиту, дерматологічних станів, діабету, цукрового діабету, діабетичного атеросклеротичного захворювання, хвороби з дифузійними тільцями Леві, дилатаційної застійної кардіоміопатії, порушень базальних ядер, синдрому Дауна в середньому віці, індукованих лікарським засобом порушень руху, які блокують рецептори допаміну ЦНС, чутливості до лікарських засобів, екземи, енцефаломієліту, ендокардиту, ендокринопатії, епіглотиту, інфекції вірусу Епштейна-Барр, еритро мелалгії,



екстрапірамідних і мозочкових порушень, сімейного гематофагоцитарного лімфогістіоцитозу, фетального відторгнення імплантата виличкової залози (тимуса), атаксії Фридрейха, функціональних периферичних артеріальних порушень, грибкового сепсису, газової гангрені, виразки шлунка, гломерулярного нефриту, відторгнення трансплантата будь-яких органа або

5 тканини, грамнегативного сепсису, грампозитивного сепсису, гранулом унаслідок внутрішньоклітинних організмів, ретикулоендотеліозу, хвороби Халлеродена-Шпатца, тиреоїдиту Хашімото, сінної лихоманки, відторгнення трансплантата серця, гемохроматозу, гемодіалізу, гемолітичного уремичного синдрому/тромболітичної тромбоцитопенічної пурпури, кровотечі, гепатиту (А), аритмії пучків Гіса, ВІЛ-інфекції/ВІЛ-невропатії, хвороби Ходжкіна,

10 гіперкінетичних порушень рухів, реакцій гіперчутливості, гіперчутливого пневмоніту, гіпертензії, гіпокінетичних порушень рухів, оцінки системи гіпоталамус-гіпофіза-надниркових залоз, ідіопатичної хвороби Адісона, ідіопатичного пневмофіброзу, опосередкованої антитілом цитотоксичності, астенії, дитячої спінально-м'язової атрофії, запалення аорти, грипу А, впливу іонізуючою радіацією, іридоцикліту/uveїту/ретробульбарного невриту, ішемічного-

15 реперфузійного ушкодження, ішемічного інсульту, ювенільного ревматоїдного артриту, ювенільної спінально-м'язової атрофії, саркоми Капоші, відторгнення трансплантата нирки, хвороби легіонерів, лейшманіозу, прокази, ушкоджень кортикоспінальної системи, ліподемії, відторгнення трансплантата печінки, лімфедми, малярії, злоякісної лімфоми, злоякісного гістіоцитозу, злоякісної меланоми, менінгіту, менінгококемії, метаболічної/ідіопатичної мігрені-

20 головного болю, порушення мітохондріальної мультисистеми, захворювання змішаної сполучної тканини, моноклональної гаммапатії, множинної мієломи, дегенерації множинних систем (Менцеля-Томаса Ши-Дрегепа і Махаді-Жозефа), важкої псевдопаралітичної міастенії, *Mycobacterium avium intracellulare*, *Mycobacterium tuberculosis*, мієлопластичного синдрому, інфаркту міокарда, ішемічних порушень міокарда, носоглоткового раку, неонатального

25 хронічного захворювання легенів, нефриту, нефрозу нейродегенеративних захворювань, нейрогенних м'язових атрофій I, нейтропенічної лихоманки, неходжкінської лімфоми, оклюзії черевної аорти і її відгалужень, оклюзійних артеріальних порушень, окт3-терапії, орхіту/епідідиміту, процедур анулювання орхіту/вазектомії, органомегалії, остеопорозу, відторгнення трансплантата підшлункової залози, раку підшлункової залози,

30 паранеопластичного синдрому/гіперкальціємії злоякісності, відторгнення трансплантата парацистовидної залози, запального захворювання тазової порожнини, хронічного алергічного риніту, захворювання перикарда, периферичного атеросклеротичного захворювання, периферичних судинних захворювань, перитоніту, перніціозної анемії, пневмонії, викликаной *Pneumocystis carinii*, пневмонії, синдрому ROEMS (поліневропатії, органомегалії, ендокринопатії,

35 моноклональної гаммапатії і синдрому змін шкіри), постперфузійного синдрому, постгемодіалізного синдрому, синдрому пост-МІ-кардіотомії, прееклампсії, прогресуючого супрануклеарного паралічу, первинної легеневої гіпертензії, променевої терапії, феномену і захворювання Рейно, хвороби Рефсума, регулярної тахікардії з вузьким QRS, вазоренальної

40 гіпертензії, реперфузійного ушкодження, рестриктивної кардіоміопатії, сарком, склеродермії, сенільної хорей, сенільної деменції, що розвивається при хворобі дифузійних тілець Леві, серонегативних артропатій, шоку, серпоподібноклітинної анемії, відторгнення шкірного трансплантата, синдрому змін шкіри, відторгнення трансплантата тонкої кишки, солідних пухлин, конкретних аритмій, спінальної атаксії, спінально-мозочкових дегенерацій, стрептококового міозиту, структурних ушкоджень мозочка, підгострого склерозуючого

45 паненцефаліту, синкопі (непритомності), сифілісу серцево-судинної системи, системної анафілаксії, синдрому системної запальної реакції, ревматоїдного артриту системного прояву, Т-клітинного або FAB ALL, телеангіектазії, облітеруючого тромбангіїту, тромбоцитопенії, токсичності, трансплантатів, травми/кровотечі, реакцій гіперчутливості типу III, реакцій гіперчутливості типу IV, нестабільної стенокардії, уремії, уросепсису, кропивниці, клапанних

50 захворювань серця, варикозних вен, васкуліту, венозних захворювань, венозного тромбозу, фібриляції шлуночків, вірусних і грибкових інфекцій, енцефаліту/асептичного менінгіту, що загрожує життю, гемофагоцитарного синдрому, що загрожує життю, синдрому Верніке-Козакова, хвороби Вільсона, відторгнення трансплантата будь-яких органа або тканини, гострих коронарних синдромів, гострого ідіопатичного поліневриту, гострої запальної демієлінізуючої

55 полірадикулоневропатії, гострої ішемії, хвороби Стіла дорослих, гніздової (осередкової) алопеції, анафілаксії, синдрому антифосфоліпідних антитіл, апластичної анемії, артеріосклерозу, атопічної екземи, атопічного дерматиту, аутоімунного дерматиту, аутоімунного порушення, пов'язаного з інфекцією *Streptococcus*, аутоімунної ентеропатії, аутоімунної втрати слуху, аутоімунного лімфопроліферативного синдрому (ALPS), аутоімунного міокардиту,

60 аутоімунного передчасного угасання функції яєчника, блефариту, бронхоектазу, бульозної

пухирчатки, серцево-судинного захворювання, гострого антифосфоліпідного синдрому, глютенної ентеропатії (спру), шийного спондилозу, хронічної ішемії, рубцевої пухирчатки, клінічно виділеного синдрому (CIS) з ризиком розсіяного склерозу, кон'юнктивіту, прояву психіатричного порушення у дітей, хронічної обструктивної хвороби легенів (COPD, ХОХЛ), дакриоцистити, дерматоміозиту, діабетичної ретинопатії, цукрового діабету, грижі міжхребцевого диска, пролапсу грижі, індукованої лікарським засобом імунної гемолітичної анемії, ендокордиту, ендометріозу, ендодфальміту, епісклериту, багатоформної (ексудативної) еритеми, великої багатоформної еритеми, гестаційної пухирчатки, синдрому Гійєна-Барре (GBS), сінної лихоманки, синдрому Hughes, ідіопатичної хвороби Паркінсона, ідіопатичної інтерстиціальної пневмонії, IgE-опосередкованої алергії, імунної гемолітичної анемії, міозиту з тільцями включень, інфекційного очного запального захворювання, запального демієлінізуючого захворювання, запального захворювання серця, запального захворювання нирок, IPF/UIP, іриту, кератиту, сухого кератокон'юнктивіту, хвороби Кусмауля або хвороби Кусмауля-Мейєра, паралічу Ландри, гістіоцитозу клітин Лангерганса, ретикулярного ліведо, дегенерації жовтої плями, мікроскопічного поліангіїту, хвороби Бехтерева; порушень мотонейронів, пухирчатки слизової оболонки, порушень функцій множинних органів, важкої псевдопаралітичної міастенії, мієлодиспластичного синдрому, міокардиту, порушень нервових закінчень, невротії, гепатиту ні А, ні В, неврити зорового нерва (ретробульбарного неврити), остеолізу, ювенільного ревматоїдного артрити (JRA) з малою кількістю уражених суглобів, оклюзивного захворювання периферичних артерій (PAOD), захворювання периферичних судин (PVD), захворювання периферичних артерій (PAD), флебіту, нодозного поліартеріїту (або нодозного періартеріїту), поліхондриту, ревматичної поліміалгії (PMR), постгемодіалізного синдрому, первинного паркінсонізму, простатиту, істинної еритроцитарної аплазії, первинної недостатності надниркових залоз, рецидивуючого нейромієліту зорового нерва, рестенозу, ревматичного захворювання серця, SAPHO (синовіту, акне, пустульозу, гіперостозу й остеїту), склеродермії, вторинного амілоїдозу, синдрому шокової легені, склериту, ішіалгії, вторинної недостатності надниркових залоз, кремній-пов'язаної хвороби сполучної тканини, синдром Снедона-Уілкінсона, анкілозуючого спондиліту, синдрому Стевенса-Джонсона (SJS), синдрому системної запальної реакції, артеріїту скроневих артерій, токсоплазмозного ретиніту, токсичного епідермального некролізу, поперечного мієліту, TRAPS (рецептора фактора некрозу пухлин, алергійної реакції типу I, діабету типу II, кропивниці), звичайної інтерстиціальної пневмонії (UIP), васкуліту, весняного кон'юнктивіту, синдрому Фогта-Коянагі-Харада (синдрому VKH), вологої дегенерації жовтої плями і загоєння ран.

В іншому аспекті зв'язувальні білки даного винаходу застосовні для лікування порушення, вибраного з групи, що складається з гострого лімфобластного лейкозу, гострого мієлоїдного лейкозу, адренокортикальної карциноми, анального раку, раку апендикса, мозочкової астроцити, церебральної астроцити, базальноклітинної карциноми, запечінкового раку жовчних проток, раку сечового міхура, раку кістки, остеосаркоми/злоякісної фіброзної гістіоцити/гліоми стовбура головного мозку, пухлини головного мозку, гліоми стовбура головного мозку, церебральної астроцити/злоякісної гліоми, епендимом, медулобластоми, супратенторіальних недиференційованих нейроектодермальних пухлин, гліом зорового шляху і гіпоталамічних гліом, раку молочної залози, бронхіальних аденом/карциноїдів, карциноїдної пухлини, шлунково-кишкового раку невідомого походження, лімфоми центральної нервової системи, первинної мозочкової астроцити, раку шийки матки, хронічного лімфоцитарного лейкозу, хронічного мієлогенного лейкозу, хронічних мієлопроліферативних порушень, раку ободової кишки, колоректального раку, шкірної Т-клітинної лімфоми, ендометріального раку, епендимом, раку стравоходу, сімейства пухлин Евінга, екстракраніальної герміноми (ембріонально-клітинної пухлини), екстрагонадної герміноми, позапечінкового раку жовчних проток, очного раку, внутрішньоочної меланоми/ретинобластоми, раку жовчного міхура, раку шлунка, карциноїдної пухлини шлунково-кишкового тракту, стромальної пухлини шлунково-кишкового тракту (GIST), екстракраніальної герміноми, екстрагонадної герміноми, герміноми яєчника, гестаційної трофобластної пухлини, гліоми, гліоми головного мозку, церебральної астроцити/гліоми, гліоми зорового шляху і гіпоталамуса дітей, ретикулоендотеліозу, раку голови і шиї, гепатоцелюлярного раку, лімфоми Ходжкіна, гіпофарингеального раку, внутрішньоочної меланоми, карциноми острівцевих клітин (ендокринної підшлункової залози), саркоми Капоші, раку нирки, ларингеального раку, гострого лімфобластного лейкозу, гострого мієлоїдного лейкозу, хронічного лімфоцитарного лейкозу, ретикулоендотеліозу, раку губ і порожнини рота, раку печінки, недрібноклітинного раку легені, дрібноклітинного раку легені, СНІД-пов'язаної лімфоми, лімфоми Беркіта, шкірної Т-клітинної лімфоми, лімфоми Ходжкіна, неходжкінської лімфоми, первинної лімфоми центральної нервової системи, макроглобулінемії

Вальденстрома, злоякісної фіброзної гістіоцитоми кістки/остеосаркоми, медулобластоми, меланоми, внутрішньоочної меланоми, раку з клітин Меркеля, злоякісної мезотеліоми, метастатичного плоскоклітинного раку шиї зі схованим первинним походженням, раку порожнини рота, синдрому множинної ендокринної неоплазії, множинної мієломи/неоплазми плазматичних, викликаної грибками саркоми шкіри, мієлодиспластичних синдромів, мієлодиспластичних/мієлопроліферативних синдромів, мієлогенного лейкозу, хронічного мієлоїдного лейкозу, множинної мієломи, мієлопроліферативних порушень, раку носової порожнини й навколоносових пазух, раку носоглотки, нейробластоми, орального раку, раку порожнини рота, раку губ і носоглотки, остеосаркоми/злоякісної волокнистої гістіоцитоми кістки, раку яєчника, епітеліального раку яєчника, герміноми яєчника, потенційної пухлини яєчника з низькою злоякісністю, раку підшлункової залози, раку панкреатичних острівцевих клітин, раку навколоносових пазух і порожнини носа, раку паращитовидної залози, раку статевого члена, фарингеального раку, феохромоцити, пінеобластоми і супратенторіальних недиференційованих нейроектодермальних пухлин, пухлини гіпофіза, неоплазми плазматичних/множинної мієломи, плевропульмональної бластоми, раку передміхурової залози, ректального раку, нирковаклітинного раку, раку ниркової миски і сечоводу, перехідноклітинного раку, ретинобластоми, раку слинних залоз, саркоми, пухлин сімейства Евінга, саркоми Капоші, саркоми м'яких тканин, саркоми матки, синдрому Сезарі, раку шкіри (немеланоми), раку шкіри (меланоми), карциноми клітин Меркеля, раку тонкої кишки, плоскоклітинного раку, метастатичного плоскоклітинного раку шиї з прихованим первинним походженням, раку шлунка, супратенторіальних недиференційованих нейроектодермальних пухлин, шкірної Т-клітинної лімфоми, раку яєчок, раку глотки, тимом, тимом і тимічної карциноми, раку щитовидної залози, перехідноклітинного раку ниркової миски і сечоводу, гестаційної трофобластної пухлини сечоводу і ниркової миски, перехідноклітинного раку, раку сечовипускального каналу, раку матки, саркоми ендометрія матки, раку вагіни, гліоми зорового шляху і гіпоталамуса, раку вульви, макроглобулінемії Вальденстрома, пухлини Вільмса.

В іншому аспекті даний винахід забезпечує спосіб лікування пацієнта, що страждає від порушення, в якому IL-13 людини є шкідливим для здоров'я, який передбачає стадію введення будь-якого із зв'язувальних білків, описаних вище, до, одночасно або після введення другого агента, як обговорювалося вище. У переважному варіанті здійснення додатковий терапевтичний агент, що може вводиться одночасно і/або може бути приготовлений з одним або декількома антагоністами IL-13 (наприклад, анти-IL-13-антитілами або їх фрагментами), включає, але не обмежується ними, один або декілька з: інгальованих стероїдів; стероїдів, що вводяться перорально; бета-агоністів, наприклад, короткостроково діючих або довгостроково діючих бета-агоністів; антагоністів лейкотриєнів або рецепторів лейкотриєнів; комбінованих лікарських засобів, таких як ADVAIR; інгібіторів IgE, наприклад, анти-IgE-антитіл (наприклад, XOLAIR); інгібіторів фосфодієстерази (наприклад, інгібіторів PDE4); ксантинів; антихолінергічних лікарських засобів; стабілізуючих мастоцити агентів, таких як кромолін; інгібіторів IL-4; інгібіторів IL-5; інгібіторів еотаксину/CCR3; антагоністів гістаміну або його рецепторів, що включають H1, H2, H3 і H4, і антагоністів простагландину D або його рецепторів (DP1 і CRTH2). Такі комбінації можуть бути використані для лікування астми й інших респіраторних порушень. Додаткові приклади терапевтичних агентів, що можуть бути спільно введені або приготовлені разом з одним або декількома анти-IL-13-антитілами або їх фрагментами, включають один або декілька з: антагоністів TNF (наприклад, розчинного фрагмента TNF-рецептора, наприклад, p55 або p75 рецептора TNF людини або його похідних, наприклад, TNFR-IgG з розміром 75 кДа (злитий білок з розміром 75 кДа TNF-рецептор-IgG, ENBREL)); антагоністи TNF-ферменту, наприклад, інгібітори TNF-перетворюючого ферменту (TACE); антагоністи мускаринового рецептора; антагоністи TGF- $\beta$ ; інтерферон гамма; перфенідон; хіміотерапевтичні агенти, наприклад метотрексат, лефлуномід або сиролімум (рапаміцин) або його аналог, наприклад, CCI-779; інгібітори COX2 і cPLA2; NSAID; імуномодулятори; інгібітори p38, TPL-2, MK-2 і інгібітори NF- $\kappa$ B, серед інших. Додатковий другий агент вибраний із групи, що складається з буденосиду, епідермального фактора росту, кортикостероїду, циклоспорину, сульфасалазину, аміносаліцилатів, 6-меркаптопурину, азатіоприну, метронідазолу, інгібіторів ліпоксигенази, мезаламіну, олсалазину, балсалазиду, антиоксидантів, інгібіторів тромбосану, антагоністів IL-1-рецепторів, моноклональних антитіл анти-IL-1 $\beta$ , моноклональних антитіл анти-IL-6, факторів росту, інгібіторів еластази, піридинілімідазольних сполук, антитіл або агоністів TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF і PDGF, антитіл CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 або їх лігандів, метотрексату, циклоспорину, FK506, рапаміцину, мікофеноляту-мофетилу, лефлуноміду, NSAID, ібупрофену, кортикостероїдів, преднізолону,

інгібіторів фосфодіестерази, агоністів аденозину, антитромботичних агентів, інгібіторів комплементу, адренергічних агентів, інгібіторів IRAK, NIK, IKK, p38, MAP-кінази, інгібіторів IL-1 $\beta$ -перетворюючого ферменту, інгібіторів TNF $\alpha$ -перетворюючого ферменту, інгібіторів передачі сигналу Т-клітин, інгібіторів металопротеїнази, сульфасалазину, азатиоприну, 6-меркаптопуринів, інгібіторів ангіотензинперетворювального ферменту, розчинних рецепторів цитокінів, розчинного рецептора TNF p55, розчинного рецептора TNF p75, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, протизапальних цитокінів, IL-4, IL-10, IL-11 і TGF $\beta$ .

У переважному варіанті здійснення описані вище фармацевтичні композиції вводять індивіду щонайменше одним способом, вибраним з парентерального, підшкірного, внутрішньом'язового, внутрішньовенного, внутрішньосуглобного, внутрішньобронхіального, внутрішньочеревного, інтракапсулярного, внутрішньохрящового, внутрішньопорожнинного, інтрацеліального, внутрішньомозочкового, інтрацеребровентрикулярного, всередину товстої кишки, інтрацервікального, внутрішньошлункового, внутрішньопечінкового, інтраміокардіального, внутрішньокісткового, внутрішньочеревинного, інтраперикардіального, інтраперитонеального, інтраплеврального, внутрішньопростатного, внутрішньолегеневого, інтраректального, інтрауретерального, інтраретинального, інтраспінального, інтрасиновіального, інтраоракального, внутрішньоматкового, внутрішньоміхурового, болюсного, вагінального, ректального, букального, сублінгвального, інтраназального і трансдермального способів.

Один з аспектів винаходу стосується щонайменше одного IL-13-антиідіотипічного антитіла, щонайменше одного IL-13-зв'язувального білка згідно з винаходом. Антиідіотипічне антитіло включає будь-який білок - або пептидвмісну молекулу, що містить щонайменше частину молекули імуноглобуліну, таку як, але не тільки, щонайменше одну ділянку, яка визначає компліментарність (CDR) важкого ланцюга або легкого ланцюга або його лігандзв'язувальну частину, варіабельну ділянку важкого ланцюга або легкого ланцюга, константну ділянку важкого ланцюга або легкого ланцюга, каркасну ділянку або їх будь-яку частину, яка може бути включена в зв'язувальний білок згідно з винаходом.

Докладний опис винаходу

Винахід стосується білків, що зв'язують IL-13 людини, зокрема анти-IL-антитіл, або їх антигензв'язувальних частин, що зв'язують IL-13. Різні аспекти винаходу стосуються антитіл і фрагментів антитіл і їх фармацевтичних композицій, а також нуклеїнових кислот, рекомбінантних експресуючих векторів і клітин-хазяїв для одержання таких антитіл і фрагментів. Винахід також стосується способів застосування антитіл згідно з винаходом для детектування IL-13 людини, інгібування активності IL-13 людини, або *in vitro*, або *in vivo*, і регуляції експресії генів.

Якщо не зазначено іншого, наукові і технічні терміни, використовувані в даному винаході, мають значення, загальноприйняті в даній галузі і зрозумілі середньому фахівцю. Однак, слід зазначити, що у випадку будь-якої неясності представлені в даному описі визначення мають перевагу над будь-яким визначенням довідників або сторонніми визначеннями. Далі, якщо контекст не має на увазі іншого, терміни в однині включають множину, а терміни в множині включають однину. У даній заявці "або" означає "і/або", якщо не зазначено іншого. Крім того, використання терміна "який включає", а також інші форми, такі як "включає" і "включали" не є обмежувачими. Такі терміни, як "елемент" і "компонент" включають як елементи і компоненти, що містять одну одиницю, так і елементи і компоненти, що містять більше однієї субоддиниці, якщо немає інших вказівок.

Звичайно номенклатура, використовувана в зв'язку зі способами, і способи культури клітин і тканин, молекулярної біології, імунології, мікробіології, генетики і хімії білків і нуклеїнових кислот і гібридизації, описані в даному описі, є номенклатурами і способами, добре відомими і звичайно використовуваними в даній галузі. Ці методи і способи згідно з винаходом звичайно виконують відповідно до загальноприйнятих способів, добре відомих в даній галузі, описаних в різних загальних і більш конкретних посиланнях, що цитуються й обговорюються у всьому описі, якщо немає інших вказівок. Ферментативні реакції і способи очищення - відповідно до вказівок виробника, як звичайно здійснюється в даній галузі або як описано в даному описі. Номенклатури, використовувані в зв'язку з лабораторними процедурами і способами, і лабораторні процедури і способи аналітичної хімії, синтетичної органічної хімії і медичної і фармацевтичної хімії, описані в даному описі, є номенклатурами і процедурами і способами, добре відомими і звичайно використовуваними в даній галузі. Стандартні способи використовуються для хімічних синтезів, хімічних аналізів, фармацевтичного одержання, приготування і доставки і лікування пацієнтів.

Для кращого розуміння винаходу вибрані терміни визначені нижче.

Термін "поліпептид" стосується в даному контексті будь-якого полімерного ланцюга амінокислот. Терміни "пептид" і "білок" використовуються взаємозамінно з терміном "поліпептид" і також стосуються полімерного ланцюга амінокислот. Термін "поліпептид" включає природні або штучні білки, фрагменти білків і поліпептидні аналоги білкової послідовності.

5 Поліпептид може бути мономерним і полімерним.

Термін "виділений білок" або "виділений поліпептид" означає білок або поліпептид, який внаслідок його походження або джерела деривації не зв'язаний із природно зв'язаними компонентами, що супроводжують його в його природному стані; він по суті не містить інших білків з того ж самого виду; експресується клітиною з виду, що відрізняється; або не існує в природі. Таким чином, поліпептид, який хімічно синтезований або синтезований у клітинній системі, що відрізняється від клітини, з якої він природно походить, буде "виділеним" з його природно зв'язаних компонентів шляхом виділення. Білок може бути також звільнений від природно зв'язаних компонентів виділенням з використанням способів очищення білка, добре відомих в даній галузі.

15 Термін "виділення" стосується в цьому контексті способу одержання хімічної молекули, такої як поліпептид, по суті вільної від природних компонентів, за допомогою виділення, наприклад, з використанням способів очищення білка, добре відомих у даній галузі.

Терміни "IL-13 людини" і "IL-13 людини дикого типу" (скорочуються в даному описі як hIL-13, hIL-13wt) включають у даному контексті цитокін людини, який секретується первинно Т-хелперними клітинами 2. Цей термін включає мономерний поліпептид з розміром 13 кДа. Структура IL-13 людини описана додатково, наприклад, у Moy, Diblasio et al. 2001, J Mol Biol 310 219-30. Передбачається, що термін IL-13 людини включає рекомбінантний IL-13 людини (rhIL-13), що може бути одержаний стандартними способами експресії рекомбінантних білків. У таблиці 1 показана амінокислотна послідовність IL-13 людини, SEQ ID NO:1, яка відома в даній галузі.

Таблиця 1

Послідовність IL-13 людини

Білок	Ідентифікатор послідовності	Послідовність
		12345678901234567890123456789012
IL-13 людини	SEQIDNO:1	MALLTTVIALTCLGGFASPGVPVPSTAL RELTEELVNTTQNQKAPLCNGSMVWSI NLTAGMYCAALESINVSGCSAIEKTQR MLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTEKIEV AQFVKDLLLHLKKLFREGRFN

Термін "варіант IL-13 людини" (скорочуваний в даному описі як hIL-13v), у даному контексті, включає варіант IL-13 людини, в якому амінокислотний залишок 130 SEQ ID NO:1 змінений з аргініну на глутамін (R130Q).

30 "Біологічна активність" означає в даному контексті всі невід'ємні біологічні властивості цього цитокіну. Біологічні властивості IL-13 включають, але не обмежуються цим, зв'язування рецептора IL-13 (інші приклади включають переключення ізотипу імунoglobulinу на ізотип IgE в В-клітинах людини і супресію продукування запальних цитокінів).

35 Терміни "специфічне зв'язування" або "зв'язування специфічно", у даному контексті, при посиланні на взаємодію антитіла, білка або пептиду з другою хімічною молекулою, означають, що ця взаємодія залежить від присутності конкретної структури (наприклад, антигенної детермінанти або епітопа) на цій хімічній молекулі; наприклад, антитіло упізнає специфічну структуру білка і зв'язується зі специфічною структурою білка, а не з білками взагалі. Якщо антитіло є специфічним відносно епітопа "А", присутність молекули, що містить епітоп А (або вільного, неміченого А), у реакції, що містить мічений "А" і це антитіло, буде зменшувати кількість міченого А, зв'язаного з цим антитілом.

45 Термін "антитіло", у даному контексті, стосується в широкому сенсі будь-якої молекули імунoglobulinу (Ig), що складається з чотирьох поліпептидних ланцюгів, двох важких (H) ланцюгів і двох легких (L) ланцюгів, або будь-якого їх фрагмента, мутанта, варіанта або похідного, які містять ознаки зв'язування основного епітопа молекули Ig. Такі формати антитіла, мутант, варіант або похідне відомі в даній галузі. Їх необмежуючі варіанти обговорюються нижче.

У повнорозмірному антитілі кожний важкий ланцюг складається з варіабельної ділянки важкого ланцюга (скорочується в даному описі як HCVR або VH) і константної ділянки важкого ланцюга. Константна ділянка важкого ланцюга складається з трьох доменів, CH1, CH2 і CH3. Кожний легкий ланцюг складається з варіабельної області легкого ланцюга (скорочується в даному описі як LCVR або VL) і константної ділянки легкого ланцюга. Константна ділянка легкого ланцюга складається з одного домену, CL. VH- і VL-області можуть бути додатково підрозділені на ділянки гіперваріабельності, які називаються районами, що визначають комплементарність (CDR), які мають у проміжках між ними каркасні ділянки (FR). Кожна з VH і VL складається з трьох CDR і чотирьох FR, розташованих від амінокінця до карбоксикінця в наступному порядку: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Молекули імуноглобуліну можуть бути будь-якого типу (наприклад, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA і IgY), класу (наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 і IgA2) або підкласу.

Термін "антигензв'язувальна частина" антитіла (або просто "частина антитіла"), у даному контексті, стосується одного або декількох фрагментів антитіла, що зберігають здатність специфічно зв'язуватися з антигеном (наприклад, hIL-13). Було показано, що антигензв'язувальна функція антитіла може виконуватися фрагментами повнорозмірного антитіла. Такі варіанти антитіл можуть бути також біспецифічними, подвійно специфічними або мультиспецифічними форматами, що специфічно зв'язуються з двома або декількома різними антигенами. Приклади зв'язувальних фрагментів, охоплених терміном "антигензв'язувальна частина", включають (i) Fab-фрагмент, моновалентний фрагмент, що складається з доменів VL, VH, CL і CH1; (ii) F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент, двовалентний фрагмент, що містить два Fab-фрагменти, зв'язаних дисульфідним містком у шарнірній області; (iii) Fd-фрагмент, що складається з доменів VH і CH1; (iv) Fv-фрагмент, що складається з доменів VL і VH єдиного плеча антитіла; (v) dAb-фрагмент (Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-546, Winter et al., публікація PCT WO 90/05144 A1, включені в даному описі як посилання), що містить єдиний варіабельний домен; і (vi) виділений район, що визначає комплементарність (CDR). Крім того, хоча ці два домени Fv-фрагменти, VL і VH, кодується різними генами, вони можуть бути з'єднані, з використанням рекомбінантних способів, синтетичним лінкером, який може робити їх єдиним білковим ланцюгом, в якому VL- і VH-області спарюються з утворенням моновалентних молекул (відомих як одноланцюгові Fv (scFv); див., наприклад, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; і Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85:5879-5883). Передбачається, що такі одноланцюгові антитіла також включені в термін "антигензв'язувальна частина" антитіла. Інші форми одноланцюгових антитіл, такі як діатіла, також включені в цей термін. Діатіла є двовалентними, біспецифічними антитілами, в яких VH- і VL-домени експресуються на єдиному поліпептидному ланцюзі, але з використанням лінкера, який є занадто коротким, щоб дозволити спарювання між цими двома доменами на одному і тому ж ланцюзі, що змушує ці домени спарюватися з комплементарними доменами іншого ланцюга і створювати два антигензв'язувальних сайти (дивіться, наприклад, Holliger, P., et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90:6444-6448; Poljak, R.J., et al. (1994) *Structure* 2: 1121-1123). Такі антигензв'язувальні частини відомі в даній галузі (Kontermann and Dubel eds., *Antibody Engineering* (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5)).

Термін "конструкція антитіла" стосується, у даному контексті, поліпептиду, що містить одну або декілька антигензв'язувальних частин даного винаходу, зв'язаних з лінкерним поліпептидом або константним доменом імуноглобуліну. Лінкерні поліпептиди містять один або декілька амінокислотних залишків, з'єднаних пептидними зв'язками, і використовуються для зв'язування однієї або декількох антигензв'язувальних частин. Такі лінкерні поліпептиди добре відомі в даній галузі (див., наприклад, Holliger, P., et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90:6444-6448; Poljak, R.J., et al. (1994) *Structure* 2: 1121-1123). Константним доменом імуноглобуліну називають константний домен важкого або легкого ланцюга. Амінокислотні послідовності константних доменів важкого ланцюга і легкого ланцюга IgG людини відомі в даній галузі і представлені в таблиці 2.

Таблиця 2

Послідовність константного домену важкого ланцюга  
і константного домену легкого ланцюга IgG людини

Білок	Ідентифікатор послідовності	Послідовність
		12345678901234567890123456789012
Константна ділянка Ig гамма-1	SEQ ID NO:2	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
Мутант константної ділянки Ig гамма-1	SEQ ID NO:3	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
Константна ділянка каппа Ig	SEQ ID NO:4	TVAAPSDFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
Константна ділянка лямбда Ig	SEQ ID NO:5	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNK YAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS

- Крім того, антитіло або його антигензв'язувальна частина можуть бути частиною більш великих молекул імуноадгезії, утворених ковалентною або нековалентною асоціацією цього антитіла або антигензв'язувальної частини з одним або декількома іншими білками або пептидами. Приклади таких молекул імуноадгезії включають використання стрептавідину як центрального району для утворення тетрамерної молекули scFv (Kipriyanov, S.M., et al. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6: 93-101) і використання залишку цистеїну, маркерного пептиду і С-кінцевої поліістидинової мітки для одержання бівалентних і біотинільованих молекул scFv (Kipriyanov, S.M., et al. (1994) Mol. Immunol. 31 1047-1058). Частини антитіл, такі як Fab- і F(ab')<sub>2</sub>-фрагменти, можуть бути одержані з повних антитіл з використанням загальноприйнятих способів, таких як розщеплення папаїном або пепсином, відповідно, повних антитіл. Крім того, антитіла, частини антитіл і молекули імуноадгезії можуть бути одержані з використанням стандартних способів рекомбінантних ДНК, описаних у даному описі.

"Виділене антитіло", у даному контексті, означає антитіло, яке по суті не містить інших антитіл, що мають відмінні антигенні специфічності (наприклад, виділене антитіло, що специфічно зв'язує hIL-13, по суті не містить антитіл, які специфічно зв'язують антигени, інші, ніж hEL-13). Однак, виділене антитіло, що специфічно зв'язує hIL-13, може мати перехресну

реактивність з іншими антигенами, такими як молекули IL-13 з інших видів. Крім того, виділене антитіло може не містити іншого клітинного матеріалу і/або хімікаліїв.

Термін "антитіло людини" включає, у даному контексті, антитіла, які мають варіабельні і константні ділянки, вироблені з послідовностей імуноглобуліну зародкової лінії людини. Антитіла людини даного винаходу можуть включати амінокислотні залишки, що не кодуються послідовностями імуноглобулінів зародкової лінії людини (наприклад, мутації, введені випадковим або сайт-специфічним мутагенезом *in vitro*, або соматична мутація *in vivo*), наприклад, у CDR і, зокрема, у CDR3. Однак, передбачається, що термін "антитіло людини", у даному контексті, не включає антитіла, у яких послідовності CDR, одержані з зародкової лінії іншого виду ссавця, наприклад миші, були трансплантовані на каркасні послідовності імуноглобуліну людини.

Термін "рекомбінантне антитіло людини", у даному контексті, включає всі антитіла людини, які одержані, експресовані, утворені або виділені рекомбінантними засобами, такі як антитіла, експресовані з використанням рекомбінантного експресуючого вектора, трансфектованого в клітину-хазяїна (як описано в розділі II С, нижче), антитіла, виділені з рекомбінантної, комбінаторної бібліотеки антитіл людини (Hoogenboom H.R. (1997) TIB Tech. 15:62-70; Azzazy H. and Highsmith W.E. (2002) Clin. Biochem. 35:425-445; Gavilondo J.V. and Larrick J.W. (2002) BioTechniques 29:128-145; Hoogenboom H. and Chames P. (2000) Immunology Today 21:371-378), антитіла, виділені з тварини (наприклад миші), яка є трансгенною відносно генів імуноглобуліну людини (дивіться, наприклад, Taylor, L.D., et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Kellermann S-A. and Green L.L. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13:593-597; Little M. et al. (2000) Immunology Today 21:364-370), або антитіла, одержані, експресовані або виділені будь-яким іншим способом, який включає сплайсинг послідовностей генів імуноглобуліну з іншими ДНК-послідовностями. Такі рекомбінантні антитіла людини мають варіабельні і константні ділянки, які походять з послідовностей імуноглобуліну зародкової лінії людини. Однак, у деяких варіантах здійснення, такі рекомбінантні антитіла людини піддають мутагенезу *in vitro* (або, коли використовують тварин, трансгенних відносно послідовностей Ig людини, соматичному мутагенезу *in vivo*) і, отже, амінокислотні послідовності VH- і VL-областей цих рекомбінантних антитіл є послідовностями, які, хоча вони і вироблені з VH- і VL-послідовностей зародкової лінії людини і є родинними VH- і VL-послідовностям зародкової лінії людини, можуть не існувати в природі в репертуарі антитіл зародкової лінії людини *in vivo*. Один варіант здійснення забезпечує повні антитіла людини, здатні зв'язувати IL-13 людини, які можуть бути генеровані з використанням способів, добре відомих у даній галузі, таких як, але не тільки, використання фагових бібліотек Ig людини, таких як фагові бібліотеки, описані в Jermutus et al., публікація PCT WO 2005/007699 A2.

Термін "химерне антитіло" стосується антитіл, які містять послідовності варіабельних областей важкого і легкого ланцюгів з одного виду і послідовності константних ділянок з іншого виду, такі як антитіла, що мають варіабельні області важкого ланцюга миші, зв'язані з константними областями людини.

Термін "CDR-трансплантоване антитіло" стосується антитіл, які містять послідовності варіабельних областей важкого і легкого ланцюгів з одного виду, але в який послідовності однієї або декількох CDR-областей VH і/або VL замінені послідовностями CDR іншого виду, таким як антитіла, що мають мишачі варіабельні області важкого і легкого ланцюгів, у яких один або декілька мишачих CDR (наприклад CDR3) замінені CDR-послідовностями людини.

Термін "гуманізоване антитіло" стосується антитіл, які містять послідовності варіабельних областей важкого і легкого ланцюгів з виду нелюдини (наприклад миші), але в яких щонайменше частина послідовності VH і/або VL була змінена, щоб бути більш "подібною послідовності людини", тобто більш подібною варіабельним послідовностям зародкової лінії людини. Одним типом гуманізованого антитіла є CDR-трансплантоване антитіло, в якому послідовності CDR людини введені в послідовності VH і VL нелюдини для заміни відповідних послідовностей CDR нелюдини. В одному варіанті здійснення забезпечені гуманізовані антитіла й антигензв'язувальні частини анти-IL-13 людини. Такі антитіла були генеровані для одержання мишачих моноклональних анти-hIL-13-антитіл з використанням традиційної гібридомної технології з наступною гуманізацією за допомогою генної інженерії *in vitro*, наприклад, антитіла, описані в Kasaian et al., публікація PCT WO 2005/123126 A2.

Терміни "нумерація Кабата", "визначення Кабата" і "маркування Кабата" використовуються в даному описі взаємозаміно. Ці терміни, що є визнаними в даній галузі, стосуються системи нумерації амінокислотних залишків, які є більш варіабельними (тобто гіперваріабельними), ніж інші амінокислотні залишки у варіабельних областях важкого і легкого ланцюгів антитіла або його антигензв'язувальної частини (Kabat et al. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391 і Kabat,



E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, публікація NIH 91-3242). Для варіабельної області важкого ланцюга ця гіперваріабельна область знаходиться в діапазоні положень амінокислот 31-35 для CDR1, положень амінокислот 50-65 для CDR2 і положень амінокислот 95-102 для CDR3. Для варіабельної ділянки легкого ланцюга ця гіперваріабельна ділянка знаходиться в діапазоні положень амінокислот 24-34 для CDR1, положень амінокислот 50-56 для CDR2 і положень амінокислот 89-97 для CDR3.

У даному контексті терміни "акцептор" і "акцепторне антитіло" стосуються антитіла, яке забезпечує, або послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує щонайменше 80 %, щонайменше 85 %, щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або 100 % амінокислотних послідовностей однієї або декількох каркасних областей. У деяких варіантах здійснення термін "акцептор" стосується амінокислотної послідовності антитіла або послідовності нуклеїнової кислоти антитіла, яка забезпечує або кодує одну або декілька константних ділянок. Ще в одному варіанті здійснення термін «акцептор» стосується амінокислотної послідовності антитіла або послідовності нуклеїнової кислоти антитіла, яка забезпечує або кодує одну або декілька каркасних ділянок і константних областей. У конкретному варіанті здійснення термін "акцептор" стосується амінокислотної послідовності антитіла або послідовності нуклеїнової кислоти антитіла, яка забезпечує або кодує щонайменше 80 %, переважно щонайменше 85 %, щонайменше 90 %, щонайменше 95 %, щонайменше 98 % або 100 % амінокислотних послідовностей однієї або декількох каркасних ділянок. Відповідно до цього варіанта здійснення акцептор може містити щонайменше 1, щонайменше 2, щонайменше 3, щонайменше 4, щонайменше 5 або щонайменше 10 амінокислотних залишків, які не зустрічаються в одному або декількох положеннях антитіла людини. Акцепторна каркасна область і/або константна ділянка (константні ділянки) можуть бути, наприклад, вироблені або одержані з гена антитіла зародкової лінії, зрілого гена антитіла, функціонального антитіла (наприклад, антитіл, добре відомих у даній галузі, антитіл, що знаходяться в розробці, або антитіл, доступних комерційно).

У даному контексті термін "CDR" стосується ділянки, що визначає комплементарність, у варіабельних послідовностях антитіл. Наявні три CDR у кожній з варіабельних областей важкого ланцюга і легкого ланцюга, що названі CDR1, CDR2 і CDR3, для кожної з варіабельних областей. Термін "набір CDR" стосується в даному контексті групи з трьох CDR, які присутні в єдиній варіабельній області, здатній зв'язувати антиген. Точні границі цих CDR визначаються по-різному відповідно до різних систем. Система, описана Кабатом (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991))), не тільки забезпечує недвозначну систему нумерації, застосовну до будь-якої варіабельної області антитіла, але також забезпечує точні границі залишків, що визначають ці три CDR. Ці CDR можуть бути названі CDR Кабата. Хотіа і співробітники (Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) і Chothia et al., Nature 342:877-883 (1989)) знайшли, що деякі підчастини в CDR Кабата використовують майже ідентичні конформації пептидного кістяка, незважаючи на велику розмаїтість на рівні амінокислотної послідовності. Ці підчастини були названі L1, L2 і L3 або H1, H2 і H3, де "L" і "H" означають області легкого ланцюга і важкого ланцюга, відповідно. Ці ділянки можуть бути названі CDR Хотіа, які мають границі, що перекриваються з CDR Кабата. Інші границі, що визначають CDR, які відповідають CDR Кабата, були описані Pedlan (FASEB J. 9: 133-139 (1995)) і MacCallum (J Mol Biol 262(5):732-45 (1996)). Інші визначення границь CDR можуть не відповідати строго одній з вищеописаних систем, але будуть проте відповідати CDR Кабата, хоча вони можуть бути укороченими або подовженими, у світлі прогнозування або експериментальних даних про те, що конкретні залишки або групи залишків, або навіть повні CDR не впливають значимо на зв'язування антигену. Використовувані в даному описі способи можуть використовувати CDR, визначені відповідно до будь-якої з цих систем, хоча переважні варіанти здійснення використовують визначені Кабатом і Хотіа CDR.

У даному контексті термін "канонічний залишок" стосується залишку в CDR або каркасі, який визначає конкретну канонічну структуру CDR, визначену Хотіа і співробітниками (Chothia et al. J. Mol. Biol. 196:901-907 (1987); Chothia et al., J. Mol. Biol. 227:799 (1992), включені в даному описі як посилання). Згідно з Chothia et al., критичні частини CDR багатьох антитіл мають майже ідентичні конформації пептидного кістяка, незважаючи на велику розмаїтість на рівні амінокислотної послідовності. Кожна канонічна структура вказує насамперед набір торсійних кутів пептидного кістяка для прилеглого сегмента амінокислотних залишків, що утворюють петлю.

У даному контексті термін "донор" і "донорське антитіло" стосуються антитіла, яке забезпечує один або декілька CDR. У переважному варіанті здійснення, донорським антитілом є антитіло з виду, що відрізняється від антитіла, з якого одержані або вироблені каркасні області.

У контексті гуманізованого антитіла, термін "донорське антитіло" стосується антитіла нелюдини, яке забезпечує один або декілька CDR.

У даному контексті термін "каркас" або "каркасна послідовність" стосується інших послідовностей варіабельної області мінус CDR. Оскільки точне визначення послідовності CDR може бути визначене з використанням різних систем, значення каркасної послідовності є предметом відповідно різних інтерпретацій. Ці шість областей CDR (CDR-L1, CDR-L2 і CDR-L3 легкого ланцюга і CDR-H1, CDR-H2 і CDR-H3 важкого ланцюга) також розділяють каркасні ділянки на легкому ланцюзі і важкому ланцюзі на чотири субрайони (FR1, FR2, FR3 і FR4) на кожному ланцюзі, у яких CDR1 розташований між FR1 і FR2, CDR2 - між FR2 і FR3 і CDR3 - між FR3 і FR4. Без зазначення цих конкретних субрайонів, таких як FR1, FR2, FR3 або FR4, каркасна область, як її називають інші автори, представляє ці комбіновані FR у варіабельній області єдиного ланцюга імуноглобуліну, що зустрічається природно. У даному контексті, FR представляє один з чотирьох субрайонів, які складають каркасну ділянку.

Акцепторні послідовності важкого ланцюга і легкого ланцюга людини відомі в даній галузі. В одному варіанті здійснення даного винаходу акцепторні послідовності важкого ланцюга і легкого ланцюга вибрані з послідовностей, описаних у таблиці 3 і таблиці 4.

Таблиця 3

Акцепторні послідовності важкого ланцюга

SEQ ID NO:	Область білка	Послідовність
		12345678901234567890123456789012
6	VH1-18&JH6 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFT
7	VH1-18&JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
8	VH1-18&JH6 FR3	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAV YYCAR
9	VH1-18&JH6 FR4	WGQGTITVTVSS
6	21/28&JH4 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFT
10	21/28&JH4 FR2	WVRQAPGQRLWMG
11	21/28&JH4 FR3	RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVY YCAR
12	21/28&JH4 FR4	WGQGTITVTVSS
13	VH2-26&JH6 FR1	QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFS LS
14	VH2-26&JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLAH
15	VH2-26&JH6 FR3	RLTISKDTSKSQVVLTMNMDPVDTAT YYCAR
9	VH2-26&JH6 FR4	WGQGTITVTVSS
16	M60&JH4 FR1	QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTLYGFS S
17	M60&JH4 FR2	WIRQPPGKALEWLA
18	M60&JH4 FR3	RLTISKDTSKNQVVLTMNMDPVDTAT YYCAR
12	M60&JH4 FR4	WGQGTITVTVSS
6	VH1-46&JH6 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFT

7	VH1-46&JH6 FR-2	WVRQAPGQGLEWMG
19	VH1-46&JH6 FR3	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCAR
9	VH1-46&JH6 FR4	WGQGTITVTVSS

Таблиця 4

## Акцепторні послідовності легкого ланцюга

SEQ ID NO:	Область білка	Послідовність
		12345678901234567890123456789012
20	A20&JK4 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
21	A20&JK4 FR2	WYQQKPGKVPKLLIY
22	A20&JK4 FR3	GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDVAT YYC
23	A20&JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
20	III-3R&JK4 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
24	III-3R&JK4 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
25	III-3R&JK4 FR3	GVPSRISGSGSGTDFTFITISLQPEDVAT YYC
23	III-3R&JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
26	A1&JK4 FR1	DVVMVTQSPSLPVTLGQPASISC
27	A1&JK4 FR2	WFQQRPQGSPRRLIY
28	A1&JK4 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYC
23	A1&JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
29	01&JK2 FR1	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISC
30	01&JK2 FR2	WYLQKPGQSPQLLIY
28	01&JK2 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYC
31	01&JK2 FR4	FGQGTKLEIKR

У даному контексті термін "ген антитіла зародкової лінії" або "фрагмент гена" стосується послідовності імуноглобуліну, кодованої нелімфоїдними клітинами, що не піддавалися процесу дозрівання, який приводить до генетичного реаранжування і мутації для експресії конкретного імуноглобуліну (дивіться, наприклад, Shapiro et al., Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200 (2002); Marchalonis et al., Adv Exp Med Biol. 484: 13-30 (2001)). Одна з переваг, забезпечуваних різними варіантами даного винаходу, походить з визнання того, що гени антитіла зародкової лінії з більшою імовірністю, ніж зрілі гени антитіл, зберігають есенційні структури амінокислотної послідовності, характерні для індивідів у цьому виді, і, отже, у меншому ступені упізнаються як гени з чужорідного джерела при застосуванні терапевтично в цьому виді.

У даному контексті термін "ключові" залишки стосується визначених залишків у варіабельній області, які мають більший вплив на специфічність зв'язування і/або афінність антитіла, зокрема гуманізованого антитіла. Ключовий залишок включає, але не обмежується ними, одне або декілька з наступного: залишок, що є суміжним з CDR, потенційний сайт глікозилювання (який може бути сайтом N- або O-глікозилювання), незвичайний залишок, залишок, здатний взаємодіяти з антигеном, залишок, здатний взаємодіяти з CDR, канонічний залишок, залишок контакту між варіабельною областю важкого ланцюга і варіабельною областю легкого ланцюга,

залишок у зоні Верньєра і залишок в області, яка відповідає області між визначенням Хотіа CDR1 варіабельної області важкого ланцюга і визначенням Кабата першої каркасної області важкого ланцюга.

У даному контексті термін "гуманізоване антитіло" є антитілом або його варіантом, похідним, аналогом або фрагментом, які специфічно зв'язуються з антигеном, що представляє інтерес, і які містять каркасну ділянку (FR), яка має по суті амінокислотну послідовність антитіла людини, і ділянку, що визначає комплементарність (CDR), яка має по суті амінокислотну послідовність антитіла нелюдини. У застосуванні в даному описі, термін "по суті" у контексті CDR стосується CDR, що має амінокислотну послідовність, щонайменше на 80 %, переважно щонайменше на 85 %, щонайменше на 90 %, щонайменше на 95 %, щонайменше на 98 % або щонайменше на 99 % ідентичну амінокислотній послідовності CDR антитіла нелюдини. Гуманізоване антитіло містить по суті всі зі щонайменше одного, звичайно двох, варіабельних доменів (Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, FabC, Fv), у яких всі або по суті всі з CDR-областей відповідають CDR-областям імуноглобуліну нелюдини (тобто донорського антитіла), і всі або по суті всі з каркасних ділянок є каркасними ділянками консенсусної послідовності імуноглобуліну людини. Переважно, гуманізоване антитіло містить також щонайменше частину константної ділянки імуноглобуліну (Fc), звичайно частину константної ділянки імуноглобуліну людини. У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло містить як легкий ланцюг, так і щонайменше варіабельний домен важкого ланцюга. Це антитіло може включати області CH1, шарніра, CH2, CH3 і CH4 важкого ланцюга. У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло містить тільки гуманізований легкий ланцюг. У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло містить тільки гуманізований важкий ланцюг. У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло містить тільки гуманізовану варіабельну область легкого ланцюга і/або гуманізований важкий ланцюг.

Гуманізоване антитіло може бути вибрано з будь-якого класу імуноглобулінів, у тому числі IgM, IgG, IgD, IgA і IgE, і будь-якого ізотипу, у тому числі, без обмеження, IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4. Гуманізоване антитіло може містити послідовності з більше ніж одного класу або ізотипу, і конкретні константні домени можуть бути вибрані для оптимізації бажаних ефекторних функцій з використанням способів, добре відомих у даній галузі.

Ці каркасні ділянки і CDR-ділянки гуманізованого антитіла не повинні обов'язково точно відповідати вихідним послідовностям, наприклад, CDR донорського антитіла або консенсусного каркаса, так що залишок CDR або залишок каркаса в конкретному сайті не відповідає ні донорському антитілу, ні консенсусному каркасу. Однак у переважному варіанті здійснення такі мутації будуть неефективними. Звичайно щонайменше 80 %, переважно щонайменше 85 %, більш переважно щонайменше 90 % і найбільш переважно 95 % залишків гуманізованого антитіла будуть відповідати залишкам вихідних послідовностей FR і CDR. У даному контексті термін "консенсусний каркас" стосується каркасної ділянки в консенсусній послідовності імуноглобуліну. У даному контексті термін "консенсусна послідовність імуноглобуліну" стосується послідовності, утвореної з амінокислот (або нуклеотидів), що найбільш часто зустрічаються у сімействі родинних послідовностей імуноглобулінів (дивіться, наприклад, Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987). У сімействі імуноглобулінів кожне положення в консенсусній послідовності зайняте амінокислотою, що найбільш часто зустрічається в цьому положенні в даному сімействі. Якщо дві амінокислоти зустрічаються однаково часто, будь-яка може бути включена в цю консенсусну послідовність.

У даному контексті зоною "Верньєра" називають субнабір залишків каркаса, які можуть коректувати структуру CDR і тонко підганяти її до антигену, як описано в роботі Foote and Winter, 1992, J. Mol. Biol. 224:487-499, що включена в даному описі як посилання. Залишки зони Верньєра утворюють шар, що лежить в основі цих CDR, і можуть впливати на структуру CDR і афінність цього антитіла.

Термін "мультивалентний зв'язувальний білок" використовується в цьому контексті для позначення зв'язувального білка, який містить два або більше антигензв'язувальних сайтів. Мультивалентний зв'язувальний білок переважно конструюють таким чином, що він має три або більше антигензв'язувальних сайтів і звичайно не є антитілом, яке зустрічається природно. Термін "мультиспецифічний зв'язувальний білок" стосується зв'язувального білка, здатного зв'язувати дві або більше родинних або неродинних мішеней. Зв'язувальні білки з подвійним варіабельним доменом (DVD), у даному контексті, є зв'язувальними білками, які містять два або більше антигензв'язувальних сайтів і є тетравалентними або мультивалентними зв'язувальними білками. Такі DVD можуть бути моноспецифічними, тобто здатними зв'язувати один антиген, або мультиспецифічними, тобто здатними зв'язувати два або більше антигенів. DVD-зв'язувальні білки, які містять два DVD-поліпептиди важкого ланцюга і два DVD-поліпептиди легкого ланцюга, називають DVD-Ig. Кожна половина DVD-Ig містить DVD-поліпептид важкого

ланцюга і DVD-поліпептид легкого ланцюга і два антигензв'язувальних сайти. Кожен сайт зв'язування містить варіабельний домен важкого ланцюга і варіабельний домен легкого ланцюга, причому в цілому 6 CDR беруть участь у зв'язуванні антигену на кожен антигензв'язувальний сайт.

5 У даному контексті термін "нейтралізація" стосується нейтралізації біологічної активності цитокіну при специфічному зв'язуванні цитокіну зв'язувальним білком. Переважно, нейтралізуючим зв'язувальним білком є нейтралізуюче антитіло, зв'язування якого з IL-13 і/або hIL-13 приводить до інгібування біологічної активності IL-13 і/або hIL-13. Переважно, нейтралізуючий зв'язувальний білок зв'язує IL-13 і/або hIL-13 і зменшує біологічну активність IL-13 і/або hIL-13 щонайменше приблизно на 20 %, 40 %, 60 %, 80 %, 85 % або більше. Інгібування біологічної активності IL-13 і/або hIL-13 нейтралізуючим зв'язувальним білком може оцінюватися вимірюванням одного або декількох індикаторів біологічної активності IL-13 і/або hIL-13, добре відомим у даній галузі. Наприклад, інгібування IL-13 людини індукувало продукування TARC (CCL-17) клітинами A-549 (дивіться приклад 1.1.C).

15 Термін "активність" включає такі активності, як специфічність зв'язування/афінність антитіла відносно антигену, наприклад, анти-hIL-13-антитіла, що зв'язується з антигеном IL-13, і/або нейтралізуюча ефективність антитіла, наприклад, анти-hIL-13-антитіла, зв'язування якого з hIL-13 інгібує біологічну активність hIL-13. Наприклад, інгібування IL-13 людини індукувало продукування TARC (CCL-17) клітинами A-549 (дивіться приклад 1.1.C).

20 Термін "епітет" включає будь-яку поліпептидну детермінанту, здатну специфічно зв'язуватися з імуноглобуліном або Т-клітинним рецептором. У деяких варіантах здійснення епітопні детермінанти включають хімічно активні поверхневі угруповання молекул, такі як амінокислоти, цукрові бічні ланцюги, фосфорил або сульфоніл, і, у деяких варіантах здійснення, можуть мати специфічні тривимірні структурні властивості і/або специфічні властивості зарядів. Епітоп є областю антигену, яка зв'язується антитілом. У деяких варіантах здійснення говорять, що антитіло специфічно зв'язує антиген, коли воно переважно упізнає його антиген-мішень у комплексній суміші білків і/або макромолекул.

Термін "резонанс поверхневих плазмонів" стосується в даному контексті оптичного явища, яке дозволяє аналізувати біоспецифічні взаємодії реального часу детектуванням змін у концентраціях білків у біосенсорному матриці, наприклад, з використанням системи BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, NJ). Відносно додаткових описів дивіться Jonsson, U., et al. (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51: 19-26; Jonsson, U., et al. (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Johnsson, B., et al. (1995) *J. Mol. Recognit.* 8: 125-131; і Johnsson, B., et al. (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277.

35 Термін " $k_{on}$ ", у даному контексті, стосується константи швидкості асоціації антитіла з антигеном з утворенням комплексу антитіло/антиген, як відомо в даній галузі. Термін " $k_{off}$ ", у даному контексті, стосується константи швидкості дисоціації антитіла з комплексу антитіло/антиген, як відомо в даній галузі.

Термін " $K_D$ ", у даному контексті, стосується константи дисоціації конкретної взаємодії антитіло/антиген, як відомо в даній галузі.

40 Термін "мічений зв'язувальний білок", у даному контексті, стосується білка з включеною міткою, яка забезпечує ідентифікацію зв'язувального білка. Переважно, міткою є детектований маркер, наприклад, включення радіоактивно міченої амінокислоти, або приєднання до поліпептиду з біотинільними частинами молекули, що можуть бути детектовані міченим авідіном (наприклад, стрептавідином, що містить флуоресцентний маркер або ферментативну активність, яка може бути детектована оптичними або колориметричними способами. Приклади міток включають, але не обмежуються ними: радіоізотопи або радіонукліди (наприклад,  $^3H$ ,  $^{14}C$ ,  $^{35}S$ ,  $^{90}Y$ ,  $^{99}Tc$ ,  $^{111}In$ ,  $^{125}I$ ,  $^{131}I$ ,  $^{177}Lu$ ,  $^{166}Ho$  або  $^{153}Sm$ ); флуоресцентні мітки (наприклад, FITC, родамін, лантанідні люмінофори (фосфори)), ферментативні мітки (наприклад, пероксидазу хрому, люциферазу, лужну фосфатазу); хемілюмінесцентні маркери; біотинільні групи; попередньо визначені поліпептидні епітопи, що упізнаються вторинним репортером (наприклад, пари послідовностей лейцинових блискавок, сайти зв'язування для вторинних антитіл, металзв'язувальні домени, епітопні мітки); і магнітні агенти, такі як хелати гадолінію.

Термін "кон'югат антитіла" стосується зв'язувального білка, такого як антитіло, хімічно зв'язаного з другою хімічною частиною молекули, такою як терапевтичний або цитотоксичний агент. Термін "агент" використовується в даному описі для позначення хімічної сполуки, суміші хімічних сполук, біологічної макромолекули або екстракту, приготовленого з біологічних матеріалів. Переважно, ці терапевтичні або цитотоксичні агенти включають, але не обмежуються ними, коклюшний токсин, таксол, цитохалазин В, граміцидин D, бромід етидію, еметин, мітоміцин, етопозид, тенопозид, вінкристин, вінбластин, колхіцин, доксорубіцин,

даунорубіцин, дигідроксіантрацидін, мітоксантрон, мітраміцин, актиноміцин D, 1-дегідротестостерон, глюкокортикоїди, прокаїн, тетракаїн, лідокаїн, пропранолол і пуроміцин і їх аналоги або гомологи.

Терміни "кристал" і "кристалізований" стосуються, у даному контексті, антитіла або його антигензв'язувальної частини, що знаходяться у формі кристала. Кристали є однією формою твердого стану речовини, що відрізняється від інших форм, таких як аморфний твердий стан або рідкокристалічний стан. Кристали складаються з регулярних, повторюваних, тривимірних матриць атомів, іонів, молекул (наприклад, білків, таких як антитіла) або молекулярних ансамблів (наприклад, комплексів антитіло/антиген). Ці тривимірні матриці аранжовані відповідно до конкретних математичних залежностей, що добре розуміються в даній галузі. Фундаментальну одиницю, або елемент структури, що повторюється в кристалі, називають асиметричною ланкою. Повторення цієї асиметричної ланки в розташуванні атомів, що відповідає правилам конкретної, добре визначеної кристалографічної симетрії, забезпечує "елементарну комірку" кристала. Повторення цієї елементарної комірки регулярними перенесеннями (трансляціями) у всіх трьох вимірюваннях забезпечує кристал. Дивіться Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach*, 2nd ed., pp. 20 1-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999).

Термін "полінуклеотид" означає, у даному контексті, полімерну форму двох або більше нуклеотидів або рибонуклеотидів, або дезоксинуклеотидів, або модифікованої форми будь-якого типу нуклеотиду. Цей термін включає одноланцюгові і двухланцюгові форми ДНК, але переважно дволанцюгову ДНК.

Термін "виділений полінуклеотид" буде означати в даному контексті полінуклеотид (наприклад, геномну ДНК, кДНК або ДНК синтетичного походження або деяку їх комбінацію), який, у силу його походження як "виділеного полінуклеотиду" не зв'язаний із усіма полінуклеотидами або з частиною полінуклеотидів, з якими цей "виділений полінуклеотид" виявляється в природі; функціонально зв'язаний з полінуклеотидом, з яким він не зв'язаний у природі; або не зустрічається в природі у вигляді частини більшої послідовності.

Термін "вектор" стосується, у даному контексті, молекули нуклеїнової кислоти, здатної транспортувати іншу нуклеїнову кислоту, з якою вона зв'язана. Одним типом вектора є "плазміда", яка є кільцевою дволанцюговою петлею ДНК, у яку можуть бути ліговані додаткові ДНК-сегменти. Іншим типом вектора є вірусний вектор, причому додаткові ДНК-сегменти можуть бути ліговані в цей вірусний геном. Деякі вектори здатні до автономної реплікації в клітині-хазяїні, у яку вони введені (наприклад, бактеріальні вектори, що мають бактеріальний сайт ініціації реплікації, або епісомні вектори ссавців). Інші вектори (наприклад, неепісомні вектори ссавців) можуть бути інтегровані в геном клітини-хазяїна і за допомогою цього реплікуються разом з геномом хазяїна. Крім того, деякі вектори здатні керувати експресією генів, з якими вони функціонально зв'язані. Такі вектори називають у даному описі "рекомбінантними експресуючими векторами" (або просто "експресуючими векторами"). Звичайно експресуючі вектори, використовувані в способах рекомбінантних ДНК, часто знаходяться у формі плазмід. У даній заявці "плазміда" і "вектор" можуть використовуватися взаємозамінно, оскільки плазміда є найбільш часто використовуваною формою вектора. Однак цей винахід включає такі інші форми експресуючих векторів, як вірусні вектори (наприклад, дефектні відносно реплікації ретровіруси, аденовіруси й аденозв'язані віруси), які виконують еквівалентні функції.

Термін "функціонально зв'язані" стосується суміжного розташування, у якому описані компоненти знаходяться у взаємозв'язку, що дозволяє їм функціонувати передбачуваним чином. Регуляторну послідовність, "функціонально зв'язану" з кодуючою послідовністю, лігують таким чином, що досягається експресія цієї кодуючої послідовності в умовах, сумісних з регуляторними послідовностями. "Функціонально зв'язані" послідовності включають як регуляторні послідовності експресії, які є суміжними з геном, що представляє інтерес, так і регуляторні послідовності експресії, що діють *in trans*, або на відстані, для регуляції гена, що представляє інтерес. Термін "регуляторна послідовність експресії" стосується в даному контексті полінуклеотидних послідовностей, які необхідні для здійснення експресії і процесингу кодуючих послідовностей, з якими вони ліговані. Регуляторні послідовності експресії включають придатні послідовності ініціації, термінації транскрипції, промоторні і енхансерні послідовності; сигнали ефективного процесингу РНК, такі як сигнали сплайсингу і поліаденілування; послідовності, які стабілізують цитоплазматичну мРНК; послідовності, які підсилюють ефективність трансляції (тобто консенсусну послідовність Козака); послідовності, які збільшують стабільність білка; і, якщо бажано, послідовності, які підсилюють секрецію білка. Природа таких регуляторних послідовностей розрізняється залежно від організму-хазяїна; у прокаріотах, такі регуляторні послідовності звичайно включають промотор, сайт зв'язування рибосом і

послідовність термінації транскрипції; у еукаріотах звичайно такі регуляторні послідовності включають промотори і послідовність термінації транскрипції. Термін "регуляторні послідовності" включає компоненти, присутність яких є необхідною для експресії і процесингу, і може також включати додаткові компоненти, присутність яких є переважною, наприклад, лідерні послідовності і послідовності партнера злиття. Конструкції білків даного винаходу можуть бути експресовані й очищені з використанням експресуючих векторів і клітин-хазяїнів, відомих у даній галузі, які включають експресійні касети, вектори, рекомбінантні клітини-хазяїни і способи рекомбінантної експресії і протеолітичного процесингу рекомбінантних поліпротеїнів і білків-попередників з єдиної відкритої рамки зчитування (наприклад, WO 2007/014162, включений у даному описі як посилання).

"Трансформація", у даному контексті, означає будь-який процес, за допомогою якого екзогенна ДНК входить у клітину-хазяїна. Трансформація може відбуватися при природних або штучних умовах з використанням способів, добре відомих у даній галузі. Трансформація може ґрунтуватися на будь-якому відомому способі вбудовування чужорідних послідовностей нуклеїнових кислот у прокаріотичну або еукаріотичну клітину-хазяїна. Спосіб вибирають на основі клітини-хазяїна, що підлягає трансформації, і може включати, але не обмежується ними, вірусну інфекцію, електропорацію, ліпофекцію і бомбардування частинками. Такі «трансформовані» клітини включають стабільно трансформовані клітини, в яких інсертована ДНК здатна до реплікації або у вигляді плазміди, що автономно реплікується, або у вигляді частини хромосоми хазяїна. Вони включають також клітини, які транзиторно експресують інсертовану ДНК або РНК протягом обмежених періодів часу.

Термін "рекомбінантна клітина-хазяїн" (або просто "клітина-хазяїн") означає, у даному контексті, клітину, у яку була введена екзогенна ДНК. Повинно бути зрозуміло, що такі терміни стосуються не тільки конкретної розглянутої клітини, але і потомства такої клітини. Оскільки в наступних генераціях можуть зустрічатися визначені модифікації внаслідок або мутації, або впливів навколишнього середовища, таке потомство може бути фактично не ідентичним батьківській клітині, але воно усе ще включене в обсяг терміна "клітина-хазяїн", використовуваного в даному описі. Переважно, клітини-хазяїни включають прокаріотичні і еукаріотичні клітини, вибрані з будь-якого з царств життя. Переважні клітини-хазяїни включають клітини одноклітинних організмів (протестів), грибів, рослин і тварин. Найбільш переважні клітини-хазяїни включають, але не обмежуються ними, лінію прокаріотичних клітин *E. coli*; лінії клітин ссавців CHO, HEK 293 і COS; лінію клітин комах Sf9; і грибні клітини *Saccharomyces cerevisiae*.

Можуть бути використані стандартні способи для рекомбінантних ДНК, синтезу олігонуклеотидів і культури тканини і трансформації (наприклад, електропорації, ліпофекції). Ферментативні реакції і способи очищення можуть виконуватися відповідно до описів виготовлювача або як звичайно виконуються в даній галузі, або як описано в даному описі. Попередні способи і процедури можуть звичайно виконуватися відповідно до загальноприйнятих способів, добре відомих в даній галузі й описаних в різних загальних або більш конкретних посиланнях, що цитуються й обговорюються протягом даного опису. Дивіться, наприклад, довідник Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)), що включений у даному описі як посилання, для будь-якої мети.

"Трансгенний організм", відомий у даній галузі й описаний у даному описі, означає організм, який має клітини, що містять трансген, причому трансген, введений у цей організм (або в предка цього організму), експресує поліпептид, який природно не експресується у цьому організмі. "Трансген" є ДНК-конструкцією, яка стабільно і функціонально інтегрована в геном клітини, з якої розвивається трансгенний організм, що керує експресією кодованого продукту гена в одному або декількох типах клітин або тканин цього трансгенного організму.

Терміни "регулюють" і "модулюють" використовуються взаємозамінно і, у даному контексті, стосуються зміни або модуляції активності молекули, що представляє інтерес (наприклад, біологічної активності hIL-13). Модуляція може бути збільшенням або зменшенням величини визначеної активності або функції молекули, що представляє інтерес. Зразкові активності і функції молекули включають, але не обмежуються ними, зв'язувальні властивості, ферментативну активність, активацію клітинних рецепторів і трансдукцію сигналів.

Таким чином, термін "модулятор" означає, у даному контексті, сполуку, здатну змінювати або модулювати активність або функцію молекули, що представляє інтерес (наприклад, біологічну активність hIL-13). Наприклад, модулятор може викликати збільшення або зменшення величини активності або функції, що спостерігається під час відсутності цього модулятора. У деяких варіантах здійснення модулятор є інгібітором, який зменшує величину

щонайменше однієї активності або функції молекули. Зразкові інгібітори включають, але не обмежуються ними, білки, пептиди, антитіла, пептитіла, вуглеводи або малі органічні молекули. Пептитіла описані, наприклад, у WO 01/83525.

Термін "агоніст" стосується, у даному контексті, модулятора, який, при контакті з молекулою, що представляє інтерес, викликає збільшення величини визначеної активності або функції цієї молекули в порівнянні з величиною цієї активності або функції, що спостерігається під час відсутності цього агоніста. Конкретні агоністи, що представляють інтерес, можуть включати, але не обмежуються ними, поліпептиди IL-13 або поліпептиди, нуклеїнові кислоти, вуглеводи або будь-які інші молекули, що зв'язуються з hIL-13.

Терміни "антагоніст" або "інгібітор" стосуються, у даному контексті, модулятора, який, при контакті з молекулою, що представляє інтерес, викликає зменшення величини визначеної активності або функції цієї молекули в порівнянні з величиною цієї активності або функції, що спостерігається під час відсутності цього антагоніста. Конкретні антагоністи, що представляють інтерес, включають антагоністи, які блокують або модулюють біологічну або імунологічну активність IL-13 і/або hIL-13. Антагоністи й інгібітори IL-13 і/або hIL-13 можуть включати, але не обмежуються ними, білки, нуклеїнові кислоти, вуглеводи або будь-які інші молекули, що зв'язуються з IL-13 і/або hIL-13.

Термін "інгібують" IL-13 з одним або декількома його рецепторами. Таке інгібування зв'язування з рецептором може приводити до зменшення або усунення біологічної активності, опосередкованої зв'язуванням IL-13 з його рецептором або рецепторами.

У даному контексті термін "ефективна кількість" стосується кількості терапевтичного засобу, яка є достатньою для зменшення або ослаблення тяжкості і/або тривалості порушення або одного або декількох симптомів порушення, запобігає прогресуванню порушення, викликає регрес порушення, запобігає рецидиву, розвитку, появі або прогресуванню одного або декількох симптомів, пов'язаних з порушенням, детектує порушення або підсилює або поліпшує профілактичні або терапевтичні ефекти іншого терапевтичного засобу (наприклад, профілактичного або терапевтичного агента).

Термін "проба" використовується в даному описі в його самому широкому розумінні. "Біологічна проба", у даному контексті, включає, але не обмежується цим, будь-яку кількість речовини з живого організму або раніше живого організму. Такі живі організми включають, але не обмежуються ними, людей, мишей, щурів, мавп, собак, кроликів і інших тварин. Такі речовини включають, але не обмежуються ними, кров, сироватку, сечу, синовіальну рідину, клітини, органи, тканини, кістковий мозок, лімфатичні вузли і селезінку.

I. Антитіла, які зв'язують IL-13 людини

Один аспект даного винаходу забезпечує виділені мишачі моноклональні антитіла або їх антигензв'язувальні частини, які зв'язуються з IL-13 з високою афінністю, низькою швидкістю дисоціації і високою нейтралізуючою здатністю. Другий аспект даного винаходу забезпечує химерні антитіла, що зв'язують IL-13. Третій аспект даного винаходу забезпечує гуманізовані антитіла, або їх антигензв'язувальні частини, які зв'язують IL-13. Переважно, ці антитіла, або їх частини, є виділеними антитілами. Переважно, антитіла даного винаходу є нейтралізуючими анти-IL-13-антитілами людини і/або анти-IL-13-антитілами людини.

A. Спосіб одержання анти-IL-13-антитіл

Антитіла даного винаходу можуть бути одержані будь-яким з ряду способів, відомих у даній галузі.

1. Моноклональні анти-IL-13-антитіла, одержані з використанням гібридомної технології

Моноклональні антитіла можуть бути одержані з використанням великої розмаїтості способів, відомих у даній галузі, які включають застосування гібридом, рекомбінантні способи або технології фагового дисплея або їх комбінації. Наприклад, моноклональні антитіла можуть бути одержані гібридомними способами, у тому числі способами, відомими в даній галузі й описаними, наприклад, у Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Gold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling, et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981) (зазначені посилання включені в даному описі як посилання в їх повному вигляді). Термін "моноклональне антитіло", у даному контексті, не обмежується антитілами, одержаними за допомогою гібридомного способу. Термін "моноклональне антитіло" стосується антитіла, яке одержане з єдиного клону, у тому числі будь-якого еукаріотичного, прокаріотичного або фагового клону, але не способу, за допомогою якого воно одержане.

Способи одержання специфічних антитіл і скринінгу на специфічні антитіла з використанням гібридомної технології є рутинними і добре відомі в даній галузі. В одному варіанті здійснення даний винахід забезпечує способи гснерування моноклональних антитіл, а також антитіла,



одержані цим способом, які передбачають культивування гібридомної клітини, секретуючої антитіло даного винаходу, причому переважно цю гібридому генерують злиттям спленоцитів, виділених з миші, імунізованої антигеном даного винаходу, з мієломними клітинами і наступним скринінгом гібридом, одержаних з цього злиття, на гібридомні клони, які секретують антитіло, здатне зв'язувати поліпептид даного винаходу (дивіться приклад 1.2). Коротко, миші можуть бути імунізовані антигеном IL-13. У переважному варіанті здійснення цей антиген IL-13 вводять з ад'ювантом для стимуляції імунної реакції. Такі ад'юванти включають повний і неповний ад'юванти Фрейнда, RJB1 (мураміддипептиди) або ISCOM (імуностимулюючі комплекси). Такі ад'юванти можуть захищати цей поліпептид від швидкого диспергування секвеструванням його в локальний депозит, або вони можуть містити речовини, які стимулюють хазяїна для секреції факторів, що є хемотаксичними для макрофагів і інших компонентів імунної системи. Переважно, при введенні поліпептиду схема імунізації буде включати два або більше введення цього поліпептиду, розтягнутих на декілька тижнів.

Після імунізації тварини антигеном IL-13, з цієї тварини можуть бути одержані антитіла і/або продукуючі антитіла клітини. Сироватку, що містить анти-IL-13-антитіло, одержують із тварини кровопусканням або умертвінням тварини. Ця сироватка може бути використана в такому вигляді, у якому вона одержана з тварини, з цієї сироватки може бути одержана фракція імуноглобулінів, або анти-IL-13-антитіла можуть бути очищені з цієї сироватки. Сироватка або імуноглобуліни, одержані таким чином, є поліклональними, тобто такими, що мають гетерогенний набір властивостей.

Після детектування імунної реакції, наприклад, після детектування антитіл, специфічних для антигену IL-13, у сироватці миші, витягають селезінку миші і виділяють спленоцити. Потім ці спленоцити зливають добре відомими способами з придатними мієломними клітинами, наприклад клітинами з клітинної лінії SP20, доступної з ATCC. Гібридами відбирають і клонують лімітуючим розведенням. Потім ці гібридомні клони аналізують способами, відомими в даній галузі, на клітини, які секретують антитіла, здатні зв'язувати IL-13. Асцитична рідина, яка звичайно містить високі рівні антитіл, може бути одержана імунізацією мишей позитивними гібридомними клонами.

В іншому варіанті здійснення можуть бути одержані продукуючі антитіло імморталізовані гібридами з імунізованої тварини. Після імунізації цю тварину умертвляють і В-клітини селезінки зливають з імморталізованими мієломними клітинами, як добре відомо в даній галузі. Дивіться, наприклад, Harlow and Lane, дивіться раніше. У переважному варіанті здійснення мієломні клітини не секретують поліпептиди імуноглобуліну (несекреторна клітинна лінія). Після злиття і відбору з використанням антибіотика ці гібридами піддають скринінгу з використанням IL-13, або його частини, або клітини, експресуючої IL-13. У переважному варіанті здійснення початковий скринінг виконують з використанням твердофазного імуносорбентного аналізу (ELISA) або радіоімуноаналізу (RIA), переважно ELISA. Приклад ELISA-скринінгу забезпечений у WO 00/37504, включеному в даному описі як посилання.

Анти-IL-13-антитілопродукуючі гібридами відбирають, клонують і додатково піддають скринінгу на бажані характеристики, що включають сильний ріст гібридами, високе продукування антитіл і бажані властивості антитіл, обговорювані додатково нижче. Гібридами можуть культивуватися і розмножуватися *in vivo* у сингенних тваринах, у тваринах, які не мають імунної системи, наприклад, голих (безтимусних) мишах, або у культурах клітин *in vitro*. Способи відбору, клонування і розмноження гібридом добре відомі фахівцю зі звичайною кваліфікацією в даній галузі.

У переважному варіанті здійснення ці гібридами є гібридомами миші, описаними вище. В іншому переважному варіанті здійснення ці гібридами одержують у видах, інших, ніж людина і миша, таких як щури, вівці, свині, кози, велика рогата худоба або коні. В іншому варіанті здійснення ці гібридами є гібридомами людини, в яких несекреторна мієломна клітина людини злита з клітиною людини, експресуючою анти-IL-13-антитіло.

Фрагменти антитіл, які упізнають специфічні епітопи, можуть бути генеровані відомими способами. Наприклад, Fab- і F(ab')<sub>2</sub>-фрагменти даного винаходу можуть бути одержані протеолітичним розщепленням молекул імуноглобуліну з використанням ферментів, таких як папаїн (для одержання Fab-фрагментів) або пепсин (для одержання F(ab')<sub>2</sub>-фрагментів). F(ab')<sub>2</sub>-фрагменти містять варіабельну область, константну ділянку легкого ланцюга і домен CH1 важкого ланцюга.

## 2. Моноклональні анти-IL-13-антитіла, одержані з використанням SLAM

В іншому аспекті даного винаходу рекомбінантні антитіла генерують з окремих виділених лімфоцитів з використанням процедури, названої в даній галузі способом вибраних лімфоцитних антитіл (SLAM), описаним у патенті США № 5627052, публікації PCT WO 92/02551

i Babcock, J.S. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci USA 93:7843-7848. У цьому способі окремі клітини, секретуючі антитіла, що представляють інтерес, наприклад лімфоцити, одержані з будь-якої з імунізованих тварин, описаних у розділі 1, піддають скринінгу з використанням антигенспецифічного аналізу гемолітичних бляшок, у якому антиген IL-13, субодиницю IL-13, або їх фрагмент, зв'язують з еритроцитами вівці з використанням лінкера, такого як біотин, і використовують для ідентифікації окремих клітин, які секретують антитіла, специфічні відносно IL-13. Після ідентифікації секретуючих антитіла клітин, що представляють інтерес, кДНК варіабельної ділянки важкого ланцюга і легкого ланцюга витягають з цих клітин за допомогою ПЛР зі зворотною транскриптазою і потім ці варіабельні ділянки експресують, разом із придатними константними ділянками імуноглобуліну (наприклад, константними ділянками імуноглобуліну людини) у клітинах-хазяїнах ссавців, таких як клітини COS або CHO. Потім клітини-хазяїни, трансфектовані цими ампліфікованими послідовностями імуноглобуліну, одержані з вибраних лімфоцитів *in vivo*, можуть бути піддані додатковому аналізу і відбору *in vitro*, наприклад, пеннінгом трансфектованих клітин для виділення клітин, експресуючих антитіла до IL-13. Ці ампліфіковані послідовності імуноглобуліну можуть бути додатково піддані маніпуляціям *in vitro*, таким як способи дозрівання афінності *in vitro*, такі як способи, описані в публікації PCT WO 07/29131 і публікації PCT WO 00/56772.

### 3. Моноклональні анти-IL-13-антитіла, одержані з використанням трансгенних тварин

В іншому варіанті здійснення даного винаходу антитіла одержують імунізацією тварини-нелюдини, що містить локус імуноглобуліну людини, антигеном IL-13. У переважному варіанті здійснення цією твариною-нелюдиною є трансгенна миша XENOMOUSE, одержаний генною інженерією штам миші, який містить великі фрагменти локусів імуноглобуліну людини і є недостатнім відносно продукування антитіл миші. Дивіться, наприклад, Green et al. Nature Genetics 7: 13-21 (1994) і патенти Сполучених Штатів 5916771, 5939598, 5985615, 5998209, 6075181, 6091001, 6114598 і 6130364. Дивіться також WO 91/10741, опублікований 25 липня 1991 року, WO 94/02602, опублікований 3 лютого 1994 року, WO 96/34096 і WO 96/33735, обидва опубліковані 13 жовтня 1996 року, WO 98/16654, опублікований 23 квітня 1998 року, WO 98/24893, опублікований 11 червня 1998 року, WO 98/50433, опублікований 12 листопада 1998 року, WO 99/45031, опублікований 10 вересня 1999 року, WO 99/53049, опублікований 21 жовтня 1999 року, WO 00/09560, опублікований 24 лютого 2000 року і WO 00/037504, опублікований 29 червня 2000 року. Ця трансгенна миша XENOMOUSE продукує репертуар повних антитіл людини, подібний репертуару антитіл дорослої людини, і генерує антигеніспецифічні mAb людини. Ця трансгенна миша XENOMOUSE містить приблизно 80 % репертуару антитіл людини за допомогою введення YAC-фрагментів конфігурації зародкової лінії з розміром мільйонів пар нуклеотидів (м.п.н.) локусів важкого ланцюга і  $\chi$  локусів легкого ланцюга людини. Дивіться Mendez et al., Nature Genetics 15: 146-156 (1997), Green and Jakobovits J. Exp. Med. 188:483-495 (1998), описи яких включені в даному описі як посилання.

### 4. Моноклональні анти-IL-13-антитіла, одержані з використанням бібліотек рекомбінантних антитіл

Способи *in vitro* також можуть бути використані для одержання антитіл даного винаходу, причому в цих способах бібліотеку антитіл піддають скринінгу для ідентифікації антитіла, яке має бажану специфічність зв'язування. Способи такого скринінгу бібліотек рекомбінантних антитіл добре відомі в даній галузі і включають способи, описані, наприклад, у Ladner et al. U.S. Patent № 5223409; Kang et al. публікація PCT WO 92/18619; Dower et al. публікація PCT WO 91/17271; Winter et al. публікація PCT WO 92/20791; Markland et al. публікація PCT WO 92/15679; Breitling et al. публікація PCT WO 93/01288; McCafferty et al. публікація PCT WO 92/01047; Garrard et al. публікація PCT WO 92/09690; Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9: 1370-1372; Hay et al. (1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81-85; Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281; McCafferty et al. Nature (1990) 348:552-554; Griffiths et al. (1993) EMBO J 12:725-734; Hawkins et al. (1992) J Mol Biol 226:889-896; Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628; Gram et al. (1992) PNAS 89:3576-3580; Garrard et al. (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137; i Barbas et al. (1991) PNAS 88:7978-7982, опублікована заявка на патент США 20030186374 і публікація PCT WO 97/29131, змісти яких включені в даному описі як посилання.

Бібліотекою рекомбінантних антитіл може бути бібліотека з індивіда, імунізованого IL-13 або hIL-13, або частиною IL-13 або hIL-13. Альтернативно, ця бібліотека рекомбінантних антитіл може бути бібліотекою з "ненавченого" індивіда, тобто індивіда, що не був імунізований IL-13 людини. Антитіла даного винаходу відбирають скринінгом бібліотеки рекомбінантних антитіл пептидом, який містить IL-13 людини, для відбору за допомогою цього антитіл, що упізнають IL-13. Способи проведення такого скринінгу і відбору добре відомі в даній галузі, наприклад

способи, описані в посиланнях попереднього абзацу. Для відбору антитіл даного винаходу, які мають конкретні зв'язувальні афінності відносно hIL-13, таких як антитіла, що дисоціюються від IL-13 людини з конкретною константою швидкості дисоціації  $k_{off}$ , може бути використаний відомий у даній галузі спосіб резонансу поверхневих плазмонів для відбору антитіл, які мають бажану константу швидкості дисоціації  $k_{off}$ . Для відбору антитіл даного винаходу, які мають конкретну нейтралізуючу активність відносно hIL-13, таких як антитіла з конкретною  $IC_{50}$ , можуть бути використані стандартні способи, відомі в даній галузі, для оцінки інгібування активності hIL-13.

В одному аспекті даний винахід стосується виділеного антитіла, або його антигензв'язувальної частини, які зв'язують IL-13 людини. Переважно, це антитіло є нейтралізуючим антитілом. У різних варіантах здійснення це антитіло є рекомбінантним антитілом або моноклональним антитілом.

Наприклад, антитіла даного винаходу можуть бути також одержані з використанням різних способів фагового дисплея, відомих у даній галузі. У способах фагового дисплея функціональні домени антитіл представлені на поверхні фагових частинок, які несуть кодуєчі їх полінуклеотидні послідовності. Зокрема, такий фаг може бути використаний для представлення антигензв'язувальних доменів, експресованих з репертуарної або комбінаторної бібліотеки антитіл (наприклад, людини або миші). Фаг, експресуючий антигензв'язувальний домен, який зв'язує антиген, що представляє інтерес, може бути відібраний або ідентифікований антигеном, наприклад, з використанням міченого антигену або антигену, зв'язаного або захопленого на твердій поверхні або на гранулі. Фаги, використовувані в цих способах, є звичайно ниткоподібними фагами, які включають домени fd і M13, експресовані з фага, з доменами антитіла Fab, Fv або стабілізованого дисульфідом Fv, злитими з білком або гена III, або гена VIII фага. Приклади способів фагового дисплея, які можуть бути використані для одержання антитіл даного винаходу, включають способи, описані в Brinkman et al., J. Immunol. Methods 182:41-50 (1995); Ames et al., J. Immunol. Methods 184: 177-186 (1995); Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994); Persic et al., Gene 187 9-18 (1997); Burton et al., Advances in Immunology 57:191-280 (1994); публікації PCT № PCT/GB91/01134; публікації PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; і патентах США з номерами 5698426; 5223409; 5403484; 5580717; 5427908; 5750753; 5821047; 5571698; 5427908; 5516637; 5780225; 5658727; 5733743 і 5969108; усі з яких включені в даному описі як посилання в повному вигляді.

Як описано в наведених вище посиланнях, після фагового відбору кодуєчі області з цього фага можуть бути виділені і використані для генерування повних антитіл, у тому числі антитіл людини або будь-якого іншого бажаного антигензв'язувального фрагмента, і експресовані в будь-якому бажаному хазяїні, у тому числі в клітинах ссавців, клітинах комах, клітинах рослин, дріжджах і бактеріях, наприклад, як описано більш докладно нижче. Наприклад, способи рекомбінантного одержання Fab-, Fab'- і  $F(ab')_2$ -фрагментів можуть бути також використані з використанням способів, відомих у даній галузі, таких як способи, описані в публікації PCT WO 92/22324; Mullinax et al., BioTechniques 12(6):864-869 (1992); і Sawai et al., AJRI 34:26-34 (1995); і Better et al., Science 240: 1041-1043 (1988) (зазначені посилання включені як посилання в їх повному вигляді). Приклади способів, що можуть бути використані для одержання однокланових Fv і антитіл включають способи, описані в патентах США 4946778 і 5258498; Huston et al., Methods in Enzymology 203:46-88 (1991); Shu et al., PNAS 90:7995-7999 (1993) і Skerra et al., Science 240:1038-1040 (1988).

Як альтернатива скринінгу бібліотек рекомбінантних антитіл з використанням фагового дисплея, інші методології, відомі в даній галузі, для скринінгу великих комбінаторних бібліотек можуть бути застосовані для ідентифікації антитіл подвійної специфічності даного винаходу. Одним типом альтернативної системи експресії є тип, у якому бібліотека рекомбінантних антитіл експресується у вигляді злиттів РНК-білок, як описано в публікації PCT WO 98/31700 by Szostak and Roberts і в Roberts, R. W. and Szostak, J.W. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci USA 94: 12297-12302. У цій системі створюють ковалентне злиття між мРНК і пептидом або білком, які вона кодує, за допомогою *in vitro* трансляції синтетичних мРНК, що несуть пуроміцин, пептидил-акцепторний антибіотик, на їх 3'-кінці. Таким чином, специфічна мРНК може бути збагачена з комплексної суміші мРНК (наприклад, комбінаторної бібліотеки) на основі властивостей кодованого пептиду або білка, наприклад, антитіла, або його частини, наприклад, зв'язуванням цього антитіла, або його частини, з антигеном подвійної специфічності. Послідовності нуклеїнових кислот, що кодують антитіла, або їх частини, витягнуті зі скринінгу таких бібліотек, можуть бути експресовані рекомбінантними способами, описаними вище (наприклад, у клітинах-хазяїнах ссавців), і, крім того, можуть бути піддані додатковому дозріванню афінності або

додатковим раундам скринінгу злиттів мРНК-пептид, у якому вводять мутації в спочатку відібрану послідовність (послідовності), або іншими способами дозрівання афінності *in vitro* рекомбінантних антитіл, як описано вище.

В іншому підході антитіла даного винаходу можуть бути генеровані з використанням способів дріжджового дисплея, відомих у даній галузі. У способах дріжджового дисплея використовують генетичні способи прикріплення доменів антитіл до стінки клітини дріжджів і представлення їх на поверхні дріжджів. Зокрема, такі дріжджі можуть бути використані для представлення антигензв'язувальних доменів, експресованих з репертуарної або комбінаторної бібліотеки антитіл (наприклад, людини або миші). Приклади способів дріжджового дисплея, які можуть бути використані для одержання антитіл даного винаходу, включають способи, описані Wittrup, et al. у патенті США № 6699658, включеному в даному описі як посилання.

В. Одержання рекомбінантних IL-13-антитіл

Антитіла даного винаходу можуть бути одержані будь-яким з ряду способів, відомих у даній галузі. Наприклад, експресією з клітин-хазяїнів, де експресуючий вектор (експресуючі вектори), що кодує важкий і легкий ланцюги, трансфектований у клітину-хазяїна стандартними способами. Передбачається, що різні форми терміна "трансфекція" включають велику розмаїтість способів, звичайно використовуваних для введення екзогенної ДНК у прокаріотичні або еукаріотичні клітини-хазяїни, наприклад, електропорацію, осадження фосфатом кальцію, ДЕАЕ-декстранову трансфекцію і т. п. Хоча антитіла даного винаходу можуть бути експресовані або в прокаріотичних, або в еукаріотичних клітинах-хазяїнах, експресія антитіл в еукаріотичних клітинах є переважною, і найбільш переважною є експресія антитіл у клітинах-хазяїнах ссавців, оскільки такі еукаріотичні клітини (і, зокрема, клітини ссавців) мають більшу імовірність, ніж прокаріотичні клітини, збирання і секреції правильно укладеного і імунологічно активного антитіла.

Переважні клітини-хазяїни ссавців для експресії рекомбінантних антитіл даного винаходу включають клітини яєчника китайського хом'ячка (клітини CHO) (у тому числі dhfr-клітини CHO, описані в Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sc USA 77:4216-4220, використовувані із селектованим маркером DHFR, наприклад, як описано в R.J. Kaufman and P.A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), клітини мієломи NSO, клітини COS і клітини SP2. При введенні рекомбінантних експресуючих векторів, які кодують гени антитіла, у клітини-хазяїни ссавців, антитіла одержують культивуванням клітин-хазяїнів протягом періоду часу, достатнього для можливості експресії антитіла в клітинах-хазяїнах, або, більш переважно, секреції антитіла в культуральне середовище, у якому вирощують клітини-хазяїни. Антитіла можуть бути витягнуті з культурального середовища з використанням стандартних способів очищення білків.

Клітини-хазяїни можуть бути також використані для одержання функціональних фрагментів антитіл, таких як Fab-фрагменти або scFv-молекули.

Буде зрозуміло, що варіації вищеописаної процедури знаходяться в обсязі даного винаходу. Наприклад, може бути бажаною трансфекція клітини-хазяїна ДНК, що кодує функціональні фрагменти легкого ланцюга і/або важкого ланцюга антитіла даного винаходу. Технологія рекомбінантних ДНК може бути також використана для видалення деякої частини або всієї ДНК, що кодує будь-який з легкого ланцюга і важкого ланцюга або обидва ланцюги, яка не є необхідною для зв'язування з антигенами, що представляють інтерес. Молекули, експресовані з таких укорочених молекул ДНК, також включені в антитіла даного винаходу. Крім того, можуть бути одержані біфункціональні антитіла, у яких один важкий і один легкий ланцюги є антитілом даного винаходу, а інші важкий і легкий ланцюги є специфічними відносно антигену, іншого, ніж антиген, що представляє інтерес, зшиванням антитіла даного винаходу з другим антитілом стандартними хімічними способами зшивання.

У переважній системі рекомбінантної експресії антитіла, або його антигензв'язувальної частини, даного винаходу рекомбінантний експресуючий вектор, що кодує як важкий ланцюг антитіла, так і легкий ланцюг антитіла, вводять у dhfr-CHO-клітини опосередкованою фосфатом кальцію трансфекцією. У цьому рекомбінантному експресуючому векторі гени важкого ланцюга і легкого ланцюга, кожен, функціонально зв'язані з регуляторними елементами енхансером CMV/промотором AdMLP, для запуску високих рівнів транскрипції цих генів. Цей рекомбінантний експресуючий вектор несе також ген DHFR, який уможливорює відбір CHO-клітин, що були трансфектовані цим вектором, з використанням відбору з метотрексатом/ампліфікації. Відібрані трансформовані клітини-хазяїни культивують для можливості експресії важкого і легкого ланцюгів антитіла, і інтактного антитіла з культурального середовища. Стандартні способи молекулярної біології використовують для одержання рекомбінантного експресуючого вектора, трансфекції клітин-хазяїнів, відбору на трансформанти, культивування клітин-хазяїнів і витягання антитіла з культурального середовища. Крім того, даний винахід забезпечує спосіб

синтезу рекомбінантного антитіла даного винаходу культивуванням клітини-хазяїна даного винаходу в придатному культуральному середовищі, поки не синтезується рекомбінантне антитіло даного винаходу. Цей спосіб може додатково передбачати виділення рекомбінантного антитіла з культурального середовища.

5 1. Анти-IL-13-антитіла

Таблиця 5 є списком амінокислотних послідовностей VH- і VL-областей переважних анти-hIL-13-антитіл даного винаходу.

Таблиця 5

Перелік амінокислотних послідовностей VH- і VL-областей

SEQ ID NO:	Область білка		Послідовність
			123456789012345678901234567890
32	VH 25C8		QVRLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFT SSWIHWVNQRPGQGLEWIGMIHPDSETRL NQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSED SAVYYCASTATDFDYWGQGTTLTVSS
	VH 25C8 CDR-H1	Залишки 31-35 SEQ ID NO:32	SSWIH
	VH 25C8 CDR-H2	Залишки 50-66 SEQ ID NO:32	MIHPDSETRLNQKFKD
	VH 25C8 CDR-H3	Залишки 99-105 SEQ ID NO:32	TATDFDY
33	VL 25C8		DVVLQTPLSLFPVNIGDQASISCKSTKSL NSDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLVSNRF SGAPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGV YYCFQHNLYPLTFGAGTNLELKR
	VL 25C8 CDR-L1	Залишки 24-39 SEQ ID NO:33	KSTKSLNSDGFTYLD
	VL 25C8 CDR-L2	Залишки 55-61 SEQ ID NO:33	LVSNRFS
	VL 25C8 CDR-L3	Залишки 94-102 SEQ ID NO:33	FQHNLYPLT
34	VH 9C11		QVRLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFT SSWIHWVNQRPGQGLEWIGMIHPDSETRL NQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSED SAVYYCASTATDFDYWGQGTTLTVSS
	VH 9C11 CDR-H1	Залишки 31-35 SEQ ID NO:34	SSWIH
	VH 9C11 CDR-H2	Залишки 50-66 SEQ ID NO:34	MIHPDSETRLNQKFKD
	VH 9C11 CDR-H3	Залишки 99-105 SEQ ID NO:34	TATDFDY
35	VL 9C11		DVVLQTPLSLFPVNIGDQASISCRSTQTL NSDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGV YYCFQNNLYPLTFGAGTKLELKR
	VL 9C11 CDR-L1	Залишки 24-39 SEQ ID NO:35	RSTQTLNSDGFTYLD
	VL 9C11 CDR-L2	Залишки 55-61 SEQ ID NO:35	LVSNRFS
	VL 9C11 CDR-L3	Залишки 94-102 SEQ ID NO:35	FQNNLYPLT
36	VH 21D9		QVQLQQSGDDLVPKPGASVKLSCKASGYTFT SYWINWIKRPGQGLEWIGHIAPGSGETYD NEMFKDKAKLTVDTSSTAYIHLSSLSED SAVYFCARGSTFFYAMDYWGQGTSTVTVSS
	VH 21D9 CDR-H1	Залишки 31-35 SEQ ID NO:36	SYWIN
	VH 21D9 CDR-H2	Залишки 50-66 SEQ ID NO:36	HIAPGSGETYDNEMFKD
	VH 21D9 CDR-	Залишки 99-109 SEQ ID	GSFTFFYAMDY

	H3	NO:36	
37	VL 21D9		DVLMQTPTPLSLPVSLGDAQASISCRSSQNIV HSNGKTYLEWYLQRPQGSPKLLIYKVSNR SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGV YYCFQGSHPVPTFGGGTKLEIKR
	VL 21D9 CDR-L1	Залишки NO:37	24-39 SEQ ID RSSQNIVHSNGKTYLE
	VL 21D9 CDR-L2	Залишки NO:37	55-61 SEQ ID KVSNRFS
	VL 21D9 CDR-L3	Залишки NO:37	94-102 SEQ ID FQGSHPVPT
38	VH 22D10		QVQLQQSGDDLVPKPGASVKLSCKASGYTFT SYWINWIKQRPQGLEWIGHIAPGSGETYD NEMFKDKAKLTVDTSSTAYIHLSSLSED SAVYFCARGSFYAMDYWGQTSVTVSS
	VH 22D10 CDR-H1	Залишки NO:38	31-35 SEQ ID SYWIN
	VH 22D10 CDR-H2	Залишки NO:38	50-66 SEQ ID HIAPGSGETYDNEMFKD
	VH 22D10 CDR-H3	Залишки NO:38	99-109 SEQ ID GSFTFFYAMDY
37	VL 22D10		DVLMQTPTPLSLPVSLGDAQASISCRSSQNIV HSNGKTYLEWYLQRPQGSPKLLIYKVSNR SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGV YYCFQGSHPVPTFGGGTKLEIKR
	VL 22D10 CDR-L1	Залишки NO:37	24-39 SEQ ID RSSQNIVHSNGKTYLE
	VL 22D10 CDR-L2	Залишки NO:37	55-61 SEQ ID KVSNRFS
	VL 22D10 CDR-L3	Залишки NO:37	94-102 SEQ ID FQGSHPVPT
39	VH 5F1		QVQLQQSGAELARPGTSVKLSCKASGYTFT TYGISWVKQRTGGQLEWIGEIYPGSYNTYY NEKFRGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSED SAVYFCSRWRTSYFSDYGYFDYWGQTTLT VSS
	VH 5F1 CDR-H1	Залишки NO:39	31-35 SEQ ID TYGIS
	VH 5F1 CDR-H2	Залишки NO:39	50-66 SEQ ID EIYPGSYNTYYNEKFRG
	VH 5F1 CDR-H3	Залишки NO:39	99-112 SEQ ID WRTSYFSDYGYFDY
40	VL 5F1		DVVMQTPTPLSLPVSLGDAQASISCRSSQSLV HSHGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYTVSNR SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGV YFCQSSTHVPPTFGGGTKLEIKR
	VL5F1 CDR-L1	Залишки NO:40	24-39 SEQ ID RSSQSLVHSHGNTYLH
	VL 5F1 CDR-L2	Залишки NO:40	55-61 SEQ ID TVSNRFS
	VL 5F1 CDR-L3	Залишки NO:40	94-102 SEQ ID SQSTHVPPT
41	VH 5G1		QVQLQQSGAELARPGTSVKLSCKASGYTFT TYGVSWVKQRTGGQLEWIGEIYPGNNTYY NEKFRGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSED SAVYFCSRWRTSYFSDYGYFDYWGQTTLT VSS
	VH 5G1 CDR-H1	Залишки NO:41	31-35 SEQ ID TYGVS
	VH 5G1 CDR-H2	Залишки NO:41	50-66 SEQ ID EIYPGNNTYYNEKFRG
	VH 5G1 CDR-H3	Залишки NO:41	99-112 SEQ ID WRTSYFSDYGYFDY

40	VL 5G1					DVVMTQTPLSLPVSLGDAQISCR <b>SSQSLV</b> <b>HSHGNTYLEWY</b> LQKPGQSPKLLIY <b>TVSNRF</b> SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGV YFC <b>SQSTHVPY</b> TFGGGTKLEIKR
	VL 5G1 CDR-L1	Залишки NO:40	24-39	SEQ	ID	RSSQSLVHSHGNTYLH
	VL 5G1 CDR-L2	Залишки NO:40	55-61	SEQ	ID	TVSNRFS
	VL 5G1 CDR-L3	Залишки NO:40	94-102	SEQ	ID	SQSTHVPYT
42	VH 3H7					EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFS <b>TYAMSWVRQTPEKRL</b> EWVAG <b>ISSGGSYTY</b> <b>PETMKG</b> RFTISRDNARNTLYLQMSSLRSED TAIYYCTRG <b>SWGQ</b> TSVTVSS
	VH 3H7 CDR-H1	Залишки NO:42	31-35	SEQ	ID	TYAMS
	VH 3H7 CDR-H2	Залишки NO:42	50-66	SEQ	ID	GISSGGSYTYYPETMKG
	VH 3H7 CDR-H3	Залишки NO:42	99-100	SEQ	ID	GS
43	VL 3H7					DVVLQTPLTSLSVTIGQPASISCK <b>SSQSL</b> <b>DS</b> DGETYLNWLLQRPQSPKRLIY <b>LVSKLD</b> SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGV YYC <b>WQGT</b> HFPWTFGGGTKLEIKR
	VL 3H7 CDR-L1	Залишки NO:43	24-39	SEQ	ID	KSSQSLLDSDGETYLN
	VL 3H7 CDR-L2	Залишки NO:43	55-61	SEQ	ID	LVSKLDS
	VL 3H7 CDR-L3	Залишки NO:43	94-102	SEQ	ID	WQGT HFPWT
44	VH 14B2					EVKLVESGGGLVLRPGGSLKLSAASGFTFS <b>SYAMN</b> WVRQTPEKRL <b>EWV</b> AS <b>ISSGGNI</b> Y <b>YS</b> <b>DSVKG</b> RFTISRDNARNTLHLQMSSLRSED AMYCARD <b>DGYLYAM</b> DYWGQTSVTVSS
	VH 14B2 CDR-H1	Залишки NO:44	31-35	SEQ	ID	SYAMN
	VH 14B2 CDR-H2	Залишки NO:44	50-65	SEQ	ID	SISSGGNIYYSDSVKG
	VH 14B2 CDR-H3	Залишки NO:44	98-106	SEQ	ID	DGYLYAMDY
45	VL 14B2					DIVMSQSPSSSLAVSVGEKVTMSCK <b>SSQN</b> LL <b>YSSNQ</b> KNYLA <b>WYQ</b> KPGQSPKLLIY <b>WASTR</b> <b>ES</b> GVDPDRFTGSGSGTDFTLTIS <b>SVKAED</b> LA VYYC <b>QQYYSYP</b> TFGSGTKLEIKR
	VL 14B2 CDR-L1	Залишки NO:45	24-40	SEQ	ID	KSSQNLLYSSNQKNYLA
	VL 14B2 CDR-L2	Залишки NO:45	56-62	SEQ	ID	WASTRES
	VL 14B2 CDR-L3	Залишки NO:45	95-103	SEQ	ID	QQYYSYPFT
46	VH 13C5					QVTLKESGPGILQPSQTL <b>SLT</b> CSFGFSLS <b>TSDMGVDW</b> IRQPSGKGLEWLA <b>HIWDDV</b> KR <b>YNPALK</b> SRLTISKDTSSSQVFLMLASVDTA DTATYYCART <b>VSSGYI</b> Y <b>AM</b> DYWGQTSVT VSS
	VH 13C5 CDR-H1	Залишки NO:46	32-38	SEQ	ID	SDMGVDW
	VH 13C5 CDR-H2	Залишки NO:46	52-67	SEQ	ID	HIWWDDVKRYNPALKS
	VH 13C5 CDR-H3	Залишки NO:46	100-112	SEQ	ID	TVSSGYIYYAMDY
47	VL 13C5					DIQMTQTASSLSASLGDRVTISCR <b>ASQ</b> DIR <b>NYL</b> NWYQRKPDGTVKLLIF <b>YTSKL</b> HS <b>GV</b> PS RFGSGSGTDYSLTIRNLEQ <b>EDIATYFC</b> Q <b>Q</b> <b>GNTLPL</b> TFGGGTKLEIKR

	VL 13C5 CDR-L1	Залишки NO:47	24-34	SEQ	ID	RASQDIRNYLN
	VL 13C5 CDR-L2	Залишки NO:47	50-56	SEQ	ID	YTSKLHS
	VL 13C5 CDR-L3	Залишки NO:47	89-97	SEQ	ID	QQGNTLPLT
48	VH 29G5					QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSL <b>TSDMGVDWIRQPSGKDLEWLAHIWDDVKR</b> <b>YNPALKSRLTISKDTSSSQVFLMLASVDTA</b> DTATYYCARIVSSGYIYYALDYWGQGTSTV VSS
	VH 29G5 CDR-H1	Залишки NO:48	31-37	SEQ	ID	TSDMGVD
	VH 29G5 CDR-H2	Залишки NO:48	52-67	SEQ	ID	HIWWDDVKRYNPALKS
	VH 29G5 CDR-H3	Залишки NO:48	100-112	SEQ	ID	IVSSGYIYYALDY
49	VL 29G5					DIQMTQTASSLSASLGDRVTISCRASQDIR <b>NYLNWYQRPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPS</b> RFGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQ <b>GNTLPLTFGGGKLEIKR</b>
	VL 29G5 CDR-L1	Залишки NO:49	24-34	SEQ	ID	RASQDIRNYLN
	VL 29G5 CDR-L2	Залишки NO:49	50-56	SEQ	ID	YTSRLHS
	VL 29G5 CDR-L3	Залишки NO:49	89-97	SEQ	ID	QQGNTLPLT
50	VH 33C3					QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSL <b>TSDLGVGWIRQPSGKLEWLAHIWDDVKR</b> <b>YNPALKSRLTISKDTSSSQVFLMIASVDTA</b> DTATYYCARIGSSGYIYYEMDYWGQGTSTV VSS
	VH33C3CDR-H1	Залишки NO:50	31-37	SEQ	ID	TSDLGVG
	VH33C3CDR-H2	Залишки NO:50	52-67	SEQ	ID	HIWWDDVKRYNPALKS
	VH 33C3CDR-H3	Залишки NO:50	100-112	SEQ	ID	IGSSGYIYYEMDY
51	VL 33C3					DIQMTQTSSLSASLGDRVTITCRASQDIR <b>NYLNWYQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPS</b> RFGSGSGTDYSLTISNLDQEDIATYFCQQ <b>GNTLPLTFGGGTRLEIKR</b>
	VL 33C3 CDR-L1	Залишки NO:49	24-34	SEQ	ID	RASQDIRNYLN
	VL 33C3 CDR-L2	Залишки NO:49	60-66	SEQ	ID	YTSRLHS
	VL 33C3 CDR-L3	Залишки NO:49	89-97	SEQ	ID	QQGNTLPLT
52	VH 4A8					EVQLQQSGAEFVRPGALVKLSCKASGFNIK <b>DYYMYWVKRPEQGLEWIGRIDPENGNTIY</b> <b>DPKFQGKASITGDTSSNTAYLQLSSLTSED</b> TAVYYCARYAYYGPFDDYWGQGTTLTVSS
	VH 4A8 CDR-H1	Залишки NO:52	31-35	SEQ	ID	DYYMY
	VH 4A8 CDR-H2	Залишки NO:52	50-66	SEQ	ID	RIDPENGNTIYDPKFQG
	VH 4A8 CDR-H3	Залишки NO:52	99-107	SEQ	ID	YAYYGPFDDY
53	VL 4A8					QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSIGT <b>TNNYANWVQEKPDHLFTGLIGSTNNRAFGV</b> PARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFC <b>ALWYSNHWVFGGKTLTVLG</b>
	VL 4A8 CDR-L1	Залишки NO:53	23-36	SEQ	ID	RSSIGTVTTNNYAN



	VL 4A8 CDR-L2	Залишки NO:53	52-58	SEQ	ID	STNNRAP
	VL 4A8 CDR-L3	Залишки NO:53	91-99	SEQ	ID	ALWYSNHWW
54	VH 1B6					QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLT <b>GYGVN</b> WVRQPPGKGLEWLG <b>MIWGDERIDYN</b> <b>SALKS</b> RLSITKDNSK SQVFLKMNSLQTD GRYFCARD <b>DGYFPYAMDY</b> WGQGTSTVTVSS
	VH 1B6 CDR-H1	Залишки NO:54	31-35	SEQ	ID	GYGVN
	VH 1B6 CDR-H2	Залишки NO:54	50-65	SEQ	ID	MIWGDERIDYNSALKS
	VH 1B6 CDR-H3	Залишки NO:54	98-107	SEQ	ID	DGYFPYAMDY
55	VL 1B6					NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASE <b>TV</b> D <b>SYGKSYL</b> HWYQQKPGQPPKLLIY <b>LASNLES</b> GVPARFSGSGSR TDFTLIIDPVEADDAATY YC <b>QQNNEGPR</b> TFGGGTKLEIKR
	VL 1B6 CDR-L1	Залишки NO:55	24-38	SEQ	ID	RASETVDSYGKSYLH
	VL 1B6 CDR-L2	Залишки NO:55	54-60	SEQ	ID	LASNLES
	VL 1B6 CDR-L3	Залишки NO:55	93-101	SEQ	ID	QQNNEGPR
56	VH 3E5					QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLT <b>GSSIN</b> WVRQPPGKGLEWLG <b>MIWGGRIDYN</b> <b>SVLKS</b> RLSISKDSK SQVFLKMNSLQADDT ARYYCARD <b>DGYFPYAMVY</b> WGQGTSTVTVSS
	VH 3E5 CDR-H1	Залишки NO:56	31-35	SEQ	ID	GSSIN
	VH 3E5 CDR-H2	Залишки NO:56	50-65	SEQ	ID	MIWGGRIDYNSVLKS
	VH 3E5 CDR-H3	Залишки NO:56	98-107	SEQ	ID	DGYFPYAMVY
57	VL 3E5					NIVLTQSPASLAVSLGQRATIFCRASE <b>SVD</b> <b>SYGNSFMH</b> WYQQKSGQPPKLLIY <b>LASNLES</b> GVPARFSGSGSR TDFTLTIDPVEADDAATF YC <b>QQNNENPR</b> TFGGGTKLEIKR
	VL 3E5 CDR-L1	Залишки NO:57	24-38	SEQ	ID	RASESVDSYGNSFMH
	VL 3E5 CDR-L2	Залишки NO:57	54-60	SEQ	ID	LASNLES
	VL 3E5 CDR-L3	Залишки NO:57	93-101	SEQ	ID	QQNNENPR
58	VH 6C8					QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSEFSLT <b>GSSVN</b> WVRQPPGKGLEWLG <b>MIWGGRIDYN</b> <b>SALKS</b> RLSISKDNSK SQVFLKMNSLQTD ARYYCARD <b>DGYFPYAMNY</b> WGQGTSTVTVSS
	VH 6C8 CDR-H1	Залишки NO:58	31-35	SEQ	ID	GSSVN
	VH 6C8 CDR-H2	Залишки NO:58	50-65	SEQ	ID	MIWGGRIDYNSALKS
	VH 6C8 CDR-H3	Залишки NO:58	98-107	SEQ	ID	DGYFPYAMNY
59	VL 6C8					NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASE <b>SVD</b> <b>SYGNSFMH</b> WYQQKPGQPPKLLIY <b>LASNLES</b> GVPARFSGSGSRADFTLTIDPVEADDAATY YC <b>QQNNENPR</b> TFGGGTKLEIKR
	VL 6C8 CDR-L1	Залишки NO:59	24-38	SEQ	ID	RASESVDSYGNSFMH
	VL 6C8 CDR-L2	Залишки NO:59	54-60	SEQ	ID	LASNLES
	VL 6C8 CDR-L3	Залишки	93-101	SEQ	ID	QQNNENPR

		NO:59	
60	VH 5D3		QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLT <b>GYNINWVRQPPGKGLEWLG LIWGDGNTAFN</b> <b>SALKSRLSISKDNSKSQVFLKLSLQTD</b> ARYYCARD <b>DGYYPYAIKY</b> WGQGSTVTVSS
	VH 5D3 CDR-H1	Залишки NO:60	31-35 SEQ ID GYNIN
	VH 5D3 CDR-H2	Залишки NO:60	50-65 SEQ ID LIWGDGNTAFNSALKS
	VH 5D3 CDR-H3	Залишки NO:60	98-107 SEQ ID DGYYPYAIKY
61	VL 5D3		NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASETVD <b>SYGNSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLES</b> GVPARFSGSGSR TDFTLTIDPVEADDAATY YC <b>QQNNEDPRT</b> FGGGTKLEIKR
	VL 5D3 CDR-L1	Залишки NO:61	24-38 SEQ ID RASETVDSYGNSFMH
	VL 5D3 CDR-L2	Залишки NO:61	54-60 SEQ ID LASNLES
	VL 5D3 CDR-L3	Залишки NO:61	93-101 SEQ ID QQNNEDPRT
62	VH 8B6		QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLT <b>GHNINWVRQPPGKGLEWLG MIWGDGNTDFN</b> <b>SALKSRLSISKDNSKSQVFLKLSLQTD</b> ARYYCARD <b>DGYYPYAIKF</b> WGQGSTVTVSS
	VH 8B6 CDR-H1	Залишки NO:62	31-35 SEQ ID GHNIN
	VH 8B6 CDR-H2	Залишки NO:62	50-65 SEQ ID MIWGDGNTDFNSALKS
	VH 8B6 CDR-H3	Залишки NO:62	98-107 SEQ ID DGYYPYAIKF
63	VL 8B6		HIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASETVD <b>SYGSSFLHWYQQKPGQPPKLLIYLASKLES</b> GVPARFSGSGSR TDFTLTIDPVEADDAATY YC <b>QQNNEGPR</b> TFGGGSKLEIKR
	VL 8B6 CDR-L1	Залишки NO:63	24-38 SEQ ID RASETVDSYGSSFLH
	VL 8B6 CDR-L2	Залишки NO:63	54-60 SEQ ID LASKLES
	VL 8B6 CDR-L3	Залишки NO:63	93-101 SEQ ID QQNNEGPR

Попередні CDR-послідовності виділеного анти-IL-13-антитіл а встановлюють нове сімейство IL-13-зв'язувальних білків, виділених відповідно до даного винаходу, що містить поліпептиди, які включають CDR-послідовності, перераховані в таблиці 6 нижче. Для генерування і відбору CDR даного винаходу, які мають переважне зв'язування IL-13 і/або переважну нейтралізуючу активність відносно IL-13 і/або hIL-13, можуть бути використані стандартні способи, відомі в даній галузі, для генерування зв'язувальних білків даного винаходу й оцінки зв'язування IL-13 і/або hIL-13 і/або нейтралізуючих властивостей цих зв'язувальних білків, у тому числі, але не тільки, конкретно описаних у даному описі.

Таблиця 6

Консенсусні афінні ліганди CDR IL-13 (альтернативні залишки перераховані нижче кожного положення амінокислоти; - указує на те, що цей залишок може бути відсутнім)

CDR-область	Ідентифікатор послідовності	Консенсусна послідовність																	
CDR-H1	SEQ ID NO:64	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub>																	
		T S D M G V D																	
		D S W I H																	
		G Y Y M S																	
		S L A Y N G																	
CDR-H2	SEQ ID NO:65	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>	X <sub>11</sub>	X <sub>12</sub>	X <sub>13</sub>	X <sub>14</sub>	X <sub>15</sub>	X <sub>16</sub>	X <sub>17</sub>	
		M	I	H	P	S	D	S	E	T	R	L	N	Q	K	F	K	D	
		E	-	Y	S	G	G	Y	N	I	Y	Y	P	E	M	L	R	G	
		H		A	W	E	S	G	Y	K	I	D	S	D	S	V	Q	S	
		R		D	G	D	E	V		D	F	D	P	T	M				
CDR-H3	SEQ ID NO:66																		
			X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>	X <sub>11</sub>	X <sub>12</sub>	X <sub>13</sub>	X <sub>14</sub>			
			W	R	T	S	Y	F	S	D	Y	G		Y	D	Y			
			T	A	F	T	F	Y	Y	L				A	V	F			
			G	S	Y	Y	G		I	Y				P	V				
CDR-L1	SEQ NO:67	ID																	
			X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>	X <sub>11</sub>	X <sub>12</sub>	X <sub>13</sub>	X <sub>14</sub>	X <sub>15</sub>	X <sub>16</sub>	X <sub>17</sub>
			K	S	S	Q	N	L	L	Y	S	S	N	Q	K	N	Y	L	A
			R	A	T	K	S	T	Q	N	I	D	G		F	T	F	A	D
						I	T	S	V	H	T	N			N	S	M	E	H
CDR-L2	SEQ NO:68	ID																	
										X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>			
										L	V	S	N	R	F	S			
										S	T	N	K	L	D	P			
CDR-L3	SEQ NO:69	ID																	
										X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	
										F	Q	H	N	Y	L	P	L	T	

## 2. Химерні анти-IL-13-антитіла

- 5 Химерне антитіло є молекулою, у якій різні частини цього антитіла вироблені з різних видів тварин, наприклад, антитіла мають варіабельну ділянку, вироблену з мишачого моноклонального антитіла, і константну ділянку імуноглобуліну людини. Способи одержання

химерних антитіл відомі в даній галузі й обговорюються докладно в прикладі 2.1. Дивіться, наприклад, Morrison, Science 229: 1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Gillies et al., (1989) J. Immunol. Methods 125:191-202; патенти США з номерами 5807715; 4816567 і 4816397, що включені в даному описі як посилання в їх повному вигляді. Крім того, можуть бути використані способи, розроблені для одержання "химерних антитіл" (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855; Neuberger et al., 1984, Nature 312:604-608; Takeda et al., 1985, Nature 314:452-454, що включені в даному описі як посилання в їх повному вигляді) сплайсингом генів з молекули мишачого антитіла придатної антигенспецифічності разом з генами з молекули антитіла людини придатної біологічної активності.

В одному варіанті здійснення химерні антитіла даного винаходу одержують заміною константної ділянки важкого ланцюга мишачих моноклональних антитіл проти IL-13 людини, описаних у розділі 1, константною ділянкою IgG1 людини. У конкретному варіанті здійснення химерне антитіло даного винаходу містить варіабельну ділянку важкого ланцюга ( $V_H$ ), що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:34; SEQ ID NO:36; SEQ ID NO:41; SEQ ID NO:42; SEQ ID NO:46, і варіабельну ділянку легкого ланцюга ( $V_L$ ), що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:35; SEQ ID NO:37; SEQ ID NO:40; SEQ ID NO:43 або SEQ ID NO:47.

### 3. Гуманізовані анти-IL-13-антитіла

Гуманізовані антитіла є молекулами антитіл з антитіла виду нелюдини, які зв'язують бажаний антиген, що має одну або декілька ділянок, що визначають комплементарність (CDR), з виду нелюдини і каркасні ділянки з молекули імуноглобуліну людини. Відомі послідовності Ig людини описані, наприклад, [www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi); [www.atcc.org/phage/hdb.html](http://www.atcc.org/phage/hdb.html); [www.sci-quest.com/](http://www.sci-quest.com/); [www.abcam.com/](http://www.abcam.com/); [www.antibodyresource.com/onlinecomp.html](http://www.antibodyresource.com/onlinecomp.html); [www.public.iastate.edu/about.pedro/research\\_tools.html](http://www.public.iastate.edu/about.pedro/research_tools.html); [www.mgen.uniheidelberg.de/SD/IT/IT.html](http://www.mgen.uniheidelberg.de/SD/IT/IT.html); [www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm](http://www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm);

[www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html](http://www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html); [www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/](http://www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/); [www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/m-ikeimages.html](http://www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/m-ikeimages.html); [www.anti-bodyresource.com/](http://www.anti-bodyresource.com/); [mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html](http://mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html); [www.immunologylink.com/](http://www.immunologylink.com/); [pathbox.wustl.edu/about.hcenter/index.html](http://pathbox.wustl.edu/about.hcenter/index.html); [www.bio-tech.ufl.edu/about.hcl/](http://www.bio-tech.ufl.edu/about.hcl/); [www.pebio.com/pa/340913/340913.html](http://www.pebio.com/pa/340913/340913.html); [www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/](http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/); [www.m.ehime-u.ac.jp/about.yasuhito-/Elisa.html](http://www.m.ehime-u.ac.jp/about.yasuhito-/Elisa.html); [www.biodesign.com/table.asp](http://www.biodesign.com/table.asp); [www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html](http://www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html); [www.biotech.ufl.edu/about.fccl/protocol.html](http://www.biotech.ufl.edu/about.fccl/protocol.html); [www.isac-net.org/sites\\_geo.html](http://www.isac-net.org/sites_geo.html); [aximtl.imt.unimarburg.de/about.rek/AEP-Start.html](http://aximtl.imt.unimarburg.de/about.rek/AEP-Start.html); [baserv.uci.kun.nl/about.jra-ats/links1.html](http://baserv.uci.kun.nl/about.jra-ats/links1.html); [www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/](http://www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/); [www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html); [www.ibt.unam.mx/vir/V\\_mice.html](http://www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html); [imgt.cnusc.fr:8104/](http://imgt.cnusc.fr:8104/); [www.biochem.ucl.ac.uk/about.martin/abs/index.html](http://www.biochem.ucl.ac.uk/about.martin/abs/index.html); [anti-body.bath.ac.uk/](http://anti-body.bath.ac.uk/); [abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html](http://abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html); [www.unizh.ch/about.honegger/AHOseminar/Slide01.html](http://www.unizh.ch/about.honegger/AHOseminar/Slide01.html); [www.cryst.bbk.ac.uk/about.ubcg07s/](http://www.cryst.bbk.ac.uk/about.ubcg07s/); [www.nimr.mrc.ac.uk/CC/caewg/caewg.htm](http://www.nimr.mrc.ac.uk/CC/caewg/caewg.htm); [www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/h-umanisation/TANHP.html](http://www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/h-umanisation/TANHP.html); [www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat'aim.html](http://www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat'aim.html); [www.bio-sci.missouri.edu/smithgp/index.html](http://www.bio-sci.missouri.edu/smithgp/index.html); [www.cryst.bioc.cam.ac.uk/about.fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html](http://www.cryst.bioc.cam.ac.uk/about.fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html); [www.jerini.de/frproducts.htm](http://www.jerini.de/frproducts.htm); [www.patents.ibm.com/ibm.html](http://www.patents.ibm.com/ibm.html). Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983), кожна включена в даному описі повністю як посилання. Такі імпортовані (екзогенні) послідовності можуть бути використані для зменшення імуногенності або зменшення, посилення або модифікації зв'язування, афінності, швидкості асоціації, швидкості дисоціації, авідності, специфічності, періоду напівжиття або іншої придатної характеристики, як відомо в даній галузі.

Каркасні залишки в каркасних ділянках імуноглобуліну людини можуть бути замінені відповідним залишком з CDR-донорського антитіла для зміни, переважно поліпшення, зв'язування антигену. Ці каркасні заміни ідентифікують способами, відомими в даній галузі, наприклад, моделюванням взаємодій CDR і каркасних залишків, для ідентифікації каркасних залишків, важливих для зв'язування антигену і порівняння послідовностей для ідентифікації незвичайних каркасних залишків у конкретних положеннях. (Дивіться, наприклад, Queen et al., патент США № 5585089; Riechmann et al., Nature 332:323 (1988), що включені в даному описі як посилання в їх повному вигляді). Тривимірні моделі імуноглобулінів звичайно доступні і відомі кваліфікованим в даній галузі фахівцям. Доступні комп'ютерні програми, які ілюструють і зображують можливі тривимірні конформаційні структури вибраних кандидатних послідовностей імуноглобулінів. Обстеження цих зображень дозволяє аналізувати ймовірну роль залишків у функціонуванні кандидатної послідовності імуноглобуліну, тобто аналізувати залишки, які впливають на здатність кандидатного імуноглобуліну зв'язувати його антиген. Таким шляхом FR-залишки можуть бути відібрані й об'єднані з консенсусних і імпортованих (екзогенних)

послідовностей таким чином, що досягається бажана властивість антитіла, така як збільшена афінність відносно антигену-мішені (антигенів-мішеней). Звичайно залишки CDR безпосередньо і найбільш суттєво беруть участь у впливі на зв'язування антигену. Антитіла можуть бути гуманізовані з використанням різноманітних способів, відомих у даній галузі, таких як, але не тільки, способи, описані в Jones et al., *Nature* 321:522 (1986); 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), Padlan, *Molecular Immunology* 28 (4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., *Protein Engineering* 7(6):805-814 (1994); Roguska. et al., *PNAS* 91:969-973 (1994); публікації PCT WO 91/09967, PC17: US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246, EP 592106; EP 519596, EP 239400, патентах США з номерами 5565332, 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5766886, 5714352, 6204023, 6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539; 4816567, описи яких, у тому числі цитовані в них посилання, включені в даному описі як посилання в повному вигляді.

#### С. Одержання антитіл і продукуючих антитіла клітинних ліній

Переважно, анти-IL-13-антитіл а даного винаходу виявляють високу здатність зменшення або нейтралізації активності IL-13, наприклад, як оцінено одним або декількома аналізами *in vitro* і *in vivo*, відомими в даній галузі (наприклад, дивіться приклад 1.1.3). Наприклад, ці антитіла нейтралізують індуковане IL-13 продукування TARC клітинами A-549 з величинами IC<sub>50</sub> у діапазоні щонайменше приблизно 10<sup>-8</sup> М, приблизно 10<sup>-9</sup> М або приблизно 10<sup>-10</sup> М.

У переважних варіантах здійснення виділене антитіло, або його антигензв'язувальна частина, зв'язує IL-13 людини, причому це антитіло, або його антигензв'язувальна частина, дисоціюється від IL-13 людини з константою швидкості дисоціації  $k_{off}$  приблизно 0,1 с.<sup>-1</sup> або менше, як визначено по резонансу поверхневих плазмонів, або інгібує IL-13 людини або активність IL-13 людини з IC<sub>50</sub> приблизно 1×10<sup>-6</sup> М або менше. Альтернативно, це антитіло, або його антигензв'язувальна частина, може дисоціюватися від IL-13 людини з константою швидкості дисоціації  $k_{off}$  приблизно 1×10<sup>-2</sup> с.<sup>-1</sup> або менше, як визначено по резонансу поверхневих плазмонів, або може інгібувати IL-13 людини і/або активність IL-13 людини з IC<sub>50</sub> приблизно 1×10<sup>-7</sup> М або менше. Альтернативно, це антитіло, або його антигензв'язувальна частина, може дисоціюватися від IL-13 людини з константою швидкості дисоціації  $k_{off}$  приблизно 1×10<sup>-3</sup> с.<sup>-1</sup> або менше, як визначено по резонансу поверхневих плазмонів, або може інгібувати IL-13 людини і/або активність IL-13 людини з IC<sub>50</sub> приблизно 1×10<sup>-8</sup> М або менше. Альтернативно, це антитіло, або його антигензв'язувальна частина, може дисоціюватися від IL-13 людини з константою швидкості дисоціації  $k_{off}$  приблизно 1×10<sup>-4</sup> с.<sup>-1</sup> або менше, як визначено по резонансу поверхневих плазмонів, або може інгібувати IL-13 людини і/або активність IL-13 людини з IC<sub>50</sub> приблизно 1×10<sup>-9</sup> М або менше. Альтернативно, це антитіло, або його антигензв'язувальна частина, може дисоціюватися від IL-13 людини з константою швидкості дисоціації  $k_{off}$  приблизно 1×10<sup>-5</sup> с.<sup>-1</sup> або менше, як визначено по резонансу поверхневих плазмонів, або може інгібувати IL-13 людини і/або активність IL-13 людини з IC<sub>50</sub> приблизно 1×10<sup>-10</sup> М або менше. Альтернативно, це антитіло, або його антигензв'язувальна частина, може дисоціюватися від IL-13 людини з константою швидкості дисоціації  $k_{off}$  приблизно 1×10<sup>-5</sup> с.<sup>-1</sup> або менше, як визначено по резонансу поверхневих плазмонів, або може інгібувати IL-13 людини і/або активність IL-13 людини з IC<sub>50</sub> приблизно 1×10<sup>-11</sup> М або менше.

IL-13 виявляє свої дії зв'язуванням з IL-13-рецептором (IL-13R) на поверхні клітини, гетеродимером, що складається з ланцюга IL-13Rα1 (IL-13Rα1) і ланцюга IL-4R (IL-4R). IL-13 зв'язується спочатку з IL-13Rα1 з низкою афінністю (K<sub>D</sub>=2-10 nM) і потім рекрутує IL-4R у цей комплекс, генеруючи високоафінний рецептор (K<sub>D</sub>=0,03-0,4 nM) (Aman, M. J., et al. 1996, *J. Biol. Chem.* 271, 29265-29270; Miloux, et al. 1997, *FEBS Lett.* 401, 163-166; Andrews, et al. 2002, *J. Biol. Chem.* 277, 46073-46078). Гетеродимеризація IL-13R викликає активацію кіназ Janus (Януса), TYK2 і JAK1, конститутивно зв'язаних з IL-13Rα1 і IL-4R, відповідно, з наступною активацією трансдуктора сигналу й активатора транскрипції 6 (STAT6) (Izuhara, K., and Arima, K. 2004, *Drug News Perspect.* 17, 91-98). Є інша IL-13-зв'язувальна одиниця, IL-13Rα2-ланцюг (IL-13Rα2), що зв'язується з IL-13 з високою афінністю (0,25-1,2 nM) (Caput, et al. 1996, *J. Biol. Chem.* 271, 16921-16926; Donaldson et al. 1998, *J. Immunol.* 161, 2317-2324). Інші рецепторні молекули, що беруть участь у комплексі IL-13-IL-13R2, невідомі. Спочатку вважали, що IL-13R2 діє як "рецептор-пастка", що не передає сигналу. Однак надалі було виявлено, що він може зв'язуватися з IL-13 і передавати сигнал через Ар-1-шлях, приводячи до продукування TNF-β у деяких типах клітин, у тому числі макрофагах, що, у свою чергу, приводить до фіброзу легень (Fichtner-Feigl, 2006, *Nat Med* 12:99-106). Таким чином, як IL-13Rα1/IL-4Rα-шлях, так і IL-13Rα2-

шлях додають вклад у загальну патофізіологію астми й інших легеневих запальних станів. Таким чином, терапевтичне анти-IL-13-антитіло, яке блокує зв'язування IL-13 з обома рецепторами, буде більш ефективним, ніж антитіло, яке блокує тільки один рецептор.

Автори виділили моноклональні антитіла, які блокують зв'язування IL-13 як з IL-13R $\alpha$ 1 так і з IL-13R $\alpha$ 2. Як аналіз зв'язування рецептора на основі ELISA, так і аналіз зв'язування <sup>125</sup>I-міченого IL-13 на поверхні клітин продемонстрували, що 13C5, як мишача версія, так і гуманізована версія (тобто 13C5.5), були здатні ефективно блокувати зв'язування IL-13 з обома рецепторами. Антитіла в тій же самій лінії диференціювання, що і 13C5, в тому числі 25C8 і 33C3, були також здатні блокувати зв'язування IL-13 з обома рецепторами. Картування епітопа 13C5 показало, що його сайт зв'язування (сайти зв'язування) включає область С-кінцевої спіралі D IL-13 людини (залишки VRDTK IEVAQ FVKDL LLHLK KLFRE GR, що відповідають амінокислотам 104-130 SEQ ID NO:1). Було зроблене припущення, що область С-кінцевої спіралі D бере участь у взаємодіях з IL-13-рецептором (Zuegg et al. 2001, Immunol Cell Biol. 79:332-9). Структура кристала IL-13 людини, у комплексі з Fab-частиною антитіла 13C5.5, показала, що 13C5.5 зв'язує область С-кінцевої спіралі D, а також область N-кінцевої спіралі A IL-13 людини. Переважно, це антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, зв'язує IL-13 людини таким чином, що IL-13 із зазначеним антитілом, або його антигензв'язувальним фрагментом, зв'язаним з епітопом, що визначається топографічними областями Ser26-Thr27-Ala28-Leu29-Arg30-Glu31-Leu32-Ile33-Glu34-Glu35-Leu36-Val37-Asn38 і Lys123-Lys124-Leu125-Phe126-Arg127-Glu128-Gly129-Arg130 SEQ ID NO:1, інгібується від зв'язування з IL-13-рецептором. Переважно, це антитіло, або його антигензв'язувальний фрагмент, зв'язує IL-13 людини таким чином, що IL-13 із зазначеним антитілом, або його антигензв'язувальним фрагментом, зв'язаним з епітопом, що визначається топографічними областями Arg30-Glu31-Leu32-Ile33-Glu34-Glu35-Leu36-Val37-Asn38 і Lys123-Lys124-Leu125-Phe126-Arg127 SEQ ID NO:1, інгібується від зв'язування з IL-13 $\alpha$ 2-рецептором.

У деяких варіантах здійснення це антитіло містить константну область важкого ланцюга, таку як константна область IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM або IgD. Переважно, константною ділянкою важкого ланцюга є константна ділянка важкого ланцюга IgG1 або константна ділянка важкого ланцюга IgG4. Крім того, це антитіло може містити константну ділянку легкого ланцюга або константну ділянку легкого ланцюга каппа, або константну ділянку легкого ланцюга лямбда. Переважно, це антитіло містить константну ділянку легкого ланцюга каппа. Альтернативно, частиною антитіла може бути Fab-фрагмент або одноланцюговий Fv-фрагмент.

Заміни амінокислотних залишків у Fc-частині для зміни ефекторної функції антитіл відомі в даній галузі (Winter, et al. патенти США з номерами 5648260; 5624821). Fc-частина антитіла опосередковує декілька важливих ефекторних функцій, наприклад індукцію цитокінів, ADCC, фагоцитоз, комплементзалежну цитотоксичність (CDC) і період напівжиття/швидкість кліренсу антитіла і комплексів антиген-антитіло. У деяких випадках ці ефекторні функції є бажаними для терапевтичного антитіла, але в інших випадках можуть бути небажаними або навіть шкідливими, залежно від цілей терапії. Деякі ізотипи IgG людини, зокрема, IgG1 і IgG3, опосередковують ADCC і CDC через зв'язування з Fc $\gamma$ R і C1q комплексу, відповідно. Неонатальні Fc-рецептори (FcRn) є критичними компонентами, які визначають час напівжиття антитіл у кровотоці. Ще в одному варіанті здійснення щонайменше один амінокислотний залишок замінюють у константній ділянці антитіла, наприклад, Fc-ділянки цього антитіла, так що ефекторні функції антитіла змінюються.

Один варіант здійснення забезпечує мічений зв'язувальний білок, в якому антитіло або частина антитіла даного винаходу дериватизовані або зв'язані з іншою функціональною молекулою (наприклад, іншим пептидом або білком). Наприклад, мічений зв'язувальний білок даного винаходу може бути вироблений функціональним зв'язуванням антитіла або частини антитіла даного винаходу (хімічним зв'язуванням, генетичним злиттям, нековалентною асоціацією або іншим способом) з однією або декількома іншими молекулярними частинками, такими як інше антитіло (наприклад, біспецифічне антитіло або діатіло), детектований агент, цитотоксичний агент, фармацевтичний агент і/або білок або пептид, які можуть опосередковувати асоціацію цього антитіла або частини антитіла з іншою молекулою (такою як область центральної частини (кора) стрептавідину або полігістидинова мітка).

Застосовні детектовані агенти, якими може бути дериватизоване антитіло або частина антитіла даного винаходу, включають флуоресцентні сполуки. Зразкові флуоресцентні детектовані агенти включають флуоресцеїн, флуоресцеїнізотіоціанат, родамін, 5-диметиламін-1-нафталінсульфонілхлорид, фікоеритрин і т. п. Антитіло може бути також дериватизоване детектованими ферментами, такими як лужна фосфатаза, пероксидаза хрому, глюкозооксидаза і т. п. При дериватизації антитіла детектованим ферментом, його детектують додаванням

додаткових реагентів, які цей фермент використовують для утворення детектованого продукту реакції. Наприклад, коли присутня детектована пероксидаза хрому, додавання пероксиду водню і діамінобензидину приводить до забарвленого продукту реакції, який є детектованим. Антитіло може бути також дериватизоване біотином і детектоване непрямим вимірюванням зв'язування

5 авідину або стрептавідину.

Інший варіант здійснення даного винаходу забезпечує кристалізований зв'язувальний білок. Переважно, винахід стосується кристалів повних анти-IL-13-антитіл і їх фрагментів, як описано в даному описі, і готових форм і композицій, що містять такі кристали. В одному варіанті здійснення кристалізований зв'язувальний білок має більш тривалий період напівжиття *in vivo*,

10 ніж розчинна копія зв'язувального білка. В іншому варіанті здійснення зв'язувальний білок зберігає біологічну активність після кристалізації.

Кристалізований зв'язувальний білок даного винаходу може бути одержаний згідно зі способами, відомими в даній галузі й описаними в WO 02072636, включеному в даному описі як посилання.

15 Інший варіант здійснення даного винаходу забезпечує глікозилований зв'язувальний білок, в якому антитіло, або його антигензв'язувальна частина, містить один або декілька вуглеводних залишків. Продуктування виникаючого *in vivo* білка може піддаватися додатковому процесингу, відомому як посттрансляційна модифікація. Зокрема, залишки цукру (глікозильні залишки) можуть додаватися ферментативно за допомогою процесу, названого глікозилюванням.

20 Одержані білки, що несуть ковалентно зв'язані олігосахаридні бічні ланцюги, відомі як глікозиловані білки або глікопротеїни. Антитіла є глікопротеїнами з одним або декількома вуглеводними залишками в Fc-домені, а також варіабельному домені. Вуглеводні залишки в Fc-домені здійснюють суттєвий вплив на ефекторну функцію Fc-домену з мінімальною дією на зв'язування антигену або час напівжиття цього антитіла (R. Jefferis, *Biotechnol. Prog.* 21 (2005), pp. 11-16). На відміну від цього, глікозилювання варіабельного домену може впливати на антигензв'язувальну активність цього антитіла. Глікозилювання у варіабельному домені може здійснювати негативний вплив на афінність зв'язування антитіла, імовірно, унаслідок стеричної перешкоди (Co, M.S., et al., *Mo. Immunol.* (1993) 30:1361-1367), або приводить до збільшеної афінності відносно антигену (Wallick, S.C, et al., *Exp. Med.* (1988) 168:1099-1109; Wright, A., et al., *EMBO J.* (1991) 10:2717-2723).

Один з аспектів даного винаходу спрямований на генерування мутантів сайтів глікозилювання, у яких О-зв'язаний або N-зв'язаний сайт глікозилювання зв'язувального білка був мutowаний. Кваліфікований у даній галузі фахівець може генерувати такі мутанти, використовуючи стандартні добре відомі технології. Мутанти сайтів глікозилювання, що зберігають біологічну активність, але мають збільшену або зменшену зв'язувальну активність, є

35 іншим об'єктом даного винаходу.

Ще в одному варіанті здійснення глікозилювання антитіла, або його антигензв'язувальної частини, є модифікованим. Наприклад, може бути одержане аглікозиловане антитіло (тобто антитіло, що позбавлене глікозилювання). Глікозилювання може бути змінене, наприклад, для збільшення афінності антитіла відносно антигену. Такі вуглеводні модифікації можуть виконуватися, наприклад, зміною одного або декількох сайтів глікозилювання в послідовності антитіла. Наприклад, можуть бути здійснені одна або декілька амінокислотних замін, які приводять до елімінації одного або декількох сайтів глікозилювання варіабельної області для елімінації за допомогою глікозилювання в сайті. Таке аглікозилювання може збільшувати афінність антитіла відносно антигену. Такий підхід описаний більш докладно в публікації PCT WO 2003016466 A2 і патентах США з номерами 5714350 і 6350861, кожний з яких включений у даному описі як посилання в повному вигляді.

Додатково або альтернативно, може бути одержане модифіковане антитіло даного винаходу, яке має змінений тип глікозилювання, наприклад, гіпофукозильоване антитіло, що має зменшені кількості фукозильних залишків, або антитіло, що має збільшені поділяючі на дві рівні частини структури GlcNA. Було показано, що такі змінені картини глікозилювання збільшують ADCC-здатність антитіл. Такі вуглеводні модифікації можуть виконуватися, наприклад, експресією антитіла в клітині-хазяїні зі зміненим апаратом глікозилювання. Клітини зі зміненим апаратом глікозилювання були описані в даній галузі і можуть бути використані як клітини-хазяїни для експресії в них рекомбінантних антитіл даного винаходу для одержання за допомогою цього антитіла зі зміненим глікозилюванням. Дивіться, наприклад, Shields, R. L. et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740; Umana et al. (1999) *Nat. Biotech.* 17: 176-1, а також Європейський патент EP 1176195; публікації PCT WO 03/035835; WO 99/54342 80, описи яких включені в даному описі як посилання в повному вигляді.

Глікозилювання білка залежить від амінокислотної послідовності білка, що представляє інтерес, а також від клітини-хазяїна, у якій експресується цей білок. Різні організми можуть продукувати різні ферменти глікозилювання (наприклад, глікозилтрансферази і глікозидази) і мають різні доступні субстрати (нуклеотидцукри). Унаслідок таких факторів, картина глікозилювання білків і склад глікозильних залишків можуть розрізнятися залежно від системи-хазяїна, в якій експресується конкретний білок. Глікозильні залишки, застосовні в цьому винаході, включають, але не обмежуються ними, глюкозу, галактозу, манозу, фукозу, н-ацетилглюкозамін і сіалову кислоту. Переважно, глікозилований зв'язувальний білок містить глікозильні залишки, так що характер (патерн) глікозилювання є таким же, що і характер (патерн) глікозилювання антитіла людини.

Кваліфікованим у даній галузі фахівцям відомо, що відмінне глікозилювання білка може приводити до відмінних властивостей білка. Наприклад, ефективність терапевтичного білка, продукованого в мікроорганізмі-хазяїні, такому як дріжджі, і глікозилювання, що використовує ендогенний шлях дріжджів, може бути зменшеним у порівнянні з глікозилюванням того ж самого білка, експресованого в клітині ссавця, такий як клітина клітинної лінії CHO. Такі глікопротеїни можуть бути також імуногенними у людини і виявляють зменшений час напівжиття *in vivo* після введення. Конкретні рецептори у людини й інших тварин можуть упізнавати специфічні глікозильні залишки і прискорювати швидкий кліренс цього білка з кровотоку. Інші шкідливі ефекти можуть включати зміни укладання, розчинності, чутливості до протеаз, спрямованої міграції, транспорту, компартменталізації, секреції, упізнавання іншими білками або факторами, антигенності або алергенності білків. Таким чином, практик може віддати перевагу терапевтичному білку з конкретними складом і картиною глікозилювання, наприклад, складом і характером глікозилювання, ідентичними, або щонайменше подібними, зі складом і характером глікозилювання в клітинах людини або у видоспецифічних клітинах передбачуваного індивіда-тварини.

Експресія глікозилованих білків, відмінних від глікозилованих білків клітини-хазяїна, може бути досягнута генетичною модифікацією клітини-хазяїна для експресії гетерологічних ферментів глікозилювання. З використанням способів, відомих у даній галузі, практик може генерувати антитіла або їх антигензв'язувальні частини, які виявляють глікозилювання білків людини. Наприклад, штами дріжджів були генетично модифіковані для експресії ферментів глікозилювання, що не зустрічаються в природі, так що глікозидовані білки (глікопротеїни), продуковані в цих штаммах дріжджів, виявляли глікозилювання білків, ідентичне глікозилюванню білків тваринних клітин, зокрема клітин людини (заявки на патент США 20040018590 і 20020137134 і публікація PCT WO 2005100584 A2).

Крім цих зв'язувальних білків, даний винахід стосується також антиідіотипічного (анти-Id) антитіла, специфічного відносно таких зв'язувальних білків даного винаходу. Анти-Id-антитіло є антитілом, яке упізнає унікальні детермінанти, зв'язані з антигензв'язувальною областю іншого антитіла. Це анти-Id може бути одержане імунізацією тварини зв'язувальним білком або його CDR-вмісною областю. Ця імунізована тварина буде упізнавати ідіотипічні детермінанти і відповідати на ідіотипічні детермінанти імунізуючого антитіла і продукувати анти-Id-антитіло. Це анти-Id-антитіло може бути також використане як "імуноген" для індукції імунної реакції в іншій тварині, що продукує так зване анти-анти-Id-антитіло.

Далі, кваліфікованому в даній галузі фахівцю буде зрозуміло, що білок, що представляє інтерес, може бути експресований з використанням бібліотеки клітин-хазяїнів, генетично сконструйованих для експресії різних ферментів глікозилювання, так що клітини-хазяїни, що є членами цієї бібліотеки, продукують білок, що представляє інтерес, з варіантними картинами глікозилювання. Потім практик може відібрати і виділити білок, що представляє інтерес, з конкретними новими картинами глікозилювання. Переважно, білок, який має конкретну вибрану картину глікозилювання, виявляє поліпшені або змінені біологічні властивості.

#### D. Застосування анти-IL-13-антитіл

Внаслідок їх здатності зв'язуватися з IL-13 людини, антитіла проти IL-13 людини, або їх частини, даного винаходу можуть бути використані для детекції IL-13 людини (наприклад, у біологічній пробі, такий як сироватка або плазма) з використанням загальноприйнятого імуноаналізу, такого як твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA), радіоімуноаналіз (RIA) або імуногістохімія тканини. Даний винахід забезпечує спосіб детекції IL-13 людини в біологічній пробі, який передбачає контактування біологічної проби з антитілом, або частиною антитіла, даного винаходу і детектування або антитіла (або частини антитіла), зв'язаного з IL-13 людини, або незв'язаного антитіла (або частини антитіла), для детекції за допомогою IL-13 людини в біологічній пробі. Антитіло прямо або опосередковано мітять детектованою речовиною для полегшення детекції зв'язаного або незв'язаного антитіла. Придатні детектовані речовини



включають різні ферменти, простатичні групи, флуоресцентні матеріали, люмінесцентні матеріали і радіоактивні матеріали. Приклади придатних ферментів включають пероксидазу хрону, лужну фосфатазу,  $\beta$ -галактозидазу або ацетилхолінестеразу; приклади придатних комплексів простатичної групи включають стрептавідин/біотин і авідин/біотин; приклади

5 придатних флуоресцентних матеріалів включають умбеліферон, флуоресцеїн, флуоресцеїнізотіоціанат, родамін, дихлортриазиніламін-флуоресцеїн, дансилхлорид або фікоеритрин; приклад люмінесцентного матеріалу включає люмінол; і приклади придатного радіоактивного матеріалу включають  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{166}\text{Ho}$  або  $^{153}\text{Sm}$ .

Альтернативно міченню антитіла, IL-13 людини може бути аналізований у біологічних рідинах конкурентним імуноаналізом з використанням rhIL-13-стандартів, мічених детектованою речовиною, і неміченого антитіла проти IL-13 людини. У цьому аналізі біологічну пробу, мічені rhIL-13-стандарту й антитіло проти IL-13 людини об'єднують і визначають кількість міченого rhIL-13-стандарту, зв'язаного з неміченим антитілом. Кількість IL-13 людини в біологічній пробі зворотно пропорційна кількості міченого rhIL-13-стандарту, зв'язаного з анти-IL-13-антитілом.

10

15 Подібним чином, IL-13 людини може бути також аналізований у біологічних рідинах конкурентним імуноаналізом з використанням rhIL-13-стандартів, мічених детектованою речовиною, і неміченого антитіла проти IL-13 людини.

Антитіла і частини антитіл даного винаходу переважно здатні нейтралізувати активність IL-13 людини як *in vitro*, так і *in vivo*. Таким чином, такі антитіла і частини антитіл даного винаходу

20 можуть бути використані для інгібування активності hIL-13, наприклад, в культурі клітин, що містять hIL-13, в індивідах-людях або в інших індивідах-ссавцях, що мають IL-13, з яким перехресно взаємодіє антитіло даного винаходу. В одному варіанті здійснення даний винахід забезпечує спосіб інгібування активності hIL-13, який передбачає контактування hIL-13 з антитілом або частиною антитіла даного винаходу, так що активність hIL-13 інгібується.

25 Наприклад, в культурі клітин, що містить або передбачувано містить hIL-13, антитіло або частина антитіла даного винаходу можуть бути додані до культурального середовища для інгібування активності hIL-13 у цій культурі.

В іншому варіанті здійснення даний винахід забезпечує спосіб зменшення активності hIL-13 у індивіда, переважно у індивіда, що страждає від захворювання або порушення, у якому

30 активність IL-13 є шкідливою для здоров'я. Даний винахід забезпечує способи зменшення активності IL-13 у індивіда, що страждає від такого захворювання або порушення, причому цей спосіб передбачає введення індивіду антитіла або частини антитіла даного винаходу, так що активність IL-13 у індивіда зменшується. Переважно, IL-13 є IL-13 людини й індивід є індивідом-людиною. Альтернативно, цей індивід може бути ссавцем, експресуючим IL-13, з яким здатне зв'язуватися антитіло даного винаходу. Крім того, цей індивід може бути ссавцем, якому був введений IL-13 (наприклад, введенням IL-13 або експресією анти-IL-13-трансгена). Антитіло даного винаходу може вводитися індивіду-людині для терапевтичних цілей. Крім того, антитіло даного винаходу може бути введено ссавцю (нелюдині), експресуючому IL-13, з яким здатне зв'язуватися це антитіло, для ветеринарних цілей або як модель захворювання людини в

40 тварині. Що стосується останнього застосування, такі моделі тварин можуть бути застосовні для оцінки терапевтичної ефективності антитіл даного винаходу (наприклад, дослідження доз і часових схем введення).

У даному контексті термін "порушення, в якому активність IL-13 є шкідливою" включає захворювання й інші порушення, для яких було показано, що присутність IL-13 у індивідів, що

45 страждають від цього порушення, є відповідальним за патофізіологію цього порушення або є фактором, який сприяє погіршенню цього порушення. Таким чином, порушення, у якому активність IL-13 є шкідливою, є порушенням, у якому, як очікується, зменшення активності IL-13 буде зменшувати симптоми і/або прогресування цього порушення. Такі порушення можуть бути виявлені, наприклад, по збільшенню концентрації IL-13 у біологічній рідині індивіда, що

50 страждає від цього порушення (наприклад, збільшенню концентрацій IL-13 у сироватці, плазмі, синовіальній рідині і т. д. індивіда), яке може бути детектоване, наприклад, з використанням анти-IL-13-антитіла, як описано вище. Необмежуючі приклади порушень, які можуть лікуватися антитілами даного винаходу, включають порушення, обговорювані в розділі нижче, який стосується фармацевтичних композицій антитіл даного винаходу.

Передбачалося, що IL-13 відіграє центральну роль у викликанні патологічних реакцій, пов'язаних з астмою. Однак, інші медіатори імунологічних шляхів також беруть участь у патогенезі астми, і блокування цих медіаторів, поряд з IL-13, може надавати додаткову терапевтичну користь. Таким чином, зв'язувальні білки даного винаходу можуть бути включені в білки DVD-Ig, де цей DVD здатний зв'язувати пари-мішені, у тому числі, але не тільки, IL-13 і прозапальний цитокін, такий як фактор некрозу пухлин альфа (TNF- $\alpha$ ). TNF- $\alpha$  може підсилювати

60

запальну реакцію в астмі і може бути зв'язаний з тяжкістю захворювання (McDonnell, et al., Progress in Respiratory Research (2001), 31 (New Drugs for Asthma, Allergy and COPD), 247-250). Це дозволяє передбачити, що блокування як IL-13, так і TNF- $\alpha$  може мати корисні дії, зокрема, у важкому захворюванні дихальних шляхів. У переважному варіанті здійснення DVD-Ig даного винаходу зв'язує мішені IL-13 і TNF- $\alpha$  і використовується для лікування астми.

В іншому варіанті здійснення зв'язувальні білки даного винаходу можуть бути використані для генерування молекул DVD-Ig, які зв'язують IL-13 і IL-1 $\beta$ , IL-13 і IL-9; IL-13 і IL-4; IL-13 і IL-5; IL-13 і IL-25; IL-13 і TARC; IL-13 і MDC; IL-13 і MIF; IL-13 і TGF- $\beta$ ; IL-13 і агоніст LHR; IL-13 і CL25; IL-13 і SPRR2a; IL-13 і SPRR2b; і IL-13 і ADAM8. Даний винахід забезпечує також DVD-Ig, здатні зв'язувати IL-13 і одну або декілька мішеней, які беруть участь в астмі, вибраних із групи, що складається з CSF1 (MCSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (GCSF), FGF2, IFNA1, IFNB1; IFNG, гістаміну і рецепторів гістаміну, IL1A, IL1B, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12A, IL12B, IL14, IL15, IL16, IL17, IL18, IL19, IL20, IL21, IL22, IL23, IL24, IL25, IL26, IL27, IL28, IL30, IL31, IL32, IL33, KITLG, PDGFB, IL2RA, IL4R, IL5RA, IL8RA, IL8RB, IL12RB1, IL12RB2, IL13RA1, IL13RA2, IL18R1, TSLP, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL13, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL22, CCL24, CX3CL1, CXCL1, CXCL2, CXCL3, XCL1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CX3CR1, GPR2, XCR1, FOS, GATA3, JAK1, JAK3, STAT6, TBX21, TGFB1, TNFSF6, YY1, CYSLTR1, FCER1 A, FCER2, LTB4R, TB4R2, LTBR і хітази.

#### D. Фармацевтична композиція

Даний винахід забезпечує також фармацевтичні композиції, які містять антитіло, або його антигензв'язувальну частину, даного винаходу і фармацевтично прийнятний носій. Ці фармацевтичні композиції, що містять антитіла даного винаходу, застосовні в (але не тільки) діагностиці, детектуванні або моніторингу порушення, у запобіганні, лікуванні, ослабленні або зменшенні порушення або його одного або декількох симптомів і/або в дослідженнях. У конкретному варіанті здійснення композиція містить одне або декілька антитіл даного винаходу. В іншому варіанті здійснення ця фармацевтична композиція містить одне або декілька антитіл даного винаходу й один або декілька профілактичних або терапевтичних агентів, інших, ніж антитіла даного винаходу, для лікування порушення, у якому активність IL-13 є шкідливою для здоров'я. Переважно, використовують профілактичні або терапевтичні агенти, про які відомо, що вони застосовні або використовувалися або використовуються в даний час для запобігання, лікування, усунення або зменшення порушення або його одного або декількох симптомів. Відповідно до варіантів здійснення ця композиція може додатково містити носій, розріджувач або ексципієнт.

Антитіла і частини антитіл даного винаходу можуть бути включені у фармацевтичні композиції, придатні для введення індивіду. Звичайно ця фармацевтична композиція містить антитіло або частину антитіла даного винаходу і фармацевтично прийнятний носій. У даному контексті «фармацевтично прийнятний носій» включає будь-які і всі розчинники, дисперсійні середовища, покриття, антибактеріальні і протигрибкові агенти, ізотонічні і затримуючі абсорбцію агенти і т. п., які є фізіологічно сумісними. Приклади фармацевтично прийнятних носіїв включають один або декілька компонентів з води, сольового розчину, забуференого фосфатом сольового розчину, декстрази, гліцерину, етанолу і т. п., а також їх комбінацій. У багатьох випадках буде переважним включення ізотонічних агентів, наприклад, цукрів, поліспиртів, таких як маніт, сорбіт або хлорид натрію, у цю композицію. Фармацевтично прийнятні носії можуть додатково містити міnorні кількості допоміжних речовин, таких як зволожуючі або емульгуючі агенти, консерванти або буфери, які збільшують термін зберігання або ефективність антитіла або частини антитіла.

Відомі різні системи доставки, і вони можуть бути використані для введення одного або декількох антитіл даного винаходу або комбінації одного або декількох антитіл даного винаходу і профілактичного агента або терапевтичного агента, застосовного для запобігання, контролю, лікування або зменшення порушення або його одного або декількох симптомів, наприклад, інкапсулювання в ліпосомах, мікрочастинки, мікрокапсули, рекомбінантні клітини, здатні експресувати антитіло або фрагмент антитіла, опосередкований рецептором ендцитоз (дивіться, наприклад, Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)), конструювання нуклеїнової кислоти у вигляді частини ретровірусного або іншого вектора і т. д. Способи введення профілактичного або терапевтичного агента даного винаходу включають, але не обмежуються ними, парентеральне введення (наприклад, інтрадермальне, внутрішньом'язове, внутрішньочеревинне, внутрішньовенне і підшкірне), епідуральне введення, внутрішньопухлинне введення і мукозне введення (наприклад, інтраназальний і оральний способи). Крім того, може бути використане легеневе введення, наприклад, з використанням інгалятора або розпилювача, і форми з аерозоліючим агентом. Дивіться, наприклад, патенти

США з номерами 6019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064, 5855913, 5290540 і 4880078; і публікації PCT із номерами WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 і WO 99/66903, кожна з яких включена в даний опис як посилання в повному вигляді. В одному варіанті здійснення антитіло даного винаходу, комбінований терапевтичний засіб або композицію даного винаходу вводять з використанням технології легеневої доставки лікарського засобу Aikermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.). У конкретному варіанті здійснення профілактичні або терапевтичні агенти даного винаходу вводять внутрішньом'язово, внутрішньовенно, інтратуморально, орально, інтраназально, введенням у легені або підшкірно. Профілактичні або терапевтичні агенти можуть вводитися будь-яким придатним способом, наприклад, інфузією або болусною ін'єкцією, абсорбцією через епітеліальні або шкірно-слизові вистілки (наприклад, через слизову оболонку порожнини рота, ректальну або кишкову слизову оболонку і т. д.), і можуть вводитися разом з іншими біологічно активними агентами. Введення може бути системним або локальним.

У конкретному варіанті здійснення може бути бажаним введення профілактичних або терапевтичних агентів даного винаходу локально в зону, яка потребує лікування; це може досягатися, наприклад, без обмеження, локальною інфузією, ін'єкцією або за допомогою імплантата, який є пористим або непористим матеріалом, що включає мембрани і матрикси, такі як мембрани із силасіку, полімери, волокнисті матрикси (наприклад, Tissuel®) або колагенові матрикси. В одному варіанті здійснення ефективну кількість одного або декількох антитіл даного винаходу вводять локально в уражену зону індивіду для запобігання, лікування, контролю і/або ослаблення порушення або його симптому. В іншому варіанті здійснення ефективну кількість одного або декількох антитіл даного винаходу вводять локально в уражену зону в комбінації з ефективною кількістю одного або декількох терапевтичних засобів (наприклад, одного або декількох профілактичних або терапевтичних агентів), інших, ніж антитіло даного винаходу, індивіду для запобігання, лікування, контролю і/або ослаблення порушення або одного або декількох його симптомів.

В іншому варіанті здійснення профілактичний або терапевтичний агент даного винаходу може бути доставлений у системі регульованого вивільнення або системі пролонгованого вивільнення. В одному варіанті здійснення може бути використаний насос для досягнення регульованого або пролонгованого вивільнення (дивіться Langer, дивіться раніше; Seft'on, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). В іншому варіанті здійснення можуть бути використані полімерні матеріали для досягнення регульованого або пролонгованого вивільнення терапевтичних засобів даного винаходу (дивіться, Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, 1983, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; дивіться також Levy et al., 1985, Science 228: 190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105); патент США № 5679377; патент США № 5916597; патент США № 5912015; патент США № 5989463; патент США № 5128326; публікацію PCT № WO 99/15154 і публікацію PCT № WO 99/20253. Приклади полімерів, використовуваних у препаратах пролонгованого вивільнення, включають, але не обмежуються ними, полі(2-гідроксіетилметакрилат), полі(метилметакрилат), полі(акрилову кислоту), полі(співполімер етилену і вінілацетату), полі(метакрилову кислоту), полігліколіди (PLG), поліангідриди, полі(N-вінілпіролідон), полівініловий спирт), поліакриламід, полі(етиленгліколь), полілактиди (PLA), полі(співполімер лактиду і гліколіду) (PLGA) і поліортоєфіри. У переважному варіанті здійснення полімер, використовуваний у формі пролонгованого вивільнення, є інертним, вільним від вилуговуваних домішок, стабільним при збереженні, стерильним і біодеградовним. Ще в одному варіанті здійснення система регульованого або пролонгованого вивільнення може бути поміщена поблизу профілактичної або терапевтичної мішені, так що для неї потрібна тільки частина системної дози (дивіться, наприклад, Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, дивіться раніше, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

Системи регульованого вивільнення обговорюються в огляді Langer (1990, Science 249: 1527-1533). Будь-який спосіб, відомий кваліфікованому у даній галузі фахівцю, може бути використаний для одержання форм пролонгованого вивільнення, що містять один або декілька терапевтичних агентів даного винаходу. Дивіться, наприклад, патент США № 4526938, публікацію PCT WO 91/05548, публікацію PCT WO 96/20698, Ning et al., 1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39: 179-189, Song et al., 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397,

Cleek et al., 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," Pro. Intl. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854 і Lam et al., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," Proc. Intl. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, описи яких включені в даному описі як посилання в їх повному вигляді.

У конкретному варіанті здійснення, де композицією даного винаходу є нуклеїнова кислота, яка кодує профілактичний або терапевтичний агент, ця нуклеїнова кислота може бути введена *in vivo* для стимуляції експресії кодованого нею профілактичного або терапевтичного агента, конструюванням її у вигляді частини придатного експресуючого вектора нуклеїнової кислоти і введенням його таким чином, що він стає внутрішньоклітинним, наприклад, з використанням ретровірусного вектора (дивіться патент США № 4980286), або прямою ін'єкцією, або з використанням бомбардування мікрочастинками (наприклад, генним пістолетом; Biolistic, Dupont), або покриванням ліпідами або рецепторами клітинної поверхні або введенням його в зв'язку з гомеобоксподібним пептидом, який, як відомо, входить у ядро (дивіться, наприклад, Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1864-1868). Альтернативно, нуклеїнова кислота може бути введена внутрішньоклітинно і включена в ДНК клітини-хазяїна для експресії гомологічною рекомбінацією.

Фармацевтичну композицію даного винаходу готують таким чином, що вона є сумісною зі способом її введення. Приклади способів введення включають, але не обмежуються ними, парентеральне, наприклад, внутрішньовенне, інтрадермальне, підшкірне, пероральне, інтраназальне (наприклад, інгаляцією), трансдермальне (наприклад, місцеве), трансмукозне і ректальне введення. У конкретному варіанті здійснення цю композицію готують відповідно до рутинних процедур у вигляді фармацевтичної композиції, адаптованої для внутрішньовенного, підшкірного, внутрішньом'язового, перорального, інтраназального або місцевого введення людині. Звичайно композиції для внутрішньовенного введення є розчинами в стерильному ізотонічному водному буфері. Якщо необхідно, композиція може також включати солюбілізуючий агент і локальний анестетик, такий як ліпокаїн, для зменшення болю в місці ін'єкції.

Якщо композиції даного винаходу повинні вводитися місцево, ці композиції можуть бути приготовлені у формі мазі, крему, трансдермального пластиру, лосьйону, гелю, шампуню, спрею, аерозолю, розчину, емульсії або іншої форми, добре відомої фахівцю з кваліфікацією в даній галузі. Дивіться, наприклад, Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995). Для нерозбризкуваних місцевих лікарських форм використовують звичайно напівтверді або тверді форми, що містять носій або один або декілька ексципієнтів, які сумісні з місцевим нанесенням і мають динамічну в'язкість, переважно більш високу, ніж в'язкість води. Придатні форми включають, без обмеження, розчини, суспензії, емульсії, креми, мазі, порошки, лініменти (рідкі мазі), цілющі мазі і т. п., які, якщо бажано, стерилізують або змішують з допоміжними агентами (наприклад, консервантами, стабілізаторами, зволожуючими агентами, буферами або солями) для впливу на різні властивості, такі як, наприклад, осмотичний тиск. Інші придатні місцеві лікарські форми включають розбризкувані аерозольні препарати, в яких активний інгредієнт, переважно в комбінації з твердим або рідким інертним носієм, упакований у суміші з летким засобом, що знаходиться під тиском (наприклад, газоподібним пропелентом, таким як фреон), або в герметизовані флакони. Зволожувачі або змочувальні засоби також можуть бути додані до фармацевтичних композицій і лікарських форм, якщо бажано. Приклади таких додаткових інгредієнтів добре відомі в даній галузі.

Якщо спосіб даного винаходу передбачає інтраназальне введення композиції, ця композиція може бути приготовлена в аерозольній формі, у формі спрею, "туману" (аерозолю) або у формі крапель. Зокрема, профілактичні або терапевтичні агенти для застосування відповідно до даного винаходу можуть бути зручним чином доставлені у формі презентації аерозольного спрею з упаковок, що знаходяться під тиском, або розпилювача, з використанням придатного пропеленту (наприклад, дихлордифторметану, трихлорфторметану, дихлортетрафторетану, діоксиду вуглецю або іншого придатного газу). У випадку аерозолю, що знаходиться під тиском, одиниця дози може визначатися забезпеченням клапана для доставки відміряної кількості. Капсули і патрони (картриджі) (виготовлені, наприклад, з желатину) для застосування в інгаляторі або в інсуфляторі можуть бути приготовлені таким чином, що вони містять порошкоподібну суміш сполуки і придатну порошкову основу, таку як лактоза або крохмаль.

Якщо спосіб даного винаходу передбачає пероральне введення, композиції можуть бути приготовлені для перорального введення у формі таблеток, капсул, крохмальних облаток (капсул), желатинових капсул, розчинів, суспензій і т. п. Таблетки або капсули можуть бути

приготовлені загальноприйнятими засобами з фармацевтично прийнятними ексципієнтами, такими як зв'язувальні агенти (наприклад, попередньо желатинізований кукурудзяний крохмаль, полівінілпіролідон або гідроксипропілметилцелюлоза); наповнювачами (наприклад, лактозою, мікрокристалічною целюлозою або гідрофосфатом кальцію); мастильними агентами (наприклад, стеаратом магнію, тальком або кремнеземом); дезінтеграторами (наприклад, картопляним крохмалем або гліколятом натрійкрохмалю) або зволожуючими агентами (наприклад, лаурилсульфатом натрію). Таблетки можуть бути покриті способами, відомими в даній галузі. Рідкі препарати для перорального введення можуть мати форму, але не обмежуються ними, розчинів, сиропів або суспензій, або вони можуть бути представлені у вигляді сухого продукту для відтворення з водою або іншими носіями перед використанням. Такі рідкі препарати можуть бути приготовлені загальноприйнятими способами з фармацевтично прийнятними добавками, такими як суспендуючі агенти (наприклад, сироп сорбіту, похідні целюлози, гідрогенізовані або їстівні жири); емульгуючі агенти (такі як лецитин або аравійська камедь); неводні носії (наприклад, мигдальна олія, масляні ефіри, етиловий спирт або фракціоновані рослинні олії) і консерванти (наприклад, метил- або пропіл-п-гідроксибензоати або сорбінова кислота). Ці препарати можуть містити також буферні солі, ароматизуючі, барвні і підсолоджувальні агенти за необхідності. Препарати для перорального введення можуть бути придатним чином приготовлені для повільного вивільнення, регульованого вивільнення або пролонгованого вивільнення профілактичного або терапевтичного агента (агентів).

Спосіб даного винаходу може передбачати легеневе введення, наприклад, з використанням інгалятора або розпилювача, композиції, приготовленої з аерозолюючим агентом. Дивіться, наприклад, патенти США з номерами 6019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064, 5855913, 5290540 і 4880078; і публікації PCT із номерами WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 і WO 99/66903, змісти яких включені в даному описі як посилання в їх повному біографі. В одному конкретному варіанті здійснення антитіло даного винаходу, комбінований терапевтичний засіб і/або композицію даного винаходу вводять з використанням технології легеневої доставки лікарського засобу Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.).

Спосіб даного винаходу може передбачати введення композиції, приготовленої для парентерального введення, ін'єкцією (наприклад, болюсною ін'єкцією або безупинною інфузією). Готові форми для ін'єкції можуть бути представлені у формі уніфікованої (стандартної) дози (наприклад у ампулах або у багатодозових контейнерах) з доданим консервантом. Ці композиції можуть бути у формі суспензій, розчинів або емульсій у масляних або водних носіях і можуть містити агенти, які полегшують приготування, такі як суспендуючі, стабілізуючі і/або диспергуючі агенти. Альтернативно, активний інгредієнт може бути в порошкоподібній формі для відтворення придатним носієм (наприклад, стерильною апірогенною водою) перед використанням.

Способи даного винаходу можуть додатково передбачати введення композицій, приготовлених у вигляді депо-препаратів. Такі препарати тривалої дії можуть вводитися імплантацією (наприклад, підшкірно або внутрішньом'язово) або внутрішньом'язовою ін'єкцією. Так, наприклад, ці композиції можуть бути приготовлені з придатними полімерними або гідрофобними матеріалами (наприклад, у вигляді емульсії в прийнятному маслі) або іонообмінними смолами або слаботорозчинними похідними (наприклад, у вигляді слаботорозчинної солі).

Способи даного винаходу включають введення композицій, приготовлених у вигляді нейтральних форм або форм солей. Фармацевтично прийнятні солі включають солі, утворені з аніонами, такі як солі, вироблені з хлористоводневої, фосфорної, оцтової, щавлевої, винної кислот і т. д., і солі, утворені з катіонами, такими як катіони, вироблені з натрію, калію, амонію, кальцію, гідроксиду тривалентного заліза, ізопропіламіну, триетиламіну, 2-етиламіноетанолу, гістидину, прокаїну і т. д.

Звичайно інгредієнти композицій поставляються або окремо, або змішаними разом в уніфікованій дозованій формі, наприклад, у вигляді сухого ліофілізованого порошку або безводного концентрату в герметичному контейнері, такому як ампула або пакетик з порошком, із зазначеною кількістю активного агента. Коли способом введення є інфузія, композиція може фасуватися з інфузійним флаконом, який містить стерильну воду або сольовий розчин фармацевтичної категорії. Коли способом введення є ін'єкція, може бути забезпечена ампула стерильної води для ін'єкції або сольового розчину, так що інгредієнти можуть бути змішані перед введенням.

Зокрема, цей винахід забезпечує також один або декілька профілактичних або терапевтичних агентів, або фармацевтичні композиції даного винаходу упаковані в герметичний

контейнер, такий як ампула або пакетик з порошком, із зазначеною кількістю агента. В одному варіанті здійснення один або декілька профілактичних або терапевтичних агентів або фармацевтичні композиції даного винаходу поставляються у вигляді сухого ліофілізованого порошку або безводного концентрату в герметичному контейнері і можуть бути відтворені (наприклад, водою або сольовим розчином) до придатної концентрації для введення індивіду. Переважно, один або декілька профілактичних або терапевтичних агентів або фармацевтичні композиції поставляються у вигляді уніфікованої дози щонайменше 5 мг, більш переважно щонайменше 10 мг, щонайменше 15 мг, щонайменше 25 мг, щонайменше 35 мг, щонайменше 45 мг, щонайменше 50 мг, щонайменше 75 мг або щонайменше 100 мг. Ці ліофілізовані профілактичні або терапевтичні агенти або фармацевтичні композиції даного винаходу повинні зберігатися при 2-8 °C у їх первісному контейнері і ці профілактичні або терапевтичні агенти або фармацевтичні композиції даного винаходу повинні вводитися в межах 1 тижня, переважно в межах 5 днів, у межах 72 годин, у межах 48 годин, у межах 24 годин, у межах 12 годин, у межах 6 годин, у межах 5 годин, у межах 3 годин або у межах 1 години після відтворення. В альтернативному варіанті здійснення один або декілька профілактичних або терапевтичних агентів або фармацевтичні композиції даного винаходу поставляються в рідкій формі в герметичному контейнері з зазначеними кількістю і концентрацією агента. Переважно, рідка форма композиції, що вводиться, поставляється в герметичному контейнері в концентрації щонайменше 0,25 мг/мл, більш переважно щонайменше 0,5 мг/мл, щонайменше 1 мг/мл, щонайменше 2,5 мг/мл, щонайменше 5 мг/мл, щонайменше 8 мг/мл, щонайменше 10 мг/мл, щонайменше 15 мг/мл, щонайменше 25 мг/мл, щонайменше 50 мг/мл, щонайменше 75 мг/мл або щонайменше 100 мг/мл. Ця рідка форма повинна зберігатися при 2-8 °C у її первісному контейнері.

Антитіла і частини антитіл даного винаходу можуть бути включені у фармацевтичну композицію, придатну для парентерального введення. Переважно, антитіло або частину антитіла готують у вигляді ін'єкційного розчину, який містить 0,1-250 мг/мл антитіла. Цей ін'єкційний розчин може складатися або з рідкої, або з ліофілізованої дозованої форми у флаконі з флінтгласу або янтарю, ампулі або попередньо заповненому шприці. Буфером може бути L-гістидин 1-50 мМ (оптимально 5-10 мМ), при рН 5,0-7,0 (оптимально рН 6,0). Інші придатні буфери включають, але не обмежуються ними, сукцинат натрію, цитрат натрію, фосфат натрію або фосфат калію. Хлорид натрію може бути використаний для модифікації токсичності цього розчину в концентрації 0-300 мМ (оптимально 150 мМ для рідкої лікарської форми). Для ліофілізованої лікарської форми можуть бути включені кріопротекторні агенти, в основному 0-10% сахароза (оптимально 0,5-1,0%). Інші придатні кріопротектори включають трегалозу і лактозу. Для ліофілізованої лікарської форми можуть бути включені наповнювачі, в основному 1-10% маніт (оптимально 2-4%). Як для рідкої, так і для ліофілізованої форм можуть бути використані стабілізатори, в основному 1-50 мМ L-метіонін (оптимально 5-10 мМ). Інші придатні наповнювачі включають гліцин, аргінін і можуть бути включені у вигляді 0-0,05% полісорбату-80 (оптимально 0,005-0,01%). Додаткові поверхнево-активні речовини включають, але не обмежуються ними, гюлісорбат-20 і поверхнево-активні речовини BRIJ. Фармацевтична композиція, що містить антитіла і частини антитіл даного винаходу, приготовлена у вигляді ін'єкційного розчину для парентерального введення, може додатково включати агент, застосовний як ад'ювант, такий як агенти, використовувані для збільшення абсорбції або дисперсії терапевтичного білка (наприклад, антитіла). Особливо застосовним ад'ювантом є гіалуронідаза, така як Hylapex® (рекомбінантна гіалуронідаза людини). Додавання гіалуронідази в ін'єкційний розчин поліпшує біодоступність для людини після парентерального введення, особливо підшкірного введення. Вона дозволяє також використовувати великі об'єми для одного місця ін'єкції (тобто більш 1 мл) з меншим болем і дискомфортом і мати меншу зустрічальність реакцій місця ін'єкції (дивіться WO 2004078140, US 2006104968, включені в даному описі як посилання).

Композиції даного винаходу можуть знаходитися в різних формах. Вони включають, наприклад, рідкі, напівтверді і тверді лікарські форми, такі як рідкі розчини (наприклад, ін'єкційні або інфузівні розчини), дисперсії або суспензії, таблетки, пігулки, порошки, ліпосоми і супозиторії. Переважна форма залежить від передбачуваного способу введення і терапевтичного застосування. Типові переважні композиції знаходяться у формі ін'єкційних і інфузівних розчинів, таких як композиції, подібні до композицій, використовуваних для пасивної імунізації людей іншими антитілами. Переважним способом введення є парентеральний (наприклад, внутрішньовенний, підшкірний, внутрішньочеревинний, внутрішньом'язовий). В одному переважному варіанті здійснення це антитіло вводять внутрішньовенною інфузією або

ін'єкцією. В іншому переважному варіанті здійснення це антитіло вводять внутрішньом'язовою або підшкірною ін'єкцією.

Терапевтичні композиції звичайно повинні бути стерильними і стабільними при умовах приготування і збереження. Композиція може бути приготовлена у вигляді розчину, мікроемульсії, дисперсії, ліпосоми або іншої упорядкованої структури, придатної для високої концентрації лікарського засобу. Стерильні ін'єкційні розчини можуть бути приготовлені включенням активної сполуки (тобто антитіла або частини антитіла) у необхідній кількості в придатному розчиннику з одним інгредієнтом або комбінацією інгредієнтів, перерахованих вище, якщо необхідно, з наступною стерилізацією за допомогою стерилізуючого фільтра. Звичайно дисперсії готують включенням активної сполуки в стерильний носій, що містить базове дисперсійне середовище і необхідні інші інгредієнти з перерахованих вище. У випадку стерильних, ліофілізованих порошків для приготування стерильних ін'єкційних розчинів, переважними способами є сушіння у вакуумі і сушіння розпиленням, що дає порошок активного інгредієнта плюс будь-який додатковий бажаний інгредієнт із попередньо стерильно відфільтрованого розчину. Необхідна текучість розчину може підтримуватися, наприклад, за допомогою покриття, такого як лецитин, за допомогою підтримання необхідного розміру частинок у випадку дисперсії і за допомогою поверхнево-активних речовин. Пролонгована абсорбція ін'єкційних композицій може досягатися включенням у цю композицію агента, який затримує абсорбцію, наприклад, моностеаратних солей і желатину.

Ці антитіла і частини антитіл даного винаходу можуть вводитися різними способами, відомими в даній галузі, хоча для багатьох терапевтичних застосувань переважним способом/типом введення є підшкірна ін'єкція, внутрішньовенна ін'єкція або інфузія. Як буде зрозуміло кваліфікованому в даній галузі фахівцю, спосіб і/або тип введення буде варіюватися залежно від бажаних результатів. У деяких варіантах здійснення активна сполука може бути приготовлена з носієм, який буде захищати цю сполуку від швидкого вивільнення, наприклад, у вигляді форми регульованого вивільнення, що включає імпланти, трансдермальні пластири і мікроінкапсульовані системи доставки. Можуть бути використані біодеградовні, біосумісні полімери, такі як етиленвінілацетат, поліангідриди, полігліколева кислота, колаген, поліортоефіри і полімолочна кислота. Багато способів для приготування таких готових форм запатентовані або звичайно відомі кваліфікованим в даній галузі фахівцям. Дивіться, наприклад, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

У деяких варіантах здійснення антитіло або його частина даного винаходу може вводитися перорально, наприклад, з інертним розріджувачем або асимільованим їстівним носієм. Ця сполука (і необов'язкові інші інгредієнти) може бути також поміщена в желатинові капсули з твердою або м'якою оболонкою, спресована в таблетки або включена безпосередньо в раціон індивіда. Для перорального терапевтичного введення ці сполуки можуть бути включені з ексципієнтами і використані у формі таблеток для ковтання, букальних таблеток, пастилок, капсул, еліксирів, суспензій, сиропів, облаток і т. п. Для введення сполуки даного винаходу іншим, непарентеральним, введенням сполука може бути обов'язково покрита матеріалом або вводиться разом з матеріалом для запобігання її інактивації.

Додаткові активні сполуки можуть бути також включені в композиції. У деяких варіантах здійснення антитіло або частину антитіла даного винаходу готують разом і/або вводять разом з одним або декількома додатковими терапевтичними агентами, що застосовні для лікування порушень, у яких активність IL-13 є шкідливою для здоров'я. Наприклад, анти-IL-13-антитіло або частина антитіла даного винаходу можуть бути приготовлені і/або можуть бути введені з одним або декількома додатковими антитілами, які зв'язують інші мішені (наприклад, антитілами, які зв'язують інші цитокіни або які зв'язують молекули поверхні клітин). Крім того, одне або декілька антитіл даного винаходу можуть бути використані в комбінації з двома або більше з попередніх агентів. Такі комбіновані терапії можуть переважно використовувати більш низькі дози терапевтичних агентів, які вводяться, що дозволяє, отже, уникнути можливих токсичностей або ускладнень, пов'язаних з різними монотерапіями.

У деяких варіантах здійснення антитіло до IL-13 або його фрагмент зв'язують з подовжувачем часу напівжиття носієм, відомим у даній галузі. Такі носії включають, але не обмежуються ними, Fc-домен, поліетиленгліколь і декстран. Такі носії описані, наприклад, у заявці на патент США з порядковим номером 09/428082 і опублікованій заявці PCT № WO 99/25044, що включені в даному описі як посилання для всіх цілей.

В одному конкретному варіанті здійснення, послідовності нуклеїнової кислоти, що включають нуклеотидні послідовності, кодуєчі антитіло даного винаходу або інший профілактичний або терапевтичний агент даного винаходу, вводять для лікування,

попередження, контролю або ослаблення порушення або одного або декількох його симптомів, за допомогою генної терапії. Генною терапією (генотерапією) називають терапію, виконувану введенням індивіду експресованої або здатної до експресії нуклеїнової кислоти. У цьому варіанті здійснення даного винаходу нуклеїнові кислоти продукують кодоване ними антитіло або профілактичний або терапевтичний агент даного винаходу, що опосередковує профілактичну або терапевтичну дію.

Будь-який зі способів генної терапії, доступних у даній галузі, може бути використаний відповідно до даного винаходу. Відносно загальних оглядів способів генної терапії, дивіться Goldspiel et al., 1993, *Clinical Pharmacy* 12:488-505; Wu and Wu, 1991, *Biotherapy* 3:87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan, *Science* 260:926-932 (1993); i Morgan and Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191-217; May, 1993, *TIBTECH* 11(5): 155-215. Способи, звичайно відомі в галузі технології рекомбінантних ДНК, які можуть бути використані, описані в Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); i Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990). Докладний опис різних способів генної терапії описаний в US 20050042664 A1, що включений у даному описі як посилання.

В іншому аспекті дана заявка описує спосіб лікування (наприклад, контролювання, супресії, ослаблення, затримки або запобігання появі, рецидиву або повторюваності) або запобігання IL-13-опосередкованому порушенню у індивіда. Цей спосіб передбачає: введення індивіду IL-13-зв'язувального агента (зокрема, антагоніста), наприклад, анти-IL-13-антитіл а або його фрагмента, описаних у даному описі, у кількості, достатній для лікування або попередження IL-13-опосередкованого порушення. Цей антагоніст IL-13, наприклад, анти-IL-13-антитіло або його фрагмент, може вводиться індивіду окремо або в комбінації з іншими терапевтичними впливами, описаними в даному описі.

В одному варіанті здійснення індивідом є ссавець, наприклад, людина, що страждає від одного або декількох IL-13-опосередкованих порушень, які включають, наприклад, респіраторні порушення (наприклад, астму (наприклад, алергійну і неалергійну астму), хронічну обструктивну хворобу легень (COPD, ХОХЛ) і інші стани, що включають запалення дихальних шляхів, еозинофілію, фіброз і надлишкове продукування слизу; atopічне порушення (наприклад, atopічний дерматит і алергійний риніт); запальні і/або аутоімунні стани шкіри, шлунково-кишкових органів (наприклад, запальні захворювання травного тракту (IBD), такі як виразковий коліт і/або хвороба Крона) і печінки (наприклад, цироз, фіброз); склеродермії; пухлини або ракові пухлини, наприклад лімфому Ходжкіна, як описано в даному описі. Таким чином, даний винахід включає застосування IL-13-зв'язувального агента (такого як анти-IL-13-антитіло або його фрагмент, описані в даному описі) для описаного в даному описі лікування і застосування IL-13-зв'язувального агента (такого як анти-IL-13-антитіл о або його фрагмент, описані в даному описі) для приготування лікарського засобу для описаного в даному описі лікування.

Приклади IL-13-опосередкованих захворювань включають, але не обмежуються ними, порушення, вибране з одного або декількох з респіраторних порушень наприклад, астми (наприклад, алергійної і неалергійної астми (наприклад, астми внаслідок інфікування, наприклад, респіраторним синцитіальним вірусом (RSV), наприклад, у дітей малого віку)), хронічної обструктивної хвороби легень (COPD, ХОХЛ) і інших станів, що включають запалення дихальних шляхів, еозинофілію, фіброз і надлишкове продукування слизу, наприклад, муковісцидоз і пневмофіброз; atopічних порушень, наприклад, які походять зі збільшеної чутливості до IL-13 (наприклад, atopічного дерматиту, кропивниці, екземи, алергійного риніту й алергійного ентерогастриту); запальних і/або аутоімунних станів шкіри (наприклад, atopічного дерматиту), шлунково-кишкових органів (наприклад, запальних захворювань травного тракту (IBD), таких як виразковий коліт і/або хвороба Крона), печінки (наприклад, цирозу, гепатоцелюлярної карциноми), і склеродермії; пухлин або ракових пухлин (наприклад, м'якої тканини або солідних пухлин), таких як лейкоз, гліобластома і лімфома, наприклад, лімфома Ходжкіна; вірусних інфекцій (наприклад, з HTLV-1); фіброзу інших органів, наприклад фіброзу печінки (наприклад, фіброзу, що викликається вірусом гепатиту В і/або С); і супресії прояву імунних реакцій захисного типу 1 (наприклад, під час вакцинації), як описано в даному описі.

В інших варіантах здійснення, дана заявка забезпечує спосіб лікування (тобто зменшення, ослаблення) або попередження одного або декількох симптомів, пов'язаних з респіраторним порушенням, наприклад, астмою (наприклад, алергійною і неалергійною астмою); алергіями; хронічною обструктивною хворобою легень (COPD, ХОХЛ); станом, що включає запалення дихальних шляхів, еозинофілію, фіброз і надлишкове продукування слизу, наприклад, муковісцидоз і пневмофіброз. Наприклад, симптоми астми включають, але не обмежуються ними, стридор (свистячий подих), задишку, бронхостеноз, гіперреактивність дихальних шляхів,



зменшену ємність легень, фіброз, запалення дихальних шляхів і продукування слизу. Цей спосіб передбачає введення індивіду антагоніста IL-13, наприклад, IL-13-антитіла або його фрагмента, у кількості, достатній для лікування (наприклад, зменшення, ослаблення) або запобігання одному або декільком симптомам. IL-13-антитіло може вводитися терапевтично або

профілактично або обома способами. Антагоніст IL-13, наприклад, анти-IL-13-антитіло або його фрагмент, може вводитися індивіду окремо або в комбінації з іншими терапевтичними режимами, як описано в даному описі. Переважно, індивідом є ссавець, наприклад людина, що страждає від IL-13-опосередкованого порушення, описаного в даному описі.

В іншому аспекті, дана заявка забезпечує спосіб детекції IL-13 у пробі *in vitro* (наприклад, біологічній пробі, такій як сироватка, плазма, тканина, біопсія). Розглянутий спосіб може бути використаний для діагностики порушення, наприклад, пов'язаного з імунними клітинами порушення. Цей спосіб передбачає: (i) контактування проби або контрольної проби з анти-IL-13-антитілом або його фрагментом, описаними в даному описі; і (ii) детектування утворення комплексу між анти-IL-13-антитілом або його фрагментом і пробю або контрольною пробю, причому статистично значуща зміна в утворенні цього комплексу в пробі відносно контрольної проби є показником присутності IL-13 у цій пробі.

Ще в одному аспекті дана заявка забезпечує спосіб детекції IL-13 *in vivo* (наприклад, візуалізації *in vivo* у індивіда). Розглянутий спосіб може бути використаний для діагностики порушення, наприклад, IL-13-опосередкованого порушення. Цей спосіб передбачає: (i) введення анти-IL-13-антитіла або його фрагмента, описаних у даному описі, індивіду або контрольному індивіду в умовах, які дозволяють зв'язування цього антитіла або фрагмента з IL-13; і (ii) детектування утворення комплексу між анти-IL-13-антитілом або його фрагментом і IL-13, причому статистично значуща зміна в утворенні цього комплексу у індивіда відносно контрольного індивіда є показником присутності IL-13.

Антитіла даного винаходу, або їх антигензв'язувальні частини, можуть бути використані окремо або в комбінації для лікування таких захворювань. Повинно бути зрозуміло, що антитіла даного винаходу, або їх антигензв'язувальні частини, можуть бути використані окремо або в комбінації з додатковим агентом, наприклад терапевтичним агентом, причому зазначений додатковий агент вибирає кваліфікований у даній галузі фахівець для його передбачуваної мети. Наприклад, цей додатковий агент може бути терапевтичним агентом, який визнаний у даній галузі як застосовний для лікування захворювання або стану, що лікують антитілом даного винаходу. Цей додатковий агент може бути також агентом, який надає корисну ознаку терапевтичної композиції, наприклад, агентом, що впливає на в'язкість композиції.

Крім того, повинно бути зрозуміло, що комбінації, які мають бути включені в даний винахід, є комбінаціями, застосовними для їх передбачуваної мети. Агенти, представлені нижче, є ілюстративними для цих цілей і не повинні розглядатися як обмежуючі даний винахід. Ці комбінації, які є частиною даного винаходу, можуть бути антитілами даного винаходу і щонайменше одним додатковим агентом, вибраним із наведених нижче списків. Ця комбінація може також включати більше одного додаткового агента, наприклад, два або три додаткових агенти, якщо ця комбінація є такою, що утворена композиція виконує її передбачувану функцію.

Комбінована терапія може включати один або декілька антагоністів IL-13, наприклад, анти-IL-13-антитіл або їх фрагментів, які приготовлені спільно і/або вводяться разом з одним або декількома додатковими терапевтичними агентами, наприклад, одним або декількома інгібіторами цитокінів і факторів росту, імуносупресорами, протизапальними агентами (наприклад, системними протизапальними агентами), антифібротичними агентами, метаболічними інгібіторами, інгібіторами ферментів і/або цитотоксичними або цитостатичними агентами, як описано більш докладно в даному описі.

Приклади переважних додаткових терапевтичних агентів, які можуть одночасно вводитися і/або можуть бути приготовлені з одним або декількома антагоністами IL-13, наприклад, анти-IL-13-антитілами або їх фрагментами, включають, але не обмежуються ними, один або декілька з інгальовних стероїдів; бета-агоністів, наприклад, короткостроково діючих або довгостроково діючих бета-агоністів; антагоністів лейкотриєнів або рецепторів лейкотриєнів; комбінованих лікарських засобів, таких як ADVAIR; інгібіторів IgE, наприклад, анти-IgE-антитіл (наприклад, XOLAIR); інгібіторів фосфодієстерази (наприклад, інгібіторів PDE4); ксантинів; антихолінергічних лікарських засобів; стабілізуючих мастоцити агентів, таких як кромолін; інгібіторів IL-4; інгібіторів IL-5; інгібіторів еотаксину/CCR3; антагоністів гістаміну або його рецепторів, що включають H1, H2, H3 і H4, і антагоністів простагландину D або його рецепторів (DP1 і CRTH2). Такі комбінації можуть бути використані для лікування астми й інших респіраторних порушень. Додаткові приклади терапевтичних агентів, що можуть бути спільно введені або приготовлені разом з одним або декількома анти-IL-13-антитілами або їх

фрагментами, включають один або декілька з антагоністів TNF (наприклад, розчинного фрагмента TNF-рецептора, наприклад, p55 або p75 рецептора TNF людини або його похідних, наприклад, TNFR-IgG з розміром 75 кДа (злитий білок з розміром 75 кДа TNF-рецептор-IgG, ENBREL)); антагоністи TNF-ферменту, наприклад інгібітори TNF-перетворюючого ферменту (TACE); антагоністи мускаринового рецептора; антагоністи TGF- $\beta$ ; інтерферон гамма; перфенідон; хіміотерапевтичні агенти, наприклад метотрексат, лефлуномід або сиролімум (рапаміцин) або його аналог, наприклад, CCI-779; інгібітори COX2 і cPLA2; NSAID; імуномодулятори; інгібітори p38, TPL-2, MK-2 і інгібітори NF- $\kappa$ B, серед інших.

Інші переважні комбінації є цитокінсупресуючими протизапальними лікарськими засобами (CSAID); антитілами до інших цитокінів або факторів росту людини або антагоністами інших цитокінів і факторів росту людини, наприклад, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, IL-21, IL-31, інтерферонів, EMAP-II, GM-CSF, FGF, EGF, PDGF і ендотеліну-1, а також рецепторів цих цитокінів і факторів росту. Антитіла даного винаходу або їх антигензв'язувальні частини, можуть комбінуватися з антитілами до молекул поверхні клітини, таких як CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90, CTLA або їх ліганди, у тому числі CD154 (gp39 або CD40L).

Переважні комбінації терапевтичних агентів можуть інтерферувати у різних точках у запальному каскаді; переважні приклади включають антагоністи TNF, такі як химерні, гуманізовані антитіла або TNF-антитіла людини, D2E7 (публікація PCT № WO 97/29131), CA2 (Remicade™), CDP 571 і розчинні TNF-рецептори p55 або p75 і їх похідні p75TNFRlg (Enbrel™) або p55TNFRlg (Lenercept), а також інгібітори TNF-перетворюючого ферменту (TACE); подібним чином інгібітори IL-1 (інгібітори інтерлейкін-1 -перетворюючого ферменту, IL-1RA і т. д.) можуть бути ефективними по тій же самій причині. Інші переважні комбінації включають інтерлейкін-4. Іншою переважною комбінацією є інші ключові члени астматичної реакції, що можуть діяти паралельно з функцією IL-13; особливо переважними є антагоністи IL-9, у тому числі IL-9-антитіла. Було показано, що IL-13 і IL-9 мають перекривні, але різні функції, і комбінація антагоністів обох з них може бути найбільш ефективною. Ще однією переважною комбінацією є анти-IL-5-антитіла. Інші переважні комбінації включають антагоністи хемокінів, що включають MCP-1, MCP-4, еотаксини, RANTES, MDC, CCL-12 і CCL-17 (TARC), і рецептори хемокінів, що включають CCR2, CCR3, CCR4 і CXCR4. Інші комбінації можуть включати антагоністи до медіаторів астми, що включають кислу хітиназу ссавців, CRHT2, хімазу, S1P1, S1P2, Tuck2, ROCK1, Stat6, p38, NF- $\kappa$ B, фосфодіестеразу-4 (PDE-4), триптазу мастоцитів, NO, аденозин, IKK2, GATA3, ICAM-1, VCAM-1 і ICOS.

Фармацевтичні композиції даного винаходу можуть включати "терапевтично ефективну кількість" або "профілактично ефективну кількість" антитіла або частини антитіла даного винаходу. Термін "терапевтично ефективна кількість" стосується кількості, ефективній у дозах і протягом періодів часу, необхідних для досягнення бажаного терапевтичного результату. Терапевтично ефективна кількість антитіла або частини антитіла може бути визначена фахівцем із кваліфікацією в даній галузі і може варіюватися відповідно до таких факторів, як стан захворювання, вік, стать і маса індивіда, і здатністю цього антитіла або його частини індукувати бажану реакцію в цьому індивіді. Терапевтично ефективна кількість є також кількістю, у якій будь-які токсичні або шкідливі дії цього антитіла або його частини перекриваються терапевтично корисними діями. Термін "профілактично ефективна кількість" стосується кількості, ефективній у дозах і протягом періодів часу, необхідних для досягнення бажаного профілактичного результату. Звичайно, оскільки профілактичну дозу використовують в індивідах до захворювання або на ранній стадії захворювання, профілактично ефективна кількість буде меншою, ніж терапевтично ефективна кількість.

Схеми введення доз можуть коректуватися для забезпечення бажаної реакції (наприклад, терапевтичної або профілактичної реакції). Наприклад, може вводитися єдиний болюс, декілька розділених доз протягом часу або доза може бути пропорційно зменшена або збільшена відповідно до необхідності терапевтичної ситуації. Особливо переважно готувати парентеральні композиції в дозованій уніфікованій формі для полегшення введення й однорідності дози. Дозована уніфікована форма означає в даному контексті фізично дискретні одиниці, придатні як однократні дози для підлягаючих лікуванню індивідів-ссавців; кожна одиниця, що містить задану кількість активної сполуки, розраховується таким чином, що вона здійснює бажану терапевтичну дію в асоціації з необхідним фармацевтичним носієм. Специфікація для дозованих однократних форм даного винаходу диктується (а) унікальними властивостями активної сполуки і залежить безпосередньо від унікальних властивостей активної сполуки і конкретних терапевтичних або профілактичних дій, що повинні бути досягнуті, і (b) обмеженнями, що існують в сфері компаундування такої активної сполуки, для лікування чутливості у індивідів.

Зразковий, необмежуваний діапазон для терапевтично або профілактично ефективної кількості антитіла або його частини даного винаходу складає 0,1-20 мг/кг, більш переважно 1-10 мг/кг. Слід зазначити, що величини доз можуть варіюватися залежно від типу і тяжкості стану, що підлягає ослабленню. Крім того, повинно бути зрозуміло, що для будь-якого конкретного

індивіда, конкретні схеми введення доз повинні коректуватися протягом часу відповідно до індивідуальної потреби і професійного судження фахівця, який вводить або контролює введення цих композицій, і що наведені в даному описі діапазони доз є тільки зразковими і не призначені для обмеження обсягу або практики заявленої композиції.

Кваліфікованим у даній галузі фахівцем буде цілком зрозуміло, що інші придатні модифікації

й адаптації описаних у даному описі способів даного винаходу є очевидними і можуть бути здійснені з використанням придатних еквівалентів без відхилення від обсягу даного винаходу або описаних у даному описі варіантів здійснення. Після докладного опису даного винаходу, опис буде ще більш зрозумілим при посиланні на наступні приклади, які включені тільки для

цілей ілюстрації і не призначені для обмеження даного винаходу.

#### Приклади

Приклад 1: Генерування і виділення моноклональних антитіл проти IL-13 людини

Приклад 1.1: Аналізи для ідентифікації антитіл проти IL-13 людини

У прикладі 1 використовували наступні аналізи для ідентифікації і характеристики антитіл проти IL-13 людини, якщо немає інших вказівок.

#### Приклад 1.1.A: ELISA

Твердофазний імуносорбентний аналіз для скринінгу на антитіла, які зв'язують IL-13 людини, виконували в такий спосіб.

Планшети ELISA (Corning Costar, Acton, MA) покривали 50 мкл на ямку 5 мкг/мл козячим антитілом проти Fc IgG миші (Pierce # 31170, Rockford, IL) у фосфатно-сольовому буфері (PBS) протягом ночі при 4 °C. Планшети промивали один раз PBS, що містить 0,05 % Твін-20. Планшети блокували додаванням 200 мкл на ямку блокувального розчину, розведеного до 2 % у PBS (BioRad # 170-6404, Hercules, CA), протягом 1 години при кімнатній температурі. Планшети промивали один раз після блокування PBS, що містить 0,05 % Твін-20.

П'ятдесят мікролітрів на ямку сироваток або гібридомних супернатантів миші, розведених у PBS, що містить 0,1 % бичачий сироватковий альбумін (BSA) (Sigma, St. Louis, MO), додавали в планшет ELISA, як описано вище, і інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі. Ямки промивали три рази PBS, що містить 0,05% Твін-20. У кожен ямку додавали п'ятдесят мікролітрів біотинільованого рекомбінантного очищеного варіанта IL-13 людини (R110Q), розведеного до 100 нг/мл у PBS, що містить 0,1 % BSA, і інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі. Планшети промивали 3 рази PBS, що містить 0,05 % Твін-20. Стрептавідин-HRP (Pierce # 21126, Rockland, IL) розбавляли 1:20000 у PBS, що містить 0,1% BSA; додавали 50 мкл на ямку і планшети інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі. Планшети промивали 3 рази PBS, що містить 0,05 % Твін-20. П'ятдесят мікролітрів розчину TMB (Sigma # T0440, St. Louis, MO) додавали в кожен ямку і інкубували протягом 10 хвилин при кімнатній температурі. Реакцію зупиняли додаванням 1 н. сірчаної кислоти. Планшети зчитували спектрофотометрично при довжині хвилі 450 нм.

#### Приклад 1.1.B: Визначення афінності з використанням технології BIACORE.

Аналіз BIACORE (Biacore, Inc, Piscataway, NJ) визначає афінність антитіл кінетичними вимірюваннями констант швидкості асоціації, швидкості дисоціації. Зв'язування антитіл з рекомбінантним очищеним IL-13 людини або рекомбінантним очищеним варіантом IL-13 людини (R110Q) визначали вимірюваннями на основі резонансу поверхневих плазмонів за допомогою приладу Biacore® 3000 (Biacore® AB, Uppsala, Sweden) з використанням проведення HBS-EP (10 mM HEPES [pH 7,4], 150 mM NaCl, 3 mM EDTA і 0,005 % поверхнево-активної речовини P20) при 25 °C. Усі хімікалії одержували з Biacore® AB (Uppsala, Sweden) або, у іншому випадку, з іншого джерела, як описано в тексті. Приблизно 5000 RU козячого антитіла проти мишачого IgG, (Fey), фрагмент-специфічного поліклонального антитіла (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL), розведеного в 10 mM ацетаті натрію (pH 4,5), безпосередньо іммобілізували на біосенсорному чипі CM5 дослідницької чистоти з використанням стандартного набору амінозв'язування відповідно до інструкцій і процедур виготовлювача при 25 мкг/мл. Частинок, що не прореагували, на поверхні біосенсора блокували етаноламіном. Поверхню модифікованого карбоксиметилдекстрану в проточній комірці 2 і 4 використовували як поверхню реакції. Немодифікований карбоксиметилдекстран без козячого антитіла проти мишачого IgG у проточній комірці 1 і 3 використовували як посилювальну поверхню. Для кінетичного аналізу рівняння швидкості, вироблені з моделі зв'язування 1:1 Langmuir, будували одночасно для фаз асоціації і дисоціації усіх восьми інжекцій (з використанням глобального

аналізу підгонки) із застосуванням програмного забезпечення Biaevaluation 4.0.1. Очищені антитіла розбавляли в HEPES-забуференому сольовому розчині для захоплення через поверхні специфічної для козячого антитіла проти мишачого IgG реакції. Мишачі антитіла, що підлягають захопленню як ліганд (25 мкг/мл), ін'єктували на матрикси реакції при швидкості потоку 5 мкл/хв. Константи швидкості асоціації і дисоціації,  $k_{on}$  (в одиницях  $M^{-1}s^{-1}$ ) і  $k_{off}$  (в одиницях  $s^{-1}$ ) визначали при безупинній швидкості потоку 25 мкл/хв. Константи швидкості визначали проведенням кінетичних вимірювань зв'язування при десятих різних концентраціях антигену в діапазоні 10-200 нМ. Потім константу дисоціації (рівноваги) (в одиницях M) реакції між мишачими антитілами і рекомбінантним очищеним IL-13 людини або рекомбінантним очищеним варіантом IL-13 людини розраховували з кінетичних констант швидкості за наступною формулою:  $K_D = k_{off}/k_{on}$ . Зв'язування реєстрували як функцію часу і розраховували кінетичні константи швидкості. У цьому аналізі могли бути виміряні такі високі швидкості асоціації, як  $10^6 M^{-1}s^{-1}$ , і такі повільні швидкості дисоціації, як  $10^{-6} s^{-1}$ .

Приклад 1.1.C: Функціональна активність антитіл проти IL-13 людини

Для випробування функціональної активності антитіл проти IL-13 людини даного винаходу ці антитіла використовували в наступних аналізах, які вимірюють здатність антитіла інгібувати активність IL-13.

Приклад 1.1.C.1: Біоаналіз A-549

Здатність антитіл проти IL-13 людини інгібувати індуковане IL-13 людини продукування TARC (CCL-17) клітинами A-549 аналізували в такий спосіб. Клітини A-549 висівали в день 1 у 96-ямковому планшеті ( $2^5$  клітин/мл) у середовищі для вирощування RPMI (з 10 % FBS). У день 2 це середовище заміняли свіжим середовищем для вирощування RPMI, що містить 400 нг/мл rhTNF (100 мкл на ямку). Тим часом, різні концентрації сироватки імунізованої миші, супернатанту мишачої гібридоми або очищених антитіл проти IL-13 людини попередньо інкубували протягом однієї години при 37°C з 10 нг/мл рекомбінантного очищеного IL-13 людини або варіанта IL-13 у 100 мкл повного середовища RPMI у мікротитраційному планшеті (U-донному, 96-ямковому, Costar). Потім суміш антитіло плюс рекомбінантний очищений IL-13 людини додавали (100 мкг на ямку) до TNF-оброблених клітин A-549, з кінцевим об'ємом 200 мкл на ямку (кінцеві концентрації IL-13 і TNF дорівнювали 5 нг/мл і 200 нг/мл, відповідно), і інкубували протягом 18 годин при 37°C. Після інкубації брали 150 мкл безклітинного супернатанту з кожної ямки і рівень продукованого TARC людини вимірювали з використанням ELISA для TARC людини (R&D Systems Cat#DDN00).

Клітини A-549 відповідали також на IL-13 інших видів, у тому числі собакоподібної мавпи, миші, щура і вівці, з величинами  $ED_{50}$ , подібними з величинами IL-13 людини. Таким чином, використовували перехресно-реактивний аналіз анти-hIL-13-mAb відносно IL-13 інших видів з використанням того ж самого експериментального протоколу.

Приклад 1.2: Генерування моноклональних антитіл проти IL-13 людини Мишачі моноклональні антитіла проти IL-13 людини одержували в такий спосіб.

Приклад 1.2.A: Імунізація мишей антигеном IL-13 людини Двадцять мікрограмів рекомбінантного очищеного варіанта IL-13 людини (Peprotech), змішаного з повним ад'ювантом Фрейнда або ад'ювантом Immunoeasy (Qiagen, Valencia, CA), ін'єктували підшкірно в п'ять 6-8-тижневих мишей Balb/C, п'ять мишей C57B/6 і п'ять мишей AJ у день 1. У дні 24, 38 і 49 двадцять мікрограмів рекомбінантного очищеного варіанта IL-13 людини, змішаного з неповним ад'ювантом Фрейнда або ад'ювантом Immunoeasy, ін'єктували підшкірно в тих же самих мишей. У день 84 або день 112, або день 144 мишей ін'єктували внутрішньовенно 1 мкг рекомбінантного очищеного варіанта IL-13 людини.

Приклад 1.2.B: Генерування гібридоми

Спленоцити, одержані з імунізованих мишей, описаних у прикладі 1.2.A, зливали з клітинами SP2/O-Ag-14 у співвідношенні 5:1 відповідно до встановленого способу, описаного у Kohler, G. and Milstein 1975, Nature, 256:495, для генерування гібридом. Злиті білки висівали в селективне середовище, що містить азасерин і гіпоксантин, у 96-ямкових планшетах при густині  $2,5 \times 10^6$  спленоцитів на ямку. Через сім-десять днів після злиття спостерігали макроскопічні гібридомні колонії. Супернатант із кожної ямки, що містить гібридомні колонії, випробували за допомогою ELISA на присутність варіанта антитіла до IL-13 (як описано в прикладі 1.1.A). Потім супернатанти, що виявляють IL-13-варіант-специфічну активність, випробували на здатність нейтралізувати IL-13-варіант і IL-13 дикого типу в біоаналізі A-549 на TARC (як описано в прикладі 1.1.3).

Приклад 1.2.C: Ідентифікація і характеристика моноклональних антитіл проти IL-13 людини

Гібридоми, продукуючі антитіла, які зв'язували IL-13-варіант, генеровані відповідно до прикладів 1.2.B і 1.2.C і здатні зв'язувати специфічно IL-13-варіант, і, зокрема, гібридоми з

величинами  $IC_{50}$  в А-549-біоаналізі 5 нМ або менше 5 нМ визначали і клонували лімітуючим розведенням.

- 5 Гібридомні клітини розмножували в середовищі, що містить 10 % фетальну телячу сироватку з низьким IgG (Hyclone #SH30151, Logan, UT). В середньому, 250 мл кожного гібридного супернатанту (виробленого з клональної популяції) збирали, концентрували й очищали білок А-афінною хроматографією, як описано в Harlow, E. and Lane, D. 1988 "Antibodies: A Laboratory Manual". Здатність очищених mAb інгібувати активність IL-13 визначали з використанням біоаналізу А-549, як описано в прикладі 1.1.С. Таблиця 7 показує величини  $IC_{50}$  з біоаналізів А-549 для 17 моноклональних антитіл.

10

Таблиця 7

## Нейтралізація IL-13 анти-IL-13-mAb у біоаналізі А-549

Мишаче моноклональне антитіло	Ізотип	Середнє $IC_{50}$ (нМ), IL-13 дикого типу людини	Середнє $IC_{50}$ (нМ), варіант IL-13 людини	Середнє $IC_{50}$ (нМ), IL-13 собакоподібної мавпи
4A8	IgG $\lambda$	не визначали	2,70E-10	не визначали
6C8	IgG1 $\kappa$	7,20E-10	3,40E-10	1,61E-10
5F1	IgG1 $\kappa$	9,70E-11	9,00E-11	1,88E-09
1B6	IgG1 $\kappa$	8,40E-10	2,40E-10	5,21E-10
5G1	IgG1 $\kappa$	7,60E-11	4,80E-11	6,12E-10
29G5	IgG2 $\alpha\kappa$	2,90E-10	2,00E-10	4,39E-09
33C3	IgG1 $\kappa$	1,50E-10	1,00E-10	8,47E-10
25C8	IgG1 $\kappa$	2,30E-10	2,60E-10	1,88E-10
13C5	IgG1 $\kappa$	1,90E-10	1,70E-10	5,00E-09
3E5	IgG2 $\alpha\kappa$	1,30E-10	3,00E-10	1,61E-10
3H7	IgG2 $\alpha\kappa$	NA	5,80E-10	7,97E-10
5D3	IgG1 $\kappa$	7,05E-10	2,90E-10	2,91E-10
8B6	Ig1 $\kappa$	не визначали	4,80E-10	3,95E-10
21D9	IgG2b $\kappa$	6,82E-11	1,36E-10	3,40E-10
14B2	Ig1 $\kappa$	не визначали	4,36E-10	NA
9C11	IgG1 $\kappa$	1,06E-10	1,70E-10	6,40E-10
22D10	IgG1 $\kappa$	2,84E-10	5,40E-10	6,11E-09

Афінності зв'язування моноклональних антитіл з рекомбінантним очищеним IL-13-варіантом людини і IL-13 людини дикого типу визначали з використанням вимірювання резонансу поверхневих плазмонів (Biacore®), як описано в прикладі 1.1.В. Таблиця 8 показує афінність 18 моноклональних антитіл, описаних вище, для IL-13 людини.

15

Таблиця 8

## Афінність анти-IL-13-mAb відносно IL-13 дикого типу і варіанта IL-13 людини

mAb	IL-13 дикого типу людини			Варіант IL-13 людини		
	$k_{on}$ (1/М·с)	$k_{off}$ (1/с)	$K_D$ (М)	$k_{on}$ (1/М·с)	$k_{off}$ (1/с)	$K_D$ (М)
4A8			8,90E-11			1,57E-10
6C8	1,45E+06	7,02E-04	4,84E-10	9,78E+05	3,94E-04	4,03 E-10
5F1	7,74E+05	2,24E-05	2,89E-11	5,02E+05	1,57E-05	3,14E-11
1B6	9,51E+05	5,18E-04	5,45E-10	1,06E+05	2,22E-04	2,10E-10
5G1	6,26E+05	5,49E-06	8,77E-12	1,57E+05	2,05E-05	1,30E-10
29G5	8,59E+05	1,75E-04	2,04E-10	3,16E+05	1,04E-04	3,29E-10
33C3	2,33E+06	1,49E-04	6,39E-11	7,70E+05	9,59E-05	1,24E-10
25C8	3,45E+05	2,60E-05	7,54E-11	1,34E+05	8,45E-06	6,31E-11
13C5	1,25E+06	9,31E-05	7,54E-11	5,74E+05	4,35E-05	7,59E-11
3E5	1,44E+06	6,58E-04	4,57E-10	1,85E+06	4,68E-04	2,53E-10

3H7	NB			2,54E+05	5,58E-05	2,20E-10
5D3	1,63E+06	4,83E-04	2,96E-10	1,51E+06	5,84E-04	3,87E-10
8B6	1,16E+06	6,07E-04	5,23E-10	9,83E+05	9,60E-04	9,76E-10
21D9	8,52E+05	6,58E-05	7,72E-11	8,31E+05	6,18E-05	7,44E-11
14B2	6,69E+05	1,84E-04	2,75E-10	8,08E+05	2,79E-04	3,46E-10
9C11	5,79E+05	6,50E-05	1,12E-10	6,37E+05	5,86E-05	9,21E-11
22D10	1,82E+05	6,50E-05	3,56E-10	2,45E+05	1,55E-04	6,32E-10

Приклад 1.2.C.1: Видоспецифічність мишачих моноклональних антитіл проти IL-13 людини

Для визначення, чи упізнають 17 моноклональних антитіл, описаних вище, мишачий IL-13, проводили непрямий ELISA покриванням планшетів ELISA 5 мкг/мл козячого антитіла проти мишачого IgG, Fc-фрагмента, (Pierce # 31170, Rockland, IL). Мишачі mAb проти IL-13 людини готували в різних концентраціях у діапазоні від 0,1 до 100 нг/мл у PBS, що містить 0,1 % BSA; 50 мкл кожного розведення антитіл додавали в покритий планшет ELISA і інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі. Ямки промивали 3 рази PBS, що містить 0,05 % Твін-20. Рекомбінантний біотинільований мишачий IL-13 (R&D Systems) розбавляли при 0,1 мкг/мл у PBS, що містить 0,1 % BSA; додавали 50 мкл на ямку і ці планшети інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі. Ямки промивали 3 рази PBS, що містить 0,05 % Твін-20. Стрептавідин-HRP (Pierce # 21126, Rockland, IL) розбавляли 1:20000 у PBS, що містить 0,1 % BSA; додавали 50 мкл на ямку і ці планшети інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі. Планшети промивали 3 рази PBS, що містить 0,05 % Твін-20. П'ятдесят мікролітрів TMB (Sigma # T0440, St. Louis, MO) додавали в кожен ямку і інкубували протягом 10 хвилин при кімнатній температурі. Реакцію зупиняли додаванням 1 н. сірчаної кислоти. Планшети зчитували спектрофотометрично при довжині хвилі 450 нм. Результати з цього непрямого аналізу ELISA показали, що mAb 3H7 було здатне зв'язувати mIL-13. У наступному біоаналізі було показано, що 3H7 могло інгібувати mIL-13-стимульоване продукування TARC залежним від дози чином, з IC<sub>50</sub> 2,4 нМ. Аналіз Біасоге продемонстрував також позитивне зв'язування 3H7 з mIL-13, з K<sub>D</sub> 12 нМ. Всі інші mAb у таблиці 8 не показали якого-небудь позитивного зв'язування з мишачим IL-13.

Активність нейтралізації анти-hIL-13-mAb проти IL-13 примата нелюдини (собакоподібної мавпи) і IL-13 вівці також вимірювали в біоаналізі A-549. Для генерування IL-13 собакоподібної мавпи і вівці кДНК для кожного білка одержували за допомогою ПЛР на геномній ДНК як матриці з використанням вироджених праймерів на основі послідовності IL-13 людини. Потім рекомбінантні IL-13-білки собакоподібної мавпи і вівці експресували в транзиторно трансфектованих клітинах COS. IL-13 людини дикого типу також генерували паралельно як контроль у всіх функціональних дослідженнях. Клітини A-549 відповідали як на IL-13 собакоподібної мавпи, так і на IL-13 вівці з подібною ED<sub>50</sub> відносно ED<sub>50</sub> IL-13 людини. Більшість цих mAb нейтралізували активність IL-13 собакоподібної мавпи, демонструючи перехресну реактивність з IL-13 собакоподібної мавпи (таблиця 7). Однак жодне з цих антитіл не виявляло значущої нейтралізації IL-13 вівці.

Приклад 1.2.C.2: Мишачі моноклональні антитіла проти IL-13 людини блокують зв'язування IL-13 з IL-13-рецепторами (IL-13Ra1 і IL-13Ra2)

Активність IL-13 опосередкована через рецепторний комплекс, що складається з ланцюгів IL-13Ra1 і IL-4Ra. Цей цитокін спочатку піддається взаємодії з відносно низкою афінністю з IL-13Ra1 на поверхні клітин. Потім комплекс IL-13/IL-13 Ra1 рекрутує IL-4Ra з утворенням повного IL-13 -рецептора, що зв'язується з його лігандом (IL-13) з високою афінністю (Zurawski et al. (1993) EMBO J. 12:2663; Zurawski et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:23869). Потім це зв'язування IL-13 з рецептором з високою афінністю посиляє сигнали далі через ланцюг IL-4Ra, утягуючи шлях трансдуктора сигналу кінази Януса й активатора транскрипції (JAK-STAT), наприклад, за допомогою фосфорилювання STAT6, що може бути піддано моніторингу у вигляді однієї із найбільш ранніх клітинних реакцій на IL-13 (Murata et al., дивіться раніше).

Є інший IL-13-зв'язувальний рецептор, ланцюг IL-13Ra2 (IL-13Ra2), що зв'язується з IL-13 з високою афінністю (0,25-1,2 нМ) (Caput, et al. 1996, J. Biol. Chem. 271, 16921-16926; Donaldson et al. 1998, J. Immunol. 161, 2317-2324). Жодна інша рецепторна молекула, що бере участь у комплексі IL-13/IL-13Ra2, не відома. Спочатку вважали, що IL-13Ra2 діє як "рецептор-пастка", що не передає сигналу. Однак надалі було виявлено, що він може зв'язуватися з IL-13 і передавати сигнал через Ар-1-шлях, приводячи до продукування TGF-β у деяких типах клітин, у

тому числі макрофагах, що, у свою чергу, приводить до фіброзу легень (Fichtner-Feigl, 2006, *Nat Med* 12:99-106). Таким чином, як комплекс IL-13R $\alpha$ 1/IL-4R, так і IL-13R $\alpha$ 2-шлях додають внесок у загальну патофізіологію астми й інших IL-13-опосередкованих захворювань. Декілька підходів, таких як картування епітопів, аналізи зв'язування рецептора, витіснювальна хроматографія на основі розміру молекул (SEC) і наступний аналіз BIACORE, використовували для з'ясування взаємодії між анти-IL-13-антитілами даного винаходу і IL-13 людини.

Для визначення, чи здатні описані вище моноклональні антитіла блокувати зв'язування IL-13 з IL-13-рецепторами (IL-13R $\alpha$ 1 і IL-13R $\alpha$ 2), був розроблений аналіз ELISA для зв'язування рецептора в такий спосіб. 96-ямкові планшети ELISA високого зв'язування покривали 4 мкг/мл рекомбінантного IL-13R $\alpha$ 1/Fc або IL-13R $\alpha$ 2/Fc (R&D Systems) у 100 мкл на ямку буфера для покриття (карбонатного-бікарбонатного буфера, Pierce) при 4 °C. Через 16 годин розчин для покривання видаляли постукуванням планшетів для струшування вмісту планшетів у водостік і ці планшети промивали і блокували 4 рази з використанням блокувального буфера Superblock (240 мкл на ямку) (Pierce). Додавали анти-IL-13-mAb (1:4 серійно розведені з 40 мкг/мл, 50 мкг/мл на ямку) і біотин-IL-13 (50 мкл на ямку, кінцеві концентрації 5 нМ для hIL-13R $\alpha$ 1/Fc і 0,5 нМ для hIL-13R $\alpha$ 2/Fc) і інкубували протягом 2 годин при кімнатній температурі (RT). Планшети промивали 5 разів 300 мкл 0,1 % PBST і потім додавали 100 мкл 1:5000 розведених мишачих анти-біотин-mAb (Jackson Immunosciences) і інкубували при кімнатній температурі протягом 45 хвилин. Ці планшети знову промивали 5 разів 300 мкл 0,1 % PBST з наступним додаванням реагенту TMB-субстрату (100 мкл на ямку, Pharmingen); проявляли протягом 5 хвилин і зупиняли додаванням 50 мкл 2 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (VWR). OD при 450 нм визначали спектрофотометрично.

Крім того, блокуючі рецептор властивості цих mAb оцінювали також аналізом зв'язування рецептора з використанням IL-13R $\alpha$ 2-трансфектованих клітин COS. Рекомбінантний IL-13 людини мітили <sup>125</sup>I (Amersham, Arlington Heights, IL) з використанням реагенту IODO-GEN (Pierce, Rockford, IL), як описано раніше (Obiri N1 et al. (1995) *J Biol Chem.* 270:8797-8804). Було визначено, що питома активність радіоактивно міченого IL-13 дорівнювала 158 мкКі/мкг білка. Цей мічений IL-13 виявляв подібну біоактивність з біоактивністю неміченого IL-13, як оцінено біоаналізом A-549. Для експериментів по зв'язуванню, клітини COS транзитивно трансфекували IL-13R $\alpha$ 2 людини із застосуванням Ліпофектаміну 2000 (Invitrogen) і інкубували протягом 48 годин. Трансфектовані клітини COS (5×10<sup>5</sup> клітин у 100 мкл буфера для зв'язування: RPMI 1640, що містить 0,2 % сироватковий альбумін людини і 10 ммоль HEPES) інкубували з 1,0 нМ <sup>125</sup>I-IL-13 з 1 мкМ неміченим IL-13 або без нього при 4°C протягом 2 годин. Клітиннозв'язаний <sup>125</sup>I-IL-13 відділяли від незв'язаного I-IL-13 центрифугуванням через градієнт фталат-масло і радіоактивність визначали гамма-лічильником (Wallac, Gaithersburg, MD). Для аналізу витіснення антитіл трансфектовані клітини COS інкубували з <sup>125</sup>I-IL-13 (1,0 нМ) зі збільшуваними концентраціями (до 50 мкг/мл) або без збільшуваних концентрацій анти-IL-13-антитіл, як описано вище. Обидві форми аналізу зв'язування рецептора продемонстрували наступне: по-перше, 13C5 і 9C11 блокували зв'язування IL-13 з IL-13 $\alpha$ 1; по-друге, 13C5 сильно блокувало зв'язування IL-13 з IL-13R $\alpha$ 2 (IC<sub>50</sub>~1-3 нМ як в RBA клітинної поверхні, так і в RB ELISA), у той час як 9C11 блокувало зв'язування IL-13 IL-13R $\alpha$ 2 з більш низькою ефективністю (IC<sub>50</sub>>10 нМ); і, по-третє, антитіла 5G1 і 3E5 не були здатні блокувати зв'язування IL-13 ні з IL-13R $\alpha$ 1, ні з IL-13R $\alpha$ 2. Три інших анти-IL-13-антитіла, BAK502G9 (CAT PCT WO 2005/007699), mAb13.2 (Wyeth PCT WO 2005/123126A2) і MJ2-7 (Wyeth PCT WO 2006/0073148A1) також аналізували на їх здатність блокування зв'язування IL-13 людини з IL-13RA2 людини як в ELISA для зв'язування рецептора, так і RBA поверхні клітини. Антитіло mAb13.2 не блокувало зв'язування IL-13 ні з IL-13R $\alpha$ 1, ні з IL-13R $\alpha$ 2. BAK502G9 і MJ2-7 були здатні блокувати зв'язування IL-13 з IL-13R $\alpha$ 1; однак вони виявляли більш низьку активність блокування зв'язування IL-13 з IL-13R $\alpha$ 2 з концентраціями антитіла до 50 мкг/мл (330 нМ).

Взаємодію між IL-13 і IL-13R $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 у присутності анти-IL-13-mAb аналізували також за допомогою BIACORE. Цей аналіз виконували в декількох форматах. По-перше, IL-13R $\alpha$ 1/Fc зв'язували з біочипом Biacore і IL-13 пропускали через цей біочип, у присутності і за відсутності анти-IL-13-mAb. mAb 13C5 і 9C11, серед інших, були здатні блокувати зв'язування IL-13 з IL-13R $\alpha$ 1, тоді як 5G1 і 3E5 не були здатні інгібувати зв'язування IL-13 з IL-13R $\alpha$ 1, що узгоджується з аналізами зв'язування рецептора. По-друге, IL-4R зв'язували з цим біочипом BIACORE і комплекс IL-13, попередньо зв'язаного з IL-13R $\alpha$ 1, пропускали через цей біочип. За відсутності анти-IL-13-mAb, демонстрували утворення комплексу з трьох молекул. Однак, додавання анти-IL-13-антитіла 5G1 до суміші IL-13, попередньо зв'язаного з IL-13R $\alpha$ 1, запобігало зв'язуванню з IL-4R на біочипі. Це показало, що, навіть хоча 5G1' не могло блокувати зв'язування IL-13 IL-13R $\alpha$ 1, воно могло блокувати зв'язування IL-13 з IL-4R, забезпечуючи механістичну основу для

його IL-13-нейтралізуючої активності. Ці спостереження були додатково підтверджені витіснювальною хроматографією на основі розміру молекул (SEC), де гетеротримерні комплекси (mAb-IL-13-IL-13R $\alpha$ 1/Fc) спостерігали для mAb 5G1, але не для 13C5. Наступні дослідження з картування епітопів з використанням протеїназного процесингу комплексу mAb-IL-13, дослідженого за допомогою мас-спектрометричного аналізу, показали наступне: по-перше, 5G1 зв'язується з залишками IL-13, що включають N-кінцевий пептид, що складається з 11 амінокислот (GPVPPSTALRE), що охоплює частину області спіралі A, який, як було показано, взаємодіє з IL-4R (Moy et al. (2001) J Mol Biol. 310:219 і Horita et al. (2001) J Mol Biol. 310:231); по-друге, антитіло 9C11 взаємодіє з областю між спіраллю C і спіраллю D (VSAGQFSSLHVR); і, по-третє, антитіло 13C5 взаємодіє з залишками IL-13, що включають область, яка охоплює спіраль D (VRDTK IEVAQ FVKDL LLHLK KLFRE GR, що відповідають амінокислотам 104-130 SEQ ID NO:1). Було показано, що спіраль D взаємодіє з рецепторами IL-13 (Moy et al. 2001, J Mol Biol. 310:219; Horita et al. 2001, J Mol Biol. 310:231 і Madhankumar et al. 2002 JBC 277:43194). Оскільки 13C5 зв'язує варіант IL-13 людини ( $K_D=50$  nM) набагато сильніше, ніж IL-13 собакоподібної мавпи ( $K_D=1800$  nM), і єдиним розходженням послідовності між IL-13 людини і IL-13 собакоподібної мавпи в цій потенційній епітопній ділянці 13C5 є L у IL-13 людини, але V у IL-13 собакоподібної мавпи в положенні 120, автори генерували Y120L-мутант IL-13 собакоподібної мавпи і випробували, чи буде ця мутація IL-13 собакоподібної мавпи збільшувати афінність зв'язування, а також нейтралізуючу активність відносно 13C5 у порівнянні з IL-13 дикого типу собакоподібної мавпи. На основі результатів Біосаге і біоаналізу, афінність зв'язування, а також нейтралізуюча активність 13C5 відносно Y120L-мутанта IL-13 собакоподібної мавпи були еквівалентними афінності зв'язування і нейтралізуючій активності IL-13 дикого типу собакоподібної мавпи, що вказує на те, що це розходження V/L у положенні 120 у C-кінцевій області не бере участь у розходженні афінності 13C5 відносно варіанта IL-13 людини проти IL-13 собакоподібної мавпи і що повинні бути інші залишки поза цією C-кінцевою областю, що додають внесок у диференціальну афінність зв'язування 13C5 відносно IL-13 людини і собакоподібної мавпи. Це узгоджується зі спостереженням, що 13C5 не упізнає денатурований IL-13 людини у Вестерн-блот-аналізі, свідчаючи про те, що епітоп зв'язування 13C5 на IL-13 людини є великою мірою конформаційним.

Дослідження зі зв'язування і картування епітопів показали, що 5G1 не інгібувало взаємодію IL-13 з IL-13R $\alpha$ 1, але руйнувало взаємодію IL-13/IL-13R $\alpha$ 1 з IL-4R $\alpha$ . Вважається, що це руйнування перешкоджає утворенню функціонального комплексу передачі сигналу IL-13. Ці спостереження забезпечують теоретичну модель для нейтралізуючої активності цього антитіла в IL-13R $\alpha$ 1/IL-4R-опосередкованій системі, такий як клітини A-549. На противагу цьому, 13C5 блокувало зв'язування IL-13 як з IL-13R $\alpha$ 1, так і з IL-13R $\alpha$ 2. Цікаво, що, навіть хоча антитіло 9C11 було здатне блокувати зв'язування IL-13 з IL-13R $\alpha$ 1, воно виявляло тільки часткове (або низьку активність) інгібування зв'язування IL-13 з IL-13R $\alpha$ 2. Хоча IL-13R $\alpha$ 1 і -R $\alpha$ 2 мають подібне 3-вимірне укладання й орієнтацію зв'язування IL-13, вони мають низьку ідентичність послідовності, і, отже, специфічні залишки, що відповідають за зв'язування IL-13, можуть варіюватися (Agita 2005 JBC 280:24915 і Madhankumar et al. 2002, JBC 277:43194). Таким чином, специфічні залишки на IL-13, що відповідають за зв'язування з IL-13R $\alpha$ 1 і IL-13R $\alpha$ 2, можуть розрізнятися, що могло б пояснювати диференціальні властивості блокування рецептора антитіла 9C11.

Аналізи зв'язування рецептора, картування епітопів, Біосаге і біоаналіз, описані вище, разом вказують на те, що нейтралізуюче анти-IL-13-антитіло може інгібувати IL-13-опосередковану активність за допомогою наступних механізмів:

1) Інгібує зв'язування IL-13 як з IL-13R $\alpha$ 1, так і з IL-13R $\alpha$ 2 взаємодією з IL-13 в області, що бере участь у зв'язуванні рецептора як IL-13R $\alpha$ 1, так і IL-13R $\alpha$ 2. Прикладом такого антитіла є 13C5. Такі антитіла будуть інгібувати передачу сигналу IL-13 як через комплекс IL-13R $\alpha$ 1/IL-4R, так і через IL-13R $\alpha$ 2.

2) Не інгібує зв'язування IL-13 ні з IL-13R $\alpha$ 1, ні з IL-13R $\alpha$ 2. Однак це антитіло інгібує взаємодію з IL-4-рецептором, отже, інгібує передачу сигналу через комплекс IL-13R $\alpha$ 1/IL-4R. Таке антитіло не може інгібувати передачу сигналу IL-13R $\alpha$ 2. Прикладами таких антитіл є 5G1 і mAbI3.2 (Wyeth PCT WO 2005/123126).

3) Інгібує зв'язування IL-13 з IL-13R $\alpha$ 1, але не інгібує ефективного зв'язування IL-13 з IL-13R $\alpha$ 2. Це могло б мати місце через наступні причини: а) епітоп: область, що бере участь у зв'язуванні з IL-13R $\alpha$ 1, але не в зв'язуванні з IL-13R $\alpha$ 2 або не бере ефективного участі в зв'язуванні з IL-13R $\alpha$ 2. Одним прикладом є 9C11; б) афінність: оскільки IL-13R $\alpha$ 2 має набагато більш високу афінність, ніж IL-13R $\alpha$ 1, відносно IL-13, антитіло більш низької афінності може бути здатне блокувати зв'язування IL-13 з IL-13R $\alpha$ 1, але не з IL-13R $\alpha$ 2 при фізіологічних концентраціях



терапевтичного антитіла. Одним прикладом є BAK502G9, що виявляє афінність 2,11 нМ відносно рекомбінантного IL-13 дикого типу людини, як оцінено за допомогою Biotcore (CAT PCT WO 2005/007699). Іншим прикладом є MJ2-7, що виявляє афінність 1,4 нМ відносно рекомбінантного IL-13 дикого типу людини і більш високу афінність (43 пМ) відносно IL-13 мавпи, як оцінено за допомогою Biotcore (Wyeth PCT WO 2006/0073148A1). Унаслідок цього розходження в афінності, це mAb може ефективно інгібувати зв'язування IL-13 мавпи з IL-13R $\alpha$ 2; однак воно інгібує зв'язування IL-13 людини з тим же самим рецептором з набагато меншою ефективністю.

mAb BAK502G9 і MJ2-7 мають подібні епітопи (CAT PCT WO 2005/007699 і Wyeth PCT WO 2006/0073148A1) і вони конкурують за зв'язування з IL-13, як оцінено конкурентним аналізом ELISA. Коротко, BAK502G9 іммобілізували на планшеті ELISA з наступним промиванням і блокуванням. Потім у планшет додавали IL-13 людини (10 нг/мл) у присутності різних концентрацій MJ2-7 (0,2 нг/мл - 20 мкг/мл) з наступним промиванням і детектуванням з використанням HRP-кон'югованого анти-біотин-антитіла. Це дослідження показало, що MJ2-7 залежним від дози чином конкурував з BAK502G9 за зв'язування з IL-13 людини. Негативний контроль IgG не виявляв конкуренції з BAK502G9.

Приклад 1.2.D: Визначення амінокислотної послідовності варіабельної області для кожного з мишачих mAb проти IL-13 людини

Для визначення кожної амінокислотної послідовності, приблизно  $10 \times 10^6$  гібридомних клітин виділяли центрифугуванням і обробляли для виділення тотальної РНК із використанням Тризола (Gibco BRL/Invitrogen, Carlsbad, CA) відповідно до інструкцій виготовлювача. Тотальну РНК піддавали синтезу ДНК першого ланцюга з використанням системи синтезу першого ланцюга Superscript (Invitrogen, Carlsbad, CA) відповідно до інструкцій виготовлювача. Оліго(dT) використовували для праймування синтезу першого ланцюга для виділення полі(A)<sup>+</sup> РНК. Потім кДНК-продукт першого ланцюга ампліфікували за допомогою ПЛР із праймерами, сконструйованими для ампліфікації варіабельних областей мишачого імуноглобуліну (Ig-Primer Sets, Novagen, Madison, WI). Продукти ПЛР розділяли на агарозному гелі, вирізали, очищали і потім клонували з набором для клонування TOPO у вектор pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) і трансформували в TOP 10 хімічно компетентну E. coli (Invitrogen, Carlsbad, CA). ПЛР колоній виконували на трансформантах для ідентифікації клонів, що містять інсерт. Плазмідну ДНК виділяли з клонів, що містять інсерт, з використанням набору QIAprep Miniprep (Qiagen, Valencia, CA). Інсерти в цих плазмідах секвенували на обох ланцюгах для визначення ДНК-послідовностей варіабельного важкого ланцюга або варіабельного легкого ланцюга з використанням прямого праймера M13 і зворотного праймера M13 (Fermentas Life Sciences, Hanover MD). Послідовності варіабельного важкого ланцюга і варіабельного легкого ланцюга 17 моноклональних антитіл, описаних у прикладі 1.2.C, описані в таблиці 5.

Приклад 2: Рекомбінантні антитіла проти IL-13 людини

Приклад 2.1: Конструювання й експресія рекомбінантних химерних антитіл проти IL-13 людини

ДНК, яка кодує константну ділянку важкого ланцюга мишачих моноклональних антитіл проти IL-13 людини 5G1, 13C5, 9C11, 21D9 і 3H7, замінювали кДНК-фрагментом, який кодує константну ділянку IgG1 людини, що містить 2 амінокислотні мутації шарнірної області, за допомогою гомологічної рекомбінації в бактеріях. Цими мутаціями є зміна лейцину на аланін у положенні 234 (EU-нумерація) і зміна лейцину на аланін у положенні 235 (Lund et al., 1991, J. Immunol., 147:2657). Константна область легкого ланцюга кожного з цих антитіл була замінена константною областю каппа людини. Повнорозмірні химерні антитіла транзитивно експресували в клітинах COS котрансфекцією химерних кДНК важкого ланцюга і легкого ланцюга, лігованих у експресійну плазмиду pBOS (Mizushima and Nagata, Nucleic Acids Research 1990, Vol 18, pg. 5322). Супернатанти клітин, що містять рекомбінантне химерне антитіло, очищали білок А-сефарозною хроматографією і зв'язане антитіло елюювали додаванням кислотного буфера. Антитіла нейтралізували і діалізували в PBS.

Потім химерні моноклональні антитіла проти IL-13 людини випробували на їх здатність інгібувати IL-13-індуковане продукування TARC клітинами A-549; як описано в прикладах 1.1.C.2 і 1.1.C.3. Таблиця 12 показує величини IC<sub>50</sub> з біоаналізів A-549 для трьох химерних антитіл.

Таблиця 9

Нейтралізація rhIL-13wt химерними антитілами проти IL-13 людини в біоаналізі A-549

Химерне (антитіло)	Середнє IC <sub>50</sub> (M)
5G1-Chim	4,10E-11
13C5-Chim	1,91E-10
9C11-Chim	1,23E-10

Приклад 2.2: Конструювання й експресія гуманізованих антитіл проти IL-13 людини

5 Приклад 2.2.1: Відбір каркасів антитіл людини

Кожну послідовність гена варіабельного важкого і варіабельного легкого ланцюгів миші (описаних у таблиці 3) окремо зіставляли проти 44 послідовностей варіабельного важкого ланцюга зародкової лінії імуноглобуліну людини або 46 послідовностей варіабельного легкого ланцюга зародкової лінії (одержаних з вебсайта NCBI Ig Blast у <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/retrieveig.html>.) з використанням програми Vector NTI.

10 Гуманізація була основана на гомології амінокислотних послідовностей, аналізі кластерів CDR, частоті використання серед експресованих антитіл людини і доступної інформації відносно кристалічних структур антитіл людини. З урахуванням можливих дій на зв'язування антитіл, VH-VL-спарювання й інших факторів, мишачі залишки мутували в залишки імуноглобуліну людини, причому мишачі і людські каркасні залишки були різними, за деякими виключеннями. Додаткові стратегії гуманізації будувалися на основі аналізу послідовностей антитіл зародкової лінії людини або їх підгрупи, яка мала високий ступінь гомології, тобто подібності послідовностей, відносно фактичної амінокислотної послідовності варіабельних областей мишачого антитіла.

20 Моделювання гомології використовували для ідентифікації залишків, унікальних для послідовностей мишачого антитіла, які, як було передбачено, є критичними для структури антигензв'язувального сайту антитіла (CDR). Моделювання гомології є комп'ютерним способом, за допомогою якого для білка генерують приблизні тривимірні координати. Джерелом початкових координат і керівництва відносно їх додаткового уточнення є другий білок, 25 посилальний білок, для якого ці тривимірні координати відомі і послідовність якого є родинною послідовністю першого білка. Це споріднення серед послідовностей двох білків використовується для генерування відповідності між посилальним білком і білком, для якого є бажаними координати, білком-мішенню. Первинні послідовності посилального білка і білка-мішені зіставляють з координатами ідентичних частин цих двох білків, що переносяться безпосередньо від посилального білка до білка-мішені. Координати для помилково спарених частин цих двох білків, наприклад, з мутацій, інсерцій або делецій залишків, конструюють із загальних структурних матриць і енергії, уточнених для гарантії сумісності з вже перенесеними координатами моделі. Ця комп'ютеризована структура білка може бути додатково уточнена або може використовуватися безпосередньо в дослідженнях, які використовують моделювання. З 35 даного опису повинно бути ясно, що якість модельної структури визначається точністю твердження, що цей посилальний білок і білок-мішень є родинними, і точністю, з якою виконується зіставлення. Для мишачих послідовностей 5G1, 13C5 і 9C11 використовували комбінацію пошуку BLAST і візуального обстеження для ідентифікації придатних посилальних структур. Ідентичність послідовностей 25 % між посилальною амінокислотною послідовністю й амінокислотною послідовністю-мішенню вважається мінімально необхідною для спроби виконання моделювання гомології. Зіставлення послідовностей конструюють вручну, а координати моделі генерують з використанням програми Jackal (дивіться Petrey, D., Xiang, Z., Tang, C.L., Xie, L., Gimpelev, M., Mitros, T., Soto, C.S., Goldsmith-Fischman, S., Kernysky, A., Schlessinger, A., et al. 2003. Using multiple structure alignments, fast model building, and energetic analysis in fold recognition and homology modeling. Proteins 53 (Suppl. 6): 430-435).

45 Первинні послідовності каркасних областей вибраних антитіл миші і людини мають значущу ідентичність. Положення залишків, які розрізняються, є кандидатами для включення мишачого залишку в гуманізовану послідовність для збереження спостережуваної ефективності зв'язування мишачого антитіла. Перелік залишків каркаса, які розрізняються між 50 послідовностями людини і миші, конструюють вручну.

Імовірність того, що конкретний залишок каркаса міг би впливати на зв'язувальні властивості антитіла, залежить від його близькості до залишків CDR. Таким чином, з використанням цих

модельних структур, залишки, які розрізняються між послідовностями миші і людини, ранжирували відповідно до їх відстані від будь-якого атома в CDR. Залишки, що попадають в межі 4,5 Å від будь-якого атома CDR, ідентифікували як найбільш важливі і рекомендували їх як кандидати для збереження мишачого залишку в цьому гуманізованому антитілі (тобто зворотної мутації).

Для гуманізації варіабельних областей 5G1, загальним підходом, забезпеченим у даному винаході, був наступний підхід. Спочатку конструювали молекулярну модель варіабельних областей 5G1 з використанням комп'ютерних програм ABMOD і ENCAD (Levitt, M., J. Mol. Biol. 168: 595-620 (1983)). Потім на основі пошуку гомології проти послідовностей людини V- і J-сегментів вибирали VH-сегмент 21/28 (Dersimonian, H, et al., J. Immunol. 139: 2496-2501 (1987)) і J-сегмент JH4 (Ravetch, J.V., et al., Cell 27: 583-591 (1981)) для забезпечення каркасів для варіабельної області важкого ланцюга Hu5G1. Для варіабельної області легкого ланцюга 5G1 використовували VL-сегмент HF-21/28 (Chastagner, P., et al., Gene 101: 305-306 (1991)) і J-сегмент JK4 (Hieter, P.A., et al., J. Biol. Chem. 257: 1516-1522 (1982)). Ідентичність амінокислот каркаса між VH 5G1 і акцепторними сегментами 21/28 і JK4-сегментами людини дорівнювала 72 %, тоді як ідентичність між VL 5G1 і акцепторними сегментами HF21/28 і JK4 людини дорівнювала 83 %. У положеннях каркаса, у яких комп'ютерна модель передбачала суттєвий контакт із CDR, амінокислотами V-областей миші заміняли вихідні амінокислоти каркаса людини. Це було зроблено в залишках 48, 67, 68, 70, 72, 74 і 97 важкого ланцюга. Для легкого ланцюга була зроблена заміна в залишку 50. Каркасні залишки, що зустрічаються тільки рідко в їх відповідних положеннях у відповідних підгрупах V-областей людини, заміняли консенсусними амінокислотами людини в цих положеннях. Це було зроблено в залишках 44 і 76 важкого ланцюга й у залишках 2, 15, 41, 42, 44 і 51 легкого ланцюга.

Для гуманізації варіабельних областей 13C5 загальним підходом, забезпеченим у даному винаході, був наступний підхід. Спочатку конструювали молекулярну модель варіабельних областей 13C5 з використанням комп'ютерних програм ABMOD і ENCAD (Levitt, M., J. Mol. Biol. 168: 595-620 (1983)). Потім на основі пошуку гомології проти послідовностей людини V- і J-сегментів вибирали VH-сегмент M60 (Schroeder, Jr., H.W. and Wang, J. Y., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6146-6150 (1990)) і J-сегмент JH4 (Ravetch, J.V., et al., Cell 27: 583-591 (1981)) для забезпечення каркасів для варіабельної області важкого ланцюга Hu13C5. Для варіабельної області легкого ланцюга Hu13C5 використовували VL-сегмент III-3R (Manheimer-Lory, A., et al., J. Exp. Med. 174: 1639-1652 (1991)) і J-сегмент JK4 (Hieter, P.A., et al., J. Biol. Chem. 257: 1516-1522 (1982)). Ідентичність амінокислот каркаса між VH 13C5 і акцепторними сегментами M60 і JH4 людини дорівнювала 74 %, тоді як ідентичність між VL 13C5 і акцепторними сегментами III-3R і JK4 людини дорівнювала 75 %.

У положеннях каркаса, у яких комп'ютерна модель передбачала суттєвий контакт із CDR, амінокислотами V-областей миші заміняли вихідні амінокислоти каркаса людини. Це було зроблено в залишках 22, 49 і 71 для легкого ланцюга. Каркасні залишки, що зустрічаються тільки рідко в їх відповідних положеннях у відповідних підгрупах V-областей людини, заміняли консенсусними амінокислотами людини в цих положеннях. Це було зроблено в залишках 10, 46, 83, 84, 86 і 87 важкого ланцюга й у залишках 62 і 73 легкого ланцюга.

Амінокислотні послідовності VL і VH гуманізованих mAb показані в таблиці 10.

Таблиця 10

## Перелік амінокислотних послідовностей гуманізованих mAb

SEQ ID NO:	Область білка	Послідовність
		<b>123456789012345678901234567890</b>
70	VH 5G1.1	<b>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT TYGVSWVRQAPGQGLEWIGEIYPGNYNFTY NEKFRGKATMTTDTSTSTAYMELRSLRSD TAVYYCSRWRTSYFSDYGYFDYWGQGT</b> VSS

Продовження таблиці 10

71	VL 5G1.1	DVVMTQSPSLSPVTLGQPASISCRSSQSLV <b>HSHGNTYLHWYQQRPGQSPRLLIYTVSNRF</b> SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCS <b>QSTHVPYTFGGG</b> TKVEIKR
72	VH 5G1.2	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT <b>TYGVSWVRQAPGQGLEWIGEIYPGNYNTYY</b> <b>NEKFRGKATLTADKSTSTAYMELSSLRSD</b> TAVYFCSRWRT <b>SYFSDYGYFDYWGQGT</b> TVT VSS
73	VL5G1.2	DVVMTQSPSLSPVTLGQPASISCRSSQSLV <b>HSHGNTYLHWYQQRPGQSPRLLIYTVSNRF</b> SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YFC <b>QSTHVPYTFGGG</b> TKVEIKR
74	VH 5G1.3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT <b>TYGVSWVRQAPGQGLEWIGEIYPGNYNTYY</b> <b>NEKFRGKATLTADKSTSTAYMELSSLRSED</b> TAVYYCSRWRT <b>SYFSDYGYFDYWGQGT</b> LVT VSS
75	VL5G1.3	DIVMTQSPSLSPVTPGQPASISCRSSQSLV <b>HSHGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYTVSNRF</b> SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCS <b>QSTHVPYTFGGG</b> TKVEIK
76	VH 13C5.1	EVTLKESGPVLVKPTETLTCTFSGFSLS <b>TSDMGVDWIRQPPGKALEWLAHIWDDVVKR</b> <b>YNPALKSRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPV</b> DTATYYCART <b>TVSSGYIYYAMDYWGQGT</b> TVT VSS
77	VL 13C5.1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIR <b>NYLNWYQRKPGKVKLLIYYTSKLHSGVPS</b> RFGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC <b>QQ</b> <b>GNTLPLTFGGG</b> TKVEIKR
78	VH 13C5.2	EVTLKESGPVLVKPTETLTCTFSGFSLS <b>TSDMGVDWIRQPPGKALEWLAHIWDDVVKR</b> <b>YNPALKSRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPV</b> DTATYYCART <b>TVSSGYIYYAMDYWGQGT</b> TVT VSS
79	VL 13C5.2	DIQMTQTPSSLSASVGDRTISCRASQDIR <b>NYLNWYQRKPGKVKLLIFYTSKLHSGVPS</b> RFGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYFC <b>QQ</b> <b>GNTLPLTFGGG</b> TKVEIKR
80	VH 13C5.5	EVTLRSGPGLVKPTQTLTLCTLYGFSLS <b>TSDMGVDWIRQPPGKGLEWLAHIWDDVVKR</b> <b>YNPALKSRLTISKDTSKNQVVLKLTSDVPV</b> DTATYYCART <b>TVSSGYIYYAMDYWGQGT</b> LVT VSS



Продовження таблиці 10

81	VL 13C5.5	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTISCRASQDIR NYLNWYQQKPGKAPKLLIFYTSKLSHSGVPS RFSGSGSGTDYTLTISSSLQPEDATYYCQQ GNTLPLTFGGGTKVEIK
82	VH 9C11.1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFT SSWIHWVRQAPGQGLEWIGMIHPDSETRL NQKFKDRATMTVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCASTATDFDYWGQGTTVTVSS
83	VL9C11.1	DVVLVTQTPSLPVTTPGEPASISCRSTQTL NSDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCFQNNYLPLTFGAGTKLEIKR
84	VH 9C11.2	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFT SSWIHWVNQAPGQGLEWIGMIHPDSETRL NQKFKDKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCASTATDFDYWGQGTTVTVSS
85	VL9C11.2	DVVLVTQTPSLPVTTPGEPASISCRSTQTL NSDGFTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCFQNNYLPLTFGAGTKLEIKR
90	VH 5G1.5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFT TYGVSWVRQAPGQGLEWIGEIYPGNNTYY NEKFRGKATLTADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCSRWRTSYFSDYGYFDYWGQGTTLV VSS
91	VL 5G1.5	DIVMTQSPSLPVTTPGQPASISCRSSQSLV HSHGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYTVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCSQSTHVPYTFGGGTKVEIK
80	VH 13C5.5L2E	EVTLRSGPGLVKPTQTLTLTCTLYGFSLS TSDMGVDWIRQPPGKGLEWLAHIWDDVKKR YNPALKSRLTISKDTSKNQVVLKLTSDVPV DTATYYCARTVSSGYIYYAMDYWGQGTTLV VSS
92	VL 13C5.5L2E	DIQ MTQSPSSLSASVGDRVTISCRASQDIRNYL NWYQQKPGKAPKLLIFYTSMKPRGVPSRFS GSGSGTDYTLTISSSLQPEDATYYCQQGNT LPLTFGGGTKVEIK
80	VH 13C5.5L3F	EVTLRSGPGLVKPTQTLTLTCTLYGFSLS TSDMGVDWIRQPPGKGLEWLAHIWDDVKKR YNPALKSRLTISKDTSKNQVVLKLTSDVPV DTATYYCARTVSSGYIYYAMDYWGQGTTLV VSS

Продовження таблиці 10

93	VL 13C5.5L3F	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTISCRASQDIR NYLNWYQQKPGKAPKLLIFYTSKLHSGVPS RFGSGSGTDYTLTISSLQPEDATYYCQQ GLTPPLTFGGGTKVEIK
80	VH 13C5.5L2EL3F	EVTLRSGPGLVKPTQTLTLTCTLYGFSLS TSDMGVDWIRQPPGKGLEWLAHIWDDVKR YNPALKSRLTISKDTSKNQVVLKLTSDVPV DTATYYCARTVSSGYIYYAMDYWGQGLT VSS
94	VL 13C5.5L2EL3F	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTISCRASQDIR NYLNWYQQKPGKAPKLLIFYTSKMPRGVPS RFGSGSGTDYTLTISSLQPEDATYYCQQ GLTPPLTFGGGTKVEIK

## Приклад 2.2.2: Конструювання гуманізованих антитіл

- Сконструйовані *in silico* вищеописані гуманізовані антитіла конструювали *de novo* з використанням олігонуклеотидів. Для кожної кДНК варіабельної ділянки конструювали 6 олігонуклеотидів з 60-80 нуклеотидів, кожний, для перекривання одного з одним 20 нуклеотидами на 5'- і 3'-кінці кожного олігонуклеотиду. У реакції відпалу, усі 6 олігонуклеотидів об'єднували, кип'ятили й відпалювали в присутності dNTP. Потім додавали ДНК-полімеразу I, великий фрагмент (фрагмент Кленова) (New England Biolabs #M0210, Beverly, MA) для добудовування приблизно 40 п.н.-генів між олігонуклеотидами, що перекриваються. Потім виконували ПЛР для ампліфікації повного гена варіабельної області з використанням двох крайніх праймерів, які містять виступаючу послідовність, комплементарну сайту множинного клонування в модифікованому векторі pBOS (Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) Nucleic acids Research Vol 18, No. 17). Продукти ПЛР, одержані з кожної збірки кДНК, розділяли на агарозному гелі і смугу, що відповідає передбаченому розміру кДНК варіабельної області, вирізали й очищали. Варіабельну важку область вбудовували в рамці зчитування на кДНК-фрагмент, що кодує константну ділянку IgG1 людини, що містить 2 амінокислотні мутації шарнірної ділянки, за допомогою гомологічної рекомбінації в бактеріях. Ці мутації є заміною лейцину на аланін у положенні 234 (нумерація EU) і лейцину на аланін у положенні 235 (Lund et al., 1991, J. Immunol., 147:2657). Область варіабельного легкого ланцюга інсертували в рамці зчитування з константною ділянкою каппа людини гомологічною рекомбінацією. Бактеріальні колонії виділяли й екстрагували плазмідну ДНК; кДНК-інсerti секвенували в їх повному вигляді. Точні гуманізовані важкі і легкі ланцюги, що відповідають кожному антитілу, котрансфекували в клітини COS для транзитного одержання повнорозмірних гуманізованих антитіл проти IL-13 людини. Для 13C5, вектори pBOS, що містять трансплантовані важким ланцюгом 13C5 кДНК і трансплантовані легким ланцюгом 13C5 кДНК, котрансфекували в клітини COS. Супернатанти клітин, що містять рекомбінантне химерне антитіло, очищали білок А-сефарозною хроматографією і зв'язане антитіло елюювали додаванням кислотного буфера. Антитіла нейтралізували і діалізували в PBS. Декілька гуманізованих антитіл описані в таблиці 10.
- Здатність очищених гуманізованих антитіл інгібувати активність IL-13 визначали з використанням А-549-біоаналізу, як описано в прикладах 1.1.С Афіності зв'язування цих гуманізованих антитіл з рекомбінантним IL-13 людини визначали з використанням вимірювання резонансу поверхневих плазмонів (Biacore®), як описано в прикладі 1.1.В. Таблиця 11 показує величини IC<sub>50</sub> з А-549-біоаналізів, а афіність перших шести гуманізованих антитіл описана в таблиці 10 для IL-13 людини дикого типу і варіанта.

Таблиця 11

## Ефективність нейтралізації й афінність гуманізованих анти-IL-13-mAb

mAb	Ефективність (IC <sub>50</sub> ), M		Афінність відносно hIL-13wt		
	hIL-13wt	hIL-13v	k <sub>on</sub> (1/M·с)	k <sub>off</sub> (1/с)	K <sub>D</sub> (M)
5G1-Chim	7,69E-11	6,92E-11	9,15E+05	3,82E-05	4,17E-11
5G1.1	2,90E-11	7,41E-11	7,86E+05	2,14E-05	2,72E-11
5G1.2	2,95E-11	5,53E-11	8,35E+05	8,81E-05	1,05E-10
5G1.5	1,14E-10	6,55E-11	8,69E+05	1,91E-05	2,20E-11
13C5-Chim	1,07E-10	3,70E-11	1,70E+06	9,65E-05	5,68E-11
13C5.1	8,68E-10	3,69E-10	6,68E+05	4,74E-04	7,10E-10
13C5.2	1,93E-10	1,30E-10	1,26E+06	1,23E-04	9,79E-11
13C5.5	1,24E-10	6,90E-11	2,51E+06	1,76E-04	7,01E-11

CDR-послідовності гуманізованого антитіла 13C5.5 додатково мутували з використанням способів, відомих у даній галузі, і генерували три додаткових гуманізованих антитіла. Здатність цих додаткових гуманізованих антитіл інгібувати активність IL-13 людини, собакоподібної мавпи і мавпи резус визначали з використанням А-549-біоаналізу, як описано в прикладах 1.1.С. Афінності зв'язування цих додаткових гуманізованих антитіл з рекомбінантним IL-13 людини, собакоподібної мавпи і мавпи резус визначали з використанням вимірювання резонансу поверхневих плазмонів (Biacore®), як описано в прикладі 1.1.В. Крім зв'язування і інгібування IL-13 людини, ці три додаткових антитіла виявляли збільшену афінність відносно IL-13 собакоподібної мавпи і мавпи резус. Таблиця 12 показує величини IC<sub>50</sub> з А-549-біоаналізів, а таблиця 13 показує афінність додаткових гуманізованих антитіл відносно IL-13 людини, собакоподібної мавпи і мавпи резус.

Таблиця 12

## Ефективність нейтралізації додаткових гуманізованих анти-IL-13-mAb

mAb	Ефективність (IC <sub>50</sub> , нМ)		
	IL-13 людини	IL-13 собакоподібної мавпи	IL-13 мавпи резус
13C5.5L2E	0,18	1,20	0,40
13C5.5L3F	0,15	0,46	0,14
13C5.5L2EL3F	0,12	0,48	0,26

Таблиця 13

## Афінність зв'язування додаткових гуманізованих анти-IL-13-mAb

mAb	Афінність (K <sub>D</sub> , нМ)		
	IL-13 людини	IL-13 собакоподібної мавпи	IL-13 мавпи резус
13C5.5L2E	0,12	0,52	0,29
13C5.5L3F	0,24	0,19	0,11
13C5.5L2EL3F	0,25	0,32	0,13

## Приклад 2.2.3: Характеристика гуманізованих анти-IL-13-антитіл

Автори винаходу виділили моноклональні антитіла, які блокують зв'язування IL-13 як з IL-13Rα1, так і з IL-13Rα2. Як аналіз на основі ELISA, так і аналіз зв'язування <sup>125</sup>I-міченого IL-13 на клітинній поверхні показали, що 13C5 як мишача версія, так і гуманізована версія (тобто 13C5.5) були здатні ефективно блокувати зв'язування IL-13 з обома рецепторами. Антитіла в тій же самій лінії диференціювання, що і 13C5, у тому числі 25C8 і 33C3, також були здатні блокувати зв'язування IL-13 з обома рецепторами.

Приклад 2.2.3.а: Гуманізовані анти-IL-13-антитіла блокують зв'язування IL-13 з IL-13-рецептором

Для визначення здатності гуманізованого антитіла 13C5.5 блокувати зв'язування IL-13 з IL-13-рецепторами (IL-13R $\alpha$ 1 і IL-13R $\alpha$ 2), використовували аналіз зв'язування рецептора на основі ELISA. 96-ямкові планшети ELISA високого зв'язування покривали 4 мкг/мл рекомбінантного IL-13R $\alpha$ 1/Fc або IL-13R $\alpha$ 2/Fc (R&D Systems) у 100 мкл на ямку буфера для покривання (карбонатного-бікарбонатного буфера, Pierce) при 4 °C. Через 16 годин розчин для покривання видаляли постукуванням планшетів для струшування вмісту планшетів у водостік і ці планшети промивали і блокували 4 рази з використанням блокувального буфера Superblock (240 мкл на ямку) (Pierce). Додавали гуманізоване анти-IL-13-mAb 13C5.5 і контрольні mAb (1:4 серійно розведені з 40 мкг/мл, 50 мкг/мл на ямку) і біотин-IL-13 (50 мкл на ямку, кінцеві концентрації 5 нМ для hIL-13R $\alpha$ 1/Fc і 0,5 нМ для hIL-13R $\alpha$ 2/Fc) і інкубували протягом 2 годин при кімнатній температурі (RT). Планшети промивали 5 разів 300 мкл 0,1 % PBST і потім додавали 100 мкл 1:5000 розведених мишачих анти-біотин-mAb (Jackson Immunosciences) і інкубували при кімнатній температурі протягом 45 хвилин. Ці планшети знову промивали 5 разів 300 мкл 0,1 % PBST з наступним додаванням реагенту TMB-субстрату (100 мкл на ямку, Pharmingen); проявляли протягом 5 хвилин і зупиняли додаванням 50 мкл 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (VWR). OD при 450 нм визначали спектрофотометрично. Ці результати показані в таблиці 14.

Крім того, що блокуючі рецептор властивості цих mAb оцінювали також аналізом зв'язування рецептора на основі клітинної поверхні з використанням IL-13R $\alpha$ 2-трансфектованих клітин COS. Рекомбінантний IL-13 людини мітили <sup>125</sup>I (Amersham, Arlington Heights, IL) з використанням реагенту IODO-GEN (Pierce, Rockford, IL), як описано раніше (Obiri N.I. et al. (1995) J Biol Chem. 270:8797-8804). Було визначено, що питома активність радіоактивно міченого IL-13 дорівнювала 158 мкКі/мкг білка. Цей мічений IL-13 виявляв подібну біоактивність з біоактивністю неміченого IL-13; як оцінено біоаналізом A-549. Для експериментів по зв'язуванню, клітини COS транзитивно трансфектували IL-13R $\alpha$ 2 людини із застосуванням Ліпофектаміну 2000 (Invitrogen) і інкубували протягом 48 годин. Трансфектовані клітини COS (5×10<sup>5</sup> клітин у 100 мкл буфера для зв'язування: RPMI 1640, що містить 0,2 % сироватковий альбумін людини і 10 ммоль HEPES), інкубували з 1,0 нМ <sup>125</sup>I-IL-13 з 1 мкМ неміченим IL-13 або без нього при 4°C протягом 2 годин. Клітиннозв'язаний <sup>125</sup>I-IL-13 відокремлювали від незв'язаного <sup>125</sup>I-IL-13 центрифугуванням через градієнт фталат-масло і радіоактивність визначали гамма-лічильником (Wallac, Gaithersburg, MD). Для аналізу витіснення антитіл трансфектовані клітини COS інкубували з <sup>125</sup>I-IL-13 (1,0 нМ) зі збільшуваними концентраціями (до 50 мкг/мл) або без збільшуваних концентрацій гуманізованого анти-IL-13-антитіла 13C5.5, як описано вище. Ці результати показані в таблиці 14.

Таблиця 14

Ефективність mAb в блокуванні зв'язування IL-13 людини (дикого типу) з IL-13R $\alpha$ 2 людини в аналізах зв'язування рецептора на основі клітинної поверхні і на основі ELISA

mAb	Ефективність (IC <sub>50</sub> , нМ)	
	Клітинна поверхня	ELISA
13C5.5	2,7	1,1
BAK502G9	75,8	34,3
5G1.5	P.B.	P.B.
mAb13.2	P.B.	P.B.
MJ2-7	17,6	19,0

P.B. Часткова блокада, яка не досягає 50 % інгібування

Таблиця 15 показує афінність зв'язування гуманізованого антитіла 13C5.5 і інших анти-IL-13-антитіл.



Таблиця 15

Афінність зв'язування анти-IL-13-mAb, оцінювана за допомогою Biacore

mAb	Афінність ( $K_D$ , нМ)	
	IL-13wt людини	Варіант IL-13 людини
13C5.5	0,07	0,05
BAK502G9	2,10	0,17
mAb13.2	0,11	0,20
MJ2-7	1,14	0,79

В аналізі зв'язування рецептора як на основі клітинної поверхні, так і на основі ELISA антитіло 13C5.5 виявляє високу ефективність у блокуванні зв'язування IL-13 людини з IL-13R $\alpha$ 2 людини, з IC<sub>50</sub> між 1 і 3 нМ. Хоча BAK502G9 і MJ2-7 також були здатні зменшувати сигнал зв'язування, їх ефективності були набагато більш низькими, ніж ефективність 13C5.5 (дивіться таблицю 14), щонайменше частково внаслідок їх більш низької афінності відносно IL-13 людини дикого типу (дивіться таблицю 15). mAb13.2 не було здатне інгібувати зв'язування IL-13 в обох аналізах при концентрації 100 нМ (або 15 мкг/мл). При тій же самій концентрації, BAK502G9 і MJ2-7 виявляли тільки 40 % і 70 % інгібування, відповідно, в аналізі зв'язування рецептора на основі клітинної поверхні, і обидва виявляли тільки 60 % інгібування в аналізі зв'язування рецептора на основі ELISA.

Для терапевтичних mAb з напівперіодом життя між 10 і 20 днями у людини, сироваткова концентрація дорівнює в нормі 5-15 мкг/мл зі схемою введення доз один раз на тиждень або один раз на два тижні IV або SC 3 тпрк або менше. На основі цього розрахунку, 13C5.5 є на даний час єдиним анти-IL-13-mAb, яке, очевидно, повністю (на 100 %) блокує зв'язування IL-13 людини з IL-13R $\alpha$ 2 in vivo як терапевтичний mAb, при концентрації в сироватці 100 нМ (або 15 мкг/мл) при загальноприйнятій схемі введення доз моноклонального антитіла.

Приклад 2.2.3.b: Зв'язування анти-IL-13-антитіл зі специфічним епітетом на IL-13

Епітопи на IL-13 людини, які зв'язують анти-IL-13-mAb 13C5, 13C5.5, 9C11 і 5G1, картували з використанням способів ексцизії епітопа з наступним пептидним аналізом за допомогою мас-спектрометрії (MS). В ексцизії епітопів, білок спочатку зв'язували з іммобілізованим mAb і потім розщеплювали протеолітичними ферментами. ділянки епітопа на білку визначали з використанням MS і MS/MS для ідентифікації епітоповмісних пептидів. Гранули CNBr-активованої сефарози (Amersham Biosciences, 10 мг на реакцію) суспендували в 500 мкл 0,1 М HCl і зрівноважували протягом 15 хвилин. Ці гранули переносили в компактні реакційні колонки (USB Corporation) і промивали 0,1 М HCl і потім 0,1 М NaHCO<sub>3</sub> буфером для зв'язування. До цієї суспензії додавали mAb (100 мкг) і інкубували протягом 2 годин при повільному обертанні при кімнатній температурі. Гранули з ковалентно приєднаним mAb промивали 0,1 М Тріс-HCl-буфером ~pH 8,0. Блокування груп, що не прореагували, на гранулах CNBr-сефарози виконували інкубуванням протягом 2 годин з 0,1 М Тріс-HCl-буфером ~pH 8,0. mAb, що не зв'язалися, видаляли послідовним промиванням двома буферами з різним pH: 1) буфером 0,1 М Na-ацетат, 0,5 М NaCl ~pH 4,0; і 2) буфером 0,1 М Тріс-HCl, 0,5 М NaCl ~pH 8,0. Ці гранули зрівноважували в PBS-0,14 М NaCl, 2,7 мМ KCl, 4,3 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2 і інкубували протягом 2 годин при кімнатній температурі з IL-13 або без IL-13. Після промивання цих гранул PBS ~pH 7,2, брали аліквоту цієї суспензії для аналізу MALDI-TOF.

Афінно зв'язаний білок розщеплювали різними протеазами (відношення фермент-субстрат 1:100-1:20) протягом 12 годин. Використовувані протеази включали: трипсин, GluC, хімотрипсин, карбоксипептидазу Y і амінопептидазу M. Після протеолізу, гранули промивали 500 мкл буфера для розщеплення. Останні 100 мкл промивного розчину зберігали як контроль. Приблизно 100 мкл 2 % ТФА додавали до цих гранул і гранули збирали. Як контрольні, так і промивні розчини спочатку концентрували до приблизно 20 мкл у вакуумі. Потім пептиди знесолювали з використанням zip tips C18. Ці проби аналізували MALDI-TOF MS з використанням або системи Voyager DE, або системи Voyager DE-Pro. Аналіз за допомогою nano-ESI-LC-MS/MS виконували на системі Agilent 1100 Capillary HPLC, сполученій з системою Sciex Q-Star Pulsar і MS.

У дослідженні епітопів 13C5, дві протеази, використані в послідовних стадіях, давали найкращі результати. З хімотрипсином детектували основний пептид, що складається з амінокислотних залишків 100-130 SEQ ID NO:1, що свідчило про те, що він може містити епітоп (епітопи). Детектували також малі кількості пептидів з амінокислотних залишків 103-130 і 104-

130 SEQ ID NO:1. Після розщеплення хімотрипсином використовували амінопептидазу М. Основним детектованим пептидом були амінокислотні залишки 104-130 SEQ ID NO:1, що передбачає, що 4 N-кінцевих амінокислотних залишки (80-83) не були частиною цього епітопа. Додаткове розщеплення карбоксипептидазою Y приводило до втрати афінності. Після розщеплення і промивання не спостерігали пептиду. Усі пептидні послідовності були підтверджені з використанням nano-ESI-LC-MS/MS.

Картування епітопів 13C5 і 13C5.5 показало, що їх сайт (сайти) зв'язування включали область С-кінцевої спіралі D IL-13 людини (залишки VRDTK EEVAQ FVKDL LL HLK KLFRE GR, що відповідають амінокислотам 104-130 SEQ ID NO:1). Було зроблене припущення, що область С-кінцевої спіралі D бере участь у взаємодіях з IL-13-рецептором (Zuegg et al. 2001, Immunol Cell Biol. 79:332-9). Приклад 2.3: Кристалізація анти-IL-13-антитіла в комплексі з IL-13 утворювали комплекс Fab-частини 13C5.5 з IL-13 людини і кристали цього комплексу генерували в такий спосіб.

Приклад 2.3.1: Одержання й очищення Fab-фрагмента 13C5.5

Для одержання Fab-фрагмента 13C5.5, IgG 13C5.5 у 0,15 М PBS-буфері спочатку концентрували до 2 мг/мл з використанням центрифужного фільтруючого пристрою (Millipore) Ultrafree-15 Biomax з відсіканням молекулярної маси 10 кДа (MWCO). Завись гелю папаїну (Pierce) попередньо промивали і завантажували в 2-3X буфері А (20 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 мМ EDTA, 20 мМ цистеїн) при співвідношенні об'ємів 1:1. Потім це концентроване антитіло змішували з 50 % суспензією гелю папаїну і інкубували при 37 °С протягом 24 годин при енергійному струшуванні. Суміш антитіло/завись центрифугували (Beckman 6KR) і супернатант наносили на попередньо зрівноважений PBS Супердекс 75. Елюювали основний пік і білок об'єднували. Афінну колонку 25 мл Protein A Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia) готували промиванням 100 мл PBS. Об'єднані фрагменти антитіла наносили на цю афінну колонку (швидкість потоку 2 мл/хв.). Фракції, що містять Fab-фрагменти 13C5.5 (що піддаються моніторингу по оптичній густині УФ 280 нм), збирали в потоці, що проходить через колонку. Фракції, що містять Fab-фрагмент 13C5.5 у концентрації, більшій ніж 0,3 мг/мл (визначені по УФ-оптичній густині при 280 нм), об'єднували і заморожували при -80 °С. Чистоту проб оцінювали електрофорезом у SDS-PAGE.

Приклад 2.3.2: Приготування комплексу IL-13/13C5.5 Fab Рекомбінантний IL-13 людини експресували в експресійній системі ссавця і потім очищали з використанням способів, добре відомих у даній галузі. Рекомбінантний IL-13 людини і Fab-білок 13C5.5 змішували при молярному співвідношенні 1:1 і інкубували протягом 1 години при 4 °С. Пробу комплексу наносили на попередньо зрівноважену (20 мМ Тріс рН 7,5, 150 мМ NaCl) колонку Супердекс 200 при 0,5 мл/хв. Комплекс об'єднували і концентрували до 24 мг/мл з використанням центрифужного фільтруючого пристрою (Millipore) Ultrafree-15 Biomax з відсіканням молекулярної маси 10 кДа (MWCO) і заморожували при -80 °С. Чистоту проби оцінювали електрофорезом у SDS-PAGE.

Приклад 2.3.3: Кристалізація комплексу IL-13/13C5.5 Fab

Заморожений вихідний розчин комплексу IL-13/13C5.5 (-24 мг/мл) розморожували на льоду. Цей комплекс (1,0 мкл) змішували з 1,0 мкл розчину резервуара (1,75 М сульфат амонію, 100 мМ MES рН 6,5, 10 мМ CaCl<sub>2</sub>). Одержану краплю змішували в ямці для сидячої краплі (планшет для сидячих крапель CrysChem) на цей резервуар при приблизно 18 °С. Схожі на алмаз кристали з'являлися в межах одного тижня.

Приклад 2.3.4: Кріопротекція і швидке охолодження кристалів комплексу IL-13/13C5.5 Fab

Кристали комплексу IL-13/13C5.5 Fab збирали за допомогою волокнистої петлі в маточному розчині +20 % гліцерин. Потім ці кристали швидко охолоджували проштовхуванням їх поршнем у рідкий азот.

Приклад 2.3.5: Збирання даних рентгенографії комплексу IL-13/13C5.5 Fab

Дані рентгенографії з кристалів IL-13/13C5.5 Fab збирали в IMCA beamline at the Advanced Photon Source in Argonne, IL. Ці кристали підтримували при температурі 100 К з використанням холодильника Oxford Cryosystems Cryostream під час збирання даних. Загалом, збирали 180 рамок при діапазоні осциляцій 1,0°. Ці дані обробляли з використанням комплексу програм HKL2000 (Otwinowski and Minor, 1997). Після визначення орієнтації кристалів ці дані інтегрували з використанням DENZO, масштабували і об'єднували з використанням SCALEPACK, і поміщали на абсолютну шкалу, і зменшували до величин структурного фактора з використанням TRUNCATE (French and Wilson, 1978). П'ять відсотків унікальних відображень відносили, випадковим чином, до "вільного" набору, для розрахунку вільного R-фактора (R<sub>free</sub>) (Brimmer, 1992); 95 % цих відображень, що залишилися, складали "робочий" набір, для розрахунку R-фактора (R). Дані рентгенографії підсумовані в таблиці 16. Наступні переліки

індексації для форми кристала: (1) IL-13/13C5.5 Fab: просторова група P2 (1)2(1)2(1),  $a=163,578$  Å,  $b=163,318$  Å,  $c=228,627$  Å,  $\alpha=90,0^\circ$ ,  $\beta=90,0^\circ$ ,  $\gamma=90,0^\circ$ . Таблиця 17 дає статистичні дані рентгенографії для цього набору даних.

Таблиця 16

Підсумовування інформації про кристалографічні елементарні комірки комплексу IL-13/13C5.5 Fab

Кристал	Просторова група	a (Å)	b (Å)	c (Å)
1	P2(1)2(1)2(1)	163,578	163,318	228,627

5

Таблиця 17

Підсумовування статистичних даних рентгенографії для комплексу IL-13/13C5.5 Fab

Кристал	Просторова група	Розрізнення (Å)	Унікальні відображення	R <sub>sym</sub> (%) <sup>*</sup>	Охоплення матеріалу (%) <sup>*</sup>	Кратність <sup>*</sup>
1	P2(1)2(1)2(1)	47,1-2,60	188,937	0,085 (0,562)	100,0 (100,0)	7,3 (7,3)

<sup>\*</sup>Найвища оболонка розрізнення в скобках

Приклад 2.3.6: Рішення молекулярної заміни й уточнення кристалічної структури комплексу IL-13/13C5.5 Fab

Рішення молекулярної заміни максимальної імовірності визначали з використанням програми PHASER (Read, 2001). Загалом, шість мономерів 13C5.5 були дозволені при розрізненні 3,0 Å у просторовій групі P2 (1)2(1)2(1). Моделлю пошуку була кристалічна структура Fab, повідомлена раніше (Protein Data Bank entry IBJI; Muller et al. 1998). Координати були одержані на основі рішення молекулярної заміни.

Уточнення кристалічної структури комплексу IL-13/13C5.5 Fab починалося з координат молекулярної заміни, описаних вище, у просторовій групі P2 (1)2(1)2(1).

Уточнення починалося з використанням уточнення фіксованого об'єкта за допомогою програми REFMAC, доступної в комплекті програм CCP (Murshudov et al., 1997, Collaborative Computational Project, 1994), яке приводило до наступної статистики при 2,6 Å: R 40,00 % (R<sub>free</sub> 39,00 %). Спостерігали де ново електронну густину IL-13. Ручна побудова шести мономерів IL-13 визначалася публічно доступною ЯМР-структурою 1IJZ IL-13 (Mou et al., 2001) з використанням програми О-молекулярної графіки (Jones et al., 1991) і випробування карт електронної густини 2Fo-Fc і Fo-Fc. Програму уточнення REFMAC (Murshudov et al., 1997) використовували для ітеративних раундів уповільненого уточнення, з одержанням наступної статистики: R 25,8 % (R<sub>free</sub> 30,5 %). Результати показані в таблиці 18.

25

Таблиця 18

Підсумовування статистики кристалографічного уточнення комплексу IL-13/13C5.5 Fab

Кристал	Розрізнення (Å)	R <sub>free</sub> (%)	R (%)
1	10,0-1,50	30,5	25,8

Приклад 2.3.6: Структура комплексу IL-13/13C5.5 Fab

Спостерігали екстенсивні контакти між IL-13 людини і множинними CDR 13C5.5. Прихована зона поверхні на поверхні розподілу антитіло-антиген складає 1415,50 Å<sup>2</sup>. Ці контакти складаються з критичного водневого зв'язку і гідрофобних взаємодій, які стабілізують поверхню розподілу. Два мінімальних сегменти послідовності, що містять більшість контактів поверхні розподілу, є спіралями A і D IL-13 (відносно структури IL-13 дивіться публікацію патенту США № 2003-0013851 A1, включену в даному описі як посилання). Ці контакти залучають CDR L1 і L3, і H2 і H3. На підставі попереднього опису діапазон зв'язування епітопа 13C5.5 включає топографічну область, що визначається Ser26-Asn38, Lys123-Arg130 SEQ ID NO:1. Більш

30

35

переважно, діапазон зв'язування епітопа 13C5.5 включає топографічну область, що визначається Arg30-Asn38, Lys123-Arg127 SEQ ID NO:1.

Приклад 2.4: Ефективність *in vivo* гуманізованих IL-13-антитіл

Ефективність *in vivo* анти-hIL-13-антитіл оцінювали в такий спосіб.

5 Приклад 2.4.1: Ефективність *in vivo* гуманізованих IL-13-антитіл у моделі індукованої IL-13 людини астми

Ефективність анти-hIL-13-антитіл 5G1, 13C5 і 13C5.5 випробували в моделі індукованої IL-13 людини астми в мишах. Мишей стимулювали рекомбінантним IL-13 людини в дозі 1 мкг у 50 мкл стерильного PBS, що доставляється в трахею мікророзбризкувачем з використанням ларингоскопа для гризунів для візуалізації відкриття трахеї. Загалом 2 дози IL-13 давали в дні 1 і 2 цього дослідження і гіперреактивність дихальних шляхів (AHR; Ноуманн, Н.Г.; J Pharmacol Toxicol Methods. 2007, Jan-Feb; 55(1): 16-26), а також слиз, кислу хондроїтиназу (AMCase, Donnelly LE, Barnes PJ., 1: Trends Pharmacol Sci. 2004, Oct.; 25(10):509-11) і регульований тимусом активацією хемокин (TARC; Bisset LR, Schmid-Grendelmeier P., Curr Opin Pulm Med. 15 2005, Jan.; 1 1(1):35-42) вимірювали в рідині бронхоальвеолярного лаважу через 24 години після кінцевої стимуляції. Дози антитіла 100, 300 і 1000 мкг вводили внутрішньоочеревинною ін'єкцією за 1 день перед першою стимуляцією IL-13, і результати підсумовані в таблиці 19. Антитіло 5G1, яке не блокує зв'язування IL-13 ні з IL-13R $\alpha$ 1, ні з IL-13R $\alpha$ 2, не було здатне нейтралізувати біоактивність IL-13 у цій моделі *in vivo*, що має порівнянні рівні AHR, AMCase і Мис5ас, детектовані в тваринах, оброблених 5G1, у порівнянні з обробленими PBS контрольними тваринами. На противагу цьому, антитіло 13C5, яке блокує зв'язування як з  $\alpha$ 1-, так і з  $\alpha$ 2-рецепторами, було ефективним у зменшенні всіх параметрів. Обробка IL-13 збільшувала опір дихальних шляхів з 3,6 см H<sub>2</sub>O/мл/с до 5,7 см H<sub>2</sub>O/мл/с. Обробка 13C5 (1000 мкг) зменшувала опір дихальних шляхів до 4,3 см H<sub>2</sub>O/мл/с. Гіперсекреція слизу, вимірювана рівнями Мис5ас, зменшувалася з 356,5 одиниць до максимально 211 одиниць обробкою антитілом, що відповідає 40 % зменшенню. Подібним чином, рівні кислої хондроїтинази ссавців (AMCase) зменшувалися з 202 Е до 68 Е, що відповідає 66 % зменшенню, з порівнянним зменшенням, що спостерігається в рівнях TARC (n=10, p<0,05, при всіх дозах). Рекомбінантне гуманізоване антитіло 13C5.5 продемонструвало подібні результати в цій моделі. IL-13 30 індукував збільшення опору дихальних шляхів після введення 30 мкг/мл метахоліну з 3,9 до 5,5 см H<sub>2</sub>O/мл/с. Антитіло 13C5.5 інгібувало опір дихальних шляхів до 4,1, 4,45 і 4,3 см H<sub>2</sub>O/мл/с при дозах 100, 300 і 1000 мкг, відповідно. Еіперсекреція слизу, вимірювана рівнями Мис5ас, зменшувалася з 247 Е, індукованих обробкою IL-13, до 154, 30,2 і 11,1 Е при дозах обробки 100, 300 і 1000 мкг антитіла, відповідно. Це являє собою 38, 88 і 96 % інгібування продукування слизу цим антитілом. Індукована обробкою IL-13 активність AMCase 130 Е, що зменшувалася до 113, 98 і 55 Е обробкою антитілом (дозами 100, 300 і 1000 мкг), являє собою 14, 24 і 68 % інгібування. Ці дані демонструють, що 13C5 і рекомбінантне гуманізоване антитіло 13C5.5, які блокують зв'язування IL-13 як з IL-13R $\alpha$ 1, так і з - $\alpha$ 2, можуть нейтралізувати IL-13-індуковані реакції AHR, продукування слизу і AMCase у легенях, у той час як антитіла, що не блокують зв'язування IL-13 з  $\alpha$ 1- і  $\alpha$ 2-рецепторами, є неефективними в блокуванні всіх цих біологічних реакцій.

Таблиця 19

Ефективність антитіл проти IL-13 людини в індукованій IL-13 моделі астми

Антитіло	Доза	AHR		Слиз		AMCase		TARC	
		Опір (SEM)	% інгібування	Мис5ас-одиниці (SEM)	% інгібування	Відносні одиниці (SEM)	% інгібування	пг/мл (SEM)	% інгібування
5G1	0	5,7 (0,38)	-0-	258 (37,2)	-0-	314,9 (26,1)	-0-	63,2 (14)	-0-
	100			315 (61)	-0-	225,2 (17,1)	9	111 (34,5)	-0-
	300			367,2 (63,2)	-0-	277 (21,3)	12	94,1 (24,2)	-0-
	1000	5,3 (0,35)	7	345,9 (61,6)	-0-	255,1 (18,6)	19	90,2 (17,1)	-0-

Продовження таблиці 19

13C5	0	5,7 (0,38)		356,5 (15,8)	-0-	202,2 (18,8)	-0-	91,7 (41,7)	-0-
	100			246 (30,6)	31	146,6 (17,9)**	28	36 (10,3)	61
	300			243,2 (36,7)	32	97,2 (10,8)**	52	23,3 (4,1)	75
	1000	4,3 (0,77)*		211,6 (28)***	41	68,3 (9,2)***	66	34,4 (12,1)	62
13C5.5	0	5,54 (0,53)	-0-	247,1 (96,4)	-0-	130,4 (20,6)	-0-	NT	
	100	4,16 (0,29)*	89	153,8 (67,6)	38	113,4 (18)	13	NT	
	300	4,45 (0,41)*	70	30,2 (15,2)**	88	98,9 (10,6)	24	NT	
	1000	4,3 (0,27)*	79	11,1 (5,8)***	96	55,5 (6,4)***	57	NT	

\* $p < 0,05$ , Т-критерій Стюдента\*\* $p < 0,05$ , ANOVA, Бонферроні\*\*\* $p < 0,01$ , ANOVA, Бонферроні

В іншому дослідженні ефективність анти-hIL-13-антитіл BAK502G9, MJ2-7 і 13C5.5 порівнювали в моделі астми людини, індукованої IL-13 в мишах. Мишей стимулювали рекомбінантним IL-13 людини в дозі 1 мкг у 50 мкл стерильного PBS, що доставляється інтраназально при легкому впливі седативним засобом. Загалом 2 дози IL-13 давали в дні 1 і 2 цього дослідження і гіперреактивність дихальних шляхів, а також слиз і AMCase, вимірювали в рідині бронхоальвеолярного лаважу через 24 години після кінцевої стимуляції. Дози антитіла 1000 мкг вводили внутрішньоочеревинною ін'єкцією за 1 день перед першою стимуляцією IL-13. Результати підсумовані в таблиці 20. Антитіло 13C5.5, що блокує зв'язування IL-13 як з IL-13 $\alpha$ 1, так і з - $\alpha$ 2-рецепторами, було ефективним у суттєвому зменшенні всіх параметрів. Обробка IL-13 збільшувала опір дихальних шляхів після стимуляції 30 мг/мл метахоліну з 4,2 см H<sub>2</sub>O/мл/с до 7,2 см H<sub>2</sub>O/мл/с. Обробка 13C5.5 (1000 мкг) зменшувала опір дихальних шляхів на 86,8 % з 4,6 см H<sub>2</sub>O/мл/с. Гіперсекреція слизу, вимірювана рівнями Мис5ас, зменшувалася з 768,2 одиниць до 412,9 Е, що відповідає 58,8 % зменшенню. Подібним чином, рівні кислоти хондроїтинази ссавців (AMCase) зменшувалися з 316,5 Е до 147 Е, що відповідає 52 % зменшенню. (n=10,  $p < 0,001$ ). Як BAK502G9-, так і MJ2-7-антитіла, що інгібують зв'язування IL-13 з IL-13R $\alpha$ 1, але не інгібують ефективно зв'язування IL-13 з IL-13R $\alpha$ 2, продемонстрували порівнянну здатність нейтралізувати IL-13-індуковане АНР у цій моделі. Антитіла BAK502G9 і MJ2-7 інгібували опір дихальних шляхів тільки з 7,2 до 5,96 см H<sub>2</sub>O/мл/с і 5,93 см H<sub>2</sub>O/мл/с, відповідно, що являє собою 42 % і 41,5 % зменшення АНР. Гіперсекреція слизу, вимірювана рівнями Мис5ас, зменшувалася з 768,2 одиниць, індукованих обробкою IL-13, до 627,8 і 380 Е при дозах 1000 мкг антитіла, що відповідає 23 % і 64 % інгібування антитілами BAK502G9 або MJ2-7, відповідно. Антитіло BAK502G9 було менш ефективним у інгібуванні AMCase у порівнянні з антитілами 13C5.5 або MJ2-7. Індукована обробкою IL-13 активність AMCase 316,5 Е, яка зменшувалася до 279 і 169 Е обробкою антитілом BAK502G9 або MJ2-7 (дозою 1000 мкг), являє собою 8 % і 45 % інгібування, відповідно. Ці дані демонструють, що рекомбінантне гуманізоване антитіло 13C5.5, що блокує зв'язування IL-13 як з IL-13R $\alpha$ 1, так і з - $\alpha$ 2, є найбільш ефективним у нейтралізації індукованих IL-13 реакцій АНР, продукування слизу і AMCase у легені, тоді як антитіла, що блокують зв'язування IL-13 з рецептором IL-13R $\alpha$ 2 з меншою активністю, не є такими ефективними в блокуванні цих біологічних реакцій, що сприяє патогенезу астми.

Таблиця 20

Порівняння антитіл 13C5.5, BAK502G9 і MJ2-7 індукованої IL-13 моделі астми

Антитіло	Доза (мкг)	AHR		Слиз		AMCase	
		Опір (SEM)	% інгібування	Одиниці Мис5ас (SEM)	% інгібування	Відносні одиниці (SEM)	% інгібування
PBS	0	7,2 (0,77)	-0-	768,2 (108)	-0-	316,5 (43)	-0-
13C5.5	1000	4,6 (0,3)	86,8	412,9 (77,3)	46	147 (27)	54
BAK502G9	1000	5,9 (0,38)	41,7	627,8 (59,7)	18	279,4 (28,5)	12
MJ2-7	1000	5,9 (0,67)	42,5	380 (48,5)	50,5	169 (20)	47

Приклад 2.4.2: In vivo ефективність IL-13-антитіл OVA-індукованої моделі астми

- 5 Для визначення, чи впливають властивості блокування рецепторів (зокрема рецептора IL-13Rα2) на ефективність in vivo pAb у моделях астми миші, генерували панель щурячих антитіл проти мишачого IL-13, що виявляли різні властивості блокування рецепторів, як визначено ELISA зв'язування рецепторів з використанням білків mIL-13Rα1/Fc і mIL-13Rα2/Fc (R&D Systems) (дивіться таблицю 21). Оскільки анти-hIL-13-mAb 3H7 перехресно реагує з мишачим
- 10 IL-13, його анти-mIL-13-властивості також включені в таблицю 21. Афіності зв'язування цих антитіл відносно мишачого IL-13 вимірювали з використанням аналізу BIACORE проти рекомбінантного мишачого IL-13 (R&D Systems), а ефективності (IC<sub>50</sub>) антитіл проти мишачого IL-13 визначали біоаналізом A-549 проти рекомбінантного мишачого IL-13. Послідовності варіабельних доменів 51D9 і 48D3 показані в таблиці 22.

15

Таблиця 21

Характеристика моноклональних анти-mIL-13-антитіл

№ клону	Ізотип	K <sub>D</sub> (M)	IC <sub>50</sub> (M)	Блокує зв'язування мишачого IL-13 с	
				mIL-13Ra1	mIL-13Ra2
3H7	IgG1 миші	1.12E-9	2.43E-9	Так	Так
51D9	IgG1κ щура	1.45E-10	3.43E-10	Так	Так
48D3	IgG1κ щура	1.05E-10	4.91E-11	Так	Ні
53F5	IgG1κ щура	2.82E-10	2.89E-10	Ні	Ні
74H2	IgG2ак щура	3.92E-10	9.76E-10	Ні	Ні
25C7	IgG2aλ щура	4.22E-10	6.09E-10	Так	Так
54D1	IgG1κ щура	3.40E-11	2.40E-11	Так	Так

Перелік амінокислотних послідовностей областей VH і VL анти-mIL-13-mAb щура

SEQ ID NO:	Область білка	Послідовність
		123456789012345678901234567890
86	VH 51D9	QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKASGYTFT DYAMHWVKQAPGKGLKWMWINTYTGKPTY ADDFKGRFVFSLEASASTATLQISNLKNE TATYFCARAGRTEGTHYYAMDAWGQGTSVT VSS
87	VL 51D9	DIVLTQSPVLAVSLGQRATISCRASQSVSI SSSDLMHWYQQRPGHQPKLLIYRTSNLVSG IPARFSGSGSGTDFTLTIDPVQADDIAAYY CQQGRESPTWFGGGTKLELKR
88	VH 48D3	EVQLVESGGDLVQPGRSLKLSCAASGFTFS DYMAWVRQAPTKGLEWVASISNDGISTYY RDSVKGRFTISREKAKSSLYLQMDSLRSED TATYYCTTWNWEFGFFDYWGQGVMTVSA
89	VL 48D3	DIVLTQSPALAVSLGQRATISCRASQSVTI SRYNRMHWYQQRPGQPKLLIYRSSYLASG IPARFSGSGSGTDFTLTIIYPVQADDIATYY CQQNRESPWTFGGGKLELNR

Для дослідження ефективності in vivo у мишачій моделі астми, тварин (самок мишей Balb/c) купували з Taconic, утримували в Abbott Bioresearch Center і використовували в 8-12-тижневому віці. Усі протоколи були схвалені IACUC. Мишей сенсibilізували до OVA (Sigma), ендотоксин виділяли з овальбуміну з використанням DetoxiGel (Pierce) відповідно до протоколу виготовлювача, і кінцевий матеріал, що містить менше 0,1 EU/мг білка вводили в день 0 і 7 внутрішньочеревинною ін'єкцією 8 мкг OVA у 2 мг галуни (Pierce). У дні 14 і 16 тварини одержували інтраназальну стимуляцію 0,3 мг OVA у 50 мл стерильного PBS. Антитіла 51D9 і 48D3 (очищені із супернатанту гібридомних клонів 51D9 і 48D3 згідно зі стандартними процедурами, що містили менше 0,1 EU/мг білка і були негативними відносно патогенів гризунів відповідно до ПЛР-тестування), вводили в день 13 у вигляді єдиної внутрішньочеревинної ін'єкції в стерильному PBS. Дексаметазон (Sigma) вводили перорально один раз на день у дні 13-17 у дозі 3 мг/кг. Усі кінцеві точки аналізували в день 17, через 24 години після 2-ої стимуляції OVA. Гіперчутливість дихальних шляхів (AHR) оцінювали з використанням плетизмографії всього тіла. Коротко, хірургічний рівень анестезії індукували внутрішньочеревинною ін'єкцією кетаміну і силлазіну. Трахеальну канюлю хірургічним шляхом вставляли між 3-тім і 4-тим трахеальними кільцями. Мимовільне дихання попереджували внутрішньовенозною ін'єкцією броміду панкуронію і тварин поміщали в плетизмограф для цілісного організму (Вихсо) і механічно вентильовали 0,2 мл кімнатного повітря при 150 вдихах на хвилину респіратором з контрольованим об'ємом (Harvard Apparatus). Тиск у легені і потік повітря усередині плетизмографа вимірювали з використанням перетворювачів (сенсорів) і опір легені розраховували у вигляді тиск/потік з використанням програмного забезпечення Biosystem Ха. Вимірювали фоновий опір, а також опір після стимуляції метахоліном (3, 10 і 30 мг/мл), який доставляли з використанням підключеного ультразвукового розпилювача. Після завершення тестування легеневої функції легені промивали 4 рази 0,5 мл стерильного PBS. Рідину лаважу аналізували на TARC, AMCase і клітинний інфільтрат. Збирали сироватку для кількісного визначення рівнів антитіл наприкінці цього дослідження.

Мишачі рівні TARC визначали за допомогою ELISA (R&D) відповідно до протоколу виготовлювача. Активність кислої хондроїтинази ссавців (AMCase) визначали в рідині бронхоальвеолярного лаважу (BAL) (розведення 1:10 з використанням 0,01 % BSA, 30 мМ цитрату натрію, 60 мМ фосфату натрію, pH 5,2 у присутності 80 мМ 4-метилумбеліферил-β-D-N,N'-діацетилцитобіозиду). Реакції інкубували протягом 15 хвилин при кімнатній температурі і зупиняли додаванням 100 мкл 1 М гліцин/NaOH pH 10,6. Утворення продукту визначали по випромінюванню флуоресценції при 460 нм із використанням збудження при 385 нм на

флуорометрії Fluoroskan Ascent. Для оцінки гіперплазії бокалоподібних клітин, легені роздували 10 % нейтрально забуференим формаліном при висоті 22 см протягом 15 хвилин для досягнення придатної площі поверхні легені. Зрізи заливали в парафін, нарізали й забарвлювали періодною кислотою Шиффа (PAS). Площа PAS-позитивних клітин разом з

головним бронхом легені, що залишилася, визначали кількісно з використанням програмного забезпечення ImagePro Plus. Рівні Мус5ас визначали за допомогою ELISA. 96-ямковий планшет покривають рідиною BAL, сушать протягом ночі і потім додають біотинільоване анти-Мус5ас-антитіло і детектують HRP-кон'югованим стрептавідином з наступним відщепленням колориметричного субстрату TMB.

Відносний внесок IL-13R $\alpha$ 1 і - $\alpha$ 2 у патогенез астми випробували в стандартній моделі індукованої овальбуміном астми у мишей. Антитіла, що блокують зв'язування IL-13 як з рецептором  $\alpha$ 1, так і з рецептором  $\alpha$ 2 (51D9, 54D1 і 3H7 з ефективностями 340, 24 і 2430 пМ, відповідно), а також антитіло, що блокує зв'язування IL-13 тільки з рецептором  $\alpha$ 1 (48D3, ефективність 50 пМ), випробували обробкою тварин цими антитілами за один день перед

локальними стимуляціями овальбуміном, і ці результати представлені в таблиці 23. OVA-стимуляція індукувала збільшення опору легені після стимуляції метахоліном, гіперсекреції слизу, як виміряно по збільшенню рівнів Мус5ас у рідині BAL, а також збільшувала PAS-позитивне фарбування епітеліальних клітин відповідно до гістологічної оцінки, інфільтрацію легені еозинофілами і Т-клітинами і продукування зв'язаних з астмою білків AMCase і TARC.

Антитіла, які блокували зв'язування IL-13 як з IL-13R $\alpha$ 1, так і з - $\alpha$ 2, усі, демонстрували ефективність і активність *in vivo* цих реагентів, зміщені відповідно до їх вимірної активності *in vitro*. 51D9 випробували в дозах 100, 300 і 1000 мкг на мишу. OVA-обробка викликала збільшення опору в дихальних шляхах після стимуляції 30 мг/мл метахоліну до 6,2 см H<sub>2</sub>O/мл/с у порівнянні з 3,6 см H<sub>2</sub>O/мл/с в неастматичних тваринах. Обробка мишей 51D9 повністю

запобігала збільшенню опору легень з величинами, порівнянними з величинами, що спостерігаються в неастматичних контрольних тваринах 4,1, 4,0 і 3,5 см H<sub>2</sub>O/мл/с для доз 100, 300 і 1000 мкг, відповідно (n=8-10/група; p<0,05). Величина інгібування, що спостерігається для 51D9, була порівнянна з величиною, що досягається обробкою стероїдами (3,3 см H<sub>2</sub>O/мл/с). Обробка 51D9 також інгібувала залежним від дози чином гіперсекрецію слизу з 404 одиниць Мус5ас до 55 Е в тваринах, оброблених 1000 мкг 51D9. Інгібування гіперсекреції слизу спостерігали також по гістологічній оцінці PAS-реактивних епітеліальних клітин. Діапазон відсотка позитивних клітин зменшувався з 1,0 % до 0,6 % і 0,5 % з дозою 300 і 1000 мкг антитіла, що, відповідно, позначає зменшення 47-65 % (n=8, p<0,01). Обробка 51D9 інгібувала також TARC і AMCase. OVA-стимуляція індукувала 61 пг/мл TARC, що зменшувався до 7,8 пг/мл обробкою 1000 мкг 51D9 (n=10, p<0,05). OVA-стимуляція індукувала 96 відносних одиниць активності AMCase, що зменшувалася залежним від дози чином антитілом 51D9 до 52, 45 і 21 Е при 100, 300 і 1000 мкг антитіла, відповідно (n=9-10, p<0,01). 54D1, що мало в 10 разів більш високу активність *in vitro* (24 пМ), демонструвало інгібування AHR при дозі 30 мкг зі зменшенням опору дихальних шляхів з 6,58 см H<sub>2</sub>O/мл/с до 4,4 см H<sub>2</sub>O/мл/с і максимальним інгібуванням, яке спостерігається з обробкою 300 мкг антитіла для зменшення опору дихальних шляхів, до величини 3,65 см H<sub>2</sub>O/мл/с. Подібну активність спостерігали при інгібуванні продукування слизу, AMCase і TARC. Третє антитіло 3H7, що має активність 25 нМ, усе ще демонструвало інгібування рівнів AHR, слизу і AMCase, але тільки при дозі 1000 мкг, що відповідає 10-кратному зсуву активності, описаної в біоаналізах *in vitro*.

Ефективність антитіл, які блокують зв'язування IL-13 тільки з IL-13R $\alpha$ 1, випробували з антитілом 48D3. Тварин обробляли 30, 100, 300 і 1000 мкг/мишу. OVA-стимуляція індукувала підвищення опору дихальних шляхів до 5,69 см H<sub>2</sub>O/мл/с у порівнянні з 4,1 см H<sub>2</sub>O/мл/с в неастматичних оброблених PBS мишах. Обробка 30 мкг 48D3 не впливала на OVA-індукований опір легень, хоча обробка 100, 300 і 1000 мкг 48D3 інгібувала OVA-індуковані зміни опору легень максимально до 4,4 см H<sub>2</sub>O/мл/с або до -80 % контрольних рівнів OVA (n=10, p<0,05). На відміну від дій, спостережуваних з 51D9, 48D3 не інгібувало OVA-індуковану секрецію слизу, як виміряно або за допомогою Мус5ас-ELISA, або за допомогою PAS-реактивних епітеліальних клітин. Невелике, але статистично значуще зменшення слизу (30 %) спостерігали з обробкою 48D3 у дозі 30 мкг, тоді як всі інші дози були еквівалентні OVA-стимульованим тваринам. Гістологічне кількісне визначення PAS-позитивного забарвлення показало 0,6 % у OVA-стимульованих тварин проти 0,8 % у тварин, стимульованих OVA і оброблених 1000 мкг 48D3. У цих дослідженнях 48D3 інгібувало OVA-індуковану експресію AMCase з 196 Е, детектованих в OVA-оброблених тваринах, до 63, 90, 87 і 96 Е при дозах 30, 100, 300 і 1000 мкг, відповідно. Аналіз рівнів антитіл показав, що порівнянні рівні 48D3 і 51D9 детектувалися як у сироватці, так і в рідині BAL оброблених антитілом мишей. Незважаючи на 7-кратну більш високу активність



антитіла 48D3 у порівнянні з антитілом 51D9 і еквівалентний вплив цих двох антитіл, антитіло 48D3 не було здатне інгібувати AHR або AMCase в тій же мірі, що й антитіло, яке блокувало зв'язування IL-13 з IL-13R $\alpha$ 1 і - $\alpha$ 2, і не було здатне послабляти продукування слизу. Разом ці дані передбачають, що IL-13R $\alpha$ 2 відіграє центральну роль в опосередкуванні OVA-індукованої гіперсекреції слизу і що IL-13R $\alpha$ 2 додає внесок у регуляцію астматичного фенотипу in vivo.

Таблиця 23

Ефективність антитіл проти мишачого IL-13 в мишачій моделі індукованої овальбуміном астми

Антитіло	Доза	AHR		Слиз		AMCase		TARC	
		Опір	% інгібування	Мус5ас-одиниці	% інгібування	Відносні одиниці	% інгібування	пг/мл	% інгібування
54D1	0	6,585 (0,89)	-0-	573 (96,2)	-0-	112,1 (19,3)	-0-	141 (43,2)	-0-
	30	4,486 (0,3)*	34	203 (22)*	65	30,8 (4,8)*	72,5	38,3 (10,6)*	63
	100	4,2 (0,32)*	37	153 (44)*	74	14,4 (2,7)*	87,3	23,8 (7,3)*	83
	300	3,65 (0,22)*	45	77,3 (6,9)*	87	11,0 (1,5)*	90,2	17,2 (4,5)*	88
	1000	3,58 (0,34)*	46	79 (8,5)*	87	10,4 (1,2)*	90,1	20 (12,3)*	86
51D9	0	6,24 (1,4)	-0-	409,2 (36,4)	-0-	97,6 (11)	-0-	61,8 (12,1)*	-0-
	100	4,13 (0,91)*	33,8	188,8 (24,8)*	54	52,9 (10,9)*	46	25,2 (12,8)*	60
	300	4,06 (0,32)*	34,8	180,8 (32,4)*	56	45,8 (13,7)*	53	23,1 (12,9)*	62
	1000	3,57 (0,78)*	43	55,1 (23,4)*	87	21,2 (7,8)*	79	7,8 (4,2)*	87
3H7	0	7,9 (1,2)	-0-	965 (59,9)	-0-	129,7 (17,2)	-0-	173,9 (32,0)	-0-
	1000	6,02 (0,31)*	24	587 (48,4)*	40	78,18 (12,3)*	40	77,3 (18,5)*	56
48D3	0	5,69 (0,42)	-0-	666,7 (74,7)	-0-	196,6 (35,5)	-0-	NT	
	30	5,288 (0,43)	8,1	445,4 (33,8)*	34	63,1 (18,2)*	68	NT	
	100	4,5 (0,42)*	19,5	567,5 (62,6)	15	90,4 (15,4)*	54	NT	
	300	5,25 (0,42)	14,1	606,3 (71,2)	9	87,4 (19,6)*	55	NT	
	1000	4,4 (0,33)*	20,7	534,9 (31)	20	96,5 (10,4)*	51	NT	

\* означає  $p < 0,05$ , ANOVA

Список последовательностей

5 <110> Abbott Laboratories, Inc.  
 Wu, Chengbin  
 <120> Інтерлейкін-13-зв'язувальні білки  
 <130> 8370 US P1  
 <160> 94  
 <170> Patentin version 3.4  
 10 <210> 1  
 <211> 132  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 1  
 15 Met Ala Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Phe Ala Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu  
 20 25 30  
 Ile Glu Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys  
 35 40 45  
 Asn Gly Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys  
 50 55 60  
 Ala Ala Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu  
 65 70 75 80  
 Lys Thr Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala  
 85 90 95  
 Gly Gln Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala  
 100 105 110  
 Gln Phe Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu  
 115 120 125  
 Gly Arg Phe Asn  
 130  
 <210> 2  
 <211> 330  
 20 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2  
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Phe 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 Glu Glu  
 225 230 235 240  
 Met 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 Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

5

<210> 3  
 <211> 330  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 3

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 Ala Ala 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 Glu Glu  
225 230 235 240

Met 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 Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
260 265 270

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

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
290 295 300

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325 330

<210> 4  
<211> 106  
<212> Білок  
<213> Homo sapiens  
<400> 4

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

<210> 5  
 <211> 105  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 5

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

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
 100 105

<210> 6  
 <211> 30  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 6

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

<210> 7  
 <211> 14  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 7

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

<210> 8

```

<211> 32
<212> Білок
<213> Homo sapiens
<400> 8
Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1          5          10          15

Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20          25          30

5
<210> 9
<211> 11
<212> Білок
<213> Homo sapiens
10 <400> 9
      Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      1          5          10

<210> 10
<211> 14
<212> Білок
15 <213> Homo sapiens
<400> 10
      Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly
      1          5          10

<210> 11
<211> 32
20 <212> Білок
<213> Homo sapiens
<400> 11
Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1          5          10          15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20          25          30

25
<210> 12
<211> 11
<212> Білок
<213> Homo sapiens
<400> 12
      Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      1          5          10

30
<210> 13
<211> 30
<212> Білок
<213> Homo sapiens
<400> 13
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
1          5          10          15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser
20          25          30

35
<210> 14
<211> 15
<212> Білок
<213> Homo sapiens
40 <400> 14
      Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala His
      1          5          10          15

<210> 15

```

<211> 32  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 15  
 Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Val Leu Thr  
 1 5 10 15  
 Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30  
 5  
 <210> 16  
 <211> 30  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 16  
 10  
 Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Leu Tyr Gly Phe Ser Leu Ser  
 20 25 30  
 <210> 17  
 <211> 14  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 17  
 15  
 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala  
 1 5 10  
 <210> 18  
 <211> 32  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 18  
 20  
 Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr  
 1 5 10 15  
 Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30  
 <210> 19  
 <211> 32  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 19  
 25  
 Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu  
 1 5 10 15  
 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30  
 30  
 <210> 20  
 <211> 23  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 20  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
 20  
 35  
 <210> 21  
 <211> 15  
 <212> Білок

<213> Homo sapiens  
 <400> 21  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15  
 5  
 <210> 22  
 <211> 32  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 22  
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15  
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30  
 10  
 <210> 23  
 <211> 11  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 23  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 1 5 10  
 15  
 <210> 24  
 <211> 15  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 24  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15  
 20  
 <210> 25  
 <211> 32  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 25  
 Gly Val Pro Ser Arg Ile Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15  
 Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30  
 25  
 <210> 26  
 <211> 23  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 26  
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys  
 20  
 30  
 <210> 27  
 <211> 15  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 27  
 Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15  
 35  
 <210> 28  
 <211> 32  
 <212> Білок  
 40



<213> Homo sapiens  
 <400> 28  
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15  
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys  
 20 25 30  
 5  
 <210> 29  
 <211> 23  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 29  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys  
 20  
 10  
 <210> 30  
 <211> 15  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 30  
 Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15  
 20  
 <210> 31  
 <211> 11  
 <212> Білок  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 31  
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 1 5 10  
 25  
 <210> 32  
 <211> 116  
 <212> Білок  
 <213> Mus musculus  
 <400> 32  
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Gln Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser  
 20 25 30  
 Trp Ile His Trp Val Asn Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Ser Thr Ala Thr Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser  
 115  
 30  
 <210> 33  
 <211> 113

<212> Білок

<213> Mus musculus

<400> 33

```

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Lys Ser Leu Leu Asn Ser
      20      25      30

Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
      35      40      45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ala Pro
      50      55      60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65      70      75      80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln His
      85      90      95

Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Asn Leu Glu Leu Lys
      100      105      110

```

5 Arg

<210> 34

<211> 116

<212> Білок

<213> Mus musculus

10 <400> 34

```

Gln Val Arg Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1      5      10      15

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

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

Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys Phe
      50      55      60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65      70      75      80

Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95

Ala Ser Thr Ala Thr Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
      100      105      110

Thr Val Ser Ser
      115

```

<210> 35

<211> 113

<212> Білок

<213> Mus musculus

<400> 35

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

Arg

<210> 36  
 <211> 120  
 <212> Білок  
 <213> Mus musculus  
 <400> 36

5

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

10

<210> 37  
 <211> 113  
 <212> Білок  
 <213> Mus musculus  
 <400> 37

15

```

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

```

Arg

5 <210> 38  
 <211> 120  
 <212> Білок  
 <213> Mus musculus  
 <400> 38

```

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

```

10 <210> 39  
 <211> 123  
 <212> Білок  
 <213> Mus musculus  
 15 <400> 39

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

5

<210> 40  
<211> 113  
<212> Білок  
<213> Mus musculus  
<400> 40

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

Arg

10

<210> 41  
<211> 123  
<212> Білок  
<213> Mus musculus  
<400> 41

15

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

5

<210> 42  
 <211> 111  
 <212> Білок  
 <213> Mus musculus  
 <400> 42

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

10

<210> 43  
 <211> 113  
 <212> Білок  
 <213> Mus musculus  
 <400> 43

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

Arg

<210> 44  
 <211> 117  
 <212> Білок  
 <213> Mus musculus  
 <400> 44

5

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

10

<210> 45  
 <211> 114  
 <212> Білок  
 <213> Mus musculus  
 <400> 45

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

Lys Arg

5 <210> 46  
 <211> 123  
 <212> Білок  
 <213> Mus musculus  
 <400> 46

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

10 <210> 47  
 <211> 108  
 <212> Білок  
 <213> Mus musculus  
 <400> 47



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

5  
 <210> 48  
 <211> 123  
 <212> Білок  
 <213> Mus musculus  
 <400> 48

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

10  
 <210> 49  
 <211> 108  
 <212> Білок  
 <213> Mus musculus  
 <400> 49

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

5  
 <210> 50  
 <211> 123  
 <212> Білок  
 <213> Mus musculus  
 <400> 50

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

10  
 <210> 51  
 <211> 108  
 <212> Білок  
 <213> Mus musculus  
 <400> 51

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

5  
 <210> 52  
 <211> 118  
 <212> Білок  
 <213> Mus musculus  
 <400> 52

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

10  
 <210> 53  
 <211> 110  
 <212> Білок  
 <213> Mus musculus  
 <400> 53

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

5  
 <210> 54  
 <211> 118  
 <212> Білок  
 <213> Mus musculus  
 <400> 54

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

10  
 <210> 55  
 <211> 112  
 <212> Білок  
 <213> Mus musculus  
 <400> 55

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

5 <210> 56  
 <211> 118  
 <212> Білок  
 <213> Mus musculus  
 <400> 56

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

10 <210> 57  
 <211> 112  
 <212> Білок  
 <213> Mus musculus  
 <400> 57

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

5  
 <210> 58  
 <211> 118  
 <212> Білок  
 <213> Mus musculus  
 <400> 58

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

10  
 <210> 59  
 <211> 112  
 <212> Білок  
 <213> Mus musculus  
 <400> 59

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

5  
 <210> 60  
 <211> 118  
 <212> Білок  
 <213> Mus musculus  
 <400> 60

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

10  
 <210> 61  
 <211> 112  
 <212> Білок  
 <213> Mus musculus  
 <400> 61

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

5

<210> 62  
 <211> 118  
 <212> Білок  
 <213> Mus musculus  
 <400> 62

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

10

<210> 63  
 <211> 112  
 <212> Білок  
 <213> Mus musculus  
 <400> 63



```

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Thr Val Asp Ser Tyr
          20           25           30

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Lys Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50           55           60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp
65           70           75           80

Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
          85           90           95

Glu Gly Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Ser Lys Leu Glu Ile Lys Arg
          100          105          110

```

```

5  <210>64
   <211>7
   <212>Білок
   <213>Штучний
   <220>
   <223>консенсусний CDR IL-13
10 <220>
   <221>MISC_FEATURE
   <222>(1)...(1)
   <223>X=T, D, G, S
   <220>
   <221>MISC_FEATURE
15 <222>(4)...(4)
   <223>X=M, S, Y, L, H
   <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (5)...(5)
20 <223> X=G, W, Y, A, S, N
   <220>
   <221>MISC_FEATURE
   <222>(6)...(6)
   <223>X=V, I, M
25 <220>
   <221>MISC_FEATURE
   <222>(7).(7)
   <223>X=D, H, S, Y, N, G
   <400>64

          Xaa Ser Asp Xaa Xaa Xaa Xaa
30          1           5

   <210>65
   <211>17
   <212>Білок
   <213>Штучний
35 <220>
   <223>консенсусний CDR IL-13
   <220>
   <221>MISC_FEATURE
   <222>(1)...1)
40 <223>X=M, E, H, R, S, G, L
   <220>
   <221> MISC_FEATURE

```

<222> (2)...(2)  
 <223>X=I або відсутній  
 <220>  
 <221>MISC\_FEATURE  
 5 <222>(3)...(3)  
 <223>X=H, Y, A, D, S, W  
 <220>  
 <221>MISC\_FEATURE  
 <222>(4)...(4)  
 10 <223>X=P, S, W, G  
 <220>  
 <221>MISC\_FEATURE  
 <222>(5)...(5)  
 <223>X=S, G, E, D  
 15 <220>  
 <221>MISC\_FEATURE  
 <222>(6)...(6)  
 <223>X=D, G, S, E, N  
 <220>  
 20 <221>MISC\_FEATURE  
 <222>(7)...(7)  
 <223>X=S, Y, G  
 <220>  
 <221>MISC\_FEATURE  
 25 <222>(8)...(8)  
 <223>X=E, N, Y, V, R  
 <220>  
 <221>MISC\_FEATURE  
 <222>(9)...(9)  
 30 <223>X=T, I, K  
 <220>  
 <221>MISC\_FEATURE  
 <222>(10)...(10)  
 <223>X=R, Y, I, D, A  
 35 <220>  
 <221>MISC\_FEATURE  
 <222>(11)...(11)  
 <223>X=L, Y, D, F  
 <220>  
 40 <221>MISC\_FEATURE  
 <222>(12)...(12)  
 <223>X=N, P, S, D  
 <220>  
 <221>MISC\_FEATURE  
 45 <222>(13)...(13)  
 <223>X=Q, E, D, P, S  
 <220>  
 <221>MISC\_FEATURE  
 <222>(14)...(14)  
 50 <223>X=K, M, S, T, A, V  
 <220>  
 <221>MISC\_FEATURE  
 <222>(15)...(15)  
 <223>X=F, L, V, M  
 55 <220>  
 <221>MISC\_FEATURE  
 <222>(16)...(16)  
 <223>X=K, R, Q  
 <220>  
 60 <221>MISC\_FEATURE

```

<222>(17)...(17)
<223>X=D, G, S
<400>65
  Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
  1      5      10      15
5
  <210>66
  <211>14
  <212>Білок
  <213>Штучний
10
  <220>
  <223> консенсусний CDR IL-13
  <220>
  <221>MISC_FEATURE
  <222>(1)...(1)
15
  <223>X=W, T, G, Y, D, I
  <220>
  <221>MISC_FEATURE
  <222>(2)...(2)
  <223>X=R, A, S, G, V
20
  <220>
  <221>MISC_FEATURE
  <222>(3)...(3)
  <223>X=T, F, Y, S
  <220>
25
  <221>MISC_FEATURE
  <222>(4)...(4)
  <223>X=S, T, Y
  <220>
  <221>MISC_FEATURE
30
  <222>(5)...(5)
  <223>X=Y, F, G
  <220>
  <221>MISC_FEATURE
  <222>(6)...(6)
35
  <223>X=F, Y
  <220>
  <221>MISC_FEATURE
  <222>(7)...(7)
  <223>X=S, Y, I, F
40
  <220>
  <221>MISC_FEATURE
  <222>(8)...(8)
  <223>X=D, L, Y, P
  <220>
45
  <221>MISC_FEATURE
  <222>(11)...(11)
  <223>X=Y, A, P, E
  <220>
  <221>MISC_FEATURE
50
  <222>(12)...(12)
  <223>X=F, M, S, L, I
  <220>
  <221>MISC_FEATURE
  <222>(13)...(13)
55
  <223>X=D, V, N, K
  <220>
  <221>MISC_FEATURE
  <222>(14)...(14)
  <223>X=Y, F

```

```

<400>66
      Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Gly Xaa Xaa Xaa Xaa
      1           5           10
<210>67
<211>17
5  <212>Білок
   <213>Штучний
   <220>
   <223>консенсусний CDR IL-13
10 <220>
   <221>MISC_FEATURE
   <222>(1)...(1)
   <223>X=K, R
   <220>
   <221>MISC_FEATURE
15 <222>(2)...(2)
   <223>X=S, A
   <220>
   <221>MISC_FEATURE
   <222>(3)...(3)
20 <223>X=S, T
   <220>
   <221>MISC_FEATURE
   <222>(4)...(4)
   <223>X=Q, K, I
25 <220>
   <221>MISC_FEATURE
   <222>(5)...(5)
   <223>X=N, S, T, G, E
   <220>
30 <221>MISC_FEATURE
   <222>(6)...(6)
   <223>X=L, T, S
   <220>
   <221>MISC_FEATURE
35 <222>(7)...(7)
   <223>X=L, Q, V
   <220>
   <221>MISC_FEATURE
   <222>(8)...(8)
40 <223>X=Y, N, H, D, T
   <220>
   <221>MISC_FEATURE
   <222>(9)...(9)
   <223>X=S, I, T
45 <220>
   <221>MISC_FEATURE
   <222>(10)...(10)
   <223>X=S, D, N, H, Y
   <220>
50 <221>MISC_FEATURE
   <222>(11)...(11)
   <223>X=N, G
   <220>
   <221>MISC_FEATURE
55 <222>(13)...(13)
   <223>X=K, F, N, E, S
   <220>
   <221>MISC_FEATURE
   <222>(14)...(14)
60 <223>X=N, T, S

```

```

<220>
<221>MISC_FEATURE
<222>(15)...(15)
<223>X=Y, F
5  <220>
    <221>MISC_FEATURE
    <222>(16)...(16)
    <223>X=L, A, M
    <220>
10  <221>MISC_FEATURE
    <222>(17)...(17)
    <223>X=A, D, E, H, N
    <400>67
      Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa
      1      5      10      15

      Xaa
15  <210>68
    <211>7
    <212>Білок
    <213>Штучний
    <220>
20  <223>консенсусний CDR IL-13
    <220>
    <221>MISC_FEATURE
    <222>(1)...(1)
    <223>X=L, S, K, T, W, Y
25  <220>
    <221>MISC_FEATURE
    <222>(2)...(2)
    <223>X=V, T, A
    <220>
30  <221>MISC_FEATURE
    <222>(3)...(3)
    <223>X=S, N
    <220>
    <221> MISC_FEATURE
35  <222>(4)...(4)
    <223>X=N, K, T, R, M
    <220>
    <221>MISC_FEATURE
    <222>(5)...(5)
40  <223>X=R, L, K
    <220>
    <221>MISC_FEATURE
    <222>(6)...(6)
    <223>X=F, D, E, H, A, P
45  <220>
    <221>MISC_FEATURE
    <222>(7)...(7)
    <223>X=S, P, R
    <400>68
      Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
      1      5

50  <210>69
    <211>9
    <212>Білок
    <213>Штучний
55  <220>
    <223>консенсусний CDR IL-13

```

```

<220>
<221>MISC_FEATURE
<222>(1)...(1)
<223>X=F, W, Q, A
5  <220>
    <221>MISC_FEATURE
    <222>(2)...(2)
    <223>X=Q, L
    <220>
10  <221>MISC_FEATURE
    <222>(3)...(3)
    <223>X=H, G, Y, W, N
    <220>
    <221>MISC_FEATURE
    <222>(4)...(4)
    <223>X=N, S, T, Y, L
    <220>
    <221>MISC_FEATURE
    <222>(5)...(5)
    <223>X=Y, T, S, E, H
    <220>
    <221>MISC_FEATURE
    <222>(6)...(6)
    <223>X=L, V, F, Y, N, G, D, P
    <220>
25  <221>MISC_FEATURE
    <222>(7)...(7)
    <223>X=P, H
    <220>
    <221>MISC_FEATURE
    <222>(8)...(8)
    <223>X=L, F, Y, W, R
    <220>
    <221>MISC_FEATURE
    <222>(9)...(9)
    <223>X=T, V
    <400>69
                                Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
                                1      5

<210>70
40  <211>123
    <212>Білок
    <213>Штучний
    <220>
    <223>варіабельна область гуманізованого важкого ланцюга 5G1.1
45  <400>70
      Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
      1      5      10      15
      Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
      20      25      30
      Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
      35      40      45

```

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

5 <210>71  
<211>113  
<212>Білок  
<213>Штучний  
<220>  
<223>варіабельна область гуманізованого легкого ланцюга 5G1.1  
<400>71

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

10  
15 Arg  
<210>72  
<211>123  
<212>Білок  
<213>Штучний  
<220>  
<223>варіабельна область гуманізованого важкого ланцюга 5G1.2  
<400>72

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

```

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

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

Ser Arg Trp Arg Thr Ser Tyr Phe Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr
            100             105             110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
            115              120

```

5 <210>73  
 <211>113  
 <212>Білок  
 <213>Штучний  
 <220>  
 <223>варіабельна область гуманізованого легкого ланцюга 5G1.2  
 <400>73

```

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
            20              25              30

His Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
            35              40              45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
            50              55              60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65              70              75              80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
            85              90              95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100             105             110

```

10 Arg  
 <210>74  
 <211>123  
 <212>Білок  
 <213>Штучний  
 15 <220>  
 <223>варіабельна область гуманізованого важкого ланцюга 5G1.3  
 <400>74

```

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

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

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

Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Asn Tyr Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
            50              55              60

```



Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80  
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ser Arg Trp Arg Thr Ser Tyr Phe Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr  
100 105 110  
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

5 <210>75  
<211>112  
<212>Білок  
<213>Штучний  
<220>  
<223>варіабельна область гуманізованого легкого ланцюга 5G1.3  
<400>75

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

10 <210>76  
<211>123  
<212>Білок  
15 <213>Штучний  
<220>  
<223>варіабельна область гуманізованого важкого ланцюга 13C5.1  
<400>76

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

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val  
65 70 75 80  
Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
85 90 95  
Cys Ala Arg Thr Val Ser Ser Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr  
100 105 110  
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210>77

<211>108

<212>Білок

5 <213>Штучний

<220>

<223>варіабельна область гуманізованого легкого ланцюга 13C5.1

<400>77

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

10 <210>78

<211>123

<212>Білок

<213>Штучний

15 <220>

<223>варіабельна область гуманізованого важкого ланцюга 13C5.2

<400>78

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

```

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val
65                               70                               75                               80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85                               90                               95

Cys Ala Arg Thr Val Ser Ser Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
100                             105                             110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115                               120

```

5 <210>79  
 <211>108  
 <212>Білок  
 <213>Штучний  
 <220>  
 <223>варіабельна область гуманізованого легкого ланцюга 13C5.2  
 <400>79

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
20      25      30

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

Phe Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50      55      60

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Leu
85      90      95

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

```

10  
 15 <210>80  
 <211>123  
 <212>Білок  
 <213>Штучний  
 <220>  
 <223>варіабельна область гуманізованого важкого ланцюга 13C5.5  
 <400>80

```

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Leu Tyr Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20      25      30

Asp Met Gly Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35      40      45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
50      55      60

```

```

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65                               70                               75                               80

Val Leu Lys Leu Thr Ser Val Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85                               90                               95

Cys Ala Arg Thr Val Ser Ser Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
100                            105                            110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115                               120

```

5 <210>81  
 <211>107  
 <212>Білок  
 <213>Штучний  
 <220>  
 <223>варіабельна область гуманізованого легкого ланцюга 13C5.5  
 <400>81

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
20                               25                               30

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

Phe Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50                               55                               60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Leu
85                               90                               95

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

```

10 <210>82  
 <211>116  
 <212>Білок  
 <213>Штучний  
 15 <220>  
 <223>варіабельна область гуманізованого важкого ланцюга 9C11.1  
 <400>82

```

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

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

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

Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys Phe
50                               55                               60

```

Lys Asp Arg Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80  
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Ser Thr Ala Thr Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
100 105 110  
Thr Val Ser Ser  
115

<210>83  
<211>113  
<212>Білок  
5 <213>Штучний  
<220>  
<223>варіабельна область гуманізованого легкого ланцюга 9C11.1  
<400>83

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

10 Arg  
<210>84  
<211>116  
<212>Білок  
<213>Штучний  
15 <220>  
<223>варіабельна область гуманізованого важкого ланцюга 9C11.2  
<400> 4

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

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

<210>85

<211>113

5 <212>Білок

<213>Штучний

<220>

<223>варіабельна область гуманізованого легкого ланцюга 9C11.2

<400>85

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

Arg

<210>86

<211>123

<212>Білок

15 <213>Rattus sp.

<400>86

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

5

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Glu Ala Ser Ala Ser Thr Ala Thr  
65 70 75 80  
Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys  
85 90 95  
Ala Arg Ala Gly Arg Thr Glu Gly Thr His Tyr Tyr Ala Met Asp Ala  
100 105 110  
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210>87

<211>111

<212>Білок

<213>Rattus sp.

<400>87

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

<210>88

<211>119

<212>Білок

<213>Rattus sp.

<400>88

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

10

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Lys Ala Lys Ser Ser Leu Tyr  
65 70 75 80  
Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Thr Thr Trp Asn Trp Glu Phe Gly Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110  
Val Met Val Thr Val Ser Ala  
115

<210>89

<211>111

<212>Білок

<213>Rattus sp.

<400>89

5

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

<210>90

<211>123

<212>Білок

<213>Штучний

<220>

<223>варіабельна область гуманізованого важкого ланцюга 5G1.5

<400>90

10

15

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



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

5 <210>91  
<211>112  
<212>Білок  
<213>Штучний  
<220>  
<223>гуманізований легкий ланцюг 5G1.5  
<400>91

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

10 <210>92  
<211>107  
<212>Білок  
<213>Штучний  
15 <220>  
<223>варіабельна область гуманізованого легкого ланцюга 13C5.5L2E  
<400> 92

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

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

5 <210>93  
<211>107  
<212>Білок  
<213>Штучний  
<220>  
<223>гуманізований легкий ланцюг 13C5.5L3F  
<400>93

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

10 <210>94  
<211>107  
<212>Білок  
<213>Штучний  
15 <220>  
<223>варіабельна область гуманізованого легкого ланцюга 13C5.5L2EL3F  
<400>94

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

```

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Leu Thr Pro Pro Leu
                        85                               90                               95

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

```

### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Рекombінантне антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, де вказане рекombінантне антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент:
  - зв'язує IL-13 людини;
  - містить два варіабельні домени, де один варіабельний домен містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 80, а інший варіабельний домен містить амінокислотну послідовність
- 10 SEQ ID NO: 81;
  - містить константну ділянку важкого ланцюга IgG1 людини, що включає шарнірну ділянку, яка містить заміну лейцину на аланін в положенні 234 і заміну лейцину на аланін в положенні 235;
  - містить константну ділянку легкого ланцюга каппа людини;
  - блокує зв'язування IL-13 з IL-13R $\alpha$ 1 і з IL-13R $\alpha$ 2; і
- 15 - здатне зв'язуватися з варіантом IL-13 людини, в якому залишок аргініну в положенні 130 SEQ ID NO: 1 замінений на залишок глутаміну.
2. Рекombінантне антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п. 1, де рекombінантне антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент містить чотири варіабельні домени, де кожен з двох з чотирьох варіабельних доменів містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 80, і
- 20 кожен з двох інших з чотирьох варіабельних доменів містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 81.
3. Виділена нуклеїнова кислота, що кодує рекombінантне антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п. 1 або п. 2.
4. Вектор, що містить виділену нуклеїнову кислоту за п. 3.
- 25 5. Вектор за п. 4, де вказаний вектор вибраний з групи, що складається з: pcDNA, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV і pBJ.
6. Клітина-хазяїн, що містить вектор за п. 4.
7. Клітина-хазяїн за п. 6, де вказана клітина-хазяїн є прокаріотичною клітиною.
8. Клітина-хазяїн за п. 7, де прокаріотична клітина є *E. coli*.
- 30 9. Клітина-хазяїн за п. 6, де клітина-хазяїн є еукаріотичною клітиною.
10. Клітина-хазяїн за п. 9, де еукаріотична клітина вибрана з групи, що складається з: клітини ссавця, клітини птаха, клітини гриба, клітини найпростішого і клітини комахи.
11. Клітина-хазяїн за п. 10, де клітина ссавця є клітиною CHO або клітиною COS.
- 35 12. Спосіб отримання рекombінантного антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, що включає культивування клітини-хазяїна за будь-яким з пп. 6-11 в культуральному середовищі в умовах, достатніх для отримання антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, які зв'язують IL-13.
13. Рекombінантне антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, які зв'язують IL-13 і отримані відповідно до способу за п. 12.
- 40 14. Фармацевтична композиція, яка містить рекombінантне антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п. 1 або п. 2 і фармацевтично прийнятний носій.
15. Фармацевтична композиція за п. 14, яка додатково містить один додатковий терапевтичний агент для лікування розладу, при якому IL-13 - активність є шкідливою.
16. Фармацевтична композиція за п. 14, яка додатково містить щонайменше один додатковий
- 45 агент, причому вказаний агент вибраний з групи, що складається з терапевтичного засобу, засобу візуалізації, цитотоксичного засобу, інгібітору ангиогенезу, інгібітору кінази, блокаторів коstimулюючих молекул, блокаторів адгезійних молекул, анти-цитокін-антитіла або його функціонального фрагмента, метотрексату, циклоспорину, рапаміцину, FK506, детектованої мітки або репортера, антагоніста TNF, протиревматичного засобу, міорелаксantu, наркотичного
- 50 засобу, нестероїдного протизапального засобу (NSAID), анальгезуючого засобу, анестетика, седативного засобу, місцевого анестетика, нейром'язового блокатора, протимікробного засобу, антипсоріатичного засобу, кортикостероїду, анаболічного стероїду, еритропоєтину, імунізуючого засобу, імуноглобуліну, імуносупресуючого засобу, гормону росту, гормонозамісного лікарського

засобу, радіофармацевтичного засобу, антидепресанта, антипсихотичного засобу (нейролептика), стимулятора, лікарського засобу для астми, бета-агоніста, інгальовного стероїду, епінефрину або аналога епінефрину, цитокіну й антагоніста цитокіну.

17. Спосіб лікування суб'єкта від розладу, при якому активність IL-13 є шкідливою, що включає стадію введення суб'єкту антитіла або антигензв'язувального фрагмента за п. 1 або п. 2, де розлад вибраний з групи, що складається з астми, еозинофілії, атонічного дерматиту, кропив'янки і алергічного риніту.

18. Спосіб за п. 17, в якому стадію введення антитіла або його антигензв'язувального фрагмента здійснюють до, одночасно або після введення другого агента, де другий агент вибраний з групи, що складається з інгальованих стероїдів, бета-агоністів, короткостроково діючих або довгостроково діючих бета-агоністів, антагоністів лейкотриєнів або рецепторів лейкотриєнів, ADVAIR, інгібіторів IgE, анти-IgE-антитіл, XOLAIR, інгібіторів фосфодіестерази, інгібіторів PDE4, ксантинів, антихолінергічних лікарських засобів, стабілізуючих мастоцити засобів, кромоліну, інгібіторів IL-4, інгібіторів IL-5, інгібіторів еотаксину/CCR3, антагоністів гістаміну або його рецепторів, що включають H1, H2, H3 і H4, антагоністів простагландину D або його рецепторів DP1 і CRTH2, антагоністів TNF, розчинного фрагмента TNF-рецептора, ENBREL, антагоністів TNF-ферменту, інгібіторів TNF-перетворюючого ферменту (TACE), антагоністів мускаринового рецептора, антагоністів TGF- $\beta$ , інтерферону гамма, перфенідону, хіміотерапевтичних агентів, метотрексату, лефлуноміду, сиролімусу (рапаміцину) або його аналога CCI-779, інгібіторів COX2 або cPLA2, NSAID, імуномодуляторів, інгібіторів p38, TPL-2, MK-2 і NF- $\kappa$ B, буденозиду, епідермального фактора росту, кортикостероїдів, циклоспорину, сульфасалазину, аміносаліцилатів, 6-меркаптопурину, азатиоприну, метронідазолу, інгібіторів ліпоксигенази, мезаламіну, олсалазину, балсалазиду, антиоксидантів, інгібіторів тромбоксану, антагоністів IL-1-рецепторів, анти-IL-1 $\beta$ -антитіл, анти-IL-6-антитіл, факторів росту, інгібіторів еластази, піридинілімідазольних сполук, антитіл або агоністів TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, EMAP-II, GM-CSF, FGF або PDGF, антитіл до CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 або їх лігандів, FK506, рапаміцину, мікофеноляту мофетилу, ібупрофену, преднізолону, інгібіторів фосфодіестерази, агоністів аденозину, антитромботичних агентів, інгібіторів комплементу, адренергічних агентів, інгібіторів IRAK, NIK, IKK, p38 або MAP-кінази, інгібіторів IL-1 $\beta$ -перетворюючого ферменту, інгібіторів TNF $\alpha$ -перетворюючого ферменту, інгібіторів передачі сигналу Т-клітин, інгібіторів металопротеїнази, 6-меркаптопуринів, інгібіторів ангіотензинперетворювального ферменту, розчинних рецепторів цитокінів, розчинного рецептора TNF p55, розчинного рецептора TNF p75, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, протизапальних цитокінів, IL-4, IL-10, IL-11 і TGF $\beta$ .

19. Спосіб за п. 17 або 18, в якому стадію введення антитіла або антигензв'язувального фрагмента здійснюють щонайменше одним способом, вибраним з парентерального, підшкірного, внутрішньом'язового, внутрішньовенного, внутрішньосуглобного, внутрішньобронхіального, внутрішньочеревного, інтракапсулярного, внутрішньохрящового, внутрішньопорожнинного, інтрацеліального, внутрішньомозочкового, інтрацеребровентрикулярного, через товсту кишку, інтрацервікального, внутрішньошлункового, внутрішньопечінкового, інтраміокардіального, внутрішньокісткового, внутрішньоочеревинного, інтраперикардіального, інтраперитонеального, інтраплеврального, внутрішньопростатного, внутрішньолегеневого, інтра ректального, інтра ренального, інтра ретинального, інтра спінального, інтра синовіального, інтра торакального, внутрішньоматкового, внутрішньоміхурового, болюсного, вагінального, ректального, букального, сублінгвального, інтраназального і трансдермального способів.

---

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

---

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601