



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **116008** (13) **C2**

(51) МПК (2017.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2015 08673	(72) Винахідник(и):	Бейдлер Кетрін Бротігем (US), Кіклі Крістін Кей (US), Стріфлер Бет Енн (US), Уїтчер Деррік Райан (US), Бойлес Джефрі Стрітмен (US)
(22) Дата подання заявки:	05.03.2014	(73) Власник(и):	ЕЛІ ЛІЛЛІ ЕНД КОМПАНІ, Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.01.2018	(74) Представник:	Шляховецький Ілля Олександрович, реєстр. №190
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/792,800	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2008130969 A2, 30.10.2008 WO 2013166099 A1, 07.11.2013 Neutralizing monoclonal antibodies to human IL-8 receptor A map to the NH2-terminal region of the receptor / Chuntharapai A., Lee J., Burnier J. et al. // The journal of immunology, The american association of immunologist. - US. - 1994. - Vol. 152. - no. 4. - P. 1783 - 1789
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	15.03.2013		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	25.11.2015, Бюл.№ 22		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.01.2018, Бюл.№ 2		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2014/020605, 05.03.2014		

(54) АНТИТІЛО ПРОТИ ПІДГРУПИ ELR⁺ CXС-ХЕМОКІНІВ

(57) Реферат:

Винахід належить до антитіла, яке специфічно зв'язують сім людських ELR⁺CXC-хемокінів, а саме: Gro-альфа, Gro-бета, Gro-гамма, ENA-78, GCP-2, NAP-2 та IL-8, молекули ДНК, клітини-хазяїна та способу лікування неспецифічного виразкового коліту, раку нирки або раку яєчників шляхом введення такого антитіла.

UA 116008 C2

Цей винахід стосується антитіл проти ELR⁺CXC-хемокінів і їх використання в лікуванні захворювань, патогенез яких опосередковується ELR⁺ CXC-хемокінами.

ELR⁺CXC-хемокіни (звані так тому, що всі члени родини хемокінів мають амінокислотний мотив E-L-R в безпосередній близькості від їхнього мотиву CXC) відіграють важливу роль у різноманітних патогенних механізмах, у тому числі у міграції нейтрофілів до місць запалення і ангіогенезу. Нейтрофіли додають свій внесок у патогенез деяких гострих і хронічних запальних/аутоімунних захворювань, таких як запальне захворювання кишечника (IBD), бляшковий псоріаз і долонно-підшовний пустульоз. ELR⁺CXC-хемокіни також відіграють важливу роль у канцерогенезі і метастазуванні пухлин. Ці хемокіни мають високий ступінь експресії в пухлинах. У середовищі пухлин ELR⁺CXC-хемокіни залучені до різних провідних шляхів, наприклад, ангіогенезу, мобілізації та інвазії ендотеліальних клітин і лейкоцитів на ділянках пухлин та проліферації і виживання пухлинних клітин.

Хемокіни згруповані в чотири підродини: CXC, CC, (X)C, і CX3C. У CXC-хемокінів одна амінокислота відокремлює перші два цистеїни ("мотив CXC"). ELR⁺CXC-хемокіни є лігандами хемокінових рецепторів CXCR1 та/або CXCR2, які являють собою сім зв'язаних з G-білком рецепторів трансмембранно-доменного типу, що специфічно зв'язують ELR⁺CXC-хемокіни. Сімома людськими ELR⁺CXC-хемокінами є людський Gro-альфа (також відомий як CXCL1), людський Gro-бета (також відомий як CXCL2), людський Gro-гамма (також відомий як CXCL3), людський ENA-78 (також відомий як CXCL5), людський GCP-2 (також відомий як CXCL6), людський NAP-2 (також відомий як CXCL7) і людський IL-8 (також відомий як CXCL8). Всі ELR⁺ CXC-хемокіни зв'язують рецептор CXCR2; крім того, деякі ELR⁺CXC-хемокіни зв'язують як рецептор CXCR1, так і рецептор CXCR2 (тобто CXCL6 і CXCL8), всі з яких вносять свій внесок у надлишковість активаційних провідних шляхів.

Антитіла, які зв'язуються з окремими ELR⁺ CXC-хемокінами, були описані раніше. Два моноклональні антитіла проти CXCL8 (IL-8) були оцінені в ранніх фазах клінічних випробувань щодо ефективності при запальних захворюваннях. (J Leuk Biol 66:401-410, J Immunol 181:669-679) Крім того, у WO 2008/130969 описане антитіло, яке зв'язується з людським IL-8 (CXCL8), людським Gro-альфа (CXCL1), людським Gro-бета (CXCL2), людським Gro-гамма (CXCL3) і людським ENA-78 (CXCL5). Однак вказаний опис не показує, що антитіло міцно зв'язується з GCP-2 (CXCL6), і не надає відомості щодо зв'язування з NAP-2 (CXCL7).

Тим не менш, антитіло, яке здатне зв'язати і нейтралізувати всі сім людських ELR⁺ CXC-хемокінів, ще не було описане. Кон'югування одного або декількох людських ELR⁺CXC-хемокінів залишає відкритою можливість виявлення численних біологічних функцій інших ELR⁺ CXC-хемокінів. Нейтралізація всіх семи ELR⁺ CXC-хемокінів могла б вплинути на здатність клітин CXCR1⁺ або CXCR2⁺ мігрувати до місць запалення і могла б пригнічувати ангіогенез. З урахуванням значної надлишковості в активаційних провідних шляхах рецепторів CXCR1 і CXCR2, все ще існує потреба в антитілі, яке зв'яже всі сім людських ELR⁺CXC-хемокінів зі специфічністю і високою спорідненістю. Існує потреба в антитілі, яке нейтралізує всі сім людських ELR⁺CXC-хемокінів. Існує також потреба в антитілі, яке є фізично стабільним. Тому бажано створити септаспецифічне антитіло, яке здатне зв'язати і нейтралізувати всі сім людських ELR⁺ CXC-хемокінів і яке є фізично стабільним.

Цим винаходом запропоноване антитіло, яке нейтралізує людський Gro-альфа, Gro-бета, Gro-гамма, ENA-78, GCP-2, NAP-2 та IL-8. Цим винаходом також запропоноване антитіло, яке нейтралізує людський Gro-альфа, Gro-бета, Gro-гамма, ENA-78, GCP-2, NAP-2 та IL-8, причому це антитіло зв'язує IL-8 (послідовність SEQ ID NO: 27) по таких амінокислотах: Arg 6, Ile 10, Ala 35, Ile40. Далі, цим винаходом запропоноване антитіло, яке нейтралізує людський Gro-альфа, Gro-бета, Gro-гамма, ENA-78, GCP-2, NAP-2 та IL-8, причому це антитіло зв'язує IL-8 (послідовність SEQ ID NO: 27) по таких амінокислотах: Arg 6, Ile 10, Ala 35, Ile 40 та Leu 49.

Цим винаходом запропоноване антитіло, що містить легкий ланцюг і важкий ланцюг, при цьому згаданий легкий ланцюг містить варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR), і згаданий важкий ланцюг містить варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR), причому LCVR містить LCDR1, LCDR2, LCDR3, і HCVR містить HCDR1, HCDR2, HCDR3, де LCDR1 являє собою RASQSISSNNLH (послідовність SEQ ID NO: 7), LCDR2 являє собою YTSRSVS (послідовність SEQ ID NO: 8), LCDR3 являє собою GQNNEWPEV (послідовність SEQ ID NO: 9), HCDR1 являє собою GYEFTSYWIH (послідовність SEQ ID NO: 10), HCDR2 являє собою NISPNSGSANYNEKFKS (послідовність SEQ ID NO: 11), і HCDR3 являє собою EGPYSYPSRXaaYYGSDL (послідовність SEQ ID NO: 20), де Хаа являє собою Е або Q.

Цим винаходом, за одним з аспектів, запропоноване антитіло, в якому амінокислотна послідовність HCVR являє собою послідовність SEQ ID NO: 2 або послідовність SEQ ID NO: 14.

Далі, цим винаходом запропоноване антитіло, в якому амінокислотна послідовність LCVR являє собою послідовність SEQ ID NO: 4 або послідовність SEQ ID NO: 16.

Цим винаходом запропоноване антитіло, в якому амінокислотна послідовність важкого ланцюга являє собою послідовність SEQ ID NO: 1 або послідовність SEQ ID NO: 13. Далі, цим винаходом також запропоноване антитіло, в якому амінокислотна послідовність легкого ланцюга являє собою послідовність SEQ ID NO: 3 або послідовність SEQ ID NO: 15.

Цим винаходом також запропонована молекула ДНК, що містить першу полінуклеотидну послідовність, яка кодує поліпептид, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1 або послідовність SEQ ID NO: 13; і містить другу полінуклеотидну послідовність, що кодує поліпептид, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3 або послідовність SEQ ID NO: 15.

Цим винаходом запропонована клітина ссавця, що містить молекули ДНК, описані вище, причому ця клітина здатна експресувати антитіло, що містить важкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1 або послідовність SEQ ID NO: 13, і легкий ланцюг, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3 або послідовність SEQ ID NO: 15. Відомо, що клітини-хазяї ссавців, здатні експресувати функціональні імуноглобуліни, охоплюють клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO), клітини COS і клітини NS0. Для використання в цьому винаході перевага віддається клітинам-хазяям, які являють собою клітини NS0.

Далі, цим винаходом запропонований спосіб продукування антитіла, що містить легкий ланцюг, амінокислотна послідовність якого являє собою послідовність SEQ ID NO: 3 або послідовність SEQ ID NO: 15, і важкий ланцюг, амінокислотна послідовність якого являє собою послідовність SEQ ID NO: 1 або послідовність SEQ ID NO: 13, який включає культивування описаної вище клітини ссавця за таких умов, що згадане антитіло експресується, і виділення експресованого антитіла.

Цим винаходом запропонований спосіб лікування неспецифічного виразкового коліту, раку нирки або раку яєчників, який включає введення пацієнту, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості антитіла за цим винаходом.

Цим винаходом запропоноване антитіло за цим винаходом для застосування в терапії. Крім того, цим винаходом запропоноване антитіло за цим винаходом для застосування в лікуванні неспецифічного виразкового коліту, раку нирки або раку яєчників. На додаток до цього, цим винаходом запропоноване застосування антитіла за цим винаходом у виготовленні лікарського засобу для лікування неспецифічного виразкового коліту, раку нирки або раку яєчників.

Цим винаходом запропонована фармацевтична композиція, яка містить антитіло за цим винаходом і один або декілька фармацевтично прийнятних носіїв, розріджувачів або наповнювачів.

У значенні, вживаному у цьому описі, термін "людські ELR⁺ CXС-хемокіни" означає сім відомих CXС-хемокінів, які мають мотив E-L-R і які зв'язуються з рецептором CXCR1 та/або CXCR2. Людськими ELR⁺ CXС-хемокінами є людський Gro-альфа (також відомий як CXCL1) (послідовність SEQ ID NO: 21), людський Gro-бета (також відомий як CXCL2) (послідовність SEQ ID NO: 22), людський Gro-гамма (також відомий як CXCL3) (послідовність SEQ ID NO: 23), людський ENA-78 (також відомий як CXCL5) (послідовність SEQ ID NO: 24), людський GCP-2 (також відомий як CXCL6) (послідовність SEQ ID NO: 25), людський NAP-2 (також відомий як CXCL7) (послідовність SEQ ID NO: 26) і людський IL-8 (також відомий як CXCL8) (послідовність SEQ ID NO: 27). У сукупності, всі сім людських ELR⁺ CXС-хемокінів у цьому описі називаються "підгрупою людських ELR⁺ CXС-хемокінів".

Термін "антитіло" у значенні, вживаному у цьому описі, означає моноклональні молекули імуноглобуліну, що містять чотири поліпептидні ланцюги, два важкі (H) ланцюги і два легкі (L) ланцюги, пов'язані між собою дисульфідними зв'язками. Кожен важкий ланцюг містить варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR) і константну ділянку важкого ланцюга. Константна ділянка важкого ланцюга містить три домени, CH1, CH2 і CH3. Кожен легкий ланцюг складається з варіабельної ділянки легкого ланцюга (LCVR) і константної ділянки легкого ланцюга, CL. HCVR і LCVR можуть далі підрозділятися на гіперваріабельні ділянки, які називають ділянками, що обумовлюють комплементарність (CDR), які чергуються з ділянками, які є більш консервативними і які називають каркасними ділянками (FR). Кожна HCVR і LCVR складається з трьох CDR і чотирьох FR, розмішених від аміно-кінця до карбокси-кінця у такому порядку: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Ділянки CDR HCVR називають HCDR1, HCDR2 і HCDR3. Ділянки CDR LCVR називають LCDR1, LCDR2 і LCDR3. CDR містять більшість залишків, які утворюють специфічні взаємодії з антигеном. На цей час існує три системи визначення CDR для антитіл, які використовуються для визначення послідовностей. Визначення CDR за номенклатурою Кебота (Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological

Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) ґрунтується на варіабельності послідовностей антитіла. Визначення CDR за номенклатурою Чотья (Chothia et al., "Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins", Journal of Molecular Biology, 196, 901-917 (1987); Al-Lazikani et al., "Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins", Journal of Molecular Biology, 273, 927-948 (1997)) ґрунтується на тривимірних структурах антитіл і топологіях петель CDR. Визначення CDR за номенклатурою Чотья є ідентичним визначенням CDR за номенклатурою Кебота, за винятком HCDR1 і HCDR2. Для цілей цього винаходу, для визначення CDR використовують гібрид визначень за номенклатурами Кебота і Чотья. Визначення амінокислот на ділянках HCVR і LCVR здійснюють у відповідності з номенклатурою Кебота. Крім того, зрозуміло, що термін "антитіло" охоплює будь-які клітинні посттрансляційні модифікації у антитілі, в тому числі, але не обмежуючись ними, ацилювання і глікозилювання.

У значенні, вживаному у цьому описі, термін "нейтралізуюче антитіло" означає антитіло, наслідком зв'язування якого з ELR⁺ CXC-хемокіном є пригнічування біологічної активності, індукованої цим хемокіном. Це пригнічування біологічної активності, індукованої ELR⁺-хемокіном, може бути оцінено із застосуванням одного або більше стандартного(-их) in vitro аналіза(-ів), відомого(-их) в цій галузі (дивись Приклади). Крім того, зрозуміло, що терміни "пригнічувати" або "нейтралізувати" у значенні, вживаному у цьому описі по відношенню до активності антитіла за цим винаходом, означає здатність антагонізувати, зменшувати або порушувати розвиток, інтенсивність або ступінь біологічної активності, індукованої одним або декількома ELR⁺ CXC-хемокінами.

У значенні, вживаному у цьому описі, термін "септаспецифічне антитіло" означає антитіло, яке зв'язує всі сім людських ELR⁺CXC-хемокінів з високою спорідненістю (наприклад, зі зв'язувальною спорідненістю (K_D) в інтервалі від приблизно 5×10^{-11} М до приблизно 1×10^{-9} М).

У значенні, вживаному у цьому описі, термін "пацієнт" означає ссавця, переважно людину, із захворюванням, розладом або станом, для яких корисним було б зниження рівня людських ELR⁺CXC-хемокінів або зменшення біологічної активності, індукованої людськими ELR⁺ CXC-хемокінами.

У значенні, вживаному у цьому описі, термін "лікування" або "лікувати" означає всі процеси, у разі яких може відбуватись уповільнення, регулювання або зупинення розвитку захворювань, що обговорюються у цьому описі, але не обов'язково означає повне усунення всіх симптомів розладу. Лікування включає введення антитіла за цим винаходом для лікування захворювання або стану у пацієнта, зокрема, у людини.

Антитіла за цим винаходом зв'язують підгрупу людських ELR⁺CXC- хемокінів з високою спорідненістю. Наприклад, згадані антитіла зв'язують всі сім людських ELR⁺CXC-хемокінів зі зв'язувальною спорідненістю (K_D) в діапазоні від приблизно 5×10^{-11} М до приблизно 1×10^{-9} М, наприклад, від приблизно $1,0 \times 10^{-10}$ М до приблизно $8,6 \times 10^{-10}$ М, як визначено із застосуванням поверхневого плазмонного резонансу, при експресії у вигляді непроцесованого антитіла IgG4. Крім того, антитіла за цим винаходом характеризуються тим, що в той час як вони специфічно зв'язують підгрупу людських ELR⁺CXC-хемокінів, з іншими CXC-хемокінами, наприклад, з фактором стромальних клітин 1-альфа (SDF-1 α , також відомий як CXCL12), вони не зв'язуються специфічно.

У одному з варіантів здійснення цього винаходу антитіла за цим винаходом можуть мати варіабельну ділянку важкого ланцюга і варіабельну ділянку легкого ланцюга, де варіабельна ділянка важкого ланцюга містить ділянки CDR з такими амінокислотними послідовностями: HCDR1 (послідовність SEQ ID NO: 10), HCDR2 (послідовність SEQ ID NO: 11) і HCDR3 (послідовність SEQ ID NO: 12); і де варіабельна ділянка легкого ланцюга містить ділянки CDR з такими амінокислотними послідовностями: LCDR1 (послідовність SEQ ID NO: 7), LCDR2 (послідовність SEQ ID NO: 8) і LCDR3 (послідовність SEQ ID NO: 9).

У іншому варіанті здійснення цього винаходу антитіла за цим винаходом можуть мати варіабельну ділянку важкого ланцюга і варіабельну ділянку легкого ланцюга, де варіабельна ділянка важкого ланцюга містить ділянки CDR з такими амінокислотними послідовностями: HCDR1 (послідовність SEQ ID NO: 10), HCDR2 (послідовність SEQ ID NO: 11) і HCDR3 (послідовність SEQ ID NO: 19); і де варіабельна ділянка легкого ланцюга містить ділянки CDR з наступними амінокислотними послідовностями: LCDR1 (послідовність SEQ ID NO: 7), LCDR2 (послідовність SEQ ID NO: 8) і LCDR3 (послідовність SEQ ID NO: 9).

У ще одному варіанті здійснення цього винаходу антитіла за цим винаходом можуть містити варіабельну ділянку важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2 або послідовність SEQ ID NO: 14, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4 або послідовність SEQ ID NO: 16.

У ще одному варіанті здійснення цього винаходу антитіла за цим винаходом можуть містити важкий ланцюг, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1 або послідовність SEQ ID NO: 13, і легкий ланцюг, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3 або послідовність SEQ ID NO: 15.

За варіантом, якому віддається перевага, антитіла складаються з двох ідентичних легких ланцюгів і двох ідентичних важких ланцюгів. За варіантом, якому віддається перевага, легкий ланцюг з амінокислотною послідовністю, представленою послідовністю SEQ ID NO: 3, кодується нуклеїновою кислотою, що містить полінуклеотидну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 6. За варіантом, якому віддається перевага, важкий ланцюг з амінокислотною послідовністю, представленою послідовністю SEQ ID NO: 1, кодується нуклеїновою кислотою, що містить полінуклеотидну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 5. За варіантом, якому віддається перевага, амінокислотна послідовність легкого ланцюгу, представлена послідовністю SEQ ID NO: 15, кодується нуклеїновою кислотою, що містить полінуклеотидну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 18. За варіантом, якому віддається перевага, амінокислотна послідовність важкого ланцюгу, представлена послідовністю SEQ ID NO: 13, кодується нуклеїновою кислотою, що містить полінуклеотидну послідовність, представлену послідовністю SEQ ID NO: 17.

Варіантом здійснення цього винаходу, якому віддається найбільша перевага, є антитіло, що містить два ідентичні важкі ланцюги, що мають амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1, і два ідентичні легкі ланцюги, що мають амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3.

Антитіла за цим винаходом можуть бути включені в фармацевтичні композиції, придатні для введення пацієнту. Зазвичай фармацевтична композиція містить антитіло за цим винаходом і фармацевтично прийнятний носій. У значенні, вживаному у цьому описі, термін "фармацевтично прийнятний носій" охоплює будь-які і всі розчинники, дисперсійні середовища, покриття, антибактеріальні та протигрибкові засоби, ізотонічні і затримуючі всмоктування засоби і т.п., які є фізіологічно сумісними. Фармацевтично прийнятні носії можуть крім того містити незначні кількості допоміжних речовин, що збільшує термін зберігання або ефективність антитіла.

Композиції за цим винаходом можуть бути виготовлені у вигляді різноманітних форм. Форма, якій віддається перевага, залежить від запланованого способу введення і терапевтичного застосування. Типові композиції, яким віддається перевага, мають форму ін'єкційних або інфузійних розчинів, таких як композиції, подібні до тих, що використовують для пасивної імунізації людей. Способом введення, якому віддається перевага, є парентеральний (наприклад, внутрішньовенний, підшкірний, внутрішньочеревинний або внутрішньом'язовий). У одному з варіантів здійснення цього винаходу антитіло вводять шляхом внутрішньочеревинної або підшкірної ін'єкції. Однак, як буде зрозуміло фахівцю в цій галузі, шлях та/або спосіб введення буде змінюватися в залежності від бажаних результатів.

До складу фармацевтичних композицій можуть також включатись додаткові активні сполуки. У деяких варіантах здійснення цього винаходу антитіло за цим винаходом включається до складу композиції разом з та/або вводиться разом з одним або більше додатковим(-ими) терапевтичним(-ими) засобом(-ами), який(-і) є корисним(-ими) для лікування розладів, в яких шкідливою є активність ELR⁺ CXC-хемокінів. Наприклад, антитіло за цим винаходом може бути введене до складу композиції разом з та/або вводиться разом з одним або більше додатковими хіміотерапевтичними агентами (наприклад, сунітинібом (sunitinib) або цисплатином (cisplatin)).

Фармацевтичні композиції за цим винаходом можуть включати "терапевтично ефективну кількість" антитіла за цим винаходом. Термін "терапевтично ефективна кількість" означає кількість, ефективну, в дозах і протягом необхідного періоду часу, для досягнення бажаного терапевтичного результату. Терапевтично ефективна кількість антитіла може змінюватись відповідно до певних факторів, таких як стан хвороби, вік, стать і маса індивідуума, і здатності антитіла викликати бажану реакцію у індивідуума. Терапевтично ефективною кількістю також є кількість, у разі якої будь-які токсичні або шкідливі впливи антитіла переважаються терапевтично корисними впливами.

Схеми введення лікарського засобу можуть бути пристосовані для забезпечення оптимальної бажаної реакції (наприклад, терапевтичної реакції). Наприклад, може вводиться одна ударна доза, протягом певного періоду часу можуть бути введені декілька розділених доз або доза може бути пропорційно зменшена або збільшена, як показано вимогами терапевтичної ситуації.

Величина дози може змінюватись у залежності від типу і тяжкості стану, що підлягає полегшенню. Крім того, слід розуміти, що для будь-якого конкретного суб'єкта конкретні режими

дозування мають бути згодом скориговані відповідно до потреби пацієнта і професійної підходу особи, що вводить згадані композиції або наглядає за введенням згаданих композицій.

Специфічне зв'язування і нейтралізація антитілом за цим винаходом людських ELR⁺ CXC-хемокінів дозволяє використовувати вказане антитіло як терапевтичний засіб для захворювань і розладів, на які сприятливо впливає пригнічування біологічної активності людських ELR⁺ CXC-хемокінів. З урахуванням їх здатності зв'язувати і нейтралізовувати всі сім людських ELR⁺ CXC-хемокінів, антитіла за цим винаходом мають переваги перед монотерапією, спрямованою на один з людських ELR⁺ CXC-хемокінів, і комбінованою терапією, спрямованою на декілька людських ELR⁺ CXC-хемокінів.

В одному з варіантів здійснення цим винаходом запропонований спосіб лікування неспецифічного виразкового коліту або раку, наприклад, раку нирки або раку яєчників. В іншому варіанті здійснення цим винаходом запропоноване антитіло для застосування при лікуванні неспецифічного виразкового коліту або раку, наприклад, раку нирки або раку яєчників.

Далі цей винахід пояснений за допомогою наведених нижче необмежувальних прикладів.

ПРИКЛАДИ

Експресія і продукування антитіл

Антитіла за цим винаходом можуть бути експресовані і очищені як показано далі. Вектор експресії, що містить послідовність ДНК SEQ ID NO: 5 (що кодує поліпептид важкого ланцюгу з послідовністю SEQ ID NO: 1) і послідовність SEQ ID NO: 6 (що кодує поліпептид легкого ланцюгу з послідовністю SEQ ID NO: 3), використовують для трансфекції клітин NS0. Антитіло, яке одержують з цього вектора експресії, являє собою "Антитіло 1".

Крім того, вектор експресії, що містить послідовність ДНК SEQ ID NO: 17 (що кодує поліпептид важкого ланцюгу з послідовністю SEQ ID NO: 13) і послідовність SEQ ID NO: 18 (що кодує поліпептид легкого ланцюгу з послідовністю SEQ ID NO: 15), використовують для трансфекції клітин NS0. Антитіло, яке одержують з цього вектора експресії, являє собою "Антитіло 2".

Для будь-якого з Антитіла 1 або Антитіла 2 трансфеговані пули висівають з низькою густиною для забезпечення можливості близького до клонального росту стабільно експресуючих клітин. Еталонні лунки піддають скринінгу на експресію антитіл, і потім масштабують у безсироваткових суспензійних культурах, які будуть використовуватися для продукування. Просвітлене середовище, до якого було секретоване антитіло, завантажують на колонку з протеїном А чи протеїном G, яка була урівноважена сумісним буфером, наприклад, забуференим фосфатом фізіологічним розчином (pH 7,4). Колонку промивають для видалення неспецифічних зв'язувальних компонентів. Зв'язане антитіло елюють градієнтом pH (наприклад, від 0,1 М розчину натрій-фосфатного буферу (pH 6,8) до 0,1 М розчину натрій-цитратного буферу (pH 2,5)). Фракції антитіла виявляють із застосуванням SDS-PAGE (електрофорез в поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфата натрію), після чого об'єднують. Подальше очищення є необов'язковим, і залежить від запланованого використання. Антитіло може бути сконцентроване і/або відфільтроване за стерильних умов із застосуванням звичайних методів. Розчинний агрегат і мультимери можуть бути ефективно видалені із застосуванням звичайних методів, в тому числі шляхом гель-хроматографії за розміром молекул, гідрофобної хроматографії, іонообмінної хроматографії або хроматографії на гідроксилапатитній адсорбційній колонці. Чистота антитіла після цих хроматографічних стадій може бути більшою за 99 %. Продукт може бути негайно заморожений при температурі -70 °C або ліофілізований.

Зв'язувальна спорідненість до людських ELR⁺ CXC-хемокінів

Для дослідження на основі поверхневого плазмонного резонансу використовують прилад Biacore 2000 і програмне забезпечення Biacore 2000 Evaluation Software, версія 4.1. Чіп CM5 готують за методом зв'язування аміногруп з використанням EDC/NHS (N-етил-N-(диметиламінопропіл)карбодіімід/N-гідроксисукцинімід), запропонованим виробником. Стисло, поверхні всіх чотирьох проточних кювет активують шляхом впорскування суміші (1:1) EDC/NHS протягом 7 хв при швидкості 10 мкл/хв. Білок А розбавляють до 100 мкг/мл в 10 мМ розчині ацетатного буферу, pH 4,5, та іммобілізують до досягнення приблизно 10000 RU (резонансних одиниць) на всіх 4 проточних кюветах шляхом впорскування протягом 7 хв при швидкості потоку 10 мкл/хв. Ділянки, які не прореагували, блокують шляхом впорскування етаноламіну протягом 7 хв при швидкості потоку 10 мкл/хв. Для видалення будь-якого нековалентно зв'язаного білка здійснюють два впорскування гліцину (pH 1,5) тривалістю по 30 с при швидкості потоку 10 мкл/хв. Буфером для електрофореза є HBS-EP⁺.

Антитіло 1 або Антитіло 2 розбавляють до 2 мкг/мл в буфері для електрофореза, і на проточній кюветі (Fc) іммобілізують приблизно 400-600 RU. Ліганди розбавляють з 100 мкг/мл

до 50 нМ в буфері для електрофореза з подальшим подвійним послідовним розведенням в буфері для електрофореза до 3,125 нМ. Ліганд в кожній концентрації двічі впорскують зі швидкістю 100 мкл/хв протягом 150 с перед фазою дисоціації. Тривалість фази дисоціації дорівнює 1800 с для всіх лігандів. Регенерацію здійснюють шляхом впорскування в усі проточні кювети 10 мМ розчину гліцину (рН 1,5) протягом 60 с при швидкості 50 мкл/хв. Дані, з яких видалений еталон, збирають як Fc2-Fc1, Fc3-Fc1 і Fc4-Fc1. Вимірювання здійснюють при температурі 25 °С. Швидкість асоціації (k_{on}) і швидкість дисоціації (k_{off}) для кожного ліганду оцінюють із застосуванням моделі зв'язування "зв'язування 1:1 (масоперенос)". Спорідненість (K_D) обчислюють за кінетикою зв'язування за співвідношенням: $K_D = k_{off}/k_{on}$.

Людські ELR⁺CXC-хемокіни спричиняють залежну від концентрації реакцію зв'язування з Антитілом 1 і Антитілом 2. Таблиця 1 і Таблиця 2 підсумовують значення k_{on} , k_{off} і K_D для Антитіла 1 і Антитіла 2. Ці результати показують, що Антитіло 1 і Антитіло 2 зв'язують всі сім людських ELR⁺ CXC-хемокінів з високою спорідненістю.

Таблиця 1 *In vitro* зв'язувальна спорідненість Антитіла 1 до людських ELR⁺ CXC-хемокінів

Хемокін	k_{on} (1/мс) $\times 10^5$	k_{off} (1/с) $\times 10^{-5}$	K_D (пМ)
людський CXCL1 (Gro-альфа)	9,30 \pm 0,45	10,50 \pm 0,14	113 \pm 4
людський CXCL2 (Gro-бета)	7,73 \pm 0,86	13,15 \pm 0,64	171 \pm 11
людський CXCL3 (Gro-гамма)	7,16 \pm 0,08	12,35 \pm 1,06	172 \pm 13
людський CXCL5 (ENA-78)	5,43 \pm 0,61	12,20 \pm 0,00	226 \pm 25
людський CXCL6 (GCP-2)	7,07 \pm 0,11	57,80 \pm 3,68	818 \pm 40
людський CXCL7 (NAP-2)	9,00 \pm 0,75	16,15 \pm 1,77	181 \pm 35
людський CXCL8 (IL-8)	3,39 \pm 0,03	13,00 \pm 0,57	384 \pm 13

Таблиця 2 *In vitro* зв'язувальна спорідненість Антитіла 2 до людських ELR⁺ CXC-хемокінів

Хемокін	k_{on} (1/Мс) $\times 10^5$	k_{off} (1/с) $\times 10^{-5}$	K_D (пМ)
людський CXCL1 (Gro-альфа)	6,28	1,53	243
людський CXCL2 (Gro-бета)	1,14	2,05	180
людський CXCL3 (Gro-гамма)	4,65	1,76	379
людський CXCL5 (ENA-78)	4,27	1,51	354
людський CXCL6 (GCP-2)	7,19	6,11	849
людський CXCL7 (NAP-2)	5,21	2,18	418
Людський CXCL8 (IL-8)	2,61	1,24	473

Оцінка фізичної стабільності

Агрегація і самоасоціація білка є небажаною властивістю антитіла, оскільки це потенційно може посилити небажані впливи, наприклад, ініціювання імунної реакції.

Тому дуже бажаним є утримування антитіла в мономерному стані. Відсоток високомолекулярного (% HMW) агрегату є показником агрегації і самоасоціації білків. Більш високий відсоток високомолекулярного агрегату вказує на посилену агрегацію/самоасоціацію білка і підвищену фізичну нестабільність. Фізична стабільність Антитіла 1 і Антитіла 2 визначається так, як наведено нижче.

Антитіло піддають діалізу протягом ночі при температурі 4 °С в 10 мМ розчині цитрату, рН 6, \pm 150 мМ розчин NaCl. Наступного ранку зразки концентрують до 50 мг/мл, фільтрують через 0,2 мкм фільтри, після чого додають Tween-80 до кінцевої 0,02 % концентрації. Кожен зразок інкубують при температурі 25 °С протягом визначеного періоду часу. Утворення розчинного агрегату відслідковують із застосуванням аналітичного гель-хроматографування за розміром молекул (SEC) з використанням 5 мкм колонки TSK3000SWXL з розмірами 30 см \times 0,78 см. Рухомою фазою є 50 мМ розчин фосфату натрію, рН7, 175 мМ розчин NaCl, при швидкості потоку 0,5 мл/хв. Зразки вводять у вигляді 1 мкл впорскувань, і контролюють при 280 нм для визначення збільшення відсотку високомолекулярного агрегату (Таблиця 3).

- Композиції з концентрацією антитіла 50 мг/мл інкубують протягом 1 тижня і 4 тижнів при температурі 25 °С для оцінки довгострокової стабільності в умовах стресу. Дельту % HMW агрегату визначають шляхом віднімання % HMW агрегату в момент часу нуль (в Таблиці 3 позначений як "Вихідний") від % HMW в момент часу 1 тиждень або момент часу 4 тижні. Після 1 тижня і 4 тижнів Антитіло 1 і Антитіло 2 демонструють значення дельта % HMW нижче 1 %, що свідчить про хорошу фізичну стабільність.

Таблиця 3 % високомолекулярного агрегату

Антитіло 1			
	Вихідний (4 °C)	50 мг/мл % HMW (t=1 тиждень)	50 мг/мл % HMW (t=4 тижні)
10 мМ розчин цитрату pH7, 150 мМ розчин NaCl	0,78 %		
25° C		1,24 %	1,41 %
Δ %HMW		0,46%	0,63%
10 мМ розчин цитрату pH7, 150 мМ розчин NaCl, 0,02% Tween-80	1,05%		
25° C		1,46 %	1,75 %
Δ %HMW		0,41%	0,7%

Антитіло 2			
	Вихідний (4 °C)	50 мг/мл % HMW (t=1 тиждень)	50 мг/мл % HMW (t=4 тижні)
10 мМ розчин цитрату pH7, 150 мМ розчин NaCl	0,37 %		
25° C		0,48 %	0,59 %
Δ %HMW		0,11%	0,22%
10 мМ розчин цитрату pH7, 150 мМ розчин NaCl, 0,02% Tween-80	0,42 %		
25° C		0,55 %	0,74 %
Δ %HMW		0,13%	0,32%

Картування епітопу для Антитіла 1

Для визначення характеристик епітопу для Антитіла 1 застосовують числені методи, у тому числі вестерн-блотинг, спільну кристалізацію антитіла з декількома ELR⁺ СХС-хемокінами і мутаційний аналіз зв'язування і нейтралізації.

Вестерн-блотинг

Для визначення того, чи є Антитіло 1 здатним зв'язувати лінійний або конформаційний епітоп, вестерн-блотинг виконують із застосуванням відновлювальних і невідновлювальних умов. Електрофорез білків здійснюють з використанням готових NuPAGE[®] 4-12 % Bis-Tris гелів. У обидві камери мінікувет, як у внутрішню (200 мл), так і у зовнішню (щонайменше 600 мл), додають- буфер для електрофореза NuPAGE[®] MES SDS. В буфері для зразків NuPAGE[®] LDS 4X виготовляють послідовно розведені розчини людського CXCL8 (400 нг, 100 нг або 25 нг на смугу) з або без відновника зразків NuPAGE[®] 10X. Зразки прогривають при температурі 95 °С протягом 2 хв. Об'єми навантаження становлять 10 мкл на смугу для зразків, і 5 мкл на смугу для попередньо забарвленого стандартного маркера SeeBlue Plus2. Процедуру розподілу на гелях здійснюють при 200 В протягом 35 хв при кімнатній температурі.

Білки переносять на PVDF із застосуванням системи електроблотингу білків iBlot[®] Dry Blotting System з нітроцелюлозною мембраною iBlot[®] Transfer Stack, Nitrocellulose, Mini. Вказану мембрану блокують у блокувальному розчині (3 % знежиреного молока в забуференому фосфатом фізіологічному розчині) протягом 1 год. при кімнатній температурі. До вказаного блокувального розчину додають Антитіло 1 до кінцевої концентрації 1 мкг/мл, після чого

інкубують протягом 2 год. при кімнатній температурі. Після первинної інкубації суміш антитіло/блокувальний розчин видаляють, і мембрану промивають 3 рази по 15 хв в промивному буфері (забуферений фосфатом фізіологічний розчин + 0,05 % Tween 20). Потім мембрану інкубують кон'югованим з пероксидазою хрому вторинним ослиачим специфічним IgG проти людського Fc антитілом (0,1 мкг/мл в блокувальному розчині) протягом 1 год. при кімнатній температурі. Після видалення вторинного антитіла, мембрану промивають 4 рази протягом 10 хв промивним буфером. Потім мембрану інкубують зі стабільним робочим розчином пероксиду, і розчином люмінолу/енхансера (хемілюмінесцентний субстрат Super Signal West Pico) протягом 5 хв. Мембрану розміщують в пластиковому захисному контейнері в касеті для рентгенівської плівки з плівкою CL-X Posure™ на 30 с. Плівку проявляють із застосуванням системи Konica SRX-101.

За невідновлювальних умов, при концентрації CXCL8 400 нг, дві зони з'являються при приблизно 17 кДа і приблизно 10 кДа. При концентрації CXCL8 100 нг, одна зона з'являється при приблизно 10 кДа. При концентрації CXCL8 25 нг, зони не з'являються. За відновлювальних умов, зони не з'являються при будь-якій з досліджуваних концентрацій.

Результати показують, що Антитіло 1 здатне зв'язувати невідновлений денатурований людський CXCL8, але нездатне зв'язувати відновлений денатурований людський CXCL8. Отже два дисульфідні зв'язки CXCL8 необхідні для утримання епітопу антитіла. Ці результати показують конформаційний епітоп для Антитіла 1.

Аналіз кристалічної структури

Кристалічні структури комплексів Fab-фрагмент/антиген для людського CXCL8 і CXCL2, CXCL3 і CXCL7 макак-крабодів встановлюють для визначення повної поверхні зв'язування Антитіла 1. Скорочений людський CXCL8 1-66 дикого типу, точкові мутанти людського CXCL8 і CXCL7 макак-крабодів експресують в E.coli з N-кінцевими мітками His-SUMO. Ці білки піддають рефолдингу; мітки відщеплюють; і білки очищають стандартними методами очищення. CXCL2 і CXCL3 макак-крабодів експресують в клітинах HEK293 EBNA, і очищають стандартними методами очищення. Утворення дисульфідних зв'язків підтверджується триптичним гідролізатом і мас-спектральним аналізом за методом "відбитків пальців", і активність підтверджується аналізом хемотаксису нейтрофілів. Fab-фрагмент Антитіла 1 експресують в клітинах HEK293 EBNA, і очищають стандартними методами очищення. Комплекси Fab-фрагмент/антиген створюють шляхом додавання невеликого молярного надлишку антигену до Fab-фрагмента з подальшим очищенням із застосуванням гел'є-хроматографії за розміром молекул для видалення надлишку вільного антигену. Комплекси кристалізують, і кристалічні структури визначають шляхом молекулярного заміщення з використанням Buster 2.9.5 (компанія Global Phasing Ltd.).

Ці кристалічні структури підтверджують, що епітоп для Антитіла 1 містить N-кінець ELR⁺ CXCL8-хемокінів, але вони також показують контакти між Fab-фрагментом і петлею β1-β2 та ланцюгами β2 і β3 ELR⁺ CXCL8-хемокінів. Згадані кристалічні структури також показують, що згадане антитіло специфічно розпізнає складку ELR⁺ CXCL8-хемокінів, оскільки кристалічні структури є такими, що можуть бути суміщені. Зареєстровані також численні водневі зв'язки і Ван-дер-Ваальсові взаємодії. Зокрема, збережений бічний ланцюг R6 мотиву ELR розташований у глибокій зв'язувальній "кишені", утвореній важким ланцюгом Fab на залишках W33, Y102 та Y110 і легким ланцюгом Fab на залишку W94. Скорочений людський хемокін CXCL8 також сполучається водневими зв'язками як з важким ланцюгом Fab на залишку E99, так і з легким ланцюгом Fab на карбонілі скелета N91. Інші водневі зв'язки зареєстровані між карбонілом скелета L5 скороченого людського хемокіну CXCL8 дикого типу і амідом скелета W94 легкого ланцюгу Fab; карбонілом скелета 110 скороченого людського хемокіну CXCL8 дикого типу і бічним ланцюгом S52 важкого ланцюгу Fab; бічним ланцюгом K11 скороченого людського хемокіну CXCL8 дикого типу і бічними ланцюгами T30 та S31 важкого ланцюгу Fab; бічним ланцюгом H33 скороченого людського хемокіну CXCL8 дикого типу і карбонілом скелета W94 легкого ланцюгу Fab; амідом скелета A35 і бічним ланцюгом N59 важкого ланцюгу Fab; і амідом скелета C50 скороченого людського хемокіну CXCL8 дикого типу і карбонілом скелета Y104 важкого ланцюгу Fab. Крім того, N-кінцеві залишки з 5 по 13 скороченого людського хемокіну CXCL8 дикого типу утворюють численні контакти з Fab-фрагментом при знаходженні N-кінця у заглибленні між CDR2 і CDR3 важкого ланцюга Fab. На додаток до цього, петля CDR3 важкого ланцюга Fab відходить вбік від цього заглиблення і взаємодіє з He-N-кінцевим залишком 140 на ланцюзі β2 і залишками Glu48, Leu49 і Cys50 на ланцюзі β3 скороченого людського хемокіну CXCL8 дикого типу. Нарешті, залишки 33-36 петлі β1-β2 скороченого людського хемокіну CXCL8 дикого типу пакуються проти CDR2 важкого ланцюгу Fab-фрагменту.

Мутаційний аналіз

В кристалічній структурі спостерігаються декілька ключових контактів між Fab-фрагментом Антитіла 1 і людським CXCL8 дикого типу, які досліджують шляхом вивчення кінетики зв'язування і нейтралізації точкових мутантів людського CXCL8 із застосуванням флуоресцентного візуалізаційного планшет-рідера (FLIPR) U937-huCXCR2. Для вивчення цих

5 ключових контактів одержали декілька точкових мутантів (R6A, I10A, A35P, I40A і L49A) на основі послідовності людського CXCL8 (послідовність SEQ ID NO: 27). Точкові мутанти людського CXCL8 дикого типу, R6A, I10A, A35P, I40A та L49A, експресують, піддають рефолдингу, і очищають за стандартними методами. Утворення дисульфідних зв'язків підтверджується триптичним гідролізатом і мас-спектральним аналізом за методом "відбитків пальців", та активність підтверджується дослідженням хемотаксису нейтрофілів.

Кінетику зв'язування досліджують на приладі Biacore 2000 з програмним забезпеченням Biacore 2000 Evaluation Software, версія 4.1, як описано вище. Людський CXCL8 дикого типу і людський мутований CXCL8 досліджують щодо біологічної активності і нейтралізації Антитілом 1 із застосуванням дослідження на U937-huCXCR2. U937-huCXCR2 являє собою клітинну лінію

10 моноцитів, трансдукованих ретровірусом для експресії людського CXCR2.

Мутанти CXCL8 послідовно розбавляють в буфері для дослідження, що містить 0,2 % BSA, в лунках 96-лункових поліпропіленових планшетів з v-подібним дном. Концентрації лігандів у 3 рази перевищують кінцеву концентрацію для дослідження (кінцеві концентрації для дослідження знаходяться в діапазоні від 300 нМ до 0,0051 нМ). Планшет з клітинами і планшет з лігандом

20 завантажують в флуоресцентний візуалізаційний планшет-рідер (FLIPR-3, компанія Molecular Devices), запрограмований на перенесення 50 мкл ліганда в лунки планшета з клітинами. Флуоресценція реєструється з інтервалом в 1 с протягом 90 с. Зміну флуоресценції [дельта відносних одиниць флуоресценції (DRFU), Max RFU-Min RFU] обчислюють по зображенням від 10 до 90. Накреслюють криву залежності "DRFU-log (концентрації ліганда)", і значення EC_{50}

25 обчислюють шляхом нелінійної регресії з використанням програмного продукту Graph Pad Prism. Дослідження виконують тричі на трьох аналітичних планшетах.

Антитіло 1 послідовно розбавляють в буфері для дослідження, що містить 0,2 % BSA. Концентрації антитіла у 3 рази перевищують кінцеву концентрацію для дослідження (кінцеві концентрації знаходяться в діапазоні від 10 мкг/мл до 0,0195 мкг/мл). Маточні розчини

30 людського CXCL8 дикого типу і мутантів CXCL8 одержують в буфері для дослідження + 0,2 % BSA при 240 нМ (30х кінцевих концентрацій для дослідження, де кінцева концентрація для дослідження дорівнює 8 нМ). 20 мкл ліганда змішують з 180 мкл Антитіла 1 в лунках 96-лункових поліпропіленових планшетів з v-подібним дном. Ліганд і антитіло інкубують при кімнатній температурі протягом 30 хв. Планшет з клітинами і планшет з лігандом-антитілом

35 завантажують в флуоресцентний візуалізаційний планшет-рідер (FLIPR-3, компанія Molecular Devices), запрограмований на перенесення 50 мкл ліганда-антитіла в лунки планшета з клітинами. Флуоресценція реєструється з інтервалом в 1 с протягом 90 с. Зміну флуоресценції (DRPU) обчислюють по зображенням від 10 до 90. Накреслюють криву залежності "DRFU-log (концентрації антитіла)", і значення IC_{50} обчислюють шляхом нелінійної регресії з

40 використанням програмного продукту Graph Pad Prism. Дослідження виконують тричі на трьох аналітичних планшетах.

Результати дослідження кінетики зв'язування, біологічної активності і нейтралізації підсумовані в Таблиці 4. Вимірювання здійснюють при температурі 25 °C. Швидкість асоціації (k_{on}) і швидкість дисоціації (k_{off}) для кожного ліганда оцінюють із застосуванням моделі

45 зв'язування "зв'язування 1:1 (масоперенос)". Спорідненість (K_D) обчислюють за кінетикою зв'язування за співвідношенням: $K_D = k_{off}/k_{on}$.

Декілька мутацій втратили активність до рецептора (EC_{50}), і тому не могли випробовуватись на нейтралізацію. Слід зазначити, що мутація A35P повністю усунула нейтралізуючу активність, незважаючи на незменшену активність до рецептора. Ці результати висувають на

50 перший план ключові контакти (R6, I10, A35, I40 і L49) в межах зв'язувальної поверхні антигену CXCL8, які є важливими для зв'язування антитіла.

Таблиця 4 Кінетика зв'язування, U937 FLIPR активність (EC₅₀) і U937 FLIPR нейтралізація (IC₅₀) людського CXCR8 дикого типу і мутантів.

Варіант	k _{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _{off} (s ⁻¹)	K _D (nM)	EC ₅₀ (мкг/мл)	IC ₅₀ (мкг/мл)
Дикого типу	3,03±3,78×10 ⁶	4,41±4,55×10 ⁻⁴	236±144	1,3±0,8 (n=4)	0,9
R6A	Зв'язування відсутнє			Активність відсутня	
I10A	2,77±0,39×10 ⁵	3,44±0,01×10 ⁻⁴	1260±184	Активність відсутня	
A35P	1,06±0,07×10 ⁶	4,97±1,72×10 ⁻³	4740±1920	1,9±0,3 (n=2)	Нейтралізація відсутня
I40A	1,61±0,21×10 ⁴	4,24±1,16×10 ⁻⁴	27100±10700	Активність відсутня	
L49A	1,43±0,24×10 ⁵	5,44±0,42×10 ⁻⁴	3830±354	5,6±1,3 (n=2)	1,5

Загалом, аналіз картування епітопів для Антитіла 1 показує, що поверхня зв'язування антигену містить N-кінець ELR⁺CXC-хемокінів (амінокислоти 5-13), петлю β1-β2 (амінокислоти 33-36), і ланцюги β2 і β3 (амінокислоти 40, 48-50). Ключові контакти в межах цієї поверхні, важливі для зв'язування антитіла, охоплюють амінокислоти R6, I10, A35, 140 та L49 CXCL8 (послідовність SEQ ID NO: 27).

Дослідження нейтралізації

In vitro нейтралізація людських ELR⁺CXC-хемокінів з використанням людських клітин HMEC, трансфектованих CXCR2

Оскільки всі ELR⁺ CXC-хемокіни можуть зв'язувати рецептор CXCR2, для in vitro досліджень були відібрані клітини, які експресують CXCR2. HMEC-huCXCR2 являє собою іморталізовану лінію людських ендотеліальних клітин, трансдукованих ретровірусом для експресії людського рецептора CXCR2. Клітини HMEC, які експресують людський CXCR2, здатні індукувати внутрішньоклітинний приплив Ca²⁺ у відповідь на ELR⁺CXC-хемокіни людини, макак-крабоїдів, пацюків і мишей. Внутрішньоклітинний приплив Ca²⁺ може бути виявлений із застосуванням флуоресцентного візуалізаційного планшет-рідера (FLIPR). Крім того нейтралізація хемокінів має також нейтралізувати внутрішньоклітинний приплив Ca²⁺, індукований цими хемокінами.

HMEC-huCXCR2 утримують в середовищі MCDB 31, доповненому 10 % зародкової бичачої сироватки, 2x GlutaMAX, їх замінили амінокислот, 1 мкг/мл гідрокортизону, 10 нг/мл фактора росту епідермісу людини і 0,4 мкг/мл пуроміцину при температурі 37 °C в 5 % CO₂. Культури утримують на рівні субконфлюентної густини (50-80 % злиття). Клітини збирають із застосуванням TrypLE Express, густину клітин доводять до 3 × 10⁵ клітин/мл в культуральному середовищі повного складу, і 100 мкл клітинної суспензії висівають в лунки чорних аналітичних планшетів з прозорим дном. Планшет з клітинами інкубують при кімнатній температурі протягом 30 хв, щоб дозволити клітинам осісти на дно лунок, перед тим, як планшети інкубують протягом ночі при температурі 37 °C в 5 % CO₂. Для кожного аналітичного планшета, вміст одного флакону засобу Fluo-4NW суспендують у 10 мл буфера для дослідження та 100 мкл пробенециду для одержання їх реагенту Fluo-4NW. Після інкубації культуральне середовище видаляють, і в кожен лунку аналітичного планшета додають 100 мкл розчину 1x Fluo-4NW. Планшети інкубують протягом 30 хв при температурі 37 °C, після чого інкубують ще 30 хв при кімнатній температурі, захищеними від світла. Антитіло 1 послідовно розбавляють в буфері для дослідження, що містить 0,2 % BSA. Концентрації антитіла у 3 рази перевищують кінцеву концентрацію для дослідження (кінцеві концентрації знаходяться в діапазоні від 10 мкг/мл до 0,195 мкг/мл). Маточні розчини лігандів одержують в буфері для дослідження + 0,2 % BSA при 300 нМ (30х кінцевих концентрацій для дослідження, де кінцева концентрація для дослідження дорівнює 10 нМ). 20 мкл ліганда змішують з 180 мкл антитіла в лунках 96-лункових поліпропіленових планшетів з v-подібним дном.

Ліганд і антитіло інкубують при кімнатній температурі протягом 30 хв. Планшет з клітинами і планшет з лігандом-антитілом завантажують в флуоресцентний візуалізаційний планшет-рідер (FLIPR-3, компанія Molecular Devices), запрограмований на перенесення 50мкл ліганда-антитіла в лунки планшета з клітинами. Флуоресценція реєструється кожної секунди протягом 90 с Зміну флуоресценції (DRFU) обчислюють по зображенням від 10 до 90. Накреслюють криву залежності "DRFU-log (концентрації антитіла)", і значення IC₅₀ обчислюють шляхом нелінійної

регресії з використанням програмного продукту Graph Pad Prism. Дослідження виконують тричі на трьох аналітичних планшетах. Дані виражають як середнє повторів.

- Результати підсумовані в Таблиці 5. Ці результати показують, що Антитіло 1 здатне нейтралізувати всі сім людських ELR⁺CXC-хемокінів. Значення IC₅₀ виражені в мкг/мл антитіла (середні квадратичні відхилення наведені в дужках). Були використані як 72-амінокислотна, так і 77-амінокислотна форми CXCL8. Дані являють собою середнє 2-5 повторів.

Таблиця 5 *In vitro* FLIPR дослідження з використанням клітин HMEC, що експресують людський CXCR2

	IC ₅₀ (мкг/мл)
CXCL1	0,867 (±0,153)
CXCL2	1,281 (±0,449)
CXCL3	0,731 (±0,187)
CXCL5	0,681 (±0,347)
CXCL6	1,122 (±0,523)
CXCL7	1,068 (±0,324)
CXCL8 (72)	0,951 (±0,416)
CXCL8 (77)	0,358 (±0,078)

- 10 *In vitro* нейтралізація людського CXCL8 або CXCL1-індукованого хемотаксису з використанням первинних людських нейтрофілів

- Хемотаксичний аналіз з використанням нейтрофілів людини був обраний для визначення нейтралізувальної активності Антитіла 1 в клітинах, природно експресуючих як CXCR1, так і CXCR2. Периферичну кров від здорових волонтерів відбирають в дві 10 мл пробірки з гепарином натрію. Для ізоляції нейтрофілів, 5 мл крові нашаровують на 5 мл Polymorphprep в чотирьох 15 мл пробірках. Пробірки центрифугують протягом 30 хв при 470× g і 18 °C. Плазму і верхній шар клітин (мононуклеари) видаляють і викидають. Другий шар (нейтрофіли) об'єднують з 4 пробірок, і додають такий самий об'єм PBS. Пробірку центрифугують протягом 10 хв при 400× g і 18 °C. Осад промивають 12 мл PBS, центрифугують так само як перед цим, і осад ресуспендують в 11 мл суміші HBSS (збалансований сольовий розчин Хенкса)/BSA (бичачий сироватковий альбумін) (7,5 мг/мл BSA, HBSS). 60 × 10⁶ клітин суспендують у 12 мл HBSS/BSA та 5 мкМ CMFDA (5-хлорметилфлуоресцеїн діацетат), і інкубують протягом 30 хв при 37 °C. Після інкубації пробірку центрифугують для осадження клітин, промивають один раз 12 мл HBSS/BSA, і потім клітини ресуспендують в 12 мл HBSS/BSA (5 × 10⁶ клітин/мл).

- 25 Антитіло 1 і ізотиповий контроль (людське IgG4-антитіло) розбавляють до 1495 нМ із застосуванням HBSS/BSA (Розбавлений розчин), після чого послідовно розводять 1:5 із застосуванням HBSS/BSA. CXCL8 розбавляють до 20 нМ із застосуванням HBSS/BSA. CXCL1 розбавляють до 10,1 нМ із застосуванням HBSS/BSA.

- 30 70 мкл Антитіла 1 або HBSS/BSA змішують з 70 мкл розчину CXCL8 або CXCL1, і інкубують при кімнатній температурі протягом ~30хв. 30 мкл суміші розподіляють в лунки нижньої камери планшету ChemoTx з потроєнням. Лунки, що містять тільки HBSS/BSA (без хемокіну або антитіла) покажуть фоновий сигнал. Фільтр ChemoTx розміщують над нижньою камерою, і 50 мкл (250000 клітин) розподіляють по кожній лунці. Планшет ChemoTx інкубують протягом 3 год. при 37 °C, 5 % CO₂. Після інкубації клітини змивають PBS з верхньої поверхні, і фільтр ChemoTx видаляють. Флуоресценцію зчитують (лічильник Wallac Victor³ 1420) при 485/535 нм, використовуючи тільки нижній детектор. Середнє значення флуоресценції фонових лунок (тільки HBSS/BSA) віднімають від флуоресценції досліджуваних лунок, і із застосуванням Excel обчислюють середнє і середню квадратичну помилку.

- 40 При концентрації CXCL8 5 нМ, IC₅₀ для Антитіла 1 (молекулярна маса 150000 кДа) становить 26,4 (±0,236) нМ. При концентрації CXCL8 10 нМ, IC₅₀ для Антитіла 1 становить 43,7 (±0,086) нМ. При концентрації CXCL1 5 нМ, IC₅₀ для Антитіла 1 становить 18,5 (±0,158) нМ. При концентрації CXCL1 20 нМ, IC₅₀ для Антитіла 1 становить 40,3 (±0,112) нМ. При всіх перевірених концентраціях CXCL1 і CXCL8 ізотипове контрольне антитіло не впливає на хемотаксис. Ці дані показують, що Антитіло 1 може блокувати хемотаксичну активність людських CXCL8 або CXCL1

дозозалежним чином, у той час як ізотипове контрольне антитіло впливу на хемотаксичну активність не чинить.

In vivo DSS модель гострого коліту у мишей

Декстран сульфат натрію (DSS) є найбільш широко застосовуваною моделлю неспецифічного виразкового коліту (UC). У цій моделі DSS є хімічним подразником, який додають до питної води, щоб спричинити гостре захворювання, яке нагадує UC. Гостра фаза DSS коліту характеризується рекрутингом нейтрофілів до слизової оболонки та підслизової основи і підвищеною експресією ELR⁺CXC-хемокінів. Разом з тим, хронічний вплив DSS викликає тяжке пошкодження травного каналу і значну втрату ваги, що є неприйнятним у моделі коліту. Для адаптування різкого характеру цієї моделі, Антитіло 1 було використане як запобіжний засіб для перевірки його здатності до пригнічування рекрутингу нейтрофілів і розвитку коліту. В цій моделі слід звернути увагу на значне зростання рівня мишачого білка CXCL5 (LIX) в тканині ободової кишки (Kwon 2005); однак, Антитіло 1 не нейтралізує цей мишачий хемокін.

Одержують мишей лінії C57BL/6 віком 8-10 тижнів, масою 18-22 г. Кров відбирають шляхом серцевої пункції, і аналізують для встановлення базового рівня. Для спричинювання коліту миші одержують 2,5 % DSS (молекулярна маса=36000-50000) з питною водою протягом 5 діб (добі 1-5) з подальшими 6 днями без DSS у воді (які відповідають гострому запаленню). Контрольні здорові миші одержують лише воду (група "без DSS"). Мишам, які одержують DSS, на 0, 2, 4 і 8 добу шляхом підшкірної ін'єкції вводять контрольне людське IgG₄-антитіло (25 мг/кг) або Антитіло 1 (25 мг/кг). Масу тіла реєструють щодня. Кількість мишей, використовуваних для кожної обробки, дорівнює 9 (за винятком 5 здорових мишей, що використовуються в групі здорових мишей "без DSS"). Дослідження виконують чотири рази.

Як показано в Таблиці 6, DSS миші, які одержували контрольне людське IgG₄-антитіло, різко худнуть між 5 добою і 8 добою. У DSS мишей, які одержували Антитіло 1 до спричинювання коліту та під час гострої фази захворювання, спостерігається менша втрата маси між 5 добою і 8 добою, аніж у DSS мишей, які одержували контрольне людське IgG₄-антитіло (94,0 % початкової маси тіла для Антитіла 1 проти 85,3 % початкової маси тіла для контрольного IgG₄ на 8 добу). Ці результати показують, що системне введення Антитіла 1 ефективно зменшує втрату маси у разі DSS-індукованого коліту, що підтверджує висновок про те, що Антитіло 1 нейтралізує активність певних мишачих ELR⁺CXC-хемокінів, і знижує рекрутинг нейтрофілів в ободову кишку.

Таблиця 6

День	% вихідної маси тіла		
	Без DSS	IgG4	Антитіло 1
1	104,4	99,9	100,0
2	103,9	99,8	102,9
3	103,0	100,3	101,4
4	101,0	99,5	100,9
5	101,2	97,5	96,9
8	102,2	85,3	94,0
9	99,8	89,6	93,5
10	100,7	93,7	93,6
11	101,3	98,2	97,0

In vivo нейтралізація в 786-О світлоклітинній нирково-клітинній ксенотрансплантатній моделі

Клітини лінії 786-О нирково-клітинної карциноми (RCC) змішують 1:1 з матрігелем, і підшкірно імплантують в праву задню бічну частину "голих" мишей-самиць з розрахунку $3,0 \times 10^6$ клітин на ін'єкцію. Мишам з ксенотрансплантатом 786-О, об'єм пухлин у яких досягає 100 мм³, перорально через шлунковий зонд двічі на добу вводять 10 мг/кг сунітинібу за безперервною схемою приймання лікарського засобу, доки у мишей не розпочинається прогресування росту пухлин, подібне до контрольних мишей (IgG₄ і 10 % носія), навіть у разі обробки сунітинібом. Мишей з розвитком росту пухлин при лікуванні сунітинібом довільно розподіляють на 2 групи. Одна група одержує сунітиніб в дозі 10 мг/кг два рази на добу плюс контрольне IgG₄-антитіло в дозі 20 мг/кг один раз на тиждень. Інша група одержує сунітиніб в дозі 10 мг/кг два рази на добу плюс Антитіло 1 в дозі 20 мг/кг один раз на тиждень. В Таблиці 7

наведені середні об'єми пухлин (середня квадратична помилка в дужках). Додання Антитіла 1 до лікування сунітинібом значно знижує ріст пухлин з перебігом часу ($p < 0,0001$), вказуючи на те, що Антитіло 1 ресенсибілізує новоутворення світлоклітинної нирково-клітинної карциноми до лікування сунітинібом.

5

Таблиця 7

Доба	Середній об'єм пухлини (мм ³)		
	IgG4 і 10% носія	IgG4 і сунітиніб	Антитіло 1 і сунітиніб
11	82,84 (±18,52)	73,21 (±8,91)	72,54 (±40,89)
17	112,12 (±25,06)	95,34 (±11,6)	95,99 (±54,11)
24	148,41 (±33,17)	124,86 (±15,19)	138,32 (±77,97)
27	180,24 (±40,29)	138,08 (±16,8)	152,87 (±86,18)
34	205,22 (±45,87)	183,2 (±22,29)	181,08 (±102,08)
38	221,66 (±49,55)	207,46 (±25,25)	211,1 (±119)

Доба	Середній об'єм пухлини (мм ³)		
	IgG4 і 10% носія	IgG4 і сунітиніб	Антитіло 1 і сунітиніб
41	255,46 (±57,1)	210,04 (±25,56)	222,01 (±125,15)
46	267,75 (±59,85)	267,53 (±32,55)	248,74 (±140,22)
48	292,17 (±65,31)	268,24 (±32,64)	276,78 (±156,03)
52	325,13 (±72,68)	301,1 (±36,64)	286,57 (±161,55)
55	331,39 (±74,37)	328,55 (±39,98)	262,9 (±148,21)
59	373,91 (±84,32)	371,36 (±45,19)	304,06 (±171,41)
62	413,09 (±93,47)	387,79 (±47,19)	313,16 (±176,54)
66	479,4 (±108,92)	417,33 (±50,78)	285,85 (±161,14)
69	537,74 (±122,53)	494,68 (±60,19)	276,64 (±155,95)
73	520,11 (±118,92)	527,88 (±64,23)	244,07 (±137,59)
76	532,57 (±122,53)	595,93 (±72,52)	228,91 (±129,04)
81	597,7 (±137,49)	601,51 (±73,19)	196,06 (±110,52)
84	720,91 (±166,16)	652,01 (±79,34)	193,08 (±108,84)
87	713,64 (±164,79)	663,62 (±80,75)	181,85 (±102,51)
90	785,88 (±181,79)	775,05 (±94,31)	175,88 (±99,15)
94	891,11 (±206,57)	836,89 (±101,84)	192,57 (±108,56)
97	1073,86 (±249,3)	1010,26 (±122,93)	210,16 (±118,47)

10 In vivo нейтралізація в ксенотрансплантатній моделі з використанням лінії клітин SKOV3-Luc раку яєчників

SKOV3-Luc являє собою лінію клітин раку яєчників людини, яка експресує ген люцифери світлячків. Клітини лінії SKOV3-Luc часто використовують in vivo для спричинення росту пухлин аденокарциноми яєчників людини.

15 Клітини лінії SKOV3-Luc раку яєчників змішують 1:1 з матрігелем, і імплантують підшкірно в праву задню бічну частину "голих" мишей-самиць з розрахунку $3,0 \times 10^6$ клітин на ін'єкцію. Мишей довільно розподіляють на 4 групи базового рівня відповідно до об'єму пухлин після росту ксенотрансплантатів до середнього об'єму пухлини 200 мм³. Миші одержують або контрольне IgG₄-антитіло (2,5 мг/кг один раз на тиждень), або цисплатин (2,5 мг/кг один раз на тиждень), або Антитіло 1 (20 мг/кг один раз на тиждень), або комбінацію цисплатину (2,5 мг/кг один раз на тиждень) і Антитіла 1 (20 мг/кг один раз на тиждень) шляхом внутрішньочеревинної ін'єкції. Зростання пухлин показане в Таблиці 8. Монотерапія цисплатином не показує статистично значущого пригнічування росту пухлин в порівнянні з ізотиповим контролем. Однак комбінація цисплатину і Антитіла 1 показує статистично значуще пригнічування росту пухлин (p<0,001) порівняно з ізотиповим контролем і монотерапією цисплатином, вказуючи на те, що Антитіло 1 синергічно підсилює хімотерапію в ксенотрансплантатній моделі раку яєчників з використанням лінії клітин SKOV3-Luc.

20

25

Таблиця 8

Доба	Середній об'єм пухлини (мм ³)			
	IgG4	Цисплатин	Антитіло 1	Антитіло 1 і цисплатин
14	128,45 (±7,25)	122,65 (±12,2)	109,35 (±12,7)	127,17 (±26,72)
19	182,92 (±10,33)	190,65 (±18,97)	173,95 (±20,2)	167,94 (±35,29)
22	269,83 (±15,23)	289,15 (±28,77)	234,58 (±27,25)	218,81 (±45,98)
26	507,66 (±28,66)	484,72 (±48,23)	364,42 (±42,33)	349,81 (±73,51)
32	904,66 (±51,07)	806,31 (±80,23)	739,26 (±85,86)	530,63 (±111,5)
35	1052,88 (±59,44)	923,02 (±91,85)	821,83 (±95,45)	579,7 (±121,81)
40	1143,39 (±64,55)	941,42 (±93,68)	1026,68 (±119,25)	585,37 (±123)
43	1382,03 (±78,03)	1047,34 (±104,22)	1098,72 (±127,61)	626,99 (±131,75)

Послідовності

Антитіло 1 Амінокислотна послідовність важкого ланцюга: послідовність SEQ ID NO: 1

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYEFTSYWIHWVRQAPGQGLEWMGNISPNSGS
 ANYNEKFKSRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDAVYYCAREGPYSYPSREYYGSDL
 WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
 VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPC
 PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAK
 TKPREEQFNSTYRVSVLTVHLQDNLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ
 VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY
 SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLG

Антитіло 1 Варіабельна ділянка важкого ланцюга: послідовність SEQ ID NO: 2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYEFTSYWIHWVRQAPGQGLEWMGNISPNSGS
 ANYNEKFKSRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDAVYYCAREGPYSYPSREYYGSDL
 WGQGTLLTVSS

Антитіло 1 Амінокислотна послідовність легкого ланцюга: послідовність SEQ ID NO: 3

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQISNNLHWYQQKPGQAPRLIYYTSSRSVSGIPARF
 SGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCGQNNNEWPEVFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
 QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLS
 KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Антитіло 1 Варіабельна ділянка легкого ланцюга: послідовність SEQ ID NO: 4

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQISNNLHWYQQKPGQAPRLIYYTSSRSVSGIPARF
 SGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCGQNNNEWPEVFGGGTKVEIK

Антитіло 1 Послідовність ДНК важкого ланцюга: послідовність SEQ ID NO: 5

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGTCTGAAGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAA
 GGTGTCCTGCAAGGCATCTGGCTACGAGTTCACCAGCTACTGGATTCACTGGGTGCG
 ACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAATATTTCTCCTAATAGTGGTA
 GTGCTAACTACAATGAGAAGTTCAAGAGCAGAGTCACCATGACCAGGGACACGTCC
 ACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA
 TTAAGTGTGCGAGAGAGGGCCCTTACAGTTATTATCCGAGTAGGGAGTACTATGGCTC
 TGACCTCTGGGGGCAAGGGACCCTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCC
 ATCGGTCTTCCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCT
 GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAATCAG

GCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT
 ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTAC
 ACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTC
 CAAATATGGTCCCCCATGCCACCCCTGCCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATC
 AGTCTTCTGTTCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA
 GGTCACGTGCGTGGTGGTGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACT
 GGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA
 GTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCT
 GAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCG
 AGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTG
 CCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAA
 AGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGCAATGGGCAGCCGGAGA
 ACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACA
 GCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCC
 GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTG
 GGT

Антитіло 1 Послідовність ДНК легкого ланцюга: послідовність SEQ ID NO: 6

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCC
 ACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAAAGTATCAGCAATAACCTACACTGGTACCAACA
 GAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATTATACTTCCCGGTCCGTCTCTGG
 CATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAG
 CAGCCTAGAGCCTGAAGATTTGCAGTTTATTACTGTGGACAGAATAACGAGTGGCC
 TGAGGTGTTGCGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCAT
 CTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGT
 GTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATA
 ACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGAC
 AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACA
 CAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA
 GCTTCAACAGGGGAGAGTGC

LCDR1 Антитіла 1/Антитіла 2: послідовність SEQ ID NO: 7

RASQSISSNNLH

LCDR2 Антитіла 1/Антитіла 2: послідовність SEQ ID NO: 8

YTSRSVS

LCDR3 Антитіла 1/Антитіла 2: послідовність SEQ ID NO: 9

GQNNEWPEV

HCDR1 Антитіла 1/Антитіла 2: послідовність SEQ ID NO: 10

GYEFTSYWIH

HCDR2 Антитіла 1/Антитіла 2: послідовність SEQ ID NO: 11

NISPNSGSANYNEKFKS

HCDR3 Антитіла 1: послідовність SEQ ID NO: 12

EGPYSYPSREYYGSDL

Антитіло 2 Амінокислотна послідовність важкого ланцюга: послідовність SEQ ID NO: 13

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYEFTSYWIHWVRQAPGQGLEWMGNISPNSGS
ANYNEKFKSRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAREGPYSYPSRQYYGSDL
WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPC
PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY
SRLTVDKSRWQEGNPFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGL

Антитіло 2 Варіабельна ділянка важкого ланцюга: послідовність SEQ ID NO: 14

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYEFTSYWIHWVRQAPGQGLEWMGNISPNSGS
ANYNEKFKSRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAREGPYSYPSRQYYGSDL
WGQGTLLTVSS

Антитіло 2 Амінокислотна послідовність легкого ланцюга: послідовність SEQ ID NO: 15

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSSINLHWYQQKPGQAPRLLIYYTSRSVSGIPARF
SGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCGQNNEWPEVFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLS
KADYEEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

Антитіло 2 Варіабельна ділянка легкого ланцюга: послідовність SEQ ID NO: 16

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSSINLHWYQQKPGQAPRLLIYYTSRSVSGIPARF
SGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCGQNNEWPEVFGGGTKVEIK

Антитіло 2 Послідовність ДНК важкого ланцюга: послідовність SEQ ID NO: 17

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGTGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAA
GGTGTCTGCAAGGCATCTGGCTACGAGTTCACCAGCTACTGGATTCACTGGGTGCG
ACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAATATTTCTCCTAATAGTGGA

GTGCTAACTACAATGAGAAGTTCAAGAGCAGAGTCACCATGACCAGGGACACGTCC
 ACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA
 TTA CTGTGCGAGAGAGGGCCCTTACAGTTATTATCCGAGTAGGCAGTACTATGGCTC
 TGACCTCTGGGGGCAAGGGACCCTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCC
 ATCGGTCTTCCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCT
 GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAG
 GCGCCCTGACCAGCGGCTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT
 ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTAC
 ACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTC
 CAAATATGGTCCCCCATGCCACCCTGCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATC
 AGTCTTCCTGTTCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA
 GGTACCGTGCCTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACT
 GGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA
 GTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCT
 GAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCG
 AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTG
 CCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAA
 AGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGCAATGGGCAGCCGGAGA
 ACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACA
 GCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCC
 GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTG
 GGT

Антитіло 2 Послідовність ДНК легкого ланцюга: послідовність SEQ ID NO: 18

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCC
 ACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAAAGTATCAGCAATAACCTACACTGGTACCAACA
 GAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATTATACTTCCCGGTCCGTCTCTGG
 CATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAG
 CAGCCTAGAGCCTGAAGATTTGCAGTTTATTACTGTGGACAGAATAACGAGTGGCC
 TGAGGTGTTCTGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCAT
 CTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGT
 GTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATA
 ACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGAC
 AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACA
 CAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA

GCTTCAACAGGGGAGAGTGC

HCDR3 Антитіла 2: послідовність SEQ ID NO: 19

EGPYSYYPSPRQYYGSDL

Консенсусна послідовність HCDR3: послідовність SEQ ID NO: 20

EGPYSYYPSPRXaaYYGSDL, де Хаа являє собою Е або Q

Людський Gro-альфа (CXCL1): послідовність SEQ ID NO: 21

ASVATELRCQCLQTLQGIHPKNIQSVNVKSPGPHCAQTEVIATLKNGRKACLNPAPIVK
KPIEKMLNSDKSN

Людський Gro-бета (CXCL2): послідовність SEQ ID NO: 22

APLATELRCQCLQTLQGIHLKNIQSVKVKSPGPHCAQTEVIATLKNGQKACLNPAAPMV
KKPIEKMLKNGKSN

Людський Gro-гамма (CXCL3): послідовність SEQ ID NO: 23

ASVVTELRCQCLQTLQGIHLKNIQSVNVRSPGPHCAQTEVIATLKNGKKACLNPAAPMV
QKPIEKILNKGSTN

Людський ENA-78 (CXCL5): послідовність SEQ ID NO: 24

AAVLRELRCVCLQTTQGVHPKMISNLQVFAIGPQCSKVEVVASLKNGKEICLDPEAPFLK
KVIQKILDGGNKEN

Людський GCP-2 (CXCL6): послідовність SEQ ID NO: 25

VSAVLTELRCCLRVTLRVNPKTIGKLQVFPAGPQCSKVEVVASLKNGKQVCLDPEAPF
LKKVIQKILDGSGNKKN

Людський NAP-2 (CXCL7): послідовність SEQ ID NO: 26

AELRCMCIKTTSGIHPKNIQSLEVIGKGTHCNQVEVIATLKDGRKICLDPAPRIKKIVQK
KLAGDESAD

Людський IL-8 (CXCL8): послідовність SEQ ID NO: 27

SAKELRCQCIKTYSKPFHPKFIKELRVIESGPHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKENWVQVR
VEKFLKRAENS

ЛІСТИНГ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Елі Ліллі енд Компані

<120> АНТИТІЛА ПРОТИ ПІДГРУПИ ELR⁺ CXС-ХЕМОКІНІВ

<130> X19897

<150> 61/792800

<151> 2013-03-15

<150> PCT/US2014/020605

<151> 2014-03-05

<160> 27

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 452

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<400> 1

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 Glu Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Asn Ile Ser Pro Asn Ser Gly Ser Ala Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val 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 Arg Glu Gly Pro Tyr Ser Tyr Tyr Pro Ser Arg Glu Tyr Tyr Gly
 100 105 110

Ser Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr
 130 135 140

Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr
 195 200 205

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

<210> 2
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетична генно-інженерна конструкція
 <400> 2

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 Glu Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Asn Ile Ser Pro Asn Ser Gly Ser Ala Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val 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 Arg Glu Gly Pro Tyr Ser Tyr Tyr Pro Ser Arg Glu Tyr Tyr Gly
 100 105 110
 Ser Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 <210> 3
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетична генно-інженерна конструкція
 <400> 3
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn
 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Ser Val Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Asn Asn Glu Trp Pro Glu
 85 90 95
 Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 4
<211> 107
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція
<400> 4

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 5
<211> 1356
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція
<400> 5

cagggtgcagc tgggtgcagtc tgggtgctgaa gtgaagaagc ctggggcctc agtgaagggtg 60
tcctgcaagg catctggcta cgagttcacc agctactgga ttactctgggt ggcacaggcc 120
cctggacaag ggccttgagt gatgggaaat attctccta atagtggtag tgctaactac 180
aatgagaagt tcaagagcag agtcaccatg accagggaca cgtccacgag cacagtctac 240


```

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagagggc 300
ccttacagtt attatccgag tagggagtag tatggctctg acctctgggg gcaaggggacc 360
ctagtcacag tctcctcagc ctccaccaag ggcccatcgg tcttcccgtc agcgccctgc 420
tccaggagca cctccgagag cacagccgcc ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc 480
gaaccgggtga cgggtgctgt gaactcaggc gccctgacca gggcgctgca cacttcccc 540
gctgtcctac agtcctcagg actctactcc ctcaagcagc tggtagccgt gccctccagc 600
agcttgggca cgaagacctc cactgcaac gtagatcaca agcccagcaa caccaggtg 660
gacaagagag ttgagtccaa atatgggtccc ccatgccac cctgcccagc acctgagttc 720
ctggggggac catcagttct cctgttcccc ccaaaaccca aggacactct catgatctcc 780
cggaccccctg aggtcacgtg cgtgggtggt gacgtgagcc aggaagaccc cgaggtccag 840
ttcaactggt acgtggatgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc ggggagag 900
cagttcaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtctccaccg tctgaccaca ggactgggtg 960
aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaaggcc tcccgtctc catcgagaaa 1020
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gagccacagg tgtacacct gcccccatcc 1080
caggagagaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaaagg cttctacccc 1140
agcgacatcg ccgtggagtg gaaagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccaag 1200
cctcccgtgc tggactccga cggtccttc ttcctctaca gcaggctaac cgtggacaag 1260
agcaggtggc aggaggggaa tgtcttctca tgtccgtga tgcagaggc tctgcacaa 1320
cactacacac agaagagcct ctccctgtct ctgggt 1356

```

```

<210> 6
<211> 642
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція
<400> 6

```

```

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctctctgca gggccagtc aagtatcagc aataacctac actgggtacca acagaaacct 120
ggccagggtc ccaggctcct catctattat acttcccgtt cgtctctctg catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtggttc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtggacag aataacgagt ggcctgaggt gttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccggca 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgc tctgtttgt gctgtctgaa taacttctat 420
ccagagagag ccaaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca sagagcagga sagcaaggac agcacctaca gctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaaag sagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtca ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gc 642

```

```

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція
<400> 7
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn Leu His
1 5 10

```

```

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція
<400> 8
Tyr Thr Ser Arg Ser Val Ser
1 5

```

```

<210> 9
<211> 9
<212> PRT

```

```

<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція
<400> 9
Gly Gln Asn Asn Glu Trp Pro Glu Val
1 5

<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція
<400> 10
Gly Tyr Glu Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His
1 5 10

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція
<400> 11
Asn Ile Ser Pro Asn Ser Gly Ser Ala Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 12
<211> 17
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція
<400> 12
Glu Gly Pro Tyr Ser Tyr Tyr Pro Ser Arg Glu Tyr Tyr Gly Ser Asp
1 5 10 15

Leu

<210> 13
<211> 452
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція
<400> 13
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 Glu Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

```

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

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Gly
450

<210> 14
<211> 126
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція
<400> 14

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 Glu Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Asn Ile Ser Pro Asn Ser Gly Ser Ala Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val 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 Arg Glu Gly Pro Tyr Ser Tyr Tyr Pro Ser Arg Gln Tyr Tyr Gly
100 105 110

Ser Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

```

<210> 15
<211> 214
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція
<400> 15
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

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

Val Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 16
<211> 107
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція
<400> 16

```

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

<210> 17
 <211> 1356
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетична генно-інженерна конструкція
 <400> 17

```

caggtgcagc tgggtgcagtc tgggtgctgaa gtgaagaagc ctgggggcctc agtgaaggtg      60
tcctgcaagg catctggcta cgagttcacc agctactgga ttacttggtg gcgacaggcc      120
ctgggacaag ggcttgagtg gatgggaat atttctocta atagtggtag tgctaactac      180
aatgagaagt tcaagagcag agtcacacat accaggggaca cgtccacgag cacagtctac      240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagagggc      300
ccttacagtt attatccgag taggcagtac tatggtcttg acctctgggg gcaagggaacc      360
ctagtacacg tctctcagc ctccaccaag ggcccatcgg tcttcccgtc agcgcctcgc      420
tcacaggaga cctccgagag cacagccgcc ctgggctgcc tgggcaagga ctacttcccc      480
gaaccggtga cgggtgctgt gaactcagcg gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc      540
gctgtcctac agtcctcagg actctactcc ctacagcagc tggtgaccgt gccctccagc      600
agcttgggca cgaagaccta cacctgcaac gtagatcaca agcccagcaa caccaagggtg      660
gacaagagag ttgagtccaa atatggtccc ccatgccacc cctgccagc acctgagttc      720
ctggggggac catcagttct cctgttcccc ccaaaaccca aggaactct catgatctcc      780
oggacccttg aggtcacgtg cgtggtggtg gacgtgagcc aggaagacc cagaggtccag      840
ttcaactggt acgtggatgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag      900
cagttcaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtctcaccg tcctgcacca ggactggctg      960
aacggcaagg agtacaaagt caaggtctcc aacaaaggcc tcccgtcttc catcgagaaa     1020
accatctcca aagccaaagg gcagcccccga gagccacagg ggtacacct gccccatcc     1080
caggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggcaagg cttctacccc     1140
agcgacatcg ccgtggagtg gaaaagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg     1200
cctcccgtgc tggactccga cggtccttc ttctctaca gcaggctaac cgtggacaag     1260
agcaggtggc aggaggggaa tgtcttctca tgctccgtga tgcattgagg tctgcacaac     1320
cactacacac agaagagcct ctcctgtctc ctgggt                                     1356

```

<210> 18
 <211> 642
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетична генно-інженерна конструкція
 <400> 18

```

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcctgca gggccagtc aagtatcagc aataacctac actggtagca acagaaacct     120

```

```

ggccaggctc ccaggctcct catctattat acttcccggg ccgtctctgg catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtggggtc tgggacagac ttcaactctca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtggacag aataacgagt ggcctgaggt gttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa acgaactgtg gctgcacccat ctgtcttcat cttcccgcga 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gctgtgtgaa taacttttat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gc 642

```

```

<210> 19
<211> 17
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція
<400> 19
Glu Gly Pro Tyr Ser Tyr Tyr Pro Ser Arg Gln Tyr Tyr Gly Ser Asp
1 5 10 15

```

Leu

```

<210> 20
<211> 17
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> Хаа у положенні 11 являє собою Glu або Gln
<400> 20
Glu Gly Pro Tyr Ser Tyr Tyr Pro Ser Arg Xaa Tyr Tyr Gly Ser Asp
1 5 10 15

```

Leu

```

<210> 21
<211> 73
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 21
Ala Ser Val Ala Thr Glu Leu Arg Cys Gln Cys Leu Gln Thr Leu Gln
1 5 10 15

Gly Ile His Pro Lys Asn Ile Gln Ser Val Asn Val Lys Ser Pro Gly
20 25 30

Pro His Cys Ala Gln Thr Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asn Gly Arg
35 40 45

Lys Ala Cys Leu Asn Pro Ala Ser Pro Ile Val Lys Lys Ile Ile Glu
50 55 60

```

Lys Met Leu Asn Ser Asp Lys Ser Asn
65 70

<210> 22
<211> 73
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 22

Ala Pro Leu Ala Thr Glu Leu Arg Cys Gln Cys Leu Gln Thr Leu Gln
1 5 10 15

Gly Ile His Leu Lys Asn Ile Gln Ser Val Lys Val Lys Ser Pro Gly
20 25 30

Pro His Cys Ala Gln Thr Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asn Gly Gln
35 40 45

Lys Ala Cys Leu Asn Pro Ala Ser Pro Met Val Lys Lys Ile Ile Glu
50 55 60

Lys Met Leu Lys Asn Gly Lys Ser Asn
65 70

<210> 23
<211> 73
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 23

Ala Ser Val Val Thr Glu Leu Arg Cys Gln Cys Leu Gln Thr Leu Gln
1 5 10 15

Gly Ile His Leu Lys Asn Ile Gln Ser Val Asn Val Arg Ser Pro Gly
20 25 30

Pro His Cys Ala Gln Thr Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asn Gly Lys
35 40 45

Lys Ala Cys Leu Asn Pro Ala Ser Pro Met Val Gln Lys Ile Ile Glu
50 55 60

Lys Ile Leu Asn Lys Gly Ser Thr Asn
65 70

<210> 24
<211> 74
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 24

Ala Ala Val Leu Arg Glu Leu Arg Cys Val Cys Leu Gln Thr Thr Gln
1 5 10 15

Gly Val His Pro Lys Met Ile Ser Asn Leu Gln Val Phe Ala Ile Gly
20 25 30

Pro Gln Cys Ser Lys Val Glu Val Val Ala Ser Leu Lys Asn Gly Lys
35 40 45


```

Glu Ile Cys Leu Asp Pro Glu Ala Pro Phe Leu Lys Lys Val Ile Gln
 50          55          60

Lys Ile Leu Asp Gly Gly Asn Lys Glu Asn
65          70

<210> 25
<211> 75
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 25
Val Ser Ala Val Leu Thr Glu Leu Arg Cys Thr Cys Leu Arg Val Thr
 1          5          10          15

Leu Arg Val Asn Pro Lys Thr Ile Gly Lys Leu Gln Val Phe Pro Ala
          20          25          30

Gly Pro Gln Cys Ser Lys Val Glu Val Val Ala Ser Leu Lys Asn Gly
          35          40          45

Lys Gln Val Cys Leu Asp Pro Glu Ala Pro Phe Leu Lys Lys Val Ile
 50          55          60

Gln Lys Ile Leu Asp Ser Gly Asn Lys Lys Asn
65          70          75

<210> 26
<211> 70
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 26
Ala Glu Leu Arg Cys Met Cys Ile Lys Thr Thr Ser Gly Ile His Pro
 1          5          10          15

Lys Asn Ile Gln Ser Leu Glu Val Ile Gly Lys Gly Thr His Cys Asn
          20          25          30

Gln Val Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asp Gly Arg Lys Ile Cys Leu
          35          40          45

Asp Pro Asp Ala Pro Arg Ile Lys Lys Ile Val Gln Lys Lys Leu Ala
 50          55          60

Gly Asp Glu Ser Ala Asp
65          70

<210> 27
<211> 72
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 27
Ser Ala Lys Glu Leu Arg Cys Gln Cys Ile Lys Thr Tyr Ser Lys Pro
 1          5          10          15

Phe His Pro Lys Phe Ile Lys Glu Leu Arg Val Ile Glu Ser Gly Pro
          20          25          30

His Cys Ala Asn Thr Glu Ile Ile Val Lys Leu Ser Asp Gly Arg Glu
          35          40          45

Leu Cys Leu Asp Pro Lys Glu Asn Trp Val Gln Arg Val Val Glu Lys
 50          55          60

Phe Leu Lys Arg Ala Glu Asn Ser
65          70

```

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

5

1. Антитіло, яке зв'язує людський Gro-альфа, Gro-бета, Gro-гамма, ENA-78, GCP-2, NAP-2 та IL-8, і це антитіло містить легкий ланцюг і важкий ланцюг, при цьому згаданий легкий ланцюг містить варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR), і згаданий важкий ланцюг містить

- варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR), причому LCVR містить LCDR1, LCDR2, LCDR3 і HCVR містить HCDR1, HCDR2, HCDR3, де LCDR1 являє собою RASQSI>NNLH (послідовність SEQ ID NO: 7), LCDR2 являє собою YTSRSVS (послідовність SEQ ID NO: 8), LCDR3 являє собою GQNNEWPEV (послідовність SEQ ID NO: 9), HCDR1 являє собою GYEFTSYWIH (послідовність SEQ ID NO: 10), HCDR2 являє собою NISPNSGSANYNEKFKS (послідовність SEQ ID NO: 11), і HCDR3 являє собою EGPYSYPSRXaaYYGSDL (послідовність SEQ ID NO: 20), де Хаа - Е або Q.
- 5 2. Антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що амінокислотна послідовність HCVR являє собою послідовність SEQ ID NO: 2 або послідовність SEQ ID NO: 14.
- 10 3. Антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що амінокислотна послідовність LCVR являє собою послідовність SEQ ID NO: 4 або послідовність SEQ ID NO: 16.
4. Антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що амінокислотна послідовність HCVR являє собою послідовність SEQ ID NO: 2, і амінокислотна послідовність LCVR являє собою послідовність SEQ ID NO: 4.
- 15 5. Антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що амінокислотна послідовність важкого ланцюга являє собою послідовність SEQ ID NO: 1, і амінокислотна послідовність легкого ланцюга являє собою послідовність SEQ ID NO: 3.
6. Антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що антитіло містить два важкі ланцюги, що мають амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1, і два легкі ланцюги, що мають амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3.
- 20 7. Молекула ДНК, що містить першу полінуклеотидну послідовність, що кодує поліпептид, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1 або послідовність SEQ ID NO: 13; і містить другу полінуклеотидну послідовність, що кодує поліпептид, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3 або послідовність SEQ ID NO: 15.
- 25 8. Клітина ссавця, що містить молекулу ДНК за п. 7, яка **відрізняється** тим, що клітина здатна експресувати антитіло за будь-яким з пп. 1-6.
9. Спосіб лікування неспецифічного виразкового коліту, раку нирки або раку яєчників у пацієнта, який включає введення цьому пацієнту терапевтично ефективної кількості антитіла за будь-яким з пп. 1-6.
- 30

Комп'ютерна верстка В. Мацело

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