



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **110051**

(13) **C2**

(51) МПК

C07K 16/22 (2006.01)

A61P 7/12 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2013 11686	(72) Винахідник(и):	Бейдлер Кетрін Бротігем (US), Хойєр Йозеф Георг (US), Петрован Рамона Джудіта (US)
(22) Дата подання заявки:	28.03.2012	(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:	10.11.2015	(74) Представник:	Шляховецький Ілля Олександрович, реєстр. №190
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/472,338	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2010137654 A1, 02.12.2010
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	06.04.2011		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.12.2013, Бюл.№ 23		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.11.2015, Бюл.№ 21		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2012/030802, 28.03.2012		

(54) АНТИТИЛО, ЯКЕ ЗВ'ЯЗУЄ TGF-АЛЬФА ТА ЕПІРЕГУЛІН

(57) Реферат:

Винахід належить до антитіла, яке зв'язує людський TGF-альфа та людський епірегулін і є придатними для лікування діабетичної нефропатії.

UA 110051 C2

Цей винахід стосується антитіл, які зв'язують людський TGF-альфа (трансформуючий альфа-фактор росту) та епірегулін, і варіантів їх застосування.

TGF-альфа і епірегулін є двома з семи лігандів рецептору епідермального фактора росту ("EGFR"), які зазвичай функціонують в процесі загоєння ран після травми. Діабетична нефропатія ("DN") є одним з основних діабетичних ускладнень і провідною причиною термінальної стадії ниркової недостатності ("ESRD"). Протеїнурія є клінічним маркером хронічного захворювання нирок, що супроводжує діабетичну нефропатію і пов'язується з прогресуванням захворювання та підвищенням серцево-судинних ризиків, таких як серцева недостатність, судинні захворювання, аритмія. Стандарт ведення хворих у разі діабетичної нефропатії включає інгібітори ACE (ангіотензинконвертувальний фермент) і блокатори рецепторів ангіотензину ("ARB"), що лише уповільнює розвиток хвороби і залишає значний залишковий ризик.

Блокування EGFR послаблює не тільки протеїнурію, але й патологію нирок на передклінічних тваринних моделях захворювання нирок. Проте інгібітори EGFR, такі як ERBITUX, разом з тим, що є схваленими для застосування при лікуванні раку, є пов'язаними з побічними ефектами, такими як сильний висип на обличчі і плечах, що пов'язується з цільовою інгібуючою терапією шкіри. Таким чином, все ще існує потреба в альтернативних лікарських засобах для терапії діабетичної нефропатії. Крім того, існує необхідність у більш ефективній терапії діабетичної нефропатії.

Були описані антитіла, які зв'язують TGF-альфа (дивись, наприклад, US 5,190,858).

Крім того, були описані антитіла, які зв'язують епірегулін (дивись, наприклад, US 2009/0324491).

Даним винаходом запропоновані антитіла проти TGF-альфа і епірегуліну для лікування діабетичної нефропатії. Крім того, цим винаходом запропоновані антитіла проти TGF-альфа і епірегуліну, які взаємодіють з мішенню *in vivo* і згодом призводять до зниження протеїнурії із супутнім зниженням прогресування захворювання і ризику виникнення серцево-судинних захворювань.

Цим винаходом запропоновані терапевтично корисні антитіла, які зв'язують як TGF-альфа, так і епірегулін, і які мають ряд бажаних властивостей. Антитіла за цим винаходом мають високу спорідненість і є селективними з повною нейтралізуючою активністю проти людського TGF-альфа і людського епірегуліну. При введенні антитіла за цим винаходом спричиняють зниження альбумінурії і ниркової патології для білка тубуліна, інтерстиціального фіброзу, збільшення об'єму мезангіальної матриці і розширення ниркових лоханок *in vivo*. Крім того, антитіла за цим винаходом, яким віддають перевагу, не спричиняють пов'язаної з повним пригніченням EGFR токсичності для шкіри.

Цим винаходом запропоноване антитіло, яке зв'язує TGF-альфа і епірегулін, яке містить легкий ланцюг і важкий ланцюг, де вказаний легкий ланцюг містить варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR), а вказаний важкий ланцюг містить варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR), де LCVR включає в себе амінокислотні послідовності LCDR1, LCDR2 і LCDR3, а HCVR включає в себе амінокислотні послідовності HCDR1, HCDR2 і HCDR3, причому LCDR1 являє собою послідовність SEQ ID NO: 4, LCDR2 являє собою послідовність SEQ ID NO: 5, LCDR3 являє собою послідовність SEQ ID NO: 6, HCDR1 являє собою послідовність SEQ ID NO: 1, HCDR2 являє собою послідовність SEQ ID NO: 2 і HCDR3 являє собою послідовність SEQ ID NO: 3.

Цим винаходом запропонована також фармацевтична композиція, яка містить антитіло за цим винаходом, яке розкрито у цьому описі, і щонайменше один(-ну) фармацевтично прийнятний(-у) носій, розріджувач або допоміжну речовину.

Цим винаходом для застосування в лікуванні діабетичної нефропатії запропоноване антитіло за цим винаходом, яке розкрито у цьому описі.

У всьому описі, антитіло за цим винаходом, яке розкрито у цьому описі, зв'язує TGF-альфа і епірегулін, і містить легкий ланцюг і важкий ланцюг, де легкий ланцюг містить варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR), а важкий ланцюг містить варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR), де LCVR включає в себе амінокислотні послідовності LCDR1, LCDR2 і LCDR3, а HCVR включає в себе амінокислотні послідовності HCDR1, HCDR2 і HCDR3, причому LCDR1 являє собою послідовність SEQ ID NO: 4, LCDR2 являє собою послідовність SEQ ID NO: 5, LCDR3 являє собою послідовність SEQ ID NO: 6, HCDR1 являє собою послідовність SEQ ID NO: 1, HCDR2 являє собою послідовність SEQ ID NO: 2 і HCDR3 являє собою послідовність SEQ ID NO: 3.

Цим винаходом запропоноване антитіло, яке розкрито у цьому описі, де вказане антитіло є селективним до людського TGF-альфа і людського епірегуліну. Крім того, цим винаходом

запропоноване антитіло, яке розкрито у цьому описі, причому вказане антитіло має повну нейтралізуючу активність проти людського TGF-альфа і людського епірегуліну. Крім того, за варіантом, якому віддають перевагу, цим винаходом запропоноване антитіло, яке розкрито у цьому описі, причому вказане антитіло є селективним до людського TGF-альфа і людського епірегуліну і має повну нейтралізуючу активність проти людського TGF-альфа і людського епірегуліну.

Цим винаходом запропоноване антитіло, яке розкрито у цьому описі, причому вказане антитіло має константу дисоціації у стані рівноваги, K_d , у межах від $0,01 \times 10^{-9}$ М до $1,0 \times 10^{-9}$ М для людського TGF-альфа (послідовність SEQ ID NO: 18). Крім того, за варіантом, якому віддають перевагу, антитіло за цим винаходом, яке розкрито у цьому описі, має константу дисоціації у стані рівноваги, K_d , у межах від $0,05 \times 10^{-9}$ М до $0,8 \times 10^{-9}$ М для людського TGF-альфа. Значення K_d встановлені за зв'язуванням у стані рівноваги при температурі 25 °С, як описано в Прикладі 2.

За цим винаходом також запропоноване антитіло, яке розкрито у цьому описі, причому вказане антитіло має константу дисоціації у стані рівноваги, K_d , від $0,1 \times 10^{-9}$ М до 30×10^{-9} М для людського мет-епірегуліну (послідовність SEQ ID NO:22). Крім того, за варіантом, якому віддають перевагу, антитіло за цим винаходом, яке розкрито у цьому описі, має константу дисоціації у стані рівноваги, K_d , у межах від $0,5 \times 10^{-9}$ М до 10×10^{-9} М для людського епірегуліну. Значення K_d встановлені за зв'язуванням у стані рівноваги при температурі 25 °С, як описано в Прикладі 2.

Цим винаходом також запропоноване антитіло, яке розкрито у цьому описі, причому вказане антитіло має константу дисоціації у стані рівноваги, K_d , у межах від $0,01 \times 10^{-9}$ М до $1,0 \times 10^{-9}$ М для людського TGF-альфа (послідовність SEQ ID NO: 18) і K_d у межах від $0,1 \times 10^{-9}$ М до 30×10^{-9} М для людського мет-епірегуліну (послідовність SEQ ID NO: 22). Крім того, за варіантом, якому віддають перевагу, антитіло за цим винаходом, яке розкрито у цьому описі, має константу дисоціації у стані рівноваги, K_d , у межах від $0,05 \times 10^{-9}$ М до $0,8 \times 10^{-9}$ М для людського TGF-альфа і K_d у межах від $0,5 \times 10^{-9}$ М до 10×10^{-9} М для людського епірегуліну. Значення K_d встановлені за зв'язуванням у стані рівноваги при температурі 25 °С, як описано в Прикладі 2.

Цим винаходом запропоновані антитіла, які зв'язують людський TGF-альфа та епірегулін і спричиняють дозозалежне зниження альбумінурії, зниження сироваткового креатиніну і азоту сечовини крові ("BUN") *in vivo* на мишачій моделі із залишком нирки та на моделі унінефректомізованих мишей лінії db/db, як описано в Прикладі 5 і в Прикладі 6, відповідно.

Цим винаходом запропоновані антитіла, які зв'язують людський TGF-альфа та епірегулін і спричиняють зниження ниркової патології для білка тубуліну та інтерстиціального фіброзу, і зменшення у разі збільшення об'єму мезангіальної матриці і розширення ниркових лоханок *in vivo* на мишачій моделі із залишком нирки та на моделі унінефректомізованих мишей лінії db/db, як описано в Прикладі 5 і в Прикладі 6, відповідно.

Цим винаходом запропоновані антитіла, які зв'язують людський TGF-альфа та епірегулін і, як вважають, викликають зниження протеїнурії із супутнім зниженням прогресування захворювання і ризику виникнення серцево-судинних захворювань у людей. Крім того, цим винаходом запропоновані антитіла, які зв'язують людський TGF-альфа та епірегулін і, як вважають, є ефективними в лікуванні діабетичної нефропатії у людини.

Цим винаходом запропоновані антитіла, які зв'язують людський TGF-альфа та епірегулін і не спричиняють токсичності для шкіри при дослідженні токсичності на макаках-крабоїдах, як описано в Прикладі 7.

Цим винаходом запропоноване антитіло, яке зв'язує TGF-альфа та епірегулін, що містить легкий ланцюг і важкий ланцюг, де легкий ланцюг містить варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR), а важкий ланцюг містить варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR), де LCVR включає в себе амінокислотні послідовності LCDR1, LCDR2 і LCDR3, а HCVR включає в себе амінокислотні послідовності HCDR1, HCDR2 і HCDR3, причому LCDR1 являє собою послідовність SEQ ID NO: 4, LCDR2 являє собою послідовність SEQ ID NO: 5, LCDR3 являє собою послідовність SEQ ID NO: 6, HCDR1 являє собою послідовність SEQ ID NO: 1, HCDR2 являє собою послідовність SEQ ID NO: 2 і HCDR3 являє собою послідовність SEQ ID NO: 3.

Крім того, цим винаходом запропоноване антитіло, яке зв'язує TGF-альфа та епірегулін, яке містить легкий ланцюг і важкий ланцюг, де легкий ланцюг містить варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR), а важкий ланцюг містить варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR), причому амінокислотна послідовність LCVR являє собою послідовність SEQ ID NO: 9 або послідовність SEQ ID NO: 10.

Цим винаходом також запропоноване антитіло, яке зв'язує TGF-альфа та епірегулін, яке містить легкий ланцюг і важкий ланцюг, де легкий ланцюг містить варіабельну ділянку легкого

ланцюга (LCVR), а важкий ланцюг містить варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR), причому амінокислотна послідовність HCVR являє собою послідовність SEQ ID NO: 7.

Цим винаходом також запропоноване антитіло, яке зв'язує TGF-альфа і епірегулін, яке містить легкий ланцюг і важкий ланцюг, де легкий ланцюг містить варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR), а важкий ланцюг містить варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR), де амінокислотну послідовність LCVR і амінокислотну послідовність HCVR вибирають з групи, яку складають:

(i) LCVR, яка являє собою послідовність SEQ ID NO: 9, і HCVR, яка являє собою послідовність SEQ ID NO: 7; та

(ii) LCVR, яка являє собою послідовність SEQ ID NO: 10, і HCVR, яка являє собою послідовність SEQ ID NO: 7.

Цим винаходом запропоноване антитіло, яке зв'язує TGF-альфа та епірегулін, яке містить легкий ланцюг і важкий ланцюг, де легкий ланцюг містить варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR), а важкий ланцюг містить варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR), причому амінокислотна послідовність LCVR являє собою послідовність SEQ ID NO: 9, а амінокислотна послідовність HCVR являє собою послідовність SEQ ID NO: 7.

Цим винаходом запропоноване антитіло, яке зв'язує TGF-альфа та епірегулін, яке містить легкий ланцюг і важкий ланцюг, де легкий ланцюг містить варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR), а важкий ланцюг містить варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR), причому амінокислотна послідовність LCVR являє собою послідовність SEQ ID NO: 10, а амінокислотна послідовність HCVR являє собою послідовність SEQ ID NO: 7.

Крім того, цим винаходом запропоноване антитіло, яке зв'язує TGF-альфа та епірегулін, яке містить легкий ланцюг і важкий ланцюг, причому амінокислотна послідовність легкого ланцюга являє собою послідовність SEQ ID NO: 13 або послідовність SEQ ID NO: 14.

Цим винаходом також запропоноване антитіло, яке зв'язує TGF-альфа та епірегулін, яке містить легкий ланцюг і важкий ланцюг, причому амінокислотна послідовність важкого ланцюга являє собою послідовність SEQ ID NO: 12.

Крім того, цим винаходом запропоноване антитіло, яке зв'язує TGF-альфа і епірегулін, яке містить легкий ланцюг і важкий ланцюг, причому амінокислотну послідовність важкого ланцюга і амінокислотну послідовність легкого ланцюга вибирають з групи, яку складають:

(i) важкий ланцюг, який являє собою послідовність SEQ ID NO: 12, і легкий ланцюг, який являє собою послідовність SEQ ID NO: 13, та

(ii) важкий ланцюг, який являє собою послідовність SEQ ID NO: 12, і легкий ланцюг, який являє собою послідовність SEQ ID NO: 14.

Цим винаходом запропоноване антитіло, яке зв'язує TGF-альфа та епірегулін, який містить два легкі ланцюги, причому амінокислотною послідовністю кожного легкого ланцюга є послідовність SEQ ID NO: 13, і два важкі ланцюги, причому амінокислотною послідовністю кожного важкого ланцюга є послідовність SEQ ID NO: 12.

Цим винаходом запропоноване антитіло, яке зв'язує TGF-альфа та епірегулін, яке містить два легкі ланцюги, причому амінокислотною послідовністю кожного легкого ланцюга є послідовність SEQ ID NO: 14, і два важкі ланцюги, причому амінокислотною послідовністю кожного важкого ланцюга є послідовність SEQ ID NO: 12.

Крім того, цим винаходом запропонований антигензв'язувальний фрагмент антитіла, яке розкрито у цьому описі.

Цим винаходом також запропонована фармацевтична композиція, яка містить антитіло за цим винаходом, яке розкрито у цьому описі, і щонайменше один(-ну) фармацевтично прийнятний(-у) носій, розріджувач або допоміжну речовину.

Крім того, цим винаходом запропонована фармацевтична композиція, яка містить антитіло за цим винаходом, яке розкрито у цьому описі, разом із щонайменше одним(-ією) фармацевтично прийнятним носієм, розріджувачем або допоміжною речовиною і, факультативно, іншими терапевтичними інгредієнтами.

Цим винаходом також запропонований спосіб лікування діабетичної нефропатії у пацієнта, який включає введення пацієнту антитіла за цим винаходом, яке розкрито у цьому описі.

Крім того, цей винахід пропонує антитіло за цим винаходом, яке розкрито у цьому описі, для застосування в терапії. За варіантом, якому віддають перевагу, цей винахід пропонує антитіло за цим винаходом, яке розкрито у цьому описі, для застосування в лікуванні діабетичної нефропатії.

Крім того, цим винаходом запропоноване застосування антитіла за цим винаходом, яке розкрито у цьому описі, для виготовлення лікарського засобу для лікування діабетичної нефропатії.

Цим винаходом також запропонований спосіб лікування діабетичної нефропатії у пацієнта, який включає введення пацієнту антитіла за цим винаходом, яке розкрито у цьому описі, в одночасній або послідовній комбінації зі стандартним веденням хворого.

Крім того, цим винаходом запропоноване антитіло за цим винаходом, яке розкрито у цьому описі, для застосування в терапії, де вказане антитіло має бути введеним в одночасній або послідовній комбінації зі стандартним веденням хворого. За варіантом, якому віддають перевагу, цим винаходом запропоноване антитіло за цим винаходом, яке розкрито у цьому описі, для застосування в лікуванні діабетичної нефропатії, де вказане антитіло має бути введеним в одночасній або послідовній комбінації зі стандартним веденням хворого.

Крім того, цим винаходом запропоноване застосування антитіла за цим винаходом, яке розкрито у цьому описі, для виготовлення лікарського засобу для лікування діабетичної нефропатії, де вказане антитіло має бути введеним в одночасній або послідовній комбінації зі стандартним веденням хворого.

Цим винаходом також запропонована фармацевтична композиція, яка містить антигензв'язувальний фрагмент антитіла за цим винаходом, яке розкрито у цьому описі, і щонайменше один(-ну) фармацевтично прийнятний(-у) носій, розріджувач або допоміжну речовину.

Крім того, цим винаходом запропонована фармацевтична композиція, яка містить антигензв'язувальний фрагмент антитіла за цим винаходом, яке розкрито у цьому описі, разом із щонайменше одним(-ією) фармацевтично прийнятним(-ою) носієм, розріджувачем або допоміжною речовиною і, за факультативним варіантом, іншими терапевтичними інгредієнтами.

Цим винаходом також запропонований спосіб лікування діабетичної нефропатії у пацієнта, який включає введення пацієнту антигензв'язувального фрагменту антитіла за цим винаходом, яке розкрито у цьому описі.

Крім того, цим винаходом запропонований антигензв'язувальний фрагмент антитіла за цим винаходом, яке розкрито у цьому описі, для застосування в терапії. За варіантом, якому віддають перевагу, цим винаходом запропонований антигензв'язувальний фрагмент антитіла за цим винаходом, яке розкрито у цьому описі, для застосування в лікуванні діабетичної нефропатії.

Крім того, цим винаходом запропоноване застосування антигензв'язувального фрагмента антитіла за цим винаходом, яке розкрито у цьому описі, для виготовлення лікарського засобу для лікування діабетичної нефропатії.

Цим винаходом також запропонований спосіб лікування діабетичної нефропатії у пацієнта, який включає введення пацієнту антигензв'язувального фрагмента антитіла за цим винаходом, яке розкрито у цьому описі, в одночасній або послідовній комбінації зі стандартним веденням хворого.

Крім того, цим винаходом запропонований антигензв'язувальний фрагмент антитіла за цим винаходом, яке розкрито у цьому описі, для застосування в терапії, де вказаний антигензв'язувальний фрагмент має бути введеним в одночасній або послідовній комбінації зі стандартним веденням хворого. За варіантом, якому віддають перевагу, цим винаходом запропонований антигензв'язувальний фрагмент антитіла за цим винаходом, яке розкрито у цьому описі, для застосування в лікуванні діабетичної нефропатії, де вказаний антигензв'язувальний фрагмент має бути введеним в одночасній або послідовній комбінації зі стандартним веденням хворого.

Крім того, цим винаходом запропоноване застосування антигензв'язувального фрагмента антитіла за цим винаходом, яке розкрито у цьому описі, для виготовлення лікарського засобу для лікування діабетичної нефропатії, де вказаний антигензв'язувальний фрагмент має бути введеним в одночасній або послідовній комбінації зі стандартним веденням хворого.

Вказане стандартне ведення хворого для діабетичної нефропатії охоплює, але ними не обмежується, інгібітори ACE і блокатори рецепторів ангіотензину (ARBs).

Загальна структура "антитіла" є дуже добре відомою в даній галузі. Для антитіла типу IgG, існує чотири амінокислотних ланцюги (два "важкі" ланцюги і два "легкі" ланцюги), які є перехресно зв'язаними за допомогою внутрішніх та міжланцюгових дисульфідних зв'язків. Антитіла, що мають немодифіковані людські послідовності Fc, коли вони експресовані у певних біологічних системах, глікозилюються на ділянці Fc. Антитіла можуть також бути глікозильованими у інших положеннях. Субодиночні структури і тривимірні конфігурації антитіл добре відомі в даній галузі. Кожний важкий ланцюг складається з N-кінцевої варіабельної ділянки важкого ланцюга ("HCVR") і константної ділянки важкого ланцюга ("HCCR"). Константна ділянка важкого ланцюга складається з трьох доменів (CH1, CH2 і CH3) у разі IgG, IgD та IgA, і 4

доменів (CH1, CH2, CH3 і CH4) у разі IgM та IgE. Кожен легкий ланцюг складається з варіабельної ділянки легкого ланцюга ("LCVR") і константної ділянки легкого ланцюга ("LCCR").

Варіабельні ділянки кожної пари легкий/важкий ланцюг утворюють антигензв'язувальний центр антитіла. Вказані ділянки HCVR і LCVR можуть також підрозділятися на гіперваріабельні ділянки, які називають ділянками, що обумовлюють комплементарність ("CDR"), які перемижуються більш консервативними ділянками, які називають каркасними ділянками ("FR"). Кожна з HCVR і LCVR складається з трьох CDR і чотирьох FR, розташованих від амінокінця до карбоксильного кінця в такому порядку: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. У цьому описі три CDRs важкого ланцюга позначають як "CDRH1, CDRH2 і CDRH3" і три CDR легкого ланцюга позначають як "CDRL1, CDRL2 і CDRL3". Вказані CDR містять більшість залишків, які утворюють специфічні взаємодії з антигеном. Розподіл амінокислот до кожного домену відповідає добре відомим номенклатурам [наприклад, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)].

Антитіло за цим винаходом може мати константну ділянку важкого ланцюга, вибрану з будь-якого класу імуноглобулінів (IgA, IgD, IgG, IgM та IgE). Крім того, антитіло за цим винаходом містить Fc-ділянку, що походить з Fc-ділянки людського IgG4 через його знижену здатність до зв'язування факторів комплементу в порівнянні з іншими підтипами IgG.

Антитіло може бути одержаним з однієї копії або клону, у тому числі, наприклад, будь-якого еукаріотного, прокаріотного або фагового клону. За варіантом, якому віддають перевагу, антитіло за цим винаходом існує у однорідній або по суті однорідній популяції молекул антитіла. Непроцесоване антитіло містить повномірні або по суті повномірні константні ділянки, у тому числі Fc-ділянку. "Антигензв'язувальним фрагментом" такого антитіла є будь-яка скорочена форма антитіла, що містить антигензв'язувальну частину та зберігає антигензв'язувальну здатність. Такі скорочені форми включають, наприклад, Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент або F(ab')₂-фрагмент, що містить CDR або варіабельні ділянки розкритих антитіл. Окрім того, такі скорочені форми антитіла можуть бути одноланцюговим Fv-фрагментом, який можна одержати шляхом сполучення ДНК, що кодує LCVR та HCVR, з лінкерною послідовністю. (Дивись, Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp 269-315, 1994). Термін "антитіло" не охоплює такі фрагменти, якщо не вказується інше. Антитіло за цим винаходом можна одержати із застосуванням методів, добре відомих у цій галузі, наприклад, технології рекомбінантних ДНК, методу фагового дисплею, методів синтезу або комбінацій таких методів чи інших методів, широко відомих у цій галузі.

Антитіло за цим винаходом являє собою сконструйоване антитіло, яке було розроблено таким чином, щоб мати каркасні ділянки, шарнірні ділянки і константні ділянки людського походження, які є ідентичними або по суті ідентичними (практично людськими) каркасним ділянкам та константним ділянкам, одержаним з людських геномних послідовностей. Повністю людськими каркасними ділянками, шарнірними ділянками і константними ділянками є ділянки людських послідовностей зародкової лінії, а також послідовностей з природними соматичними мутаціями і ділянки із сконструйованими мутаціями. Антитіло за цим винаходом може містити каркасні, шарнірні або константні ділянки, одержані з повністю людської каркасної, шарнірної або константної ділянки, яка містить одну або декілька амінокислотних замінів, делецій або додань. Крім того, антитіло за цим винаходом є практично неімуногенним в організмі людини.

Різні людські каркасні послідовності можуть бути використані окремо або в комбінації як основа для антитіла за цим винаходом. За варіантом, якому віддають перевагу, каркасні ділянки антитіла за цим винаходом мають людське або по суті людське походження (щонайменше 95 %, 97 % або 99 % людське походження). Послідовності каркасних ділянок людського походження можна одержати з The Immunoglobulin Factsbook, by Marie-Paule Lafranc, Gerard Lefranc, Academic Press 2001, ISBN 012441351.

Каркасна послідовність для антитіла за цим винаходом відіграє роль "донорної" варіабельної каркасної ділянки і може бути використана для створення додаткових антитіл з такими ж самими CDR, визначеними у цьому описі, з використанням методики, відомої у цій галузі. Крім того, каркасна послідовність для антитіла за цим винаходом може бути зіставлена з іншими відомими людськими каркасними послідовностями для одержання додаткових антитіл. Таким чином, ця інформація може бути використана для "зворотного мутування" іншої вибраної гомологічної людської каркасної ділянки до донорного амінокислотного залишку у цих положеннях. Крім того, будь-які "рідкісні" амінокислоти можуть бути виявлені у додаткових людських каркасних ділянках, завдяки чому у відповідному положенні може бути використаним консенсусний або донорний амінокислотний залишок.

Терміни "TGF-альфа" або "людський TGF-альфа" означають людський білок TGF-альфа (послідовність SEQ ID NO: 18).

Терміни "епірегулін" або "людський епірегулін" означають людський білок епірегуліна (послідовність SEQ ID NO: 33). Людський мет-епірегулін (послідовність SEQ ID NO: 22) використовується в цьому документі в *in vitro* експериментах. Посилання на здатність антитіл за цим винаходом, яке розкрито у цьому описі, до зв'язування або нейтралізування людського епірегуліну відноситься також до їх здатності зв'язувати і нейтралізувати людський мет-епірегулін в *in vitro* експериментах.

Термін "пацієнт" означає ссавця, за варіантом, якому віддають перевагу, людину.

Термін "лікування" (або "лікувати") означає уповільнення, зупинення, зменшення або зворотного розвитку або тяжкості симптомів, розладу, стану або захворювання.

Термін "терапевтично ефективна кількість" означає кількість або дозу антитіла за цим винаходом, які, при введенні пацієнтові однією або декількома дозами, забезпечують необхідне лікування.

Наведені далі приклади можуть бути виконані по суті так, як описано нижче.

ПРИКЛАДИ

Приклад 1: Виготовлення антитіл

Антитіло I і Антитіло II можна одержати і очистити так, як наведено нижче. Відповідну лінію клітини-хазяїна, наприклад, HEK 293 або CHO, тимчасово або стабільно трансфекують експресійною системою для секретування антитіл із застосуванням оптимального попередньо визначеного співвідношення векторів HC:LC або одновекторною системою, яка кодує як HC, такі як послідовність SEQ ID NO: 15, так і LC, такі як послідовність SEQ ID NO: 16 або послідовність SEQ ID NO: 17. Просвітлене середовище, до якого було секретовано антитіло, очищають із застосуванням будь-якого з численних традиційних методів. Наприклад, середовище можна зручно завантажити у колонку Protein A або G, врівноважену сумісним буфером, таким як забуферений фосфатом фізіологічний розчин (pH7,4). Вказану колонку промивають для видалення компонентів неспецифічного зв'язування. Зв'язане антитіло елюють, наприклад, градієнтом рН (наприклад, від 0,1 М натрійфосфатного буферу (pH6,8) до 0,1 М натрійцитратного буферу (pH2,5)). Фракції антитіла виявляють, наприклад, із застосуванням SDS-PAGE (електрофорез у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію), після чого змішують. Подальше очищення є факультативним, у залежності від передбачуваного застосування. Антитіло може бути сконцентроване та/або відфільтроване за стерильних умов із застосуванням традиційних методів. Розчинні агрегати і мультимери можуть бути ефективно видалені із застосуванням традиційних методів, у тому числі шляхом гель-хроматографування за розміром молекул, гідрофобного хроматографування, іонообмінного хроматографування або хроматографування на гідроксипатитній адсорбційній колонці. Ступінь чистоти антитіла після згаданих етапів хроматографування перевищує 99 %. Вказаний продукт може бути негайно заморожений при температурі -70 °C або може бути підданий ліофілізації. Нижче наведені амінокислотні послідовності цих антитіл.

Послідовності (SEQ ID Nos) антитіл

Антитіло	Важкий ланцюг	Легкий ланцюг	HCVR	LCVR
I	12	13	7	9
II	12	14	7	10
III	31	32	8	11

Антитіло	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
I	1	2	3	4	5	6
II	1	2	3	4	5	6
III	1	2	3	4	5	6

Приклад 2: Визначення зв'язувальної спорідненості антитіла I поверхневим плазмонним резонансом (BIAcore)

Дослідження методом поверхневого плазмонного резонансу здійснюють із застосуванням установки Biacore T2000 (BIAcore® AB, Uppsala, Sweden), реактивів та програми Biacore T2000 Evaluation Software Ver 4.1. Чип CM5 готують за розробленим виробником методом сполучення аміногруп із застосуванням активації за допомогою EDC/NHS. Поверхню всіх чотирьох протокових кювет активують шляхом введення суміші (1:1) EDC/NHS протягом 7хв зі швидкістю 10 мкл/хв. Козяче антилюдське Fc γ специфічне антитіло розводять до 50 мкг/мл в 10 мМ

розчині ацетатного буферу (pH 4,0), та іммобілізують з розрахунку приблизно 10000 RU (реакційних одиниць) на всіх чотирьох протокових кюветах шляхом введення протягом 7 хв зі швидкістю потоку 10 мкл/хв. Сайти, що не прореагували, блокують шляхом введення етаноламіну протягом 7 хв зі швидкістю потоку 10 мкл/хв. Введення гліцину (3 × 20 с, pH 1,5, швидкість потоку 30мкл/хв) застосовують для видалення нековалентно сполученого білку. Протоковим буфером є розчин HBS-EP [10 mM розчин HEPES, 150 mM розчин хлориду натрію, 3 mM розчин EDTA, 0,005 % розчин полісорбату 20].

При проведенні дослідження 1, антитіло I розбавляють до 50 мкг/мл у протоковому буфері і приблизно 400-600 RU іммобілізують в протоковій кюветі 2. Людський TGF-альфа (послідовність SEQ ID NO: 18), паціючий TGF-альфа (послідовність SEQ ID NO: 20), людський мет-епірегулін (послідовність SEQ ID NO: 22) та епірегулін макак-крабоїдів (послідовність SEQ ID NO:24) розбавляють від 100 мкг/мл до 200 нМ у протоковому буфері, після чого піддають двократному послідовному розведенню в протоковому буфері до 6,25 нМ. Мишачий епірегулін (послідовність SEQ ID NO: 23) розбавляють від 100 мкг/мл до 4мкМ в протоковому буфері, після чого піддають двократному послідовному розведенню в протоковому буфері до 125 нМ. Протягом 300 с при швидкості потоку 30 мкл/хв здійснюють введення ліганду у кожній концентрації з повторенням, з подальшою фазою дисоціації. Тривалість фази дисоціації становить 1800 с для людського і паціючого TGF-альфа, 1200 с для людського епірегуліну і епірегуліну макак-крабоїдів, і 120 с для мишачого епірегуліну. Регенерацію здійснюють шляхом введення 10 mM розчину гліцину (pH 1,5, 3 × 20 с при швидкості потоку 30 мкл/хв) до всіх протокових кювет.

При проведенні дослідження 2, антитіло III розбавляють до 100 мкг/мл в протоковому буфері і приблизно 400-600 RU іммобілізують в протоковій кюветі 2. Мишачий TGF-альфа (послідовність SEQ ID NO:19) розбавляють від 100 мкг/мл до 200 нМ у протоковому буфері, після чого піддають двократному послідовному розведенню в протоковому буфері до 6,25 нМ. Мишачий епірегулін (послідовність SEQ ID NO: 23) розбавляють від 100 мкг/мл до 4 мкМ в протоковому буфері, після чого піддають двократному послідовному розведенню в протоковому буфері до 125 нМ. Протягом 300 с при швидкості потоку 30 мкл/хв здійснюють введення ліганду у кожній концентрації з повторенням, з подальшою фазою дисоціації. Тривалість фази дисоціації становить 1800 с для мишачого TGF-альфа і 120 с для мишачого епірегуліну. Регенерацію здійснюють шляхом введення 10 mM розчину гліцину (pH 1,5, 3 × 20 с при швидкості потоку 30 мкл/хв) до всіх протокових кювет.

Дані (мінус еталонні значення) збирають як Fc2-Fc1. Результати вимірювань визначають при температурі 25 °C. Швидкість асоціації (k_{on}) і швидкість дисоціації (k_{off}) для кожного ліганда оцінюють із застосуванням моделі "1:1 (ленгмюрівського (Langmuir)) зв'язування". Спорідненість (K_D) обчислюють, виходячи з кінетики зв'язування відповідно до співвідношення: $K_D = k_{off}/k_{on}$.

Таблиця 1

Параметри зв'язування для антитіла I

Ліганд	Вид	Швидкість асоціації (k_o ($M^{-1}s^{-1}$) (\pm SD (середнє квадратичне відхилення))	Швидкість дисоціації (k_{off}) (s^{-1}) (\pm SD)	Спорідненість (K_D^a) (\pm SD)
TGF-альфа	Людський	$4,18 \pm 0,28 \times 10^5$	$4,09 \pm 0,96 \times 10^{-5}$	$97,6 \pm 20,6$ пМ
	Паціючий	$3,78 \pm 0,39 \times 10^5$	$2,66 \pm 0,74 \times 10^{-5}$	$70,5 \pm 19,4$ пМ
Епірегулін	Людський	$4,91 \pm 0,42 \times 10^5$	$6,31 \pm 0,55 \times 10^{-4}$	$1,29 \pm 0,03$ нМ
	Макак-крабоїдів	$6,73 \pm 0,71 \times 10^5$	$7,05 \pm 0,23 \times 10^{-4}$	$1,05 \pm 0,09$ нМ
	Мишачий	$4,10 \pm 1,15 \times 10^4$	$1,33 \pm 0,16 \times 10^{-2}$	342 ± 136 нМ

^a Обчислено як $K_D = k_{off}/k_{on}$

Таблиця 2

Параметри зв'язування для антитіла III

Ліганд	Швидкість асоціації (k_{on}) ($M^{-1}s^{-1}$) ($\pm SD$)	Швидкість дисоціації (k_{off}) (s^{-1}) ($\pm SD$)	Спорідненість (K_D^a) ($\pm SD$)
Мишачий TGF-альфа	$5,41 \pm 0,50 \times 10^5$	$2,02 \pm 0,54 \times 10^{-5}$	$38,0 \pm 13,6$ пМ
Мишачий епірегулін	$6,55 \pm 0,38 \times 10^4$	$1,41 \pm 0,09 \times 10^{-2}$	215 ± 15 нМ
^a Обчислено як $K_D = k_{off}/k_{on}$			

Антитіло I зв'язується з людським TGF-альфа і людським епірегуліном зі спорідненістю близько 98 пМ і 1,3 нМ, відповідно. Антитіло I також зв'язується з паючим TGF-альфа і мишачим епірегуліном зі спорідненістю від приблизно 70 пМ до 340 нМ, відповідно. Крім того, антитіло I зв'язується з епірегуліном макак-крабоїдів зі спорідненістю приблизно 1 нМ. Антитіло III зв'язується з мишачим TGF-альфа і мишачим епірегуліном зі спорідненістю приблизно 38 пМ і 220 нМ, відповідно. Таким чином, антитіло I і антитіло III за цим винаходом мають високу спорідненість до людського TGF-альфа і людського епірегуліну.

Приклад 3: Інтерналізації EGF-цільових лігандів в клітинній лінії HT-29 карциноми товстої кишки людини

Кон'югування Alexa Fluor® 488 з антитілами

Alexa Fluor® 488 кон'югують з антитілом I і контрольним IgG відповідно до методики виробника. Білки розбавляють до 2 мг/мл у PBS. До 0,5 мл цього розчину, з концентрацією білка 2 мг/мл, додають 50 мкл 1 М розчину бікарбонату натрію (pH 9). Після цього розчин білку переносять у флакон з барвником, і перемішують при кімнатній температурі протягом 1 год. Мічений білок очищають за допомогою смоли Bio-Rad BioGel P-30, яка входить до складу маркувального набору.

In vitro аналіз інтерналізації

При проведенні дослідження 1, 10000 клітин лінії HT-29 (лінія клітин аденокарциноми ободової кишки, що експресує TGF-альфа і епірегулін) висівають в кожну лунку 96-лункового планшету і інкубують протягом ночі в живильному середовищі повного складу [модифіковане за способом Дульбекко середовище Ігла/середовище F12 (Ham) (1:1) ("DMEM/F12"), що містить L-глутамін, 10 % інактивованої нагріванням зародкової бичачої сироватки ("FBS"), 1 × антибіотик і розчин (2,438 г/л) бікарбонату натрію]. Наступного дня клітини промивають PBS (забуферений фосфатом фізіологічний розчин), який містить 0,1 % BSA (бичачий сироватковий альбумін), після чого інкубують з Alexa Fluor® 488-кон'югованим антитілом I або контрольним IgG в PBS з 0,1 % BSA при концентраціях від 0 мкг/мл до 88 мкг/мл протягом 2 год. при температурі 37 °C в інкубаторі для культур тканин. Після періоду інкубації клітини декілька разів промивають у PBS з 0,1 % BSA, після чого фіксують в 4 % розчині формальдегіду для аналізів. Кількісне визначення інтерналізації робиться таким чином: 500 клітин/лунку збирають за допомогою Cellomics ArrayScan VTI (компанія Thermo Scientific). Аналіз зображень здійснюють за допомогою програми "Compartment a1 analysis", призначеної для біологічного використання системи. Ядра клітин ідентифікують за допомогою барвника Hoechst (синій). Дві ділянки інтересу (ROI) встановлюють для збирання флуоресцентних сигналів з внутрішньоклітинних плям (червоні) і загальної зеленої флуоресценції (червоної і синьої), одержаних із замаскованого зображення. Обчислюють кількість, площу та інтенсивність флуоресценції від кожної плями і клітини. Для визначення інтерналізації, індукованої антитілом I, вибирають середню сумарну інтенсивність флуоресценції внутрішньоклітинних плям (червоних).

При проведенні дослідження 2, 10000 клітин лінії HT-29 одержують, як описано вище, і до клітин, з розрахунку 40 мкг/мл, додають Alexa Fluor® 488-кон'юговане антитіло I або контрольний IgG в PBS, що містить 0,1 % BSA. Клітини інкубують при температурі 37 °C в інкубаторі для культури тканин протягом різних періодів часу від 0 хв до 120 хв, після чого декілька разів промивають у PBS, що містить 0,1 % BSA, і фіксують в 4 % розчині формальдегіду для аналізів. Кількісне визначення сигналу здійснюють по суті так, як описано вище.

Таблиця 3а

Дослідження 1 - Середня сумарна інтенсивність кільцевої флуоресценції

Доза (мкг/мл)	88	44	22	11	5,5
Контрольний IgG	2440±199	1808±207	1763±68	1391±76	1357±63
Антитіло I	24809±4343	17451±217	15135±131	11516±54	8474±269
Середнє ± SEM (середня квадратична помилка середнього)					

Таблиця 3б

Дослідження 1 - Середня сумарна інтенсивність кільцевої флуоресценції

Доза (мкг/мл)	2,75	1,38	0,69	0,34	0
Контрольний IgG	1570±70	1473±7	1483±90	1407±41	1630±155
Антитіло I	6503±262	4349±186	3440±96	2432±62	1460±84
Середнє ± SEM					

- 5 За результатами аналізу зображень з дослідження 1 встановлено, що флуоресцентний сигнал інтерналізувався клітинами і був дозозалежним у разі антитіла I, але не у разі контрольного IgG (Таблиця 3а і Таблиця 3б).

Таблиця 4

Дослідження 2 - Середня сумарна інтенсивність кільцевої флуоресценції

Час після додання (хв)	120	60	30	15	5	0
Контрольний IgG	177±29	167±23	124±10	126±18	116±4	94±11
Антитіло I	4449±866	4131±688	1494±66	717±72	261±17	89±1
Середнє ± SEM						

- 10 Результати дослідження 2 показали, що антитіло I інтерналізувалось швидко і інтерналізація була завершена через 2 год. після додання до клітин (Таблиця 4). Антитіло I індукувало інтерналізацію мішені клітинами лінії HT-29 in vitro часозалежним чином (Таблиця 4).

Приклад 4: Визначення нейтралізації проліферації клітин, стимульованих лігандом EGFR, в клітинній лінії міофібробластів

- 15 Клональна клітинна лінія мишачих міофібробластів ("MFC7") використовується для перевірки здатності антитіл за цим винаходом до блокування проліферативної активності лігандів EGFR. Сімома лігандами, які можуть активувати EGFR, є TGF-альфа (TGFA), епірегулін (EREG), EGF, гепаринзв'язувальний EGF (HB-EGF), епіген (EPGN), амфірегулін (AREG) і бетацелюлін (BTC). Ліганди EGFR поділяють спільний структурний фрагмент, EGF-подібний домен, який характеризується трьома внутрішньомолекулярними дисульфідними зв'язками, які сформовані шістьма розташованими на однаковій відстані один від одного залишками цистеїну, які зберігаються. Проліферативна активність визначається включенням бромдезоксидуридину ("BrdU") і вимірюється із застосуванням колориметричного набору BrdU ELISA відповідно до інструкцій виробника.

- 25 По-перше, 2000 клітин лінії MPC7/лунку висівають на оброблений культурою тканин 96-лунковий мікропланшет на модифіковане за способом Дульбекко середовище Ігла/середовище F12 (Ham) (1:1) ("DMEM/F12"), що містить L-глутамін, 10 % інактивованої нагріванням зародкової бичачої сироватки ("FBS"), 1 × антибіотик і розчин (2,438 г/л) бікарбонату натрію. Клітинам надавали можливість прикріплення протягом 6 год., після чого середовище видаляли і замінювали на 0,1 мл безсироваткового середовища DMEM/F12, яке містить 0,1 % BSA, для культивування клітин на безсироватковому середовищі протягом ночі. Наступного дня послідовні розведення лігандів EGFR здійснюють за допомогою безсироваткового середовища, що містить 0,1 % BSA, на 96-лункових поліпропіленових планшетах в об'ємі 0,12 мл/лунку з концентрацією від 0,001 нг/мл до 3000 нг/мл. Після розведення, середовище з клітин, що знаходились у безсироватковому середовищі, видаляють з їх подальшим стимулюванням лігандом EGFR протягом 24 год. Після стимуляції, клітини імпульсно мітять BrdU впродовж 4

год., після чого аналізують із застосуванням колориметричного набору BrdU ELISA відповідно до інструкцій виробника.

При перевірці специфічності антитіла I до лігандів EGFR, послідовні розведення 2× або 3× антитіла здійснюють на 96-лункових поліпропіленових планшетах в об'ємі 0,06 мл/лунку з концентрацій від 3000 нМ до 0,059 нМ. Після послідовних розведень антитіла, в кожен лунку додають 0,06 мл ліганда EGFR. Потім планшет інкубують протягом 30 хв при температурі 37 °C у інкубаторі із зволоженням культури тканин. Після інкубації у кожен лунку до клітин переносять 0,1 мл розчину. Клітини стимулюють протягом 24 год. Після стимуляції клітини імпульсно мітять BrdU протягом 4 год., після чого аналізують із застосуванням колориметричного набору BrdU ELISA. Значення оптичної густини (450 нм - 690 нм) визначають за допомогою планшет-рідери SpectraMax 190 (компанія Molecular Devices), і дані аналізують.

Таблиця 5

Аналіз клітин лінії MFC7

Ліганд EGFR	Діапазон EC ₅₀ (нМ)	IC ₅₀ (нМ) Антитіло I	IC ₅₀ (нМ) Антитіло III
Людський TGF-альфа ^a	11-12	0,46±0,03	0,52±0,04
Людський епірегулін	78-282	3,15±1,04	1,12±0,36
Людський епіген	3797-18987	807±577	nd ^b
Людський EGF	0,3-2,4	> 2000	nd ^b
Людський HBEGF	30-39	> 2000	nd ^b
Людський бетацелюлін	1,8-3,2	> 2000	nd ^b
Людський амфірегулін	273-2727	> 2000	nd ^b
Пацючий TGF-альфа	13-13,8	0,19±0,06	0,13±0,01
Мишачий епірегулін	163-320	334±41	214±49
^a Людські ліганди EGFR при випробуванні антитіла I мали концентрацію 0,5 нМ, за виключенням амфірегуліну (60 нМ) та епігену (100 нМ)			
Пацючий TGF-альфа і мишачий епірегулін застосовувались з концентрацією 0,5 нМ			
^b nd, не визначено			

За результатами вказаного аналізу встановили, що мишачий епірегулін і пацючий TGF-альфа, а також всі людські ліганди EGFR, за винятком епігену і амфірегуліну, є сильнодіючими стимуляторами проліферації клітин (Таблиця 5). Антитіло I і антитіло III мають високу спорідненість до людського і пацючого TGF-альфа та мають високу активність по відношенню до людського епірегуліну (Таблиця 5).

У Таблиці 5 підсумовані обчислені значення EC₅₀ для випробуваних лігандів EGFR і абсолютні значення IC₅₀ для антитіл до вказаних лігандів. Обчислена середня IC₅₀ для антитіла I дорівнювала 0,46±0,03 нМ для людського TGF-альфа і 3,15±1,04 нМ для людського епірегуліну. Обчислена середня IC₅₀ для антитіла III дорівнювала 0,52±0,04 нМ для людського TGF-альфа і 1,12±0,36 нМ для людського епірегуліну. Обчислене середнє значення IC₅₀ для антитіла III дорівнювало 0,13±0,01 нМ для пацючого TGF-альфа і 214±49 нМ для мишачого епірегуліну. Таким чином, антитіло I і антитіло III мають високу спорідненість до людського TGF-альфа і людського епірегуліну, і є селективними з повною нейтралізуючою активністю проти людського TGF-альфа і людського епірегуліну.

Приклад 5: Функція і патологія нирок на мишачій моделі (із залишком нирки) гіпертензії ниркового походження

Мишача модель із залишком нирки, яка включає хірургічне видалення 75 % загальної маси нирки, використовується як доклінічна модель гіпертензії ниркового походження. [Ma LJ, Fogo AB. Kidney Int. 2003 Jul;64(1):350-5]. Хірургічному видаленню ниркової тканини або фіктивній операції піддають 129 мишей-самців лінії Svej у віці 9-10 тижнів. Довільний розподіл на групи з 12 мишей здійснюють через 2 тижні після операції за співвідношенням альбумін/креатинін ("ACR") і масою тіла. Ізотиповий контрольний IgG (10 мг/кг) або антитіло III (1 мг/кг і 10 мг/кг) вводять підшкірним шляхом після довільного розподілу, і продовжують здійснювати введення один раз на тиждень до 16-го тижня після операції. Ціллю дослідження є визначення таких показників як виживаність, систолічний кров'яний тиск, альбумінурія, сироватковий креатинін, сироватковий BUN, сечовий TGF-альфа, сечовий MIP-2 (макрофагальний запальний протеїн-2) і ниркова патологія.

На прикінці цього дослідження було зареєстровано 3 смерті в групі, яка одержувала контрольний IgG (25 % смертність), та не було смертельних випадків в групах, які одержували антитіло III.

Визначення систолічного кров'яного тиску

5 Кров'яний тиск вимірюють через 12 тижнів після операції методом хвостової манжети. Відібраних мишей з кожної групи (N=3-4 на групу) призвичаюють до обмеження рухів шляхом розміщення їх в утримувачі мишей з хвостовою манжетою, яка прикріплюється до хвоста на 5 хв кожного дня, за 3-5 днів до фактичного вимірювання тиску. Температура кімнати з обладнанням підвищується до 24 °C для забезпечення додаткового тепла в процесі збирання даних з 10 кров'яного тиску. Мишей вміщують у пристрій для фіксування, і встановлюють на верхній частині пристрою для підігрівання подушечок лапок (температура 31-33°C), щоб забезпечити розширення судинної мережі хвоста. Хвіст пропускають через хвостову манжету, і кожну мишу знерухомлюють впродовж приблизно 30 хв, але не більше 45 хв. Цей період часу включає в себе початкове нагрівання і вимірювання тиску з подальшим негайним поверненням до місця 15 спільного знаходження тварин. Анестезія не використовується. Хвостова манжета надувається, щільно стискаючи хвіст достатньою мірою для миттєвого переривання артеріального кровотоку, з подальшим поступовим випусканням повітря з манжети і спостереженням за відновленням повернення артеріального пульсу. При відновленні артеріального пульсу, манжету повністю спускають.

20 Вимірювання альбумінурії

Сечу збирають кожні 4 тижні в камері для дослідження метаболізму (компанія Nalgene) протягом 24 год. Кожна миша (окремо розміщена) отримує корм і воду протягом 24 год. процесу збирання сечі. Наприкінці 24-годинного періоду зібрану сечу поміщають на лід, центрифугують і піддають аналізу на альбумін і креатинін. Альбумінурія визначається як відношення кількості 25 альбуміну в сечі до кількості креатиніну в сечі (мкг/мг).

Сироватковий креатинін і BUN (азот сечовини крові)

На кінець дослідження сироватку, яка була одержана шляхом пункції серця, аналізують на BUN і креатинін.

TGF-альфа і MIP-2 ELISA

30 Сечу, яка була одержана впродовж 24 год. збирання, концентрують (5×) шляхом центрифугування з використанням мембрани з 3К смугою пропускання при 14000×g протягом 30 хв. Проводять сендвіч-ELISA (твердофазний імуоферментний аналіз) на мишачий TGF-альфа. Паціючий TGF-альфа використовують як стандарт. 96-лункові полістиролові планшети сенсibiliзують 3 мкг/мл антитіла III протягом ночі при температурі 4 °C. Планшети промивають, 35 блокують блокувальним буфером, знову промивають, після чого додають концентровані зразки сечі. Через 2 год. при кімнатній температурі планшети промивають, після чого додають "друге" біотинізоване поліклональне анти-hTGF-альфа антитіло. Через 2 год. при кімнатній температурі планшети промивають, і інкубують зі стрептавідином-HRP (пероксидаза хрому) протягом 30 хв. Сигнал генерують за допомогою TMB-субстрату, і зупиняють реакцію доданням 2н розчину 40 H₂SO₄. Наявний у продажу набір Quantikine® sandwich-ELISA для мишачого макрофагального запального протеїну-2 (MIP-2, еквівалент людського IL-8) застосовують для виявлення сечового MIP-2 відповідно до інструкцій виробника. Дані оптичної густини для обох твердофазних імуоферментних аналізів одержують за допомогою планшет-рідери SpectraMax 190 (компанія Molecular Devices), і вказані дані аналізують.

45 Патологія нирок

Залишки нирок після закінчення дослідження видаляють, фіксують у формаліні і обробляють парафіном для секціонування у відповідності зі стандартною методикою. Зрізи нирок оцінюються на ураження патологоанатомом. Рівень білка тубуліна, збільшення об'єму мезангіальної матриці та ступінь інтерстиціального фіброзу піддають напівкількісній оцінці за 50 наведеною нижче шкалою: немає (0), мінімальний(-е) (1), невеликий(-е) (2), помірний(-е) (3), явно виражений(-е) (4) і тяжкий(-е) (5). Збільшення об'єму гломерулярних мезангіальних клітин і потовщення базальної мембрани оцінюють на зрізах, забарвлених гематоксиліном та еозинном ("H&E"), і періодичною обробкою кислотою і шифовою основою ("PAS"). Зрізи нирок, забарвлені трихромом за методом Массона, оцінюють для визначення ступеню фіброзу (інтерстиціального і гломерулярного).

55 Статистичні методи

Всі дані аналізують із застосуванням програмного забезпечення JMP v.8.0 (компанія SAS Institute). Оцінку патологічних змін у балах піддають статистичній обробці шляхом аналізу спряженості ознак і точного критерію Фішера. Усі інші дані оцінюються шляхом дисперсійного

аналізу з log-трансформованими даними і непарним t-критерієм Стюдента. Статистично значущим вважається р-значення <0,05.

Таблиця 6

Розвиток альбумінурії з перебігом часу

Тижні	2	4	8	12	16
Контрольний IgG (10 мг/кг)	1601±269	3377±860	5201±907	6144±1654	4863±2170
Антитіло III (1 мг/кг)	1665±305	3211±343	3224±518	3790±857	5240±2004
Антитіло III (10 мг/кг)	1626±273	2245±334	2399±261 ^a	2749±401 ^a	3254±654
Середнє арифметичне ± SEM для співвідношення альбуміна і креатиніна (мкг/мг)					
^a Статистично значуща різниця порівняно з контрольним IgG (p < 0,05)					

- 5 Було продемонстроване дозозалежне зниження альбумінурії в порівнянні з групою, яка одержувала контрольний IgG з антитілом III (Таблиця 6). Наслідком введення антитіла III в дозі 10 мг/кг було значне зниження альбумінурії через 8 тижнів і 12 тижнів після операції в порівнянні з групою, яка одержувала контрольний IgG, але не через 2 тижні, 4 тижні і 16 тижнів (Таблиця 6).

10

Таблиця 7

Систолічний кров'яний тиск, сироватковий креатинін і BUN

Кінцева точка	Систолічний кров'яний тиск на 12 тижні (мм Hg)	Сироватковий креатинін на 16 тижні (мг/дл)	Сироватковий BUN на 16 тижні (мг/дл)
Симульовано оперовані	nd	0,17±0,01	31,5±2,5
Контрольний IgG (10 мг/кг)	139,6±4,0	0,31±0,04 ^a	64,0±12,5 ^a
Антитіло III (1 мг/кг)	147,5±8,2	0,29±0,01 ^a	47,6±1,7
Антитіло III (10 мг/кг)	157,3±4,5	0,23±0,01 ^b	44,8±1,5 ^b
Середнє арифметичне + SEM			
^a Статистично значуще порівняно з симульовано оперованою групою (p < 0,05)			
^b Статистично значуща різниця порівняно з групою, яка одержувала контрольний IgG (p < 0,05)			
nd, не визначалось			

Антитіло III продемонструвало відсутність впливу на систолічний кров'яний тиск, оскільки в усіх групах була зареєстрована гіпертензія через 12 тижнів після операції (Таблиця 7). Крім того, результатом обробки антитілом III в дозі 10 мг/кг було поліпшення функції нирок, про що свідчить значне зниження сироваткового креатиніну і BUN в порівнянні з групою, яка одержувала контрольний IgG (Таблиця 7).

15

Таблиця 8

Оцінка сечового TGF-альфа, сечового MIP-2 і ниркової патології

Кінцева точка	Співвідношення сечового TGF-альфа і креатиніну на 8 тижні (пг/мг)	Співвідношення сечового MIP-2 і креатиніну на 12 тижні (пг/мг)	Оцінка у балах патологічного білка тубуліна на 16 тижні (1-5)	Оцінка у балах патологічної мезангіальної матриці на 16 тижні (1-5)	Оцінка у балах патологічного інтерстиціального фіброзу на 16 тижні (1-5)
Симульовано оперовані	115±4	Неможливо визначити	0±0	0±0	0,25±0,25
Контрольний IgG (10 мг/кг)	102±53	22,8±7,4	2,55±0,16	1,91±0,28	2,09±0,16
Антитіло III (1 мг/кг)	74±18	nd	2,17±0,11	1,58±0,15	1,83±0,21
Антитіло III (10 мг/кг)	19±5 ^a	5,6±0,9 ^a	2,08±0,08 ^a	**1,42±0,15	1,42±0,15 ^a
Середнє арифметичне ± SEM					
^a Статистично значуща різниця порівняно з групою, яка одержувала контрольний IgG (p < 0,05)					
nd, не визначалось					

Було продемонстроване статистично значуще зниження сечового TGF-альфа і сечового MIP-2 на 8 тижні і 12 тижні після операції, відповідно, при дозі антитіла III, що дорівнювала 10 мг/кг, в порівнянні з групою, яка одержувала контрольний IgG (Таблиця 8). Крім того, було продемонстроване статистично значуще зниження ниркової патології для білка тубуліна та інтерстиціального фіброзу і зменшення розширення мезангіальної матриці при дозі антитіла III, що дорівнювала 10 мг/кг, в порівнянні з групою, яка одержувала контрольний IgG (Таблиця 8).

Приклад 6: Альбумінурія і ниркова патологія на мишачій моделі (унінефректомізовані миші лінії db/db) ураження нирок діабетичного походження

Модель унінефректомізованих мишей лінії db/db являє собою модель діабетичної нефропатії. [Ninichuk et al., Eur J Med Res. 2007 Aug 16;12(8):351-5]. Модель унінефректомізованих мишей лінії db/db використовують для визначення впливу антитіла III на показники ниркового захворювання, спричиненого діабетом. Хірургічну операцію з унінефректомії ("UniNx") на мишах лінії db/db на фоні C57BLKS/J здійснюють у віці 4 тижнів з видаленням правої нирки. Довільний розподіл на групи по 12 мишей робиться у віці 8 тижнів за співвідношенням кількості альбуміна і креатиніну, рівнями глюкози у крові та масою тіла. Всі миші є гіперглікемічними на початку кожного дослідження. Ізотиповий контрольний IgG або антитіло III вводять підшкірним шляхом, починаючи з 9-тижневого віку, і продовжують введення один раз на тиждень до 25-тижневого віку. Дослідження 1 здійснюють з антитілом III у дозах 0,3 мг/кг і 10 мг/кг та ізотиповим контрольним IgG у дозі 10 мг/кг. Кінцевими точками дослідження 1 є виживаність, % HbA1c, альбумінурія, сечовий TGF-альфа, маса нирок і ниркова патологія. Дослідження 2 здійснюють на групах, яким вводять антитіло III у дозі 30 мг/кг, 10 мг/кг, 3 мг/кг і 0,3 мг/кг і ізотиповий контрольний IgG у дозі 30 мг/кг. Ціллю дослідження 2 є визначення таких показників як виживаність і альбумінурія.

При проведенні дослідження 1 було зареєстровано лише один випадок смерті в групі, яка одержувала контрольний IgG. Жодного випадку смерті при проведенні дослідження 2 зареєстровано не було.

Збирання сечі та вимірювання альбумінурії

Сеча збирається методом місцевого збирання протягом періоду часу 2-4 год. Окрему мишу вміщують на 96-лунковий поліпропіленовий мікропланшет і накривають камерою з оргскла з отворами для дихання, але без доступу до їжі або води. На кінець вказаного періоду часу сечу видаляють з мікропланшету за допомогою мікропіпетки, поміщають на лід, центрифугують, і аналізують на вміст альбуміну і креатиніну. Альбумінурія визначається як відношення альбуміну в сечі до креатиніну (мкг/мг).

Визначення % HbA1c

% HbA1c використовується як критерій гіперглікемії в кінці дослідження. EDTA-плазму одержують при розтині шляхом серцевої пункції. Зразки крові центрифугують при 2000×g

протягом 20 хв для видалення клітин крові та одержання плазми. Зразки плазми аналізують на гемоглобін A1c і загальний гемоглобін. Виходячи з цих даних, обчислюють % HbA1c.

Маса нирок

Нирки видаляють при розтині для визначення їх маси.

5 Визначення сечового TGF-альфа методом ELISA

Сечу, одержану методом місцевого збирання, концентрують (5×) за допомогою 0,5 мл центрифужного ультра фільтру (компанія Amicon), що містить мембрану з 3К смугою пропускання (компанія Ultracel), при 14000×g протягом 30 хв, після чого концентровані зразки сечі збирають. За методикою типа сендвіч-метода здійснюють аналіз ELISA на мишачий TGF-альфа. Паціючий TGF-альфа використовують як стандарт при проведенні аналізу TGF-альфа методом ELISA. 96-лункові полістиролові планшети сенсibiliзують 3 мкг/мл антитіла III протягом ночі при температурі 4 °C. Планшети промивають, блокують блокувальним буфером, знову промивають, після чого додають концентровані зразки сечі. Через 2 год. при кімнатній температурі планшети промивають, після чого додають "друге" біотинізоване поліклональне анти-hTGF-альфа антитіло. Через 2 год. при кімнатній температурі планшети промивають, і інкубують зі стрептавідином-HRP протягом 30 хв. Сигнал генерують за допомогою TMB-субстрату, і реакцію зупиняють доданням 2н розчину H₂SO₄. Дані з оптичної густини одержують за допомогою планшет-рідери SpectraMax 190 (компанія Molecular Devices), і вказані дані передають у Microsoft Excel 2007 і Sigmaplot v.9.01 для аналізу.

20 Патологія нирок

Нирки видаляють після закінчення дослідження, видаляють капсули, після чого фіксують у формаліні і обробляють парафіном для секціонування у відповідності зі стандартною методикою. Зрізи нирок оцінюються патологоанатомом на ураження. Мезангіальну матрицю, розширення ниркових лоханок і ступінь гломерулярного фіброзу піддають напівкількісній оцінці за наведеною нижче шкалою: немає (0), мінімальний(-е) (1), невеликий(-е) (2), помірний(-е) (3), явно виражений(-е) (4) і тяжкий(-е) (5). Збільшення об'єму гломерулярної мезангіальної матриці і потовщення базальної мембрани оцінюють на зрізах, забарвлених гематоксиліном та еозином ("H&E") і періодичною обробкою кислотою і шифовою основою (PAS). Зрізи нирок, забарвлені трихромом за методом Массона, оцінюють для визначення ступеню фіброзу (гломерулярного).

30 Статистичні методи

Всі дані аналізують із застосуванням програмного забезпечення JMP v.8.0 (компанія SAS Institute). Оцінку патологічних змін у балах піддають статистичній обробці шляхом аналізу спряженості ознак і точного критерію Фішера. Статистичний аналіз альбумінурії (ACR) здійснюють із застосуванням підгонкової моделі з нетрансформованими даними і вихідної ACR на 8 тижні як коваріат. Розвиток ACR аналізують шляхом порівняння даних 24 тижня з даними 16 тижня у межах кожної групи за допомогою дисперсійного аналізу і непарного t-критерію Стюдента. Зміну ACR від 16 тижня до 24 тижня визначають за допомогою дисперсійного аналізу і непарного t-критерію Стюдента. Статистично значущим вважається р-значення <0,05. Усі інші дані оцінюються шляхом дисперсійного аналізу з log-трансформованими даними і непарним t-критерієм Стюдента.

Таблиця 9

Дослідження 1 - Розвиток альбумінурії

Вік (тижні)	8	12	16	20	24	16-24 тижні, зміна ACR (мкг/мг)	16-24 тижні, зміна ACR (%)
Здорові, худі	nd	15±2	19±3	13±3	12±2	nd	nd
Db/db, контрольний IgG @ 10 мг/кг	273±59 ^a	903±125 ^a	1551±180 ^a	2384±257 ^a	3228±488 ^{ac}	1677±419	108±27
Db/db, антитіло III @ 0,3 мг/кг	299±63 ^a	913±174 ^a	1573±209 ^a	1911±222 ^a	2248±417 ^{ab}	675±332 ^b	43±21
Db/db, антитіло III @ 10 мг/кг	291±55 ^a	1002±107 ^a	965±141 ^a	1433±90 ^{ab}	1426±230 ^{ab}	461±219 ^b	48±23
Середнє арифметичне ± SEM							
^a Статистично значуще у порівнянні з групою здорових худих тварин (p < 0,05)							
^b Статистично значуща різниця у порівнянні з групою, яка одержувала контрольний IgG (p < 0,05)							
^c Статистично значуще відносно часової точки 16 тижнів у межах цієї групи (p < 0,05)							

- 5 У дослідженні 1 було продемонстроване дозозалежне зниження альбумінурії в порівнянні з групою, яка одержувала контрольний IgG з антитілом III (Таблиця 9). Впродовж двох останніх місяців розвиток альбумінурії був меншим у обох групах, які одержували антитіло III, порівняно з групою, яка одержувала контрольний IgG. Зміна альбумінурії в групі протягом останніх двох місяців дослідження показала значне збільшення альбумінурії з 16 тижня по 24 тижень у групі, яка одержувала контрольний IgG, з відсутністю подібного явища у групах, які одержували антитіло III (Таблиця 9). У дослідженні 2 було продемонстроване дозозалежне зниження розвитку з перебігом часу у разі антитіла III, в порівнянні з контрольним IgG (Таблиця 9).

Таблиця 10

Дослідження 2 - Розвиток альбумінурії

Вік (тижні)	8	12	16	20	24	16-24 тижні, зміна ACR (мкг/мг)	16-24 тижні, зміна ACR (%)
Здорові, худі	nd	13±0	15±0	9±0	9±0	nd	nd
Db/db, контрольний IgG @ 30 мг/кг	358±76 ^a	1325±271 ^a	1621±350 ^a	2219±320 ^a	2397±242 ^a	776±379	48±23
Db/db, антитіло III @ 0,3 мг/кг	356±60 ^a	1200±213 ^a	2410±393 ^a	2286±416 ^a	2086±394 ^a	-323±279 ^b	-13±12 ^b
Db/db, антитіло III @ 3 мг/кг	367±77 ^a	1122±248 ^a	1670±193 ^a	1427±204 ^a	1544±264 ^{ab}	-126±208 ^b	-8±12 ^b
Db/db, антитіло III @ 10 мг/кг	326±77 ^a	1107±304 ^a	1659±286 ^a	1202±189 ^{ab}	1171±252 ^{ab}	-489±275 ^b	-29±17 ^b
Db/db, антитіло III @ 30 мг/кг	308±68 ^a	1155±179 ^a	1669±223 ^a	1334±237 ^a	950±132 ^{ac}	-719±230 ^b	-43±14 ^b
Середнє арифметичне і SEM							
^a Статистично значуще у порівнянні з групою здорових худих тварин (p < 0,05)							
^b Статистично значуща різниця у порівнянні з групою, яка одержувала контрольний IgG (p < 0,05)							
^c Статистично значуще відносно часової точки 16 тижнів у межах групи (p < 0,05)							

10 Зміна альбумінурії протягом останніх двох місяців Дослідження 2 показала, що антитіло III у дозі 30 мг/кг призвело до значного зниження альбумінурії протягом останніх двох місяців дослідження, в той час як альбумінурія в групі, яка одержувала контрольний IgG, за той же період часу збільшилася (Таблиця 10).

Таблиця 11

Оцінка HbA1c, маси нирок, сечового TGF-альфа і ниркової патології

Кінцева точка	HbA1c (%)	Маса нирок (мг)	8 тижень, сечовий TGF-альфа (пг/мг)	24 тижень, сечовий TGF-альфа (пг/мг)	Оцінка у балах патології мезангіальної матриці (1-5)	Оцінка у балах патологічного розширення ниркових лоханок (1-5)
Здорові, худі	4,1±0,0	138±4	nd	nd	0±0	0±0
Db/db, контрольний IgG @ 10 мг/кг	11,1±0,3 ^a	396±13 ^a	215±17	199±18	1,92±0,08 ^a	1,67±0,14 ^a
Db/db, антитіло III @ 0,3 мг/кг	11,2±0,4 ^a	375±14 ^a	208±17	145±30 ^b	1,64±0,15 ^a	0,45±0,16 ^{ab}
Db/db, антитіло III @ 10 мг/кг	10,7±0,4 ^a	359±2 ^{ab}	193±16	3±1 ^b	1,17±0,11 ^{ab}	0,25±0,13 ^{ab}
Середнє арифметичне ± SEM						
^a Статистично значуща різниця у порівнянні з групою здорових худих тварин (p < 0,05)						
^b Статистично значуща різниця у порівнянні з групою, яка одержувала контрольний IgG (p < 0,05)						

15 Маса лівої нирки була значно меншою в групі, яка одержувала антитіло III у дозі 10 мг/кг, порівняно з групами, які одержували контрольний IgG у дозі 10 мг/кг і антитіло III у дозі 0,3 мг/кг (Таблиця 11). Було продемонстроване значне зниження сечового TGF-альфа протягом

дослідження в групі, яка одержувала антитіло III у дозі 10 мг/кг (Таблиця 11). Крім того, % HbA1c в усіх експериментальних групах був значно вищим в порівнянні з контрольною групою худих мишей (Таблиця 11). Обробка антитілом III не впливає на % HbA1c в порівнянні з групою, яка одержувала контрольний IgG (Таблиця 11). Крім того, було продемонстроване значне

5 зниження оцінки в балах ниркової патології стосовно розширення мезангіальної матриці і розширення ниркових лоханок у разі застосування антитіла III у дозі 10 мг/кг в порівнянні з контрольним IgG (Таблиця 11).

Приклад 7: Токсичні і токсикокінетичні дослідження на макаках-крабоїдах, які щотижня впродовж 6 тижнів одержували внутрішньовенну ін'єкцію ударної дози

10 На мавпах було проведено токсикологічне дослідження тривалістю 6 тижнів, щоб оцінити, чи приведе пригнічення TGF-альфа і епірегуліну до виникнення токсичності для шкіри. Мавпам вводили носій і щотижнево впродовж 6 тижнів внутрішньовенною ін'єкцією (IV) вводили антитіло I у дозі 10 мг/кг або 100 мг/кг. Місце ін'єкції змінювали поперемінно між підшкірною веною правої і лівої лапки. Корм надавали двічі на день (один раз вранці і один раз у другій половині дня).

15 Вранішній корм надавали незабаром після введення дози у дні введення дози. В ході дослідження домішки і лікарські засоби з високим вмістом кальцію не надавали. Раз на тиждень (субота) надавали дитячі полівітаміни (через 96 год. після відбору проби крові після введення дози, там, де це доречно).

Впродовж дослідження мавп утримували в "розділених парних" сітчастих клітках з

20 нержавіючої сталі і тонких дощечок. Протягом перших трьох тижнів тварин утримували окремо. Протягом часу дослідження, що залишився, тварин розміщують парами в досліджуваних групах, починаючи з кожної другої половини дня і до наступного ранку, для того, щоб надати додаткові можливості для соціалізації.

При проведенні цього дослідження на токсичність максимальна доза, введена без

25 негативного впливу, становила 100 мг/кг антитіла I. У експериментальних тварин жодних змін на шкірі не було. Інших патологічних змін також не було.

Лістинг послідовностей

CDRs важкого ланцюга

SEQ ID NO:1

GYTFTDAYIN

SEQ ID NO:2

WIWPGPVITYYNPKFKG

SEQ ID NO:3

REVLSPFAY

CDRs легкого ланцюга

SEQ ID NO:4	RSSQSIVHSTGNTYLE
SEQ ID NO:5	KVSNRFS
SEQ ID NO:6	FHGTHVPYT

Варіабельні ділянки важкого ланцюга

SEQ ID NO:7 (антитіло I і антитіло II)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTDAYINWVRQAPQGQGLEWMGWIWPGPVI
 TYYNPKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARREVLSPFAYWGQGTITVTV
 SS

SEQ ID NO:8 (Антитіло III)

QVQLQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDAYINWVKQRPQGQGLEWIGWIWPGPVITY
 YNPKFKGKATLTVDKSSSTAYMLSSLTSEDSAFYFCARREVLSPFAYWGQGLTVTVSA

Варіабельні ділянки легкого ланцюга

SEQ ID NO:9 (Антитіло I)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSIVHSTGNTYLEWYQQKPGQPPKLLIYKVSNRFS
 GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCFHGTHVPYTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:10 (Антитіло II)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSIVHSTGNTYLEWYQQKPGKAPKLLIYKVSNRFS
 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFHGTHVPYTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:11 (Антитіло III)

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS
 GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFHGTHVPYTFGGGTKLEIK

Непроцесований важкий ланцюг

SEQ ID NO:12 (антитіло I і антитіло II)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTDAYINWVRQAPQGQGLEWMGWIWPGPVI
 TYYNPKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARREVLSPFAYWGQGTITVTV
 SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGP
 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE
 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR
 WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG

Непроцесовані легкі ланцюги

SEQ ID NO:13 (антитіло I)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSIVHSTGNTYLEWYQQKPGQPPKLLIYKVSNRFS
GVPRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCFHGTHVPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:14 (антитіло II)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSQSIVHSTGNTYLEWYQQKPGKAPKLLIYKVSNRFS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCFHGTHVPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS
TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Нуклеотидні послідовності

Варіабельна ділянка важкого ланцюга

SEQ ID NO:15

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCAGTGAA
GGTTTCCTGCAAGGCATCTGGCTACACCTTCACTGACGCGTATATAAACTGGGTGCG
ACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATTGGCCTGGACCCGTTA
TTACTTACTACAATCCGAAGTTCAAGGGCAGAGTCACCATTACCGCGGACAAATCCA
CGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTAT
TACTGTGCGAGAAGGGAAGTACTATCCCCGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGAACCAC
GGTACCCGTCTCCTCA

Нуклеотидні послідовності

Варіабельні ділянки легкого ланцюга

SEQ ID NO:16

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCC
ACCATCAACTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTACTGGAAACACCTATTTA
GAATGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACAAAGTTTCC
AACCGATTTTCTGGGGTCCCTGACCGATTCACTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTT
ACTCTACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTTTTCAC
GGCACTCATGTTCCGTACACGTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

SEQ ID NO:17

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCTCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTC
ACCATCACTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTACTGGAAACACCTATTTA
GAATGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATAAAGTTTC

CAACCGATTTTCTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTT
CACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGAACCTTACTACTGTTTTCAC
GGCACTCATGTTCCGTACACGTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

Зрілий людський TGF-альфа

SEQ ID NO:18

VVSHFNDCPDSHTQFCFHGTCRFLVQEDKPACVCHSGYVGARCEHADLLA

Зрілий мишачий (Mus musculus) TGF-альфа

SEQ ID NO:19

VVSHFNKCPDSHTQYCFHGTCTRFLVQEEKPACVCHSGYVGVRCEHADLLA

Зрілий пацючий (Rattus norvegicus) TGF-альфа

SEQ ID NO:20

VVSHFNKCPDSHTQYCFHGTCTRFLVQEEKPACVCHSGYVGVRCEHADLLA

Зрілий TGF-альфа макак-крабодів (Macaca fascicularis)

SEQ ID NO:21

VVSHFNDCPDSHTQFCFHGTCRFLVQEDKPACVCHSGYVGARCEHADLLA

Зрілий людський епірегулін – додток N-кінцевого метіоніну

SEQ ID NO:22

MVSITKCSSDMNGYCLHGQCIYLVDMSQNYCRCEVGYTGVRCEHFFL

Зрілий мишачий (Mus musculus) епірегулін - додток N-кінцевого метіоніну

SEQ ID NO:23

MVQITKCSSDMNGYCLHGQCIYLVDMREKFCRCEVGYTGRLCEHFFL

Зрілий епірегулін макак-крабодів (Macaca fascicularis)

SEQ ID NO:24

VSITKCNDSMNGYCLHGQCIYLVDMSQNYCRCEVGYTGVRCEHFYL

Зрілий людський епіген

SEQ ID NO:25

AVTVTPPITAQQADNIEGPIALKFSLCLEDHNSYINGACAFHHELEKAICRCFTGYTGE
RCEHLTLTSYA

Зрілий мишачий (Mus musculus) епіген

SEQ ID NO:26

LKFSLPCLEDHNSYINGACAFHHELEKQAICRCFTGYTGQRCEHLTLTSYA

Зрілий людський EGF - додток N-кінцевого метіоніну

SEQ ID NO:27

MNSDSECLSHDGYCLHDGVCMYEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKWWELR

Зрілий людський HBEGF

SEQ ID NO:28

DLQEADLLRLVTLSKPKALATPNKEEHGKRKKKGKGLGKKRDPCLRKYKDFCIHGE
CKYVKELRAPSCICHPGYHGERCHGLSL

Зрілий людський бетацелюлін

SEQ ID NO:29

DGNSTRSPETNGLLCGDPEENCAATTTQSKRKGHFSRCPKQYKHICYGRCRFVVAEQT
PSCVCDEGYIGARCERVDLFY

Зрілий людський амфірегулін

SEQ ID NO:30

SVRVEQVVKPPQNKTESENTSDKPKRKKKGKNGKNRRNRKKKNPCNAEFQNFICIGE
CKYIEHLEAVTCKCQEQYFGERCGEKSMKTHSMIDSSLSK

Непроцесоване антитіло III з важким ланцюгом – Мишаче антитіло

SEQ ID NO:31

QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDAYINWVKQRPQGQLEWIGWIWPGPVITY
YNPKFKGKATLTVDKSSSTAYMLLSSLTSEDSAFYFCARREVLSPFAYWGQGLTVTVSA
AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQS
DLYTLSSSVTPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIF
PPKPKDVLITITLPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSV
SELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKV
SLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVNQSWEAGN
TFTCSVLHEGLHNHTEKSLSHSPGK

Непроцесоване антитіло III з легким ланцюгом – Мишаче антитіло

SEQ ID NO:32

DVLMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS
GVPRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYYCFHGHVPHYTFGGGTKEIKRADAAPTVS
IFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSEKQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMS
STLTLTKEDEYERHNSYTCEATHKSTSTSPIVKSFNRNEC

Зрілий людський епірегулін

SEQ ID NO:33

VSITKCSSDMNGYCLHGQCIYLVDMSQNYCRCEVGYTGVRCEHFFL

ЛІСТИНГ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Eli Lilly and Company

<120> АНТИТИЛА, ЯКІ ЗВ'ЯЗУЮТЬ TGF-АЛЬФА ТА ЕПІРЕГУЛІН

<130> X18890

<150> 61/472338

<151> 2011-04-06

<160> 33

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 1

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ala Tyr Ile Asn

1 5 10

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 2

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

Gly

<210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
 <400> 3

Arg Glu Val Leu Ser Pro Phe Ala Tyr
 1 5

<210> 4
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетичний конструкт
 <400> 4

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 5

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 6

Phe His Gly Thr His Val Pro Tyr Thr

1 5

<210> 7

<211> 118

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 7

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ala

20 25 30

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

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Pro Val Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile 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

Ala Arg Arg Glu Val Leu Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8

<211> 118

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 8

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

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

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

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Pro Val Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Arg Glu Val Leu Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 9

<211> 112

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 9

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

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

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
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 Thr Ile
65 70 75 80

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

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

<210> 10

<211> 112

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 10

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 Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

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

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

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe His Gly
85 90 95

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

<210> 11

<211> 112

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 11

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 Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys 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 His Gly
85 90 95

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

<210> 12

<211> 444

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 12

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

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

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

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Pro Val Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile 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

Ala Arg Arg Glu Val Leu Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln			
	165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser			
	180	185	190
Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser			
	195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys			
	210	215	220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu			
	225	230	235
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu			
	245	250	255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln			
	260	265	270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys			
	275	280	285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu			
	290	295	300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys			
	305	310	315
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys			
	325	330	335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser			
	340	345	350

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

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440

<210> 13

<211> 219

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 13

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

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

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 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 Thr Ile
65                      70                      75                      80

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

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
                      115                     120                     125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130                     135                     140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145                     150                     155                     160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
                      165                     170                     175

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210                     215

```

<210> 14

<211> 219

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 14

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 Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

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

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

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe His Gly
85 90 95

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 15

<211> 354

<212> DNA

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 15

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc agtgaagggt 60

tcctgcaagg catctggcta caccttcact gacgcgtata taaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atttggcctg gacccgttat tacttactac 180

aatccgaagt tcaagggcag agtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaagggaa 300

gtactatccc cgtttgctta ctggggccaa ggaaccacgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 16

<211> 336

<212> DNA

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 16

gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc	60
atcaactgca gatctagtca gagcattgta catagtactg gaaacaccta tttagaatgg	120
taccagcaga aaccaggaca gcctcctaag ctgctcattt acaaagtttc caaccgattt	180
tctgggggtcc ctgaccgatt cagtggcagc gggctctggga cagatttcac tctcaccatc	240
agcagcctgc aggtgaaga tgtggcagtt tattactggt ttcacggcac tcatgttccg	300
tacacgttcg gcggaggag caaggtggag atcaaa	336

<210> 17

<211> 336

<212> DNA

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 17

gacatccaga tgaccagtc tccatcctct ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgca gatctagtca gagcattgta catagtactg gaaacaccta tttagaatgg	120
tatcagcaga aaccaggaa agcccctaag ctctgatct ataaagtttc caaccgattt	180
tctgggggtcc catcaaggtt cagtggcagt ggatctggga cagatttcac tctcaccatc	240
agcagctgc aacctgaaga ttttgcaact tactactggt ttcacggcac tcatgttccg	300
tacacgttcg gcggaggag caaggtggag atcaaa	336

<210> 18

<211> 50

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Val Val Ser His Phe Asn Asp Cys Pro Asp Ser His Thr Gln Phe Cys
1 5 10 15

Phe His Gly Thr Cys Arg Phe Leu Val Gln Glu Asp Lys Pro Ala Cys
20 25 30

Val Cys His Ser Gly Tyr Val Gly Ala Arg Cys Glu His Ala Asp Leu
35 40 45

Leu Ala

50

<210> 19

<211> 50

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 19

Val Val Ser His Phe Asn Lys Cys Pro Asp Ser His Thr Gln Tyr Cys
1 5 10 15

Phe His Gly Thr Cys Arg Phe Leu Val Gln Glu Glu Lys Pro Ala Cys
20 25 30

Val Cys His Ser Gly Tyr Val Gly Val Arg Cys Glu His Ala Asp Leu
35 40 45

Leu Ala

50

<210> 20

<211> 50

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 20

Val Val Ser His Phe Asn Lys Cys Pro Asp Ser His Thr Gln Tyr Cys
1 5 10 15

Phe His Gly Thr Cys Arg Phe Leu Val Gln Glu Glu Lys Pro Ala Cys
20 25 30

Val Cys His Ser Gly Tyr Val Gly Val Arg Cys Glu His Ala Asp Leu
35 40 45

Leu Ala
50

<210> 21

<211> 50

<212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 21

Val Val Ser His Phe Asn Asp Cys Pro Asp Ser His Thr Gln Phe Cys
1 5 10 15

Phe His Gly Thr Cys Arg Phe Leu Val Gln Glu Asp Lys Pro Ala Cys
20 25 30

Val Cys His Ser Gly Tyr Val Gly Ala Arg Cys Glu His Ala Asp Leu
35 40 45

Leu Ala
50

<210> 22

<211> 47

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Зрілий людський епірегулін з доданням N-кінцевого метіоніну

<400> 22

Met Val Ser Ile Thr Lys Cys Ser Ser Asp Met Asn Gly Tyr Cys Leu
1 5 10 15

His Gly Gln Cys Ile Tyr Leu Val Asp Met Ser Gln Asn Tyr Cys Arg
20 25 30

Cys Glu Val Gly Tyr Thr Gly Val Arg Cys Glu His Phe Phe Leu
35 40 45

<210> 23

<211> 47

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Зрілий мишачий (*Mus musculus*) епірегулін з доданням N-кінцевого метіоніну

<400> 23

Met Val Gln Ile Thr Lys Cys Ser Ser Asp Met Asp Gly Tyr Cys Leu
1 5 10 15

His Gly Gln Cys Ile Tyr Leu Val Asp Met Arg Glu Lys Phe Cys Arg
20 25 30

Cys Glu Val Gly Tyr Thr Gly Leu Arg Cys Glu His Phe Phe Leu
35 40 45

<210> 24

<211> 46

<212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 24

Val Ser Ile Thr Lys Cys Asn Ser Asp Met Asn Gly Tyr Cys Leu His
1 5 10 15

Gly Gln Cys Ile Tyr Leu Val Asp Met Ser Gln Asn Tyr Cys Arg Cys
20 25 30

Glu Val Gly Tyr Thr Gly Val Arg Cys Glu His Phe Tyr Leu
35 40 45

<210> 25

<211> 72

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 25

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

Glu Gly Pro Ile Ala Leu Lys Phe Ser His Leu Cys Leu Glu Asp His
20 25 30

Asn Ser Tyr Cys Ile Asn Gly Ala Cys Ala Phe His His Glu Leu Glu
35 40 45

Lys Ala Ile Cys Arg Cys Phe Thr Gly Tyr Thr Gly Glu Arg Cys Glu
50 55 60

His Leu Thr Leu Thr Ser Tyr Ala
65 70

<210> 26
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 26

Leu Lys Phe Ser His Pro Cys Leu Glu Asp His Asn Ser Tyr Cys Ile
 1 5 10 15

Asn Gly Ala Cys Ala Phe His His Glu Leu Lys Gln Ala Ile Cys Arg
 20 25 30

Cys Phe Thr Gly Tyr Thr Gly Gln Arg Cys Glu His Leu Thr Leu Thr
 35 40 45

Ser Tyr Ala
 50

<210> 27
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Зрілий людський EGF з доданням N-кінцевого метіоніну

<400> 27

Met Asn Ser Asp Ser Glu Cys Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys Leu
 1 5 10 15

His Asp Gly Val Cys Met Tyr Ile Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala Cys
 20 25 30

Asn Cys Val Val Gly Tyr Ile Gly Glu Arg Cys Gln Tyr Arg Asp Leu
 35 40 45

Lys Trp Trp Glu Leu Arg
 50

<210> 28
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 28

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

Lys Pro Gln Ala Leu Ala Thr Pro Asn Lys Glu Glu His Gly Lys Arg
 20 25 30

Lys Lys Lys Gly Lys Gly Leu Gly Lys Lys Arg Asp Pro Cys Leu Arg
 35 40 45

Lys Tyr Lys Asp Phe Cys Ile His Gly Glu Cys Lys Tyr Val Lys Glu
 50 55 60

Leu Arg Ala Pro Ser Cys Ile Cys His Pro Gly Tyr His Gly Glu Arg
 65 70 75 80

Cys His Gly Leu Ser Leu
 85

<210> 29
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 29

Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly
1 5 10 15

Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys
20 25 30

Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys
35 40 45

Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys
50 55 60

Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp Leu Phe Tyr
65 70 75 80

<210> 30

<211> 98

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 30

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

Ser Glu Asn Thr Ser Asp Lys Pro Lys Arg Lys Lys Lys Gly Gly Lys
20 25 30

Asn Gly Lys Asn Arg Arg Asn Arg Lys Lys Lys Asn Pro Cys Asn Ala
35 40 45

Glu Phe Gln Asn Phe Cys Ile His Gly Glu Cys Lys Tyr Ile Glu His
50 55 60

Leu Glu Ala Val Thr Cys Lys Cys Gln Gln Glu Tyr Phe Gly Glu Arg
65 70 75 80

Cys Gly Glu Lys Ser Met Lys Thr His Ser Met Ile Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Lys

<210> 31

<211> 442

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 31

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

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

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

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Pro Val Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Arg Glu Val Leu Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro			
115	120	125	
Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly			
130	135	140	
Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn			
145	150	155	160
Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln			
	165	170	175
Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr			
	180	185	190
Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser			
	195	200	205
Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro			
210	215	220	
Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro			
225	230	235	240
Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys			
	245	250	255
Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp			
	260	265	270
Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu			
	275	280	285
Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met			
290	295	300	

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser
305 310 315 320

Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
325 330 335

Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln
340 345 350

Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe
355 360 365

Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu
370 375 380

Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe
385 390 395 400

Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn
405 410 415

Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr
420 425 430

Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 32

<211> 219

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний конструкт

<400> 32

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	Ser	Ile	Val	His	Ser
			20					25					30		
Thr	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Glu	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	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	His	Gly
				85					90					95	
Thr	His	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		
Arg	Ala	Asp	Ala	Ala	Pro	Thr	Val	Ser	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu
		115					120				125				
Gln	Leu	Thr	Ser	Gly	Gly	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Phe	Leu	Asn	Asn	Phe
	130					135					140				
Tyr	Pro	Lys	Asp	Ile	Asn	Val	Lys	Trp	Lys	Ile	Asp	Gly	Ser	Glu	Arg
145					150					155					160
Gln	Asn	Gly	Val	Leu	Asn	Ser	Trp	Thr	Asp	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser
				165					170				175		
Thr	Tyr	Ser	Met	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Lys	Asp	Glu	Tyr	Glu
			180					185					190		

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
195 200 205

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210 215

<210> 33
<211> 46
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 33

Val Ser Ile Thr Lys Cys Ser Ser Asp Met Asn Gly Tyr Cys Leu His
1 5 10 15

Gly Gln Cys Ile Tyr Leu Val Asp Met Ser Gln Asn Tyr Cys Arg Cys
20 25 30

Glu Val Gly Tyr Thr Gly Val Arg Cys Glu His Phe Phe Leu
35 40 45

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Антитіло, яке зв'язує TGF-альфа і епірегулін, яке містить легкий ланцюг і важкий ланцюг, де вказаний легкий ланцюг містить варіабельну ділянку легкого ланцюга (LCVR), а вказаний важкий ланцюг містить варіабельну ділянку важкого ланцюга (HCVR), де LCVR включає в себе амінокислотні послідовності LCDR1, LCDR2 і LCDR3, а HCVR включає в себе амінокислотні послідовності HCDR1, HCDR2 і HCDR3, причому LCDR1 являє собою послідовність SEQ ID NO: 4, LCDR2 являє собою послідовність SEQ ID NO: 5, LCDR3 являє собою послідовність SEQ ID NO: 6, HCDR1 являє собою послідовність SEQ ID NO: 1, HCDR2 являє собою послідовність SEQ ID NO: 2 і HCDR3 являє собою послідовність SEQ ID NO: 3.
- 10 2. Антитіло за п. 1, де амінокислотна послідовність LCVR являє собою послідовність SEQ ID NO: 9 або послідовність SEQ ID NO: 10.
- 15 3. Антитіло за п. 1 або п. 2, де амінокислотна послідовність HCVR являє собою послідовність SEQ ID NO: 7.
4. Антитіло за будь-яким з пп. 1-3, де амінокислотна послідовність LCVR являє собою послідовність SEQ ID NO: 9, а амінокислотна послідовність HCVR являє собою послідовність SEQ ID NO: 7.
- 20 5. Антитіло за будь-яким з пп. 1-4, де амінокислотна послідовність легкого ланцюга являє собою послідовність SEQ ID NO: 13 або послідовність SEQ ID NO: 14.
6. Антитіло за будь-яким з пп. 1-5, де амінокислотна послідовність важкого ланцюга являє собою послідовність SEQ ID NO: 12.
7. Антитіло за будь-яким з пп. 1-6, що містить два легкі ланцюги, де амінокислотна послідовність кожного легкого ланцюга являє собою послідовність SEQ ID NO: 13, і два важкі ланцюги, де амінокислотна послідовність кожного важкого ланцюга являє собою послідовність SEQ ID NO: 12.
- 25 8. Антитіло за будь-яким з пп. 1-3 або 5-6, що містить два легкі ланцюги, де амінокислотна послідовність кожного легкого ланцюга являє собою послідовність SEQ ID NO: 14, і два важкі ланцюги, де амінокислотна послідовність кожного важкого ланцюга являє собою послідовність SEQ ID NO: 12.
- 30 9. Фармацевтична композиція, яка містить антитіло за будь-яким з пп. 1-8 і щонайменше один(ну) фармацевтично прийнятний(у) носій, розріджувач або допоміжну речовину.

10. Спосіб лікування діабетичної нефропатії у пацієнта, який включає введення вказаному пацієнту антитіла за будь-яким з пп. 1-8.
11. Антитіло за будь-яким з пп. 1-8 для застосування в терапії.
12. Антитіло за будь-яким з пп. 1-8 для застосування в лікуванні діабетичної нефропатії.
- 5 13. Антигензв'язувальний фрагмент за будь-яким з пп. 1-8.
14. Фармацевтична композиція, яка містить антигензв'язувальний фрагмент за п. 13 і щонайменше один(ну) фармацевтично прийнятний(у) носій, розріджувач або допоміжну речовину.
- 10 15. Спосіб лікування діабетичної нефропатії у пацієнта, який включає введення вказаному пацієнту антигензв'язувального фрагмента за п. 13.
16. Антигензв'язувальний фрагмент за п. 13 для застосування в терапії.
17. Антигензв'язувальний фрагмент за п. 13 для застосування в лікуванні діабетичної нефропатії.

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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