



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **111954** (13) **C2**

(51) МПК (2016.01)

**C07K 16/24** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 29/00**

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки:	<b>а 2013 05873</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и):	<b>Бембрідж Гері Пітер (GB), Чунг Чун-ва (GB), Фіні Марія (GB), Форд Сусанна Карен (GB), Кірбі Ян (GB), Макадам Рус (GB)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки:	<b>21.11.2011</b>	<b>(73)</b> Власник(и):	<b>ГЛАКСО ГРУП ЛІМІТЕД, 980 Great West Road Brentford, Middlesex TW8 9GS, United Kingdom (GB)</b>
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід:	<b>11.07.2016</b>	<b>(74)</b> Представник:	<b>Крилова Надія Іванівна, реєстр. №30</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>61/416,495</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	<b>WO 2005/095457 A2, 13.10.2005 WO 99/48523 A2, 30.09.1999</b>
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>23.11.2010</b>		
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заяву:	<b>US</b>		
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заяву:	<b>27.08.2013, Бюл.№ 16</b>		
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту:	<b>11.07.2016, Бюл.№ 13</b>		
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	<b>РСТ/EP2011/070604, 21.11.2011</b>		

**(54) БІЛКИ ЗВ'ЯЗУВАННЯ АНТИГЕНУ**

**(57) Реферат:**

Заявлений винахід стосується антигензв'язувального білка, що специфічно зв'язується з OSM та інгібує зв'язування OSM з рецептором gp130, але безпосередньо не взаємодіє із залишками сайту II, причому антигензв'язувальний білок за винаходом включає: CDRH3 послідовності SEQ ID NO:3; CDRH2 послідовності SEQ ID NO:2; CDRL1 послідовності SEQ ID NO:4; CDRL3 послідовності SEQ ID NO:6, CDRH1 послідовності SEQ ID NO:77 та CDRL2 послідовності SEQ ID NO:5.

UA 111954 C2



Заявлений винахід стосується імуноглобулінів, що специфічно зв'язують онкостатин М (OSM) та, зокрема, OSM людини (hOSM).

Заявлений винахід також стосується способів лікування хвороб або розладів вказаними імуноглобулінами, фармацевтичних композицій, що містять вказані імуноглобуліни та способів

виробництва. Інші втілення заявленого винаходу будуть зрозумілими з нижченаведеного опису.

Онкостатин М є глікопротеїном у 28 кДа, що належить до родини цитокінів інтелейкіну 6 (IL-6), що охоплює IL-6, фактор, що інгібує лейкемію (LIF), циліарний нейротрофічний фактор (CNTF), кардіотропін-1 (CT-1) та цитокін, подібний до кардіотропіну-1 (див. Kishimoto T et al (1995) Blood 86: 1243-1254), що описали трансмембранний рецептор сигналування gp130 (див. Taga T та Kishimoto T(1997) Annu. Rev. Immunol. 15: 797-819). Спочатку OSM відкрили завдяки його здатності інгібувати зростання клітинної лінії меланоми A375 (див. Malik N (1989) et al Mol. Cell. Biol. 9: 2847-2853), потім було знайдено ще декілька його ефектів та відмічена його роль у якості багатофункціонального посередника, подібно до інших членів родини IL-6. Онкостатин М виробляють різні типи клітин, в тому числі макрофаги, активовані Т-клітини (див. Zarling JM (1986) PNAS (USA) 83: 9739-9743), поліморфно-ядерні нейтрофіли (див. Grenier A et al (1999) Blood 93:1413-1421), еозинофіли (див. Tamura S et al (2002) Dev. Dyn. 225: 327-31) та дендритні клітини (див. Suda T et al (2002) Cytokine 17:335-340).

Також, експресію цього білка спостерігали у підшлунковій залозі, нирках, яєчках, шлунку, селезінці, мозку (див. Znoyko I et al (2005) Anat Rec A Discov Mol Клітин Evol Biol 283: 182-186) та у кістковому мозку (див. Psenak O et al (2003) Acta Haematol 109:68-75). Його головні біологічні функції полягають у активуванні ендотелію (див. Brown TJ et al (1993) Blood 82: 33-7), активуванні гострофазової відповіді (див. Benigni F et al (1996) Blood 87: 1851-1854), у кровотворенні, індукуванні клітинної проліферації або диференціації, модуляції вивільнення медіатора запалення (див. Tanaka M et al (2003) 102: 154-3162), метаболізмі кісток (див. de Hooge ASK (2002) Am J Pathol 160: 1733-1743), просуванні ангиогенезу (див. Vasse M et al (1999) Arterioscler Thromb Vase Biol 19:1835-1842) та у загоюванні ран.

Рецептори OSM ( $\beta$ -рецептор OSM, "OSMR $\beta$ ") експресуються у багатьох клітинах, в тому числі у клітинах епітелію, хондроцитах, фібробластах (див. Langdon C et al (2003) J Immunol 170: 548-555), нейронах гладких м'язів, лімфатичних вузлах, кістках, серці, тонкому кишечнику, нирках, легенях (див. Tamura S et al (2002) Mech Dev 1 15: 127-131) та клітинах ендотелію. Декілька отриманих результатів свідчать про те, що ендотеліальні клітини є головним об'єктом дії OSM. Ці клітини експресують у 10-20 разів більшу кількість рецепторів з низькою та високою спорідненістю та демонструють поглиблені та тривалі змінення фенотипу після стимуляції з OSM (див. Modur V et al (1997) J Clin Invest 100: 158-168). На додачу, OSM є головним аутокринним фактором зростання клітин саркоми Капоші, що, як вважається, мають ендотеліальне походження (див. Murakami-Mori K et al (1995) J Clin Invest 96:1319-1327).

Разом з іншими цитокінами родини IL-6, OSM зв'язується з трансмембранним глікопротеїном трансдукції сигналу gp130. Головною властивістю цитокінів gp130 є утворення олігомерних рецепторних комплексів, що містять gp130 та один або декілька ко-рецепторів у залежності від ліганду (Reviewed у Heinrich PC et al (2003) Biochem J. 374: 1-20), в результаті чого ці цитокіни можуть опосередковувати як загальні, так і унікальні типи біологічних активностей *in vitro* та *in vivo* в залежності від композиції рецепторного комплексу, що утворюється. OSM людини (hOSM) відрізняється від інших цитокінів IL-6 тим, що він може утворювати комплекси з gp130 та з одним або з двома ко-рецепторами, LIFR або рецептором ондостатину (OSMR). У Фіг. 27 зображена взаємодія між hOSM та gp130, LIFR та OSMR.

Виявлено, що кристалічна структура hOSM, яку було визначено, містить чотири альфа-спиральних вузла з двома потенційними сайтами глікозилування. Також, за допомогою сайт-спрямованого мутагенезу молекули hOSM було визначено два окремих сайту зв'язування ліганду (див. Deller MC et al (2000) Structural Fold Des. 8:863-874), де перший з них, який отримав назву "сайт II" (або "сайт 2") взаємодіє з gp130 та другий сайт зв'язування, що отримав назву "сайт III" (або "сайт 3") взаємодіє або з LIFR або з OSMR на протилежному кінці молекули.

Експерименти з застосуванням мутагенезу показали, що сайти зв'язування для LIFR та OSMR є завжди ідентичними, але можуть відрізнитися наявністю однієї амінокислотної мутації.

Існує все більше доказів на користь гіпотези, що модуляція взаємодії OSM-gp130 може бути корисною у лікуванні розсіяного склерозу (RA) та інших хвороб та розладів, особливо хронічних запальних хвороб та розладів, як-то остеоартрит, ідіопатичний легеневий фіброз, біль, запальне захворювання легень, серцево-судинне захворювання та псоріаз.

OSM знайшли у синовіальній рідині (SF) людей, що страждають на RA (див. Hui W et al (1997) 56: 184-7). Його рівні корелюють з кількістю нейтрофілів у SF, рівнями TNF - альфа (іноді

позначеного, як просто "TNF") у SF та маркерами руйнування хрящів (Manicourt DH et al (2000) *Arthritis Rheum* 43: 281-288).

Крім того, синовіальні тканини пацієнтів з RA спонтанно секретують OSM *ex vivo* (див. Okamoto H et al (1997) *Arthritis and Rheumatism* 40: 1096-1105). Також була виявлена присутність OSM у синовіальних мікрофагах (Cawston TE et al (1998) *Arthritis Rheum* 41: 1760-1771) та, як вже обговорювалося вище, рецептори OSM та gp130 також експресуються у ендотеліальних клітинах, синовіальних фібробластах, хондроцитах та остеобластах. Аденовірусна експресія мишачого OSM (mOSM) у суглобах нормальних мишей веде до появи тяжкого запального та ерозійного артриту (див. Langdon C et al (2000) *Am J Pathol* 157:1187-1196). Подібну агресивну хворобу спостерігали у "нокаутних" мишей, позбавлених TNF, IL-1, IL-6 та iNOS після доставки аденовірусного mOSM (див. de Hooge ASK et al (2003) *Arthritis and Rheumatism* 48:1750-1761), що демонструє те, що OSM може опосередковувати всі втілення патології артриту. Експресія мишачого OSM з застосуванням вектора mOSM, що експресується подібно до аденовірусів спричинює типові для ювенільного ідіопатичного артриту пошкодження епіфізарної пластинки (див. de Hooge ASK et al (2003) *Arthritis and Rheumatism* 48:1750-1761). У експериментальній моделі артриту, викликаного колагеном, терапевтично введені мишам анти-OSM антитіла повністю запобігають подальшому розвитку хвороби. Подібні результати спостерігали після профілактичного введення анти-OSM мишам з артритом, викликаним пристаном, які являли собою зворотно-ремітуючу модель, що нагадує захворювання людини (див. Plater-Zyberk C et al (2001) *Arthritis and Rheumatism* 44:

Остеартрит є хворобливим станом, що уражає суглоби. Існує три характеристики остеоартриту. Він призводить до пошкодження хрящів - сильної, рівної поверхні, що розділяє кістки суглобів та дозволяє їм переміщатися легко та без тертя. Це веде до появи кісткових наростів, що розвиваються навколо краю суглобів та спричинює запалення м'яких тканин навколо суглобів (синовіт). Оскільки OSM, як було виявлено, відіграє важливу роль у руйнуванні хрящів, запаленні та ремоделюванні кістки, блокада цього цитокіну також буде відігравати важливу роль у ключових аспектах патогенезу хвороби. OSM діє синергетично або з IL-1 або з TNF, викликаючи лізис колагену у назальному хрящі людини, що тягне за собою втрату протеогліканів (PG) та колагену, де втрата колагену корелює з індукуванням MMP-1 та MMP-13. OSM з IL-1 також буде індукувати втрату PG суглобового хряща людини, але збільшення цієї втрати колагену є незначним. (Morgan et al 2006). Декілька досліджень з застосуванням аденовірусних векторів для підвищення концентрацій цитокіну у суглобах показали, що надлишкова експресія OSM буде викликати запалення, утворення поверхневого дифузного судинного кератиту, руйнування хряща та ерозію кісток. (Langdon et al 2000). Загальні дані літератури свідчать про те, що OSM, особливо у поєднанні з іншими цитокінами, індукує дію протеаз, залучених до руйнування протеоглікану та колагену, що веде до деградування хрящів та ерозії кісток. Отримана з літератури інформація свідчить про те, що молекула OSM може приймати певну участь у запальному процесі, пов'язаному з псоріазом. У праці Voifati et al (1998) показано, що спонтанне вивільнення OSM збільшується у органах культури псоріатичних уражень порівняно з неураженою псоріатичною та нормальною шкірою. (Kunsefeld et al 2004) Кератиноцити експресують рецептор для цієї молекули та у відповідь до ліганду, що спричинює їх міграцію та збільшує товщину відновленого епідермісу. Мікроматричний аналіз порівняння модуляторних ефектів гена OSM з 33 іншими цитокінами вказує, що він є сильним активатором кератиноцитів та синергічно впливає з прозапальними цитокінами на індукування експресії таких молекул, як S100A7 та  $\beta$ -дефенсин 2, характерної для псоріатичної шкіри. (Gazel et al 2006)

З літератури також відомо про роль OSM у запальних легеневи хворобах, як-то астма та легеневий фіброз. Ці хвороби відрізняються підвищеним накопичуванням позаклітинного матриксу (ECM) з супутньою проліферацією та активуванням суб-епітеліальних фібробластів. OSM виявили у рідині бронхоальвеолярного промивання пацієнтів під час гострого ураження легень, особливо у випадках пневмонії (Grenier et al 2001). OSM також виявили у мозку пацієнтів з розсіяним склерозом (MS), де він локалізується у мікроглії, астроцитах та інфільтруючихся лейкоцитах (Ruprecht et al 2001). На додачу, PBMC, отримані від пацієнтів з MS спонтанно вивільнюють більше цитокінів, в тому числі OSM, ніж клітини від здорових контролів та пацієнтів з MS, що проявляють тенденцію до збільшення сироватки [OSM] (Ensoli et al 2002).

На додачу до сприяння запаленню у мозку, OSM може безпосередньо приймати участь у нейродегенерації, що є ознакою хвороби Альцгеймера, MS та частини пацієнтів з ВІЛ. Супернатанти моноцитів пацієнтів з ВІЛ викликають глибоке гальмування зростання нейробластів та загибель нервових клітин. Ці дії у культуральному супернатанті є опосередкованими онкостатином M (Ensoli et al 1999). Оскільки багато пацієнтів з ВІЛ

страждають від атрофії мозку, викликану втратою нервових клітин, OSM може бути причетним до цієї патології у якості одного з посередників. Праця Tamura et al свідчить про те, що OSM може приймати участь у розвитку та підтриманні невропатичного болю (2003). Ці дослідження виявили підгрупу ноцицептивних сенсорних нейронів, що експресують рецептор OSMr. Всі нейрони OSMr +ve також експресують рецептори VR1 та P2X3, які, як було виявлено, відіграють вирішальну роль у розвитку як невропатичного, так і запального болю (Jarvis et al 2002, Walker et al 2003). Також було виявлено, що OSM +/- миші демонструють зменшені шкідливі відповіді відносно хімічного, термального, вісцерального та механічного болю (Morikawa et al 2004). Цікаво, що ці тварини мають дефіцит VR1+, P2X3+ нейронів малого розміру, але в іншому є нормальними тваринами.

Підтримуюча роль OSM у модуляції біології злоякісних клітин також відома з відповідної літератури. Як було повідомлено, у дослідженнях з застосуванням пухлинних клітинних ліній OSM має властивості стимулювання та інгібування зростання (Grant та Begly 1999). Він є потенційним мітогеном для клітин, що походять від саркоми Капоші (Miles et al 1992) та для мієломних клітинних ліній (Zhang et al 1994). OSM знижує темпи зростання та посилює диференціацію численних пухлинних клітинних ліній, в тому числі клітин молочних залоз (Douglas et al 1998) та легенів (McKormick et al 2000). Проте, хоча OSM може інгібувати зростання принаймні у деяких клітинних лініях карциноми молочних залоз, він збільшує відкріплення клітин та підсилює метастатичний потенціал (Holzer et al 2004, Jorcyk et al 2006). OSM також посилює експресію та стан активування гіалуронового рецептора CD44 у деяких пухлинних клітинних лініях (Cichy et al 2000), що пов'язані зі зростанням пухлин та метастазами (Yu et al 1997). На додачу, ангіогенні властивості OSM та його здатність індукувати інші ангіогенні фактори у деяких пухлинних клітинах (Repovic et al 2003) свідчить про його можливу участь у пухлинному ангіогенезі у цих пухлинах, що експресують OSM. Наукова література свідчить про участь OSM у біології пухлин, але вказує на її складність. Можливо, що нейтралізація OSM буде бажаною для лікування деяких пухлин. З іншого боку, подібно до нейтралізації TNF та IL-6, вона несе певний потенційний ризик у інших аспектах.

Дані літератури також свідчать про потенційну роль OSM у серцево-судинних захворюваннях. OSM був виявлений у атеросклеротичних ураженнях у тканинних макрофагах (Modur et al 1997) та у якості ангіогенного фактора (Vasse et al 1999) може сприяти неоваскуляризаційним характеристиками атеросклеротичних бляшок, які, як вважається, спричиняють крихкість стінок судин. Проте, OSM також викликають експресію інших ангіогенних факторів у ендотеліальних клітинах; VEGF (Wijeloh et al 1997) та bFGF (Be PKH rd et al 1999). Цікаво, що ендотеліальні клітини людини мають приблизно у 10-20 разів більшу щільність OSM рецепторів, ніж інші клітини (Brown et al 1991).

Отже, предметом заявленого винаходу є надання терапевтичного підходу до лікування RA та інших хвороб та розладів, особливо хронічних запальних хвороб та розладів, як-то остеоартриту, ідіопатичного фіброзу легень, раку, астми, болю, серцево-судинної хвороби та псоріазу. Зокрема, предметом заявленого винаходу є надання імуноглобулінів, особливо антитіл, що специфічно зв'язують OSM (наприклад, hOSM, особливо за допомогою його сайту зв'язування Site II) та модулювання (тобто пригнічення або блокування) взаємодії між OSM та gp130 у лікуванні хвороб та розладів, чутливих до модуляції цієї взаємодії.

У W099/48523 винахідники висвітлюють застосування антагоністів OSM у лікуванні запальних хвороб та розладів на прикладі анти-мишачих антитіл OSM у мишачій моделі артриту.

Всі патенти та літературні посилання, що наведені в даному описі безумовно та повністю включені до нього у вигляді посилання.

Стислий опис фігур.

Фіг.1: IFA gp130 людини - інгібування зв'язування OSM людини з gp130 людини антитілами 10G8, 9G2, 3E3 & 2B7. Неконкурентні анти-OSM мишачі антитіла (15E10) додали з порівняльною метою. У якості негативного контролю застосовані антитіла інструменту досліджень. Наведені дані відображають одне з чотирьох повторень аналізу.

Фіг. 2: Аналіз клітин KB - інгібування OSM людини антитілами 10G8, 9G2, 3E3 & 2B7. Неконкурентні анти-OSM мишачі антитіла (15E10) додали з порівняльною метою. У якості негативного контролю застосовані антитіла інструменту досліджень. Наведені дані відображають одне з трьох повторень аналізу.

Фіг. 3: Аналіз клітин KB - інгібування OSM людини у присутності 25% сироватки АВ людини антитілами 10G8, 9G2, 3E3 & 2B7. Неконкурентні анти-OSM мишачі антитіла (15E10) додали з порівняльною метою. У якості негативного контролю застосовані антитіла інструменту досліджень. Наведені дані відображають одне з двох повторень аналізу.

Фіг. 4: Аналіз ендогенного OSM gp130 людини - інгібування зв'язування ендогенного OSM

людини з gr130 людини антитілами 10G8, 9G2, 3E3 & 2B7. Неконкурентні анти-OSM мишачі антитіла (110) додали з порівняльною метою. У якості негативного контролю застосовані антитіла інструменту досліджень. Наведені дані відображають одного з двох донорів.

Фіг. 5: Аналіз клітин KB - втрата інгібування LIF людини антитілами 10G8, 9G2, 3E3 & 2B7. Неконкурентні анти-OSM мишачі антитіла (15E10) додали з порівняльною метою. У якості позитивного контролю застосовані наявні у продажу анти-людинні моноклональні антитіла LIF (R&D systems, MAB250). У якості негативного контролю застосовані антитіла інструменту досліджень.

Фіг. 6: Аналіз клітин KB - інгібування OSM мармозетки антитілами 10G8, 9G2, 3E3 & 2B7. Неконкурентні анти-OSM мишачі антитіла (15E10) додали з порівняльною метою. У якості негативного контролю застосовані антитіла інструменту досліджень. Наведені дані відображають один з двох повторів аналізу.

Фіг. 7: Порівняння послідовності VH гібридом 2B7, 3E3, 9G2 та 10G8. Залишки, що відрізняються від більшості наведені у маленьких рамках. У великих рамках знаходяться послідовності, що являють собою CDR.

Фіг. 8: Порівняння послідовності VL гібридом 2B7, 3E3, 9G2 та 10G8. Залишки, що відрізняються від більшості наведені у маленьких рамках. У великих рамках знаходяться послідовності, що являють собою CDR.

Фіг. 9: Аналіз послідовності варіабельних (мінливих) легких ланцюгів 10G8, 9G2, 3E3 та 2B7 у порівнянні з неконкурентними анти-OSM мишачими батьківськими антитілами 15E10.

Фіг. 10: Аналіз послідовності варіабельних важких ланцюгів 10G8, 9G2, 3E3 та 2B7 у порівнянні з неконкурентними анти-OSM мишачими батьківськими антитілами 15E10.

Фіг. 11: Безпосередній ІФА - аналіз зв'язування OSM людини - порівняння зв'язування OSM людини химерними антитілами 10G8 та 9G2 з химерним антитілом 15E10 (15E10c).

Фіг. 12: ІФА gr130 людини - інгібування зв'язування OSM людини з gr130 людини антитілами 10G8 та 9G2 та химерними антитілами 10G8 та 9G2. Неконкурентні анти-OSM мишачі антитіла (15E10) додали з порівняльною метою. У якості негативного контролю застосовані антитіла інструменту досліджень. Наведені дані відображають один з трьох повторів аналізу.

Фіг. 13: Аналіз клітин KB - інгібування OSM людини антитілами 10G8 та 9G2 та химерними антитілами 10G8 та 9G2. Неконкурентні анти-OSM мишачі антитіла (15E10) додали з порівняльною метою. У якості негативного контролю застосовані антитіла інструменту досліджень. Наведені дані відображають один з трьох повторів аналізу.

Фіг. 14: Аналіз клітин KB - інгібування OSM людини антитілами 10G8 та 9G2 та химерними антитілами 10G8 та 9G2 у присутності 25% сироватки АВ людини. Неконкурентні анти-OSM мишачі антитіла (15E10) додали з порівняльною метою. У якості негативного контролю застосовані антитіла інструменту досліджень. Наведені дані відображають один з трьох повторів аналізу.

Фіг. 15: Аналіз ендogenous OSM gr130 людини - інгібування зв'язування ендogenous OSM людини з gr130 людини антитілами 10G8 та 9G2 та химерними антитілами 10G8 та 9G2. Неконкурентні анти-OSM мишачі антитіла (15E10) додали з порівняльною метою. У якості негативного контролю застосовані антитіла інструменту досліджень. Наведені дані відображають одного з двох донорів.

Фіг. 16: LIF людини у аналізі клітин KB - відсутність інгібування LIF людини антитілами 10G8 та 9G2 та химерними антитілами 10G8 та 9G2. Неконкурентні анти-OSM мишачі антитіла (15E10) додали з порівняльною метою. У якості позитивного контролю застосовані анти-людинні антитіла LIF (MAB250, R&D systems). У якості негативного контролю застосовані антитіла інструменту досліджень. Наведені дані відображають один з трьох повторів аналізу.

Фіг. 17: Аналіз клітин KB - інгібування OSM людини варіантами гуманізованих антитіл 10G8 L1 та L4. Антитіла 15E10h додали для порівняння. Наведені дані відображають один з трьох повторів аналізу.

Фіг. 18: ІФА gr130 людини - інгібування зв'язування OSM людини з gr130 людини варіантами гуманізованих антитіл 10G8 H0L1, H1L1 та H2L1. Антитіла 15E10h додали для порівняння. У якості негативного контролю застосовані антитіла інструменту досліджень. Наведені дані відображають один з двох повторів аналізу.

Фіг. 19: Комплекс зв'язування OSM людини та моноклонального антитіла 10G8 - зв'язування OSM людини з легким та важким ланцюгами моноклонального антитіла 10G8. Сайти зв'язування рецептора OSM наведені, як Site II та Site III. Відповідно, для кожного сайту перелічені важливі для зв'язувальних ділянок рецептора амінокислотні залишки.

Фіг. 20: Аналіз клітин KB - інгібування OSM людини варіантами гуманізованих антитіл 10G8

H0L1 CDRH1 та CDRL2. 15E10h додали для порівняння. У якості негативного контролю застосовані антитіла інструменту досліджень. Наведені дані відображають один з трьох повторів аналізу.

Фіг. 21: ІФА gr130 людини - інгібування зв'язування OSM людини з gr130 людини мишачими батьківськими антитілами 10G8, химерними антитілами 10G8, гуманізованими гібридними антитілами 10G8 H0L1 (H0L1) та H0 (huCDRH1)L1. 15E10h додали для порівняння. У якості негативного контролю застосовані антитіла інструменту досліджень. Наведені дані відображають один з трьох повторів аналізу.

Фіг. 22: Аналіз клітин KB - інгібування OSM людини мишачими батьківськими антитілами 10G8, химерними антитілами 10G8, гуманізованими гібридними антитілами 10G8 H0L1 (H0L1) та H0 (huCDRH1)L1. 15E10h додали для порівняння. Наведені дані відображають один з трьох повторів аналізу.

Фіг. 23: Аналіз клітин KB - інгібування OSM людини мишачими батьківськими антитілами 10G8, химерними антитілами 10G8, гуманізованими гібридними антитілами 10G8 H0L1 (H0L1) та H0 (huCDRH1)L1 у присутності 25% сироватки АВ людини. 15E10h додали для порівняння. У якості негативного контролю застосовані антитіла інструменту досліджень. Наведені дані відображають один з двох повторів аналізу.

Фіг. 24: Аналіз ендogenous OSM gr130 людини - інгібування ендogenous зв'язування OSM людини з gr130 людини мишачими батьківськими антитілами 10G8, химерними антитілами 10G8, гуманізованими гібридними антитілами 10G8 H0L1 (H0L1) та H0 (huCDRH1)L1. 15E10h додали для порівняння. У якості негативного контролю застосовані антитіла інструменту досліджень. Наведені дані відображають одного з чотирьох донорів.

Фіг. 25: LIF людини у аналізі клітин KB - відсутність інгібування LIF людини мишачими батьківськими антитілами 10G8, химерними антитілами 10G8, гуманізованими гібридними антитілами 10G8 H0L1 (H0L1) та H0 (huCDRH1)L1. 15E10h додали для порівняння. У якості позитивного контролю застосовані анти-людинні антитіла LIF (MAB250, R&D systems). У якості негативного контролю застосовані антитіла інструменту досліджень. Наведені дані відображають один з трьох повторів аналізу.

Фіг. 26: Аналіз первинних гепатоцитів людини - інгібування вивільнення сироваткового амілоїду А (SAA) антитілами H0(huCDRH1)L1 гепатоцитів людини, стимульованих (А) 3 нг/мл та (Б) 10 нг/мл OSM людини. Гуманізовані 15E10 додали з порівняльною метою. Наведені дані відображають одного з трьох донорів гепатоцитів.

Фіг. 27: Аналіз первинних гепатоцитів людини - інгібування вивільнення С-реактивного білка (CRP) антитілами H0(huCDRH1)L1 гепатоцитів людини, стимульованих (А) 3 нг/мл та (Б) 10 нг/мл OSM людини. Гуманізовані 15E10 додали з порівняльною метою. Наведені дані відображають одного з трьох донорів гепатоцитів.

Фіг. 28: Аналіз клітин RA людини, подібних до фіброblastів - інгібування вивільнення IL-6 антитілами H0(huCDRH1)L1 подібних до фіброblastів клітин синовіоцитів RA людини (HFLS-RA), стимульованих (А) 0,3 нг/мл та (Б) 3 нг/мл OSM людини. Гуманізовані 15E10 додали з порівняльною метою. Наведені дані відображають одного з трьох донорів HFLS-RA.

Фіг. 29: Аналіз клітин RA людини, подібних до фіброblastів - інгібування вивільнення MCP-1 антитілами H0(huCDRH1)L1 подібних до фіброblastів клітин синовіоцитів RA людини (HFLS-RA), стимульованих (А) 0,3 нг/мл та (Б) 3 нг/мл OSM людини. Гуманізовані 15E10 додали з порівняльною метою. Наведені дані відображають одного з трьох донорів HFLS-RA.

Фіг. 30: Аналіз ендотеліальних клітин пупкової вени людини - інгібування вивільнення IL-6 антитілами H0(huCDRH1)L1 ендотеліальних клітин пупкової вени людини, стимульованих (А) 30 нг/мл та (Б) 100 нг/мл OSM людини. Гуманізовані 15E10 додали з порівняльною метою. Наведені дані відображають один з трьох повторів аналізу.

Фіг. 31: Аналіз фіброblastів легенів людини - інгібування вивільнення MCP-1 антитілами H0(huCDRH1)L1 фіброblastів легенів людини, стимульованих OSM людини. Гуманізовані 15E10 додали з порівняльною метою. Наведені дані відображають (А) одного здорового та (Б) одного IPF донора.

Фіг. 32: Аналіз фіброblastів легенів людини - інгібування вивільнення IL-6 антитілами H0(huCDRH1)L1 фіброblastів легенів людини, стимульованих OSM людини. Гуманізовані 15E10 (позначені, як "антитіло Х") додали з порівняльною метою. Наведені дані відображають (А) одного здорового та (Б) одного IPF донора.

Фіг. 33: Дані зв'язування варіанту CDRH3 - сканування аланіну проводили у залишках, знайдених у CDRH3. Отримані дані демонструють, як спорідненість зв'язування залежить від змінень таких залишків.

Фіг. 34: Ілюстрація взаємодій між hOSM та gr130, LIFR та OSMR.

Термінологія антитіл - для уникнення сумнівів, антитіло 15E10h та гуманізоване 15E10 мають відношення до того ж самого антитіла, що у деяких фігурах позначено, як "антитіло X". 10G8/A9 та 10G8 теж мають відношення до одного антитіла.

Заявлений винахід стосується білків зв'язування антигену, здатних зв'язуватися з OSM, наприклад антитіл, що специфічно зв'язуються з OSM та інгібують зв'язування OSM з рецептором gp130 але без безпосередньої взаємодії з залишками сайту II.

Антитіла OSM заявленого винаходу пов'язані з мишачими моноклональними антитілами mAb 10G8 або отримані від них. Амінокислотна послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга мишачого антитіла 10G8 наведена, як SEQ ID NO.26. Амінокислотна послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга мишачого антитіла 10G8 наведена, як SEQ ID NO.28.

Варіабельні ділянки важкого ланцюга (VH) заявленого винаходу можуть містити наступні CDR або варіанти цих CDR (як визначено по Kabat (Kabat et al; Sequences of proteins of Immunological Interest NIH, 1987)):

CDRH1 SEQ ID NO.1 або SEQ ID NO 77

CDRH2 SEQ ID NO.2

CDRH3 SEQ ID NO.3

Варіабельні ділянки легкого ланцюга (VH) заявленого винаходу можуть містити наступні CDR або варіанти цих CDR (як визначено по Kabat (Kabat et al; Sequences of proteins of Immunological Interest NIH, 1987)):

CDRL1 SEQ ID NO.4

CDRL2 SEQ ID NO.5 або SEQ ID NO 78

CDRL3 SEQ ID NO.6

Винахід також стосується полінуклеотидної послідовності, що кодує важкий ланцюг будь-якого з описаних тут антиген-зв'язуючих білків та полінуклеотиду, що кодує легкий ланцюг будь-якого з описаних тут антиген-зв'язуючих білків. Подібні полінуклеотиди являють собою кодуєчу послідовність, що має відношення до еквівалентної поліпептидної послідовності, проте слід розуміти, що їх можна клонувати у вектор експресії разом з відповідною сигнальною послідовністю та старт- та стоп- кодонами.

Винахід також стосується рекомбінантних трансформованих або трансфікованих клітин-хазяїв, що містять один або декілька полінуклеотидів, що кодуєть важкий та /або легкий ланцюг будь-якого з описаних тут антиген-зв'язуючих білків..

Винахід додатково передбачає спосіб отримання будь-якого з описаних тут антиген-зв'язуючих білків, складовою частиною якого є стадія культивування клітин-хазяїв, що містять перш та другий вектори, де вказаний перший вектор містить полінуклеотид, що кодує важкий ланцюг будь-якого з описаних тут антиген-зв'язуючих білків та вказаний другий вектор містить полінуклеотид, що кодує легкий ланцюг будь-якого з описаних тут антиген-зв'язуючих білків у прийнятному культуральному середовищі, наприклад, у культуральному середовищі, вільному від сироватки.

Винахід додатково передбачає фармацевтичну композицію, що міст антиген-зв'язуючий білок, як описано тут та фармацевтично прийнятний носій.

У додатковому аспекті, заявлений винахід стосується способу лікування або профілактики захворювання або розладу, чутливого до модуляції взаємодії між hOSM та gp130, складовою частиною якого є стадія введення вказаному пацієнту терапевтично ефективної кількості його антиген-зв'язуючого білка, як тут описано.

Отже, предметом заявленого винаходу є надання терапевтичного підходу до лікування RA та інших хвороб та розладів, особливо хронічної запальної хвороби та розладів, як-то остеоартриту, ідіопатичного легеневого фіброзу, болю, запального захворювання легень, серцево-судинного захворювання та псоріазу. Зокрема, предметом заявленого винаходу є отримання імуноглобулінів, особливо антитіл, що специфічно зв'язують OSM (наприклад, hOSM, особливо його сайту II) та модулюють (тобто інгібують або блокують) взаємодію між OSM та gp130 для лікування хвороб та розладів, чутливих до модуляції цієї взаємодії.

У іншому аспекті заявленого винаходу передбачено спосіб лікування пацієнта-людини, ураженого запальним захворюванням або розладом, складовою частиною якого є стадія введення вказаному пацієнту терапевтично ефективної кількості антиген-зв'язуючого білка, як тут описано. У іншому аспекті заявленого винаходу передбачено спосіб гуманізації антитіла, що полягає у: отриманні антитіл не-людинної природи, що зв'язуються з цільовим антигеном, отриманні спільної кристалографічної структури антитіло - антиген з визначенням залишків антитіл не-людинної природи від цієї кристалічної структури, що безпосередньо залучені до зв'язування з антигеном та мають розмір приблизно 2-5 Å, а також у отриманні мутацій одного або декількох залишків, не залучених до зв'язування з залишком, що походить від людської



послідовності та у відновленні вказаних антитіл.

Заявлений винахід стосується антиген-зв'язуючого білка, що специфічно зв'язується з OSM, наприклад що специфічно зв'язується з OSM людини (hOSM) та інгібує зв'язування OSM з рецептором gp130, але безпосередньо не взаємодіє з залишками сайту II.

5 Як тут описано, у додатковому аспекті винаходу антиген-зв'язуючий білок безпосередньо не зв'язується з залишками Q20, G120, Q16, N124.

Як тут описано, у додатковому аспекті винаходу передбачено антиген-зв'язуючий білок, який специфічно зв'язується з OSM, наприклад, специфічно зв'язується з OSM людини (hOSM) та інгібує зв'язування OSM з рецептором gp130 та взаємодіє з одним або з декількома з залишків

10 82, 83, 84, 90, 94, 112, 115, 122, 123, 152 hOSM.  
У одному аспекті, винахід передбачає антиген-зв'язуючий білок, що специфічно зв'язується з OSM, наприклад, специфічно зв'язується з OSM людини (hOSM) та інгібує зв'язування OSM з рецептором gp130, але безпосередньо не взаємодіє з залишками сайту II та не конкурує у конкурентному ІФА - аналізі з антитілом, що має важкий ланцюг SEQ ID NO.79 та легкий ланцюг

15 SEQ ID NO.80 .  
У одному аспекті, винахід передбачає антиген-зв'язуючий білок, що конкурує, як тут описано, з антиген-зв'язуючим білком за зв'язування до OSM, наприклад, до OSM людини.

У іншому аспекті, антиген-зв'язуючий білок зв'язується з OSM людини з високою спорідненістю, наприклад, при вимірюванні на біосенсорі Biacore, антиген-зв'язуючий білок

20 зв'язується з OSM людини зі спорідненістю у 500 pM або менше або зі спорідненістю у 400 pM або менше або 300 pM або менше або 250 pM або менше або 200 pM або менше або, наприклад, 140 pM або менше. У додатковому втіленні, при вимірюванні на Biacore, антиген-зв'язуючий білок зв'язується з OSM людини зі спорідненістю приблизно 100-500 pM або приблизно 100-300 pM або приблизно 100-250 pM або приблизно 100-200 pM. У одному втіленні

25 заявленого винаходу, антиген-зв'язуючий білок зв'язується з OSM зі спорідненістю, меншою, ніж 250 pM, а у додатковому втіленні заявленого винаходу антиген-зв'язуючий білок зв'язується з OSM зі спорідненістю, меншою, ніж 140 pM. У одному такому втіленні, це було виміряне на Biacore, наприклад, як вказано у Прикладі 2.5.1.

У іншому аспекті, антиген-зв'язуючий білок зв'язується з OSM людини з високою спорідненістю, наприклад, при вимірюванні за допомогою кінетичного ексклюзійного аналізу KinExA® на основі застосування розчину, антиген-зв'язуючий білок зв'язується з OSM людини зі спорідненістю у 200 pM або менше або 150 pM або менше або 100 pM або менше або 50 pM або менше або, наприклад, 40 pM або менше. У додатковому втіленні, при вимірюванні за допомогою кінетичного ексклюзійного аналізу KinExA®, антиген-зв'язуючий білок зв'язується з

35 OSM людини зі спорідненістю приблизно 10-200 pM або приблизно 10-150 pM або приблизно 10-100 pM або приблизно 10-70 pM або приблизно 10-40 pM. У одному втіленні заявленого винаходу, антиген-зв'язуючий білок зв'язується з OSM з спорідненістю, меншою, ніж 70 pM. У додатковому втіленні заявленого винаходу, антиген-зв'язуючий білок зв'язується з OSM з спорідненістю, меншою, ніж 40 pM. У одному такому втіленні, це було виміряне за допомогою

40 способу KinExA®, наприклад, як вказано у Прикладі 2.5.1.

У іншому аспекті, антиген-зв'язуючий білок зв'язується з OSM людини та нейтралізує OSM у аналізі нейтралізації клітин, де антиген-зв'язуючий білок має IC<sub>50</sub> (50% пригнічення цитопатичної дії) приблизно у діапазоні 10-200 pM або приблизно 10-150 pM або приблизно 10-100 pM або приблизно 20-100 pM. У додатковому втіленні заявленого винаходу, антиген-

45 зв'язуючий білок зв'язується з OSM та нейтралізує OSM у аналізі нейтралізації клітин, де антиген-зв'язуючий білок має IC<sub>50</sub> приблизно у 20 pM з спорідненістю, меншою, ніж 140 pM. У одному такому втіленні, це було виміряне за допомогою аналізу нейтралізації клітин, наприклад, як вказано у Прикладі 2, розділ 2.2.1.

У одному аспекті, заявлений винахід додатково передбачає, що антиген-зв'язуючий білок містить CDRH3 SEQ ID NO.3 або варіант SEQ ID NO.3, де CDRH3 має заміщення альтернативними амінокислотами, як зазначено нижче, у одному або у декількох наступних

положеннях (з застосуванням нумерації по Kabat):  
Амінокислота у положенні 95 заміщена на Ala, Glu, Gly, His, Leu, Met, Pro, Gin, Ser, Thr або

55 Val  
Амінокислота у положенні 96 заміщена на Ala, Cys, Phe, Gly, His, Lys, Leu, Ser, Thr, Trp або

Tyr  
Амінокислота у положенні 97 заміщена на Ala, Cys, Phe, Met або Ser

Амінокислота у положенні 98 заміщена на Ala, Asp, Phe, Gly, Leu, Pro, Gin або Trp

Амінокислота у положенні 99 заміщена на Ala, Cys, Pro, Ser, Val або Tyr

60 Амінокислота у положенні 100B заміщена на Glu

Амінокислота у положенні 100C заміщена на Ala, Glu, Phe, Gly, Val або Trp

Амінокислота у положенні 100D заміщена на Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Leu, Ser, Thr, Val, Trp або Tyr

Амінокислота у положенні 101 заміщена на Glu, Gly, Ser, Thr або Val

5 Амінокислота у положенні 102 заміщена на Ala, Phe, Gly, Leu, Pro, Gin, Arg, Ser Tyr, His, lie, Asp або Trp

У додатковому аспекті винаходу, антиген-зв'язуючий білок містить:

i) CDRH3, як це наведено у SEQ ID NO.3 або варіант SEQ ID NO.3, де Val 102 заміщений на Tyr, His, lie, Ser, Asp або Gly.

10 ii) CDRH2, як це наведено у SEQ ID NO.2 або варіант SEQ ID NO.2, де Thr 50 заміщений на Gly, Tyr, Phe, lie, Glu або Val та/або Ile51 заміщений на Leu, Val, Thr, Ser або Asn та/або Ser 52 заміщений на Phe, Trp або His та/або Gly 53 заміщений на Asp, Ser або Asn та/або Gly 54 заміщений на Ser та/або Phe 56 заміщений на Ser, Tyr, Thr, Asn, Asp або Arg та/або Tyr 58 заміщений на Gly, His, Phe, Asp або Asn.

15 iii) CDRL1, як це наведено у SEQ ID NO.4 або варіант SEQ ID NO.4, де Ser 27A заміщений на Asn, Asp, Thr або Glu та/або Ser 27C заміщений на Asp, Leu, Tyr, Val, lie, Asn, Phe, His, Gly або Thr та/або Asn 31 заміщений на Ser, Thr, Lys або Gly та/або Phe 32 заміщений на Tyr, Asn, Ala, His, Ser або Arg та/або Met 33 заміщений на Leu, Val, lie або Phe.

20 iv) CDRL3, як це наведено у SEQ ID NO.6 або варіант SEQ ID NO.6, де Leu 89 заміщений на Gin, Ser, Gly або Phe та/або His 90 заміщений на Gin або Asn, Ser 91 заміщений на Asn, Phe, Gly, Arg, Asp, His, Thr, Tyr або Val та /або Arg 92 заміщений на Asn, Tyr, Trp, Thr, Ser, Gin, His, Ala або Asp та/або Glu 93 заміщений на Asn, Gly, His, Thr, Ser, Ar або Ala та/або Phe 96 заміщений на Pro, Leu, Tyr, Arg, lie або Trp.

У ще одному аспекті, антиген-зв'язуючий білок додатково містить:

25 v) CDRL2, як це наведено у SEQ ID NO.5 або SEQ ID NO.78

У ще одному аспекті, антиген-зв'язуючий білок додатково містить:

30 vi) CDRH1, як це наведено у SEQ ID NO.1 або SEQ ID NO.77 або варіант SEQ ID NO.1 або SEQ ID NO.77, де Tyr 32 заміщений на lie, His, Phe, Thr, Asn, Cys, Glu або Asp та/або Ala 33 заміщений на Tyr, Trp, Gly, Thr, Leu або Val та/або Met 34 заміщений на lie, Val або Trp та /або Ser 35 заміщений на His, Glu, Asn, Gin, Tyr або Thr.

Варіантні послідовності CDR для CDR L1, L2, L3, H1 та H2 були визначені з застосуванням мутагенезу та/або канонічної технології. Ділянки, що визначають комплементарність (CDR) L1, L2, L3, H1 та H2 мають тенденцію приймати одну з обмеженої кількості конформацій основного ланцюга. Окремий канонічний структурний клас CDR з характерною довжиною та пакуванням петель CDR визначають за рахунок його залишків, розташованих у ключових положеннях обох CDR та каркасних ділянок (залишки структурного визначення або SDR). Martin та Thornton (1996; J Mol Biol 263:800-815) були отримані за допомогою автоматичного способу визначення "ключового залишку" канонічних зразків. Для визначення канонічних класів наборів CDR застосували кластерний аналіз, після чого канонічні зразки ідентифікували шляхом аналізу

40 заглиблених гідрофобних залишків з водневим зв'язком та консервативних гліцинів та пролінів. Послідовності CDR антитіл можуть бути віднесені до канонічних класів шляхом порівняння послідовності зі зразками ключових залишків та оцінки кожного зразка з застосуванням матриць ідентичності або подібності.

45 У одному аспекті, винахід стосується антиген-зв'язуючого білка, що містить CDR H3 послідовності SEQ.ID.NO: 3, CDRH2 послідовності SEQ.ID.NO: 2, CDRL1 послідовності SEQ.ID.NO: 4 та CDRL3 послідовності SEQ.ID.NO: 6 та додатково може містити CDR H1 послідовності SEQ.ID.NO:1 або SEQ.ID.NO:77 та CDRL2 послідовності SEQ.ID.NO: 5 або SEQ ID NO.78.

50 У іншому аспекті, антиген-зв'язуючий білок містить CDRH3 послідовності SEQ. ID.NO:3; CDRH2 послідовності SEQ.ID.NO:2; CDRL1 послідовності SEQ.ID.NO:4; CDRL2 послідовності SEQ.ID.NO:5 та CDRL3 послідовності SEQ.ID.NO:6.

У ще іншому аспекті, антиген-зв'язуючий білок містить CDRH3 послідовності SEQ.ID. NO:3; CDRH2 послідовності SEQ.ID.NO:2; CDRH1 послідовності SEQ.ID.NO:1; CDRL1 послідовності SEQ.ID.NO:4; CDRL2 послідовності SEQ.ID.NO:5 та CDRL3 послідовності SEQ.ID.NO: 6.

55 У ще іншому аспекті, антиген-зв'язуючий білок містить CDRH3 послідовності SEQ.ID.NO: 3; CDRH2 послідовності SEQ.ID.NO:2; CDR H1 послідовності SEQ.ID.NO:1; CDRL1 послідовності SEQ.ID.NO:4; CDRL2 послідовності SEQ.ID.NO:78 та CDRL3 послідовності SEQ.ID.NO: 6.

60 У ще іншому аспекті, антиген-зв'язуючий білок містить CDRH3 послідовності SEQ.ID.NO:3; CDRH2 послідовності SEQ.ID.NO:2; CDR H1 послідовності SEQ.ID.NO: 77; CDRL1 послідовності SEQ.ID.NO:4; CDRL2 послідовності SEQ.ID.NO:5 та CDRL3 послідовності SEQ.ID.NO: 6.

У ще іншому аспекті, антиген-зв'язуючий білок містить CDRH3 послідовності SEQ.ID.NO:3; CDRH2 послідовності SEQ.ID.NO:2; CDR H1 послідовності SEQ.ID.NO: 77; CDRL1 послідовності SEQ.ID.NO:4; CDRL2 послідовності SEQ.ID.NO:78 та CDRL3 послідовності SEQ.ID.NO: 6.

У одному аспекті заявленого винаходу, антиген-зв'язуючий білок безпосередньо не взаємодіє з OSM через CDR H1.

У одному аспекті заявленого винаходу, антиген-зв'язуючий білок безпосередньо не взаємодіє з OSM через CDR H1 або CDR L2.

Антиген-зв'язуючі білки винаходу можуть містити варіабельні ділянки важкого ланцюга та варіабельні ділянки легкого ланцюга винаходу, що можуть бути відформатовані у структуру природного антитіла або його функціонального фрагмента або еквівалента. Отже, антиген-зв'язуючий білок винаходу може містити VH ділянки винаходу, відформатовані у повнорозмірне антитіло, його фрагмент (Fab')<sub>2</sub>, фрагмент Fab або його еквівалент (як-то scFV, бі- три- або тетрабіла, Т та abs тощо) при паруванні з відповідним легким ланцюгом. Прийнятне антитіло може бути антитілом IgG1, IgG2, IgG3, IgG4; IgM; IgA, IgE або IgD або його модифікованим варіантом. Також може бути відповідно вибраний сталий домен важкого ланцюга антитіла. Сталий домен легкого ланцюга може бути сталим лямбда- чи каппа- доменом. Крім того, антиген-зв'язуючий білок може містити модифікації всіх класів, наприклад, IgG димери, Fc мутанти, що більш не зв'язують Fc рецептори або опосередковують зв'язування C1q. Антиген-зв'язуючий білок може також бути антитілом химерного типу, описаним у WO86/01533, що містить антиген-зв'язуючу ділянку та не-імуноглобулінову ділянку.

Стала ділянка є вибраною відповідно до будь-якої потрібної функціональності. IgG1 може проявляти літичну здатність через зв'язок з комплементом та/або буде опосередковувати ADCC (залежну від антитіл клітинну цитотоксичність). При необхідності нецитотоксичного блокування антитіл можуть бути застосовані антитіла IgG4. Однак, антитіла IgG4 при отриманні можуть бути нестійкими, отже альтернативний шлях полягає у модифікації, як правило, більш стійких антитіл IgG1. Запропоновані модифікації описані у EP0307434, наприклад, мутації у положеннях 235 та 237. Отже, винахід передбачає отримання літичних або не- літичних форм антиген-зв'язуючого білка, наприклад, антитіла відповідно до винаходу.

У певних формах, антитіло винаходу є повнорозмірним (наприклад, тетрамером H2L2) літичним або не- літичним антитілом IgG1, що має будь-які описані тут варіабельні ділянки важкого ланцюга.

Антиген-зв'язуючі білки заявленого винаходу є отриманими від мишачих антитіл, що мають варіабельні ділянки, як описано у SEQ ID NO:26 та SEQ ID NO:28 або їх не- мишачими еквівалентами, як-то щурів, людини, їх химерними або гуманізованими варіантами, наприклад, отриманими від гуманізованих антитіл, що мають важкий та легкий ланцюги, як описано у SEQ ID NO:54 та SEQ ID NO:62.

У одному аспекті, винахід стосується антиген-зв'язуючого білка, що містить виділений варіабельний домен важкого ланцюга, вибраний від будь-чого з наступного: SEQ ID NO 54, SEQ ID NO 56, SEQ ID NO.58 або SEQ ID NO: 74.

У одному аспекті, винахід стосується антиген-зв'язуючого білка, що містить виділений варіабельний домен легкого ланцюга, вибраний від будь-чого з наступного: SEQ ID NO 62, SEQ ID NO 64, SEQ ID NO.66 або SEQ ID NO.68.

У додатковому аспекті винаходу, передбачено антиген-зв'язуючий білок, що містить виділений варіабельний домен важкого ланцюга, вибраний від будь-чого з наступного: SEQ ID NO 54, SEQ ID NO 56, SEQ ID NO.58 або SEQ ID NO: 74 та виділений варіабельний домен легкого ланцюга, вибраний від будь-чого з наступного: SEQ ID NO 62, SEQ ID NO 64, SEQ ID NO.66 або SEQ ID NO.68.

У додатковому втіленні, винахід стосується антиген-зв'язуючого білка, що містить виділений варіабельний домен важкого ланцюга SEQ ID NO 54 та виділений варіабельний домен легкого ланцюга SEQ ID NO 62. У додатковому втіленні, антиген-зв'язуючий білок містить варіабельну ділянку важкого ланцюга SEQ. ID. NO:74 та варіабельну ділянку легкого ланцюга SEQ. ID. NO:62.

У одному аспекті, антиген-зв'язуючий білок заявленого винаходу містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що кодується SEQ. ID. NO:53 та варіабельну ділянку легкого ланцюга, що кодується SEQ. ID. NO:61 У одному аспекті, антиген-зв'язуючий білок заявленого винаходу містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що кодується SEQ. ID. NO:73 та варіабельну ділянку легкого ланцюга, що кодується SEQ. ID. NO:61 .

У одному аспекті, передбачено полінуклеотид, що кодує вказаний полінуклеотид виділеного варіабельного важкого ланцюга, що містить SEQ.ID.NO.53 або SEQ.ID.NO. 55 або SEQ.ID.NO. 57 або SEQ.ID.NO.73.

У одному аспекті, передбачено полінуклеотид, що кодує вказаний полінуклеотид виділеного варіабельного легкого ланцюга, що містить SEQ.ID.NO.61 або SEQ.ID.NO.63 або SEQ.ID.NO.65 або SEQ.ID.NO.67.

У додатковому аспекті, передбачено полінуклеотид, що кодує вказаний полінуклеотид виділеного варіабельного важкого ланцюга, що містить SEQ.ID.NO. 53 або SEQ.ID.NO. 73 та полінуклеотид, що кодує вказаний полінуклеотид виділеного варіабельного легкого ланцюга, що містить SEQ.ID.NO. 61 або SEQ.ID.NO.63 або SEQ.ID.NO.65 або SEQ.ID.NO.67. У іншому додатковому аспекті, передбачено полінуклеотид, що кодує вказаний полінуклеотид виділеного варіабельного важкого ланцюга, що містить SEQ.ID.NO. 53 або SEQ.ID.NO.73 та полінуклеотид, що кодує вказаний полінуклеотид виділеного варіабельного легкого ланцюга, що містить SEQ.ID.NO.61.

У додатковому аспекті, антиген-зв'язуючий білок може містити будь-який один з описаних тут варіабельних важких ланцюгів у комбінації з будь-яким одним з описаних тут легких ланцюгів.

У одному аспекті, антиген-зв'язуючий білок є антитілом або його антиген-зв'язуючим фрагментом, що містить один або декілька CDR, описаних тут відповідно до винаходу або один або обидва варіабельних домену важкого або легкого ланцюга, описаних тут відповідно до винаходу. У одному втіленні, антиген-зв'язуючий білок зв'язується з OSM приматів. У одному такому втіленні, антиген-зв'язуючий білок додатково зв'язується з OSM приматів, до яких не належить людина, наприклад з OSM макаки-крабодіа. У іншому втіленні, антиген-зв'язуючий білок зв'язується з OSM мармозетки.

У одному аспекті, передбачено антиген-зв'язуючий білок, що зв'язується як з OSM мармозетки, так і з OSM людини з спорідненістю, більшою, ніж 1 нМ при вимірюванні на Biacore або KinExA®.

Здатність цих антитіл нейтралізувати OSM мармозетки надає унікальні засоби оцінки ролі OSM для додаткових показань у моделях захворювання з застосуванням мармозеток, як-то модель EAE розсіяного склерозу.

У іншому аспекті, антиген-зв'язуючий білок є вибраним з групи, що охоплює dAb, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, діатіла, тріатіла, тетратіла, мінітіла та мініантитіла.

У одному аспекті заявленого винаходу антиген-зв'язуючий білок є гуманізованим або химерним антитілом, у додатковому аспекті антитіло є гуманізованим.

У одному аспекті, антитіло є моноклональним антитілом.

Заявлений винахід додатково передбачає, що у одному аспекті антиген-зв'язуючий білок містить: i) CDRH3, як це наведено у SEQ ID NO.3 або варіант SEQ ID NO.3, де CDRH3 має заміщення альтернативними амінокислотами, як зазначено нижче, у одному або у декількох наступних положеннях (з застосуванням нумерації по Kabat):

Амінокислота у положенні 95 є заміщеною на Ala, Glu, Gly, His, Leu, Met, Pro, Gin, Ser, Thr або Val

Амінокислота у положенні 96 є заміщеною на Ala, Cys, Phe, Gly, His, Lys, Leu, Ser, Thr, Trp або Tyr

Амінокислота у положенні 97 є заміщеною на Ala, Cys, Phe, Met або Ser

Амінокислота у положенні 98 є заміщеною на Ala, Asp, Phe, Gly, Leu, Pro, Gin або Trp

Амінокислота у положенні 99 є заміщеною на Ala, Cys, Pro, Ser, Val або Tyr

Амінокислота у положенні 100B є заміщеною на Glu

Амінокислота у положенні 100C є заміщеною на Ala, Glu, Phe, Gly, Val або Trp

Амінокислота у положенні 100D є заміщеною на Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Leu, Ser, Thr, Val, Trp або Tyr

Амінокислота у положенні 101 є заміщеною на Glu, Gly, Ser, Thr або Val

Амінокислота у положенні 102 є заміщеною на Ala, Phe, Gly, Leu, Pro, Gin, Arg, Ser, Tyr, His, lie, Asp або Trp ii) CDRH1, як це наведено у SEQ ID NO.1 або SEQ ID NO.77 або варіант SEQ ID NO.1 або SEQ ID NO.77, де Tyr 32 заміщений на lie, His, Phe, Thr, Asn, Cys, Glu або Asp та/або Ala 33 заміщений на Tyr, Trp, Gly, Thr, Leu або Val та/або Met 34 заміщений на lie, Val або Trp та/або Ser 35 заміщений на His, Glu, Asn, Gin, Tyr або Thr.

iii) CDRH2, як це наведено у SEQ ID NO.2 або варіант SEQ ID NO.2, де Thr50 заміщений на Gly, Tyr, Phe, lie, Glu або Val та/або Ile51 заміщений на Leu, Val, Thr, Ser або Asn та/або Ser 52 заміщений на Phe, Trp або His та/або Gly 53 заміщений на Asp, Ser або Asn та /або Gly54 заміщений на Ser та/або Phe56 заміщений на Ser, Tyr, Thr, Asn, Asp або Arg та/або Tyr58 заміщений на Gly, His, Phe, Asp або Asn.

iv) CDRL1, як це наведено у SEQ ID NO.4 або варіант SEQ ID NO.4 де Ser 27A заміщений на Asn, Asp, Thr або Glu та/або Ser 27C заміщений на Asp, Leu, Tyr, Val, lie, Asn, Phe, His, Gly або

Thr та/або Asn 31 заміщений на Ser, Thr, Lys або Gly та/або Phe<sup>32</sup> заміщений на Tyr, Asn, Ala, His, Ser або Arg та/або Met 33 заміщений на Leu, Val, Ile або Phe.

v) CDRL2, як це наведено у SEQ ID NO.5 або SEQ ID NO.78

vi) CDRL3, як це наведено у SEQ ID NO.6 або варіант SEQ ID NO.6 де Leu 89 заміщений на  
 5 Gin, Ser, Gly або Phe та/або His 90 заміщений на Gin або Asn, Ser 91 заміщений на Asn, Phe, Gly, Arg, Asp, His, Thr, Tyr або Val та/або Arg 92 заміщений на Asn, Tyr, Trp, Thr, Ser, Gin, His, Ala або Asp та/або Glu 93 заміщений на Asn, Gly, His, Thr, Ser, Arg або Ala та/або Phe 96 заміщений на Pro, Leu, Tyr, Arg, Ile або Trp.

vii) Каркасну послідовність важкого ланцюга, що містить наступні залишки:

10 Val, Ile або Gly у положенні 2

Leu або Val у положенні 4

Leu, Ile, Met або Val у положенні 20

Cys у положенні 22

Thr, Ala, Val, Gly або Ser у положенні 24

15 Gly у положенні 26

Ile, Phe, Leu або Ser у положенні 29

Trp у положенні 36

Trp у положенні 47

Ile, Met, Val або Leu у положенні 48

20 Ile, Leu, Phe, Met або Val у положенні 69

Arg у положенні 71

Ala, Leu, Val, Tyr або Phe у положенні 78

Leu, Met у положенні 80

Tyr або Phe у положенні 90

25 Cys у положенні 92

Arg, Lys, Gly, Ser, His або Asn у положенні 94

Заявлений винахід додатково передбачає, що, у одному аспекті, антиген-зв'язуючий білок містить: i) CDRH3, як це наведено у SEQ ID NO.3

ii) CDRH1, як це наведено у SEQ ID NO.1 або SEQ ID NO.77

30 iii) CDRH2, як це наведено у SEQ ID NO.2

iv) CDRL1, як це наведено у SEQ ID NO.4

v) CDRL2, як це наведено у SEQ ID NO.5 або SEQ ID NO.78

vi) CDRL3, як це наведено у SEQ ID NO.6

vii) каркасну послідовність важкого ланцюга, що містить наступні залишки:

35 Val, Ile або Gly у положенні 2

Leu або Val у положенні 4

Leu, Ile, Met або Val у положенні 20

Cys у положенні 22

Thr, Ala, Val, Gly або Ser у положенні 24

40 Gly у положенні 26

Ile, Phe, Leu або Ser у положенні 29

Trp у положенні 36

Trp у положенні 47

Ile, Met, Val або Leu у положенні 47

45 Ile, Leu, Phe, Met або Val у положенні 69

Arg у положенні 71

Ala, Leu, Val, Tyr або Phe у положенні 78

Leu, Met у положенні 80

Tyr або Phe у положенні 90

50 Cys у положенні 92

Arg, Lys, Gly, Ser, His або Asn у положенні 94

Заявлений винахід додатково передбачає, що, у одному аспекті, антиген-зв'язуючий білок містить: i) CDRH3, як це наведено у SEQ ID NO.3

ii) CDRH1, як це наведено у SEQ ID NO.1 або SEQ ID NO.77

55 iii) CDRH2, як це наведено у SEQ ID NO.2

iv) CDRL1, як це наведено у SEQ ID NO.4

v) CDRL2, як це наведено у SEQ ID NO.5 або SEQ ID NO.78

vi) CDRL3, як це наведено у SEQ ID NO.6

vii) каркасну послідовність важкого ланцюга, що містить наступні залишки:

60 Val у положенні 2

Leu у положенні 4  
 Leu у положенні 20  
 Cys у положенні 22  
 Ala у положенні 24  
 Gly у положенні 26  
 Phe у положенні 29  
 Trp у положенні 36  
 Trp у положенні 47  
 Val у положенні 48  
 Ile у положенні 69  
 Arg у положенні 71  
 Leu у положенні 78  
 Leu у положенні 80  
 Tyr у положенні 90  
 Cys у положенні 92  
 Arg у положенні 94

Заявлений винахід додатково передбачає, що, у одному аспекті, антиген-зв'язуючий білок містить: i) CDRH3, як це наведено у SEQ ID NO.3

ii) CDRH1, як це наведено у SEQ ID NO.1 або SEQ ID NO.77

iii) CDRH2, як це наведено у SEQ ID NO.2

iv) CDRL1, як це наведено у SEQ ID NO.4

v) CDRL2, як це наведено у SEQ ID NO.5 або SEQ ID NO.78

vi) CDRL3, як це наведено у SEQ ID NO.6

vii) каркасну послідовність важкого ланцюга, що містить наступні залишки:

Val у положенні 2  
 Leu у положенні 4  
 Leu у положенні 20  
 Cys у положенні 22  
 Ala у положенні 24  
 Gly у положенні 26  
 Phe у положенні 29  
 Trp у положенні 36  
 Trp у положенні 47  
 Leu у положенні 48  
 Ile, Leu, Phe, Met або Val у положенні 69  
 Arg у положенні 71  
 Ala у положенні 78  
 Leu, Met у положенні 80  
 Tyr або Phe у положенні 90  
 Cys у положенні 92  
 Arg, Lys, Gly, Ser, His або Asn у положенні 94

Антиген-зв'язуючі білки, наприклад, антитіла заявленого винаходу можна отримати шляхом трансфекції клітин - хазяїв вектором експресії, що містить кодуючу послідовність антиген-зв'язуючого білка винаходу. Вектор експресії або рекомбінантну плазмиду отримують шляхом розміщення цих кодуючих послідовностей антиген-зв'язуючого білка в оперативному зв'язку зі звичайними регуляторними контрольними послідовностями, здатними контролювати реплікацію та експресію та/або секрецію у клітинах - хазяях. Регуляторні послідовності містять промоторні послідовності, наприклад, промотор CMV та сигнальні послідовності, що можуть бути отримані від інших відомих антитіл. Так саме можна отримати й другий вектор експресії, що має послідовність ДНК, що кодує комплементарний легкий або важкий ланцюг антиген-зв'язуючого білка. У певному втіленні, цей другий вектор експресії є настільки ідентичним першому за виключенням кодуючих послідовностей та селективних маркерів, щоб забезпечити, наскільки це можливо, функціональну експресію кожного поліпептидного ланцюга. Альтернативно, кодуючі послідовності важкого та легкого ланцюгів антиген-зв'язуючого білка можуть знаходитися у одиничному векторі.

Вибрані клітини-хазяї співтрансфікують за допомогою загальноприйнятих способів з обома, першим та другим векторами (або просто трансфікують їх одиничним вектором) для отримання трансфікованих клітин - хазяїв винаходу, що містять обидва (легкий та важкий) ланцюга рекомбінантного або синтетичного походження. Потім трансфіковану клітину культивують за допомогою загальноприйнятих способів для отримання новоутвореного антиген-зв'язуючого

білка винаходу. Антиген-зв'язуючий білок, що містить поєднання обох рекомбінантних важкого та/або легкого ланцюгів виявляють у культурі за допомогою відповідного аналізу, як-то ІФА або РІА. Подібні загальноприйнятні способи також можна застосувати для отримання інших антиген-зв'язуючих білків.

Прийнятні для застосування у способах та для отримання етапів клонування та субклонування композицій цього винаходу вектори можуть бути вибрані будь-яким пересічним фахівцем. Наприклад, можна застосувати загальноприйнятні вектори для клонування серії рUC. Один вектор, рUC19, є наявним у продажу від декількох постачальників, як-то Amersham (Бакінгемшир, Великобританія) або Pharmacia (Упсала, Швеція). На додачу до цього, для клонування можна застосувати будь-який вектор, здатний до легкого маніпулювання та до легкої реплікації, що має велику кількість сайтів клонування та селективні гени (наприклад, стійкості до антибіотиків). Отже, вибір вектора клонування у цьому винаході не є обмежуючим фактором.

Вектори експресії також можуть відрізнятися наявністю генів, прийнятних для ампліфікації експресії гетерологічних послідовностей ДНК, наприклад, гена дигідрофолатредуктази ссавців (DHFR). Інші векторні послідовності містять полі-А сигнальну послідовність, як-то послідовність бичачого гормону зростання (BGH) та послідовність бетаглобінового промотору (betaglopro). Прийнятні тут вектори експресії можуть бути синтезованими за допомогою способів, добре відомих фахівцям у цей галузі.

Компоненти цих векторів, наприклад, реплікони, маркерні гени, підсилювачі, промотори, сигнальні послідовності тощо, може отримати з торгівельних або природних джерел або синтезувати їх за допомогою відомих процедур для застосування у керуванні експресії та/або секреції продукту рекомбінантних ДНК у вибраному хазяїні. Для цієї мети також можна вибрати інші відповідні вектори експресії, численні типи яких є відомими у цій галузі для експресії у клітинах ссавців, бактерій, комах, дріжджів та грибів.

Заявлений винахід також охоплює клітинну лінію, трансфіковану рекомбінантною плазмідною, що містить кодуючі послідовності антиген-зв'язуючих білків заявленого винаходу. Також, звичайно, можна застосувати прийнятні для клонування та інших маніпуляцій з цими векторами клонування клітини-хазяї. В той же час, для реплікації векторів клонування та інших етапів отримання антиген-зв'язуючих білків цього винаходу, можуть бути застосовані клітини різних штамів *E. coli*.

Прийнятні для експресії антиген-зв'язуючих білків винаходу клітини - хазяї або клітинні лінії охоплюють клітини ссавців, як-то NSO, Sp2/0, CHO (наприклад, DG44), COS, HEK, клітини фібробластів (наприклад, 3T3) та міеломи, наприклад їх можна експресувати у клітинах CHO або міеломи. Також можна застосувати людські клітини, дозволяючи таким чином змінення молекули відповідно до людського типу глікозилювання.

Альтернативно, можна застосувати інші еукаріотичні клітинні лінії. Вибір прийнятних клітин-хазяїв ссавців та способів трансформації, культивування, ампліфікації, скринінгу, отримання продукту та збагачення можна знайти у літературі, див., наприклад, Sambrook et al., див. вище.

В якості клітин-хазяїв, прийнятних для експресії рекомбінантних Fab або у інших втіленнях заявленого винаходу можуть бути застосовані бактеріальні клітини (див., наприклад, Plickthun, A., Immunol. Rev., 130:151-188 (1992)). Однак, через тенденцію експресованих у бактеріальних клітинах білків знаходитися у розгорнутому або неправильним чином згорнутому стані або у неглікозилованій формі, будь-які з отриманих у бактеріальних клітинах рекомбінантних Fab потрібно піддати перевірці відносно збереження їх антиген-зв'язуючої здатності. Якщо експресована у бактеріальних клітинах молекула була отримана у належним чином згорнутому стані, то така бактеріальна клітина може бути бажаним господарем або, у альтернативному втіленні, молекула може експресуватися у бактеріальній клітині-хазяїні та згодом бути піддана рефолдингу. Наприклад, у біотехнології, у якості клітин-хазяїв добре відомі різні штами *E. Coli*, які застосовують для експресії. Також, для цього способу можна застосувати різні штами *B. subtilis*, *Streptomyces*, інших бацил тощо.

Якщо це бажано, у якості клітин-хазяїв також можна застосувати відомі фахівцям штами дріжджів, а також клітини комах, наприклад, *Drosophila* та *Lepidoptera* та системи вірусної експресії. Див., наприклад, Miller et al., Genetic Engineering, 8:277-298, Plenum Press (1986) та зазначені тут посилання.

Головні способи конструювання векторів, необхідні для отримання клітин-хазяїв винаходу способи трансфекції та необхідні для отримання антиген-зв'язуючого білка винаходу від цих клітин-хазяїв способи культивування можуть являти собою загальноприйнятні технічні прийоми. Звичайно, способом культивування заявленого винаходу є спосіб культивування без додавання сироватки, звичайно шляхом культивування позбавлених сироватки клітин у суспензії. Також,

при отриманні, антиген-зв'язуючі білки винаходу можуть бути очищені від змісту клітинної культури згідно зі стандартними процедурами у цій галузі, в тому числі за допомогою осадження сульфатом амонію, афінної хроматографії та хроматографії на колонках, гель-електрофорезу тощо. Такі способи відомі кожному фахівцю у цій галузі та не обмежують даний винахід.

Наприклад, отримання змінених антитіл описано у WO 99/58679 та WO 96/16990.

У іншому способі експресії антиген-зв'язуючих білків може бути застосована експресія у трансгенних тваринах, як-то описано у U. S. Patent NO. 4,873,316. Це також стосується систем експресії з застосуванням тваринного казеїнового промотору, що при трансгенному введенні до ссавців жіночої статі дозволяє отримати бажаний рекомбінантний білок у їх молоці.

У додатковому втіленні винаходу передбачено спосіб отримання антитіл винаходу, складовою частиною якого є стадія культивування клітин-хазяїв, трансформованих або трансфікованих вектором, що кодує легкий та/або важкий ланцюг антитіл винаходу та відновлення отриманих таким чином антитіл.

У відповідності з заявленим винаходом, передбачено спосіб отримання анти-OSM антитіл заявленого винаходу, що зв'язуються з та нейтралізують активність OSM людини, який полягає у:

- (а) наданні першого вектора, що кодує важкий ланцюг антитіл;
- (б) наданні другого вектора, що кодує легкий ланцюг антитіл;
- (в) трансформації клітин-хазяїв ссавців (наприклад, CHO) вказаним першим та другим векторами;
- (г) культивуванні клітин-хазяїв етапу (с) в умовах, що сприяють секреції антитіл із зазначеної клітини-господаря в зазначене культуральне середовище;
- (д) відновленні секретованих антитіл етапу (d).

Після експресії, здійсненої бажаним способом, антитіла перевіряють на активність *in vitro* за допомогою відповідного аналізу. Для кількісної та якісної оцінки зв'язування антитіл з OSM застосовують загальноприйнятий зараз формат ІФА-аналізу. Крім того, для перевірки ефективності нейтралізації перед наступними клінічними дослідженнями на людях можна також застосувати інші аналізи *in vitro*, які проводять для оцінки тривалості існування антитіл у тілі, незважаючи на існуючі механізми очищення.

Доза та тривалість лікування мають відношення до відносної тривалості існування молекул заявленого винаходу у кровотоці людини та можуть бути визначені будь-яким фахівцем у цій галузі у залежності від стану, підданого лікуванню та загального здоров'я пацієнтів. Передбачається, що дози, що повторюються (наприклад, раз на тиждень або раз у кожен два тижні) протягом тривалого періоду часу (наприклад, 4-6 місяців) можуть бути необхідними для досягнення максимальної терапевтичної ефективності.

У одному втіленні заявленого винаходу передбачено отримання рекомбінантних трансформованих, трансфікованих або трансдукованих клітин-хазяїв, що містять принаймні одну касету експресії, наприклад, де касета експресії містить полінуклеотид, що кодує описаний тут відповідно до винаходу важкий ланцюг антиген-зв'язуючого білка та додатково містить полінуклеотид, що кодує описаний тут відповідно до винаходу легкий ланцюг антиген-зв'язуючого білка або де існують дві касети експресії та перша з них кодує легкий ланцюг та друга кодує важкий ланцюг. Наприклад, у одному втіленні, перша касета експресії містить полінуклеотид, що кодує важкий ланцюг антиген-зв'язуючого білка, що містить сталу ділянку або її антиген-зв'язуючий фрагмент, пов'язаний зі сталою ділянкою, описаною тут відповідно до винаходу та додатково містить другу касету, що містить полінуклеотид, який кодує легкий ланцюг антиген-зв'язуючого білка, що містить сталу ділянку або її антиген-зв'язуючий фрагмент, пов'язаний зі сталою ділянкою, описаною тут відповідно до винаходу. Наприклад, перша касета експресії містить полінуклеотид, що кодує важкий ланцюг, вибраний від SEQ.ID.NO:70 або SEQ.ID.NO:76 та друга касета експресії містить полінуклеотид, що кодує легкий ланцюг, вибраний від SEQ.ID.NO:72.

Треба розуміти, що описані тут послідовності (SEQ ID NO.25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 83) охоплюють послідовності, що є істотно ідентичними, наприклад, що мають принаймні 90% тотожності, наприклад, принаймні 91% або принаймні 92% або принаймні 93% або принаймні 94% або принаймні 95% або принаймні 96% або принаймні 97% або принаймні 98% або принаймні 99% тотожності до описаних тут послідовностей.

Відносно нуклеїнових кислот, термін "істотно ідентичні" вказує на те, що дві нуклеїнові кислоти або їх зазначені послідовності, при оптимальному вирівнюванні та порівнянні є ідентичними, з відповідними нуклеотидними вставками або делеціями у принаймні приблизно 80% від загального числа нуклеотидів, принаймні приблизно 90% - 95% або принаймні



приблизно 98% - 99.5% нуклеотидів. Альтернативно, істотна ідентичність має місце, коли сегменти будуть гібридизуватися у селективних гібридизаційних умовах з комплементом ланцюга.

Для нуклеотидних та амінокислотних послідовностей, термін "ідентичність" вказує на ступінь тотожності між двома нуклеїновими кислотами або амінокислотними послідовностями при оптимальному вирівнюванні та у порівнянні з відповідними вставками або делеціями. Альтернативно, істотна ідентичність має місце, коли сегменти ДНК сегменти будуть гібридизуватися у селективних гібридизаційних умовах з комплементом ланцюга.

У іншому втіленні, винахід стосується стійко трансформованих клітин-хазяїв, що містять вектор, який містить одну або декілька касет експресії, що кодують важкий ланцюг та/або легкий ланцюг антитіл, що містить сталу ділянку або її антиген-зв'язуючий фрагмент, пов'язаний, як тут описано, зі сталою ділянкою. Наприклад, подібні клітини-хазяї можуть містити один вектор, що кодує легкий ланцюг та другий вектор, що кодує важкий ланцюг, наприклад, перший вектор, що кодує важкий ланцюг, вибраний від SEQ.ID.NO:70 або SEQ.ID.NO: 76 та другий вектор, що кодує легкий ланцюг, наприклад, легкий ланцюг SEQ ID NO: 72.

У іншому втіленні заявленого винаходу передбачені описані тут відповідно до винаходу клітини-хазяї, де клітина є еукаріотичною, наприклад, клітиною ссавців. Приклади таких клітинних ліній охоплюють клітинні лінії CHO або NS0.

У іншому втіленні заявленого винаходу передбачено спосіб отримання антитіл, що містять сталу ділянку або її антиген-зв'язуючий фрагмент, приєднаний до описаної тут відповідно до винаходу сталої ділянки, складовою частиною якого є стадія культивування клітин-хазяїв у культуральному середовищі, наприклад, у вільному від сироватки культуральному середовищі.

У іншому втіленні заявленого винаходу передбачено спосіб, описаний тут відповідно до винаходу, де вказане антитіло є додатково очищеним до ступеня чистоти принаймні 95% або вище (наприклад, 98% або вище) щодо зазначеного антитіла, що містить вільне від сироватки культуральне середовище.

У іншому втіленні передбачено фармацевтичну композицію, що містить антиген-зв'язуючий білок та фармацевтично прийнятний носій .

У іншому втіленні заявленого винаходу передбачено набір з компонентів, що містить описану тут відповідно до винаходу композицію разом з інструкціями по застосуванню.

Застосування терапевтичного агента винаходу може бути здійснено будь-яким прийнятним шляхом доставки агента до хазяїна. Антиген-зв'язуючі білки та фармацевтичні композиції винаходу є особливо корисними для парентерального введення, тобто підшкірного (s.c), інтратекального, внутрішньочеревного, внутрішньом'язового (i.m.) або внутрішньовенного (i.v.).

Терапевтичні агенти винаходу можуть бути отримані у вигляді фармацевтичних композицій, що містять ефективну кількість антиген-зв'язуючого білка винаходу у вигляді активного інгредієнту у фармацевтично прийнятному носії. У одному втіленні, профілактичний агент винаходу знаходиться у вигляді водної суспензії або розчину, що містить антиген-зв'язуючий білок у готовій формі для ін'єкції. У одному втіленні, суспензія або розчин є буферизованими до фізіологічного значення pH. У одному втіленні, композиція для парентерального введення містить розчин антиген-зв'язуючого білка винаходу або його "коктейль", розчинений у фармацевтично прийнятному носії. У одному втіленні, носій є водним носієм. Може бути застосовано багато водних носіїв, наприклад, 0.9% сольовий розчин, 0.3% гліцин тощо. Ці розчини можуть бути отримані у стерильному стані та головним чином бути вільними від будь-яких частинок. Їх можна стерилізувати шляхом загальноприйнятих добре відомих способів стерилізації (наприклад, шляхом фільтрації). Також, якщо це необхідно для наближення до фізіологічних умов, композиції можуть містити відповідні фармацевтично прийнятні допоміжні речовини, як-то агенти регулювання pH та буферизації тощо. Концентрація антиген-зв'язуючого білка винаходу у подібному фармацевтичному препараті може бути дуже різною, тобто від менш, ніж приблизно 0.5%, звичайно біля або принаймні приблизно 1%, аж до приблизно 15 або 20% за вагою та її обирають, в першу чергу, на основі обсягів рідини, характеристик в'язкості тощо в залежності від певного обраного способу введення.

Отже, можна отримати фармацевтичну композицію винаходу для внутрішньом'язової ін'єкції, що містить приблизно 1 мл стерильної буферизованої води та приблизно 1 нг - 100 мг, наприклад, приблизно 50 нг - 30 мг або приблизно 5-25 мг антиген-зв'язуючого білка, наприклад, антитіл винаходу. Аналогічним чином, можна отримати фармацевтичну композицію винаходу для внутрішньовенної інфузії, що буде містити приблизно 250 мл стерильного розчину Рінгера та приблизно 1-30 мг або приблизно 5-25 мг антиген-зв'язуючого білка винаходу на мл розчину Рінгера. Актуальні способи отримання композицій для парентерального введення добре відомі у цей галузі, є зрозумілими для фахівців та більш детально описані, наприклад, у Remington's

Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania. Стосовно отримання препаратів антиген-зв'язуючого білка винаходу для внутрішньовенного введення див. Lasmar U and Parkins D "The formulation of Biopharmaceutical products", Pharma. Sci.Tech.today, page 129-137, Vol.3 (3rd April 2000); Wang, W "Instability, stabilisation and formulation of liquid protein pharmaceuticals", Int. J. Pharm 185 (1999) 129-188; Stability of Protein Pharmaceuticals Part A and B ed Ahern T.J., Manning M.C., New York, NY: Plenum Press (1992); Akers.M.J. "Excipient-Drug interactions in Parenteral Formulations", J. Pharm Sci 91 (2002) 2283-2300; Imamura, K et al "Effects of types of sugar on stabilization of Protein in the dried state", J Pharm Sci 92 (2003) 266-274; Izutsu, Kkojima, S. "Excipient crystalinity and its protein-structure-stabilizing effect during freeze-drying", J Pharm. Pharmacol, 54 (2002) 1033-1039; Johnson, R, "Mannitol-sucrose mixtures-versatile formulations for protein lyophilization", J. Pharm. Sci, 91 (2002) 914-922; та Ha, E Wang W, Wang Y.j. "Peroxide formation in polysorbate 80 and protein stability", J. Pharm Sci, 91, 2252-2264, (2002), де повний зміст цієї літератури, до якої може звернутися читач, є включений сюди шляхом посилання.

У одному втіленні, терапевтичний агент винаходу у складі фармацевтичного препарату є присутнім у вигляді стандартної дози. Відповідна терапевтично ефективна доза може бути легко визначена фахівцем. Прийнятні для пацієнтів дози можуть бути обчислені відповідно до їх ваги, наприклад, прийнятна доза може бути у діапазоні приблизно 0.1-20 мг/кг, наприклад, приблизно 1-20 мг/кг, наприклад, приблизно 10-20 мг/кг або, наприклад, приблизно 1-15 мг/кг, наприклад, приблизно 10-15 мг/кг. Для ефективного лікування у людей таких захворювань, як астма або ідіопатичний легеневий фіброз (IPF), прийнятні дози можуть бути у діапазоні між приблизно 0.1-1000 мг, наприклад, приблизно 0.1-500 мг, наприклад, приблизно 500 мг, наприклад, приблизно 0.1-100 мг або приблизно 0.1-80 мг або приблизно 0.1-60 мг або приблизно 0.1-40 мг або, наприклад, приблизно 1-100 мг або приблизно 1-50 мг антиген-зв'язуючого білка цього винаходу, який можна буде ввести парентеральним шляхом, наприклад, підшкірно, внутрішньовенно або внутрішньом'язово. Подібну дозу можна, якщо це необхідно, повторити через відповідні інтервали у часі, вибрані лікарем в міру необхідності.

Описані тут антиген-зв'язуючі білки можуть бути піддані ліофілізації для зберігання та потім бути відновлені перед застосуванням у прийнятному носії. Було показано, що цей спосіб є ефективним відносно загальноприйнятих імуноглобулінів та відповідно до цього винаходу можуть бути застосовані відомі у цій галузі способи ліофілізації та відновлення.

У іншому аспекті заявленого винаходу, передбачено спосіб лікування пацієнта-людини, ураженого запальним захворюванням суглобів, як-то ревматоїдний артрит, ювенільний ревматоїдний артрит, остеоартрит, псоріатичний артрит та анкілозуючий спондиліт, складовою частиною якого є стадія введення вказаному пацієнту, як тут описано, терапевтично ефективної кількості антиген-зв'язуючого білка.

У іншому аспекті заявленого винаходу, передбачено спосіб лікування пацієнта-людини, ураженого захворюванням або розладом, вибраним від цукрового діабету першого типу, псоріазу, запальних захворювань кишечника (IBD), в тому числі хвороби Крона та неспецифічного виразкового коліту (UC), системного червоного вовчачка (SLE, Lupus), атопічного дерматиту, алергічного риніту, хронічного обструктивного захворювання легень (ХОЗЛ), пневмонії, еозинофільного езофагіту, системного склерозу (SS) або ідіопатичного легеневого фіброзу (IPF), синдрому Шегрена, склеродермії, васкулітів (у тому числі синдрому Такаясу, хвороби Хортон, вузликового поліартриту, гранулематозу Вегенера, хвороби Кавасакі, ізольованого васкуліту ЦНС, артеріїту Черджа-Стросс, мікроскопічного поліартеріїту / ангіопатії, алергічного васкуліту, хвороби Шенлейна-Геноха та первинного кріоглобулінемічного васкуліту), недиференційованих спондилоартропатій (USpA), хвороби Бехтерева (AS), реакції типу "трансплантат проти хазяїна" (GVHD), первинного біліарного цирозу печінки (PBC), первинного склерозуючого холангіту (PSC), хвороби Верльгофа (ITP), розсіяного склерозу (MS) та астми, де етапом вказаного способу є введення вказаному пацієнту, як тут описано, терапевтично ефективної кількості антиген-зв'язуючого білка.

Будь-яка одна або декілька вищевказаних хвороб може бути цільовим захворюванням для способу лікування винаходу.

У окремому аспекті, захворювання або розлад є вибраним з групи, що охоплює остеоартрит, (OA), псоріаз, ідіопатичний легеневий фіброз (IPF), системний склероз (CB), синдром Шегрена, склеродермію або розсіяний склероз (MS).

У одному аспекті заявленого винаходу, автоімунне захворювання є остеоартритом.

У одному аспекті заявленого винаходу, автоімунне захворювання є псоріазом.

У одному аспекті заявленого винаходу, автоімунне захворювання або розлад є фіброзним захворюванням або розладом.

У одному аспекті заявленого винаходу, автоімунне захворювання є ідіопатичним легенеvim фіброзом (IPF).

У одному аспекті заявленого винаходу, автоімунне захворювання є системним склерозом (SS).

5 У одному аспекті заявленого винаходу, автоімунне захворювання є синдромом Шегрена.

У одному аспекті заявленого винаходу, автоімунне захворювання є склеродермою.

10 У іншому аспекті винаходу, передбачено спосіб скорочення або запобігання хрящової деградації у пацієнта-людини, ураженого (або з підозрою на ураження) такою деградацією, складовою частиною якого є стадія введення вказаному пацієнту, як тут описано, терапевтично ефективної кількості антиген-зв'язуючого білка.

15 У іншому аспекті заявленого винаходу передбачено спосіб зменшення продукування фактора некрозу пухлин - альфа у пацієнта, страждаючого захворюванням або розладом, чутливим до зменшення кількості фактора некрозу пухлин - альфа, складовою частиною якого є стадія введення вказаному пацієнту, як тут описано, терапевтично ефективної кількості антиген-зв'язуючого білка.

20 У іншому аспекті винаходу, передбачено спосіб лікування позасуглобних проявів захворювання на артрит або розладу, наприклад, синдрому Фелті та/або лікування утворення атеросклеротичних бляшок, складовою частиною якого є стадія введення вказаному пацієнту - людині, що має позасуглобні прояви захворювання на артрит або розлад, як тут описано, терапевтично ефективної кількості антиген-зв'язуючого білка.

У іншому аспекті заявленого винаходу передбачено спосіб лікування пацієнта-людини, ураженого захворюванням ендотеліального клітинного походження, складовою частиною якого є стадія введення вказаному пацієнту, як тут описано, терапевтично ефективної кількості антиген-зв'язуючого білка.

25 У іншому аспекті заявленого винаходу передбачено спосіб лікування пацієнта-людини, ураженого фіброзою хворобою або розладом, як-то ідіопатичний легенеvim фіброз, прогресивний системний склероз (склеродерма), фіброз печінки, печінкова гранульома, шистосомоз та лейшманіоз, складовою частиною якого є стадія введення вказаному пацієнту, як тут описано, терапевтично ефективної кількості антиген-зв'язуючого білка..

30 У іншому аспекті заявленого винаходу передбачено спосіб лікування пацієнта-людини, ураженого захворюванням або розладом центральної нервової системи, як-то розсіяний склероз (MS), хвороба Альцгеймера (AD) та інші деменції та, крім того, відноситься до застосування у лікуванні болю, зокрема нейропатичного та/або запального болю, де вказаний спосіб має стадію введення вказаному пацієнту, як тут описано, терапевтично ефективної кількості антиген-зв'язуючого білка.

35 Також передбачено, як тут описано, застосування антиген-зв'язуючого білка у виробництві ліків для лікування, як тут також описано, хвороб та розладів.

40 Наприклад, у одному аспекті винаходу передбачено застосування антиген-зв'язуючого білка, як тут описано, у лікуванні або профілактиці хвороб та розладів, чутливих до модуляції взаємодії між hOSM та gp130.

У іншому аспекті винаходу передбачено застосування антиген-зв'язуючого білка, як тут описано, у лікуванні або профілактиці запального захворювання суглобів, як-то ревматоїдного артриту, ювенільного ревматоїдного артриту, остеоартриту, псоріатичного артриту та анкілозуючого спондилоартриту .

45 У іншому аспекті винаходу передбачено застосування антиген-зв'язуючого білка, як тут описано, у лікуванні або профілактиці захворювання або розладу, вибраного від цукрового діабету першого типу, псоріазу, запальних захворювань кишечника (IBD), в тому числі хвороби Крона та неспецифічного виразкового коліту (UC), системного червоного вовчака (SLE, Lupus), atopічного дерматиту, алергічного риніту, хронічного обструктивного захворювання легень (ХОЗЛ), пневмонії, еозинофільного езофагіту, системного склерозу (SS) або ідіопатичного легеневого фіброзу (IPF), синдрому Шегрена, склеродермії, васкулітів (у тому числі синдрому Такаюсу, хвороби Хортонна, вузликового поліартриту, гранулематозу Вегенера, хвороби Кавасакі, ізольованого васкуліту ЦНС, артеріїту Черджа-Стросс, мікроскопічного поліартеріїту/ангіопатії, алергічного васкуліту, хвороби Шенлейна-Геноха та первинного кріоглобулінемічного васкуліту), недиференційованих спондилоартропатій (USpA), хвороби Бехтерева (AS), реакцій типу "трансплантат проти хазяїна" (РТПХ), (GVHD), первинного біліарного цирозу печінки (PBC), первинного склерозуючого холангіту (PSC), хвороби Верльгофа (ITP), розсіяного склерозу (MS) та астми, де етапом вказаного способу є введення вказаному пацієнту, як тут описано, терапевтично ефективної кількості антиген-зв'язуючого білка.

60

Наприклад, у окремому аспекті передбачено застосування антиген-зв'язуючого білка у лікуванні або профілактиці остеоартриту (OA), псоріазу, ідіопатичного легеневого фіброзу (IPF) або розсіяного склерозу (MS).

Інші аспекти та переваги заявленого винаходу додатково зазначені у його детальному описі та втіленнях.

У одному аспекті, винахід стосується фармацевтичної композиції, що містить антиген-зв'язуючий білок заявленого винаходу або його функціональний фрагмент та фармацевтично прийнятний носій для лікування або профілактики запальних хвороб та /або розладів, наприклад, запального захворювання суглобів, як-то ревматоїдного артрити, ювенільного ревматоїдного артрити, остеоартриту, псоріатичного артрити та анкілозуючого спондиліту або вибраний від цукрового діабету першого типу, псоріазу, запальних захворювань кишечника (IBD), в тому числі хвороби Крона та неспецифічного виразкового коліту (UC), системного червоного вовчака (SLE, Lupus), atopічного дерматиту, алергічного риніту, хронічного обструктивного захворювання легень (ХОЗЛ), пневмонії, еозинофільного езофагіту, системного склерозу (SS) або ідіопатичного легеневого фіброзу (IPF), синдрому Шегрена, склеродермії, васкулітів (у тому числі синдрому Такаясу, хвороби Хортон, вузликівого поліартриту, гранулематозу Вегенера, хвороби Кавасакі, ізолюваного васкуліту ЦНС, артеріїту Черджа-Стросс, мікроскопічного поліартеріїту / ангіопатії, алергічного васкуліту, хвороби Шенлейна-Геноха та первинного криоглобулінемічного васкуліту), недиференційованих спондилоартропатій (USpA), хвороби Бехтерева (AS), реакцій типу "трансплантат проти хазяїна" (GVHD), первинного біліарного цирозу печінки (PBC), первинного склерозуючого холангіту (PSC), хвороби Верльгофа (ITP), розсіяного склерозу (MS) та астми.

У іншому втіленні заявленого винаходу передбачено спосіб лікування пацієнта-людини, ураженого запальним розладом або захворюванням, складовою частиною якого є стадія введення, як тут описано, терапевтично ефективної кількості антиген-зв'язуючого білка відповідно до винаходу, наприклад, передбачено спосіб лікування пацієнта-людини, ураженого запальним розладом або захворюванням, складовою частиною якого є стадія введення фармацевтичної композиції, що містить антиген-зв'язуючий білок відповідно до заявленого винаходу у комбінації з фармацевтично прийнятним носієм.

У додатковому втіленні передбачено спосіб лікування пацієнта-людини, ураженого запальним розладом або захворюванням, вибраним від, наприклад, запального захворювання суглобів, як-то ревматоїдного артрити, ювенільного ревматоїдного артрити, остеоартриту, псоріатичного артрити та анкілозуючого спондиліту або вибраний від цукрового діабету першого типу, псоріазу, запальних захворювань кишечника (IBD), в тому числі хвороби Крона та неспецифічного виразкового коліту (UC), системного червоного вовчака (SLE, Lupus), atopічного дерматиту, алергічного риніту, хронічного обструктивного захворювання легень (ХОЗЛ), пневмонії, еозинофільного езофагіту, системного склерозу (SS) або ідіопатичного легеневого фіброзу (IPF), синдрому Шегрена, склеродермії, васкулітів (у тому числі синдрому Такаясу, хвороби Хортон, вузликівого поліартриту, гранулематозу Вегенера, хвороби Кавасакі, ізолюваного васкуліту ЦНС, артеріїту Черджа-Стросс, мікроскопічного поліартеріїту/ангіопатії, алергічного васкуліту, хвороби Шенлейна-Геноха та первинного криоглобулінемічного васкуліту), недиференційованих спондилоартропатій (USpA), хвороби Бехтерева (AS), реакцій типу "трансплантат проти хазяїна" (GVHD), первинного біліарного цирозу печінки (PBC), первинного склерозуючого холангіту (PSC), хвороби Верльгофа (ITP), розсіяного склерозу (MS) та астми.

У альтернативному аспекті винаходу передбачено спосіб гуманізації не-людинних антитіл або фрагментів цих антитіл, що містить етапи:

- а) включення одного або декількох не-людинних CDR до акцепторної каркасної послідовності для отримання химерних або гуманізованих антитіл;
- б) зв'язування химерних або гуманізованих антитіл зі своїм антигеном;
- в) визначення залишків антитіл, безпосередньо залучених до зв'язування з антигеном;
- г) змінення шляхом мутації одного або декількох залишків, не залучених до етапу (с) послідовності ембріональної лінії людини;
- е) відновлення вказаних антитіл.

У додатковому аспекті, залишки антитіл, залучені до зв'язування з антигеном можуть бути визначені шляхом кристалографії, моделювання гомології, докінгу (стикування) білків, мутагенезу або лінійного пептидного картування.

Наприклад, у одному аспекті винаходу, як тут описано, була отримана кристалографічна структура сокристу антитіла - антиген та залучені до зв'язування залишки, як було визначено, дорівнювали приблизно 2-5Å.

Термін "не-людинні" охоплює будь-які антитіла, що можуть бути піддані мутації або деяким

іншим чином заміщені для більшого наближення до послідовності людської ембріональної лінії, в результаті чого зменшується ймовірність імуногенності.

У одному аспекті, принаймні один CDR є повернутим до первісного стану послідовності людської ембріональної лінії. У додатковому аспекті, принаймні два CDR є повернутими до первісного стану послідовностей людської ембріональної лінії. У ще одному додатковому аспекті, принаймні 5 залишків є повернутими до первісного стану послідовностей людської ембріональної лінії, наприклад принаймні 7 або принаймні 8 або принаймні 9 або принаймні 10 залишків є повернутими до первісного стану послідовностей людської ембріональної лінії.

Перенесення не-людських моноклональних антитіл або їх фрагментів до людського акцептора додатково часто має у основі введення заміщень у каркасну послідовність для відновлення належних взаємодій ділянки CDR з антигеном, часто позначених, як зворотні мутації. У одному втіленні заявленого винаходу, зворотні мутації є необхідними для відновлення належних взаємодій ділянки CDR з антигеном.

У альтернативному втіленні, акцепторна каркасна послідовність людини може бути включена до антитіла з одним або декількома не-людськими CDR для отримання химерного антитіла. У ще одному альтернативному втіленні, послідовність може бути отримана шляхом синтезу олігонуклеотидів.

CDR (або залишки гіперваріабельної ділянки) не-людських антитіл є включеними до складу VL та/або VH ланцюгів акцепторних каркасних послідовностей людини. Наприклад, до складу таких послідовностей вони можна включати залишки, відповідні залишкам CDR по нумерації Kabat, гіперваріабельні петельні залишки по нумерації Chothia, гіперваріабельні залишки, згідно з нумерацією по Abm та/або Contact.

У одному втіленні, передбачено спосіб гуманізації антитіла, що містить етапи:

а) отримання не-людських антитіл, що зв'язуються з цільовим антигеном  
б) отримання кристалографічної структури сокристалу типу антитіло - антиген  
с) визначення приблизно 2-5A кристалічної структури залишків не-людських антитіл, безпосередньо залучених до зв'язування з антигеном

е) отримання мутацій у одному або у декількох залишках, не залучених до етапу (с) до залишку, отриманого від послідовності людини;

ф) відновлення вказаного антитіла.

У додатковому втіленні описаних тут способів, антитіло або фрагмент зв'язування антитіла зберігає здатність зв'язуватися зі своїм антигеном. Наприклад, антитіло або фрагмент зв'язування антитіла зберігає здатність зв'язуватися зі своїм антигеном порівняно з не-людським антитілом. Наприклад, антитіло етапу ф) у порівнянні з не-людськими антитілами етапу а) має зв'язувальну здатність (KD) у межах або більш, ніж у десять разів або, наприклад, антитіло етапу ф) у порівнянні з не-людськими антитілами етапу а) має зв'язувальну здатність (KD) у межах або більш, ніж у 3-5 разів.

Наприклад, антитіло або фрагмент зв'язування антитіла зберігає зв'язування до свого антигену з концентрацією не-людських антитіл у межах 1000 нМ при вимірюванні за допомогою Biacore або у межах 500 нМ при вимірюванні за допомогою Biacore або у межах 100 нМ при вимірюванні за допомогою Biacore. Наприклад, антитіло або фрагмент зв'язування антитіла зберігає зв'язування до свого антигену з концентрацією не-людських антитіл у межах 500 пМ при вимірюванні за допомогою Biacore або у межах 300 пМ при вимірюванні за допомогою Biacore або у межах 100 пМ при вимірюванні за допомогою Biacore. Наприклад, антитіло етапу ф) зв'язується зі своїм антигеном зі спорідненістю (KD) що дорівнює або є меншою, ніж 400 пМ або що дорівнює або є меншою, ніж 300 пМ або що дорівнює або є меншою, ніж 200 пМ або що дорівнює або є меншою, ніж 140 пМ.

У іншому втіленні описаних тут способів, антитіло або фрагмент зв'язування антитіла зберігає такі ж саме канонічні структури, як і не-людське антитіло або фрагмент антитіла.

У ще одному втіленні, не-людське антитіло або його фрагмент є вибраним від тварини, що не є людиною, наприклад, акули, кролів, мишей або верблюда.

У додатковому втіленні, не-людське антитіло або його фрагмент є мишачим.

У ще одному втіленні, не-людське антитіло або його фрагмент є моноклональним, поліклональним або мультиспецифічним антитілом або може бути імуноглобуліновим одиничним варіабельним доменом, наприклад, імуноглобуліновим одиничним варіабельним доменом верблюда або акули або може бути доменом, що походить від не-людського каркасного білка, який не є антитілом.

У іншому додатковому втіленні, не-людське антитіло є моноклональним антитілом.

У додатковому втіленні описаних тут способів, принаймні 2 не-людських CDR є включеними до акцепторної послідовності людини або принаймні 3 CDR або принаймні 4 CDR або принаймні

5 CDR або всі 6 CDR є включеними до акцепторної послідовності людини.

У додатковому втіленні описаних тут способів, залишки піддають мутації до отримання такого залишку послідовності людини, що не буде безпосередньо залученим до зв'язування антигену, вже не має людської природи та може належати до залишків у CDR або у каркасних ділянках або у обох цих місцях. У додатковому втіленні, принаймні один CDR є підданим мутації до послідовності ембріональної лінії людини або принаймні два CDR піддані мутації або принаймні три CDR піддані мутації або принаймні чотири CDR піддані мутації. У іншому втіленні, принаймні 5 залишків є підданими мутації до послідовності ембріональної лінії людини або принаймні 7 залишків або принаймні 10 залишків або принаймні 15 залишків або принаймні 20 залишків або принаймні 40 залишків або принаймні 60 залишків є підданими мутації до послідовності ембріональної лінії людини.

У іншому втіленні описаних тут способів, залишки антитіл, що безпосередньо залучені до зв'язування з антигеном, визначені у межах приблизно 2-5 Å або приблизно 3-5 Å або приблизно 3-4 Å або приблизно 3.5 Å.

У додатковому втіленні описаних тут способів, передбачені антитіла, які можна отримати за допомогою цих способів.

Термін "антиген-зв'язуючий білок", як тут застосовано, має відношення до антитіл, фрагментів антитіл та інших білкових конструкцій, що здатні зв'язуватися з OSM людини та нейтралізовувати його.

Терміни "Fv, Fc, Fd, Fab або F(ab)2" застосовують відповідно до їх стандартних значень (див., наприклад, Harlow et al., *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)).

Термін "антитіло" є застосованим тут у широкому сенсі та певним чином охоплює моноклональні антитіла (в тому числі повнорозмірні моноклональні антитіла), поліклональні антитіла, мультиспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла).

Термін "моноклональне антитіло", як тут застосовано, має відношення до антитіл, отриманих від популяції істотно гомогенних антитіл, тобто окремі антитіла, що входять до складу популяції є ідентичними за виключенням можливих природно виникаючих мутацій, що можуть бути присутніми у незначних кількостях. Моноклональні антитіла є високоспецифічно спрямованими проти одного антигенного сайту зв'язування.

Крім того, на відміну від препаратів поліклональних антитіл, що звичайно містять різні антитіла, спрямовані проти різних детермінантів (епітопів), кожне моноклональне антитіло спрямовано проти одного антигенного детермінанту.

"Химерне антитіло" має відношення до типу штучно створених антитіл, у яких частина важкого та/або легкого ланцюга є ідентичною або гомологічною відповідній послідовності антитіла, отриманого від певного класу або підкласу донорних антитіл, у той час, як позостала частина ланцюга (ланцюгів) є ідентичною або гомологічною відповідній послідовності антитіла, отриманого від інших видів або належить до іншого класу або підкласу антитіл, а також фрагментів таких антитіл, якщо вони проявляють бажану біологічну активність (US Patent NO. 4, 816,567 та Morrison et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855) (1984)).

"Гуманізоване антитіло" має відношення до типу штучно створених антитіл, що має CDR, отримані від донорного імуноглобуліну не-людинного походження та позосталі частини молекули, отримані від одного (чи декількох) людського імуноглобуліну (імуноглобулінів). На додачу, каркасні підтримуючі залишки можуть бути змінені для збереження здатності до зв'язування (див., наприклад, Queen et al., *Proc. Natl Acad Sci USA*, 86:10029-10032 (1989), Hodgson et al., *Bio/Technology*, 9:421 (1991)). Прийнятне акцепторне антитіло людини може бути будь-яким вибраним від загальноприйнятої бази даних, наприклад, бази даних KABAT®, бази даних Los Alamos та бази даних Swiss Protein, відповідно до гомології до нуклеотидних та амінокислотних послідовностей донорного антитіла. Антитіло людини, що відрізняється гомологією до каркасних ділянок донорного антитіла (на амінокислотній основі) може бути прийнятним у якості надання її сталої ділянки важкого ланцюга та/або варіабельної каркасної ділянки важкого ланцюга для вставки донорних CDR. Подібним чином може бути вибрано прийнятне акцепторне антитіло, здатне віддавати свої сталі або варіабельні каркасні ділянки легкого ланцюга. Слід зазначити, що важкий та легкий ланцюги акцепторного антитіла не обов'язково можуть походити від того ж акцепторного антитіла. У науковій літературі з обмежувальної частини Формули Винаходу описано декілька шляхів отримання подібних гуманізованих антитіл - див. наприклад EP-A-0239400 та EP-A-054951.

Під "ідентичністю" для полінуклеотидів та поліпептидів мається на увазі, що вона, залежно від обставин, може бути порівнянням, обчисленням за допомогою алгоритму, наведеного у пп. (1) та (2) нижче:

(1) ідентичність для полінуклеотидів обчислюють шляхом множення загальної кількості нуклеотидів у даній послідовності на ціле визначення відсотка ідентичності, поділене на 100 з наступним відніманням цього продукту від зазначеної загальної кількості нуклеотидів у зазначеній послідовності або у вигляді формули:

$$np \leq xp - (xp \cdot y),$$

де np є кількістю нуклеотидних змінень, xp є загальною кількістю нуклеотидів у даній послідовності, у дорівнює 0.95 для 95%, 0.97 для 97% або 1.00 для 100%, знак "·" є символом операції множення та будь-який нецілий продукт xp та y є округленим до найближчого цілого числа перед відніманням його від xp. Змінення полінуклеотидної послідовності, що кодує поліпептид може створити у цій кодуєчій послідовності різні нонсенс-, місенс-мутації або мутації зі зсувом рамки, що ведуть до відповідного змінення поліпептиду, що кодується цим полінуклеотидом.

(2) Ідентичність для поліпептидів обчислюють шляхом множення загальної кількості амінокислот на ціле визначення відсотка ідентичності, поділене на 100 з наступним відніманням цього продукту від зазначеної загальної кількості амінокислот або у вигляді формули:

$$na \leq xa - (xa \cdot y),$$

де na є кількістю амінокислотних змінень, xa є загальною кількістю амінокислот у послідовності, у дорівнює 0.95 для 95%, 0.97 для 97% або 1.00 для 100%, знак "·" є символом операції множення та де будь-який нецілий продукт xa та y є округленим до найближчого цілого числа перед відніманням його від xa.

"Виділений" означає змінений "рукою людини" від свого природного стану, заміщений або видалений від свого оригінального оточення або те та інше. Наприклад, природно присутній у живому організмі полінуклеотид або поліпептид не є "виділеним", але такий саме полінуклеотид або поліпептид, відокремлений від співіснуючих матеріалів свого природного стану є "виділеним", в тому числі, але без обмеження тих випадків, коли цей полінуклеотид або поліпептид знову вводять у клітину, навіть якщо клітина є такого ж самого виду або типу, як та, від якої вилучили цей полінуклеотид або поліпептид.

У цій заявці та її Формулі Винаходу, термін "що містить" та "містить" також охоплює терміни "що складається" та "складається з". Тобто, ці слова призначені для передачі можливого включення інших елементів або певним чином не зазначених цілих чисел, де це дозволено контекстом.

Термін "специфічно зв'язується з" у цій заявці застосований по відношенню до антиген-зв'язуючих білків винаходу, де мається на увазі, що антиген-зв'язуючий білок зв'язується з OSM людини (hOSM) з наявністю або відсутністю незначного зв'язування з іншими білками людини. Проте, цей термін не виключає того факту, що антиген-зв'язуючі білки винаходу також можуть бути перехресно-реактивними з іншими формами OSM, наприклад, OSM приматів.

Термін "безпосередньо взаємодіє" у цій заявці застосований по відношенню до антиген-зв'язуючих білків винаходу, де мається на увазі, що коли антиген-зв'язуючий білок є зв'язаним з OSM людини (hOSM), то певні залишки антиген-зв'язуючого білка знаходяться у межах певних залишків hOSM розміром 3.5A.

Термін "інгібує" у цій заявці застосований по відношенню до антиген-зв'язуючих білків винаходу, де мається на увазі, що біологічна активність OSM є зменшеною у присутності антиген-зв'язуючих білків заявленого винаходу у порівнянні з активністю OSM у відсутності таких антиген-зв'язуючих білків. Інгібування може виникати завдяки але без обмеження, одному або декільком процесам блокування зв'язування ліганду, що попереджає лігандне активування рецептора та знижує активність OSM або впливає на ефекторну функціональність. Антитіла винаходу можуть нейтралізувати OSM та рівні нейтралізації можна виміряти різним шляхом, наприклад, за допомогою аналізів, як це наведено у Прикладах нижче, наприклад, за допомогою аналізу нейтралізації клітин KB у Прикладі 2. OSM є здатним індукувати вивільнення клітинами KB інтерлейкіну 6 шляхом сигналування через комплекс Grp130/OSMR. Нейтралізація OSM у цьому аналізі вимірюють шляхом оцінки здатності анти-OSM моноклональних антитіл інгібувати продукування IL6.

Якщо антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент є здатним до нейтралізації, то це буде показником інгібування взаємодії між OSM людини та його рецептором grp130. Антитіла, що, як вважається, володіють нейтралізуючою активністю відносно OSM людини будуть мати показник IC50 у аналізі нейтралізації клітин KB, менший, ніж 10 мкг/мл або менший, ніж 5 мкг/мл або менший, ніж 2 мкг/мл або менший, ніж 1 мкг/мл або менший, ніж 0.1 мкг/мл, як це наведено у Прикладі 2.

"CDR" визначені тут, як ділянки амінокислотних послідовностей антитіл, що визначають комплементарність, які є гіперваріабельними доменами важкого та легкого ланцюгів

імуноглобуліну. У варіабельній частині імуноглобуліну існують три важколанцюгових та три легколанцюгових CDR (ділянки CDR). Отже, термін "CDR", як тут застосовано, може мати відношення до всіх трьох важколанцюгових або всіх трьох легколанцюгових CDR (або, у разі необхідності, до всіх важколанцюгових та легколанцюгових CDR).

Ділянки CDR надають більшість контактних залишків зв'язування антитіла з антигеном або епітопом. У цьому винаході, інтересуючі CDR є отриманими від варіабельних послідовностей важкого та легкого ланцюга донорного антитіла та містять аналоги природних CDR, що також можуть мати або зберігати таку саме антиген-зв'язувальну специфічність та/або нейтралізуючу здатність, як і у донорного антитіла, від якого вони були отримані. Послідовності CDR антитіл можуть бути визначені за допомогою системи нумерації Kabat (Kabat et al; (Sequences of proteins of Immunological Interest NIH, 1987), альтернативно їх можна визначити з застосуванням системи нумерації Chothia (Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948), способу контактного визначення MacCallum R.M., and Martin A.C.R. and Thornton J.M., (1996), Journal of Molecular Biology, 262 (5), 732-745) або будь-якого іншого визнаного та відомого фахівцям способу нумерації залишків антитіл та визначення CDR. Інші доступні фахівцям системи нумерації для послідовностей CDR охоплюють способи "AbM" (University Bath) та "contact" (University College London). Мінімальна ділянка, що перекривається при застосуванні принаймні двох способів, вибраних з групи, що охоплює Kabat, Chothia, AbM та contact може бути визначена для передбачення "мінімальної одиниці зв'язування". Мінімальна одиниця зв'язування може бути субчастиною CDR.

Наведена нижче Таблиця 1 відображає одне визначення з застосуванням кожної з систем нумерації для кожного CDR або одиниці зв'язування. Для нумерації амінокислотної послідовності варіабельного домену у Таблиці 1 застосована схема нумерації Kabat. Слід зауважити, що деякі визначення CDR можуть відрізнятися у залежності від окремої застосованої публікації.

Таблиця 1

	CDR по Kabat	CDR по Chothia	CDR по AbM	CDR по Contact	мінімальна одиниця зв'язування
H1	31-35/35A/35B	26-32/33/34	26-35/35A/35B	30-35/35A/35B	31-32
H2	50-65	52-56	50-58	47-58	52-56
H3	95-102	95-102	95-102	93-101	95-101
L1	24-34	24-34	24-34	30-36	30-34
L2	50-56	50-56	50-56	46-55	50-55
L3	89-97	89-97	89-97	89-96	89-96

У даному описі, амінокислотні залишки послідовності антитіл мають нумерацію відповідно до системи Kabat. Аналогічним чином, терміни "CDR", "CDRL1", "CDRL2", "CDRL3", "CDRH1", "CDRH2" та "CDRH3" наведені у відповідності з системою нумерації Kabat, як вказано у Kabat et al; Sequences of proteins of Immunological Interest NIH, 1987.

Терміни "VH" та "VL" застосовані тут відносно варіабельного домену важкого ланцюга та варіабельного домену легкого ланцюга відповідно до антитіла.

Як тут застосовано, термін "домен" має відношення до згорнутої білкової структури, що має незалежну від залишку білка третинну структуру. Взагалі, домени несуть відповідальність за окремі функціональні властивості білків, але, у багатьох випадках, їх можна додати, вилучити або перенести до інших білків без суттєвої втрати функції позосталого білка та/або домену. Термін "одиничний варіабельний домен антитіла" має відношення до згорнутого поліпептидного домену, що містить характерні для змінних доменів антитіл послідовності, тому він охоплює повні варіабельні домени антитіл та модифіковані варіабельні домени, наприклад, де одна або декілька петель є заміщеними на непритаманні варіабельним доменам антитіл послідовності або варіабельні домени антитіл, які є усіченими або містять N- або C- кінцеві розширення, а також згорнуті фрагменти варіабельних доменів що зберігають принаймні зв'язувальну активність та специфічність повнорозмірного домену.

Фраза "імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен" має відношення до варіабельного домену антитіл (VH, VHH, VL), що специфічно зв'язується з антигеном або епітопом незалежно від різної V-ділянки або домену. Імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен може бути наявним у конформації (наприклад, як гомо- або гетеромультимер з іншими, відмінними від нього варіабельними ділянками або варіабельними



доменами, де інші ділянки або домени не є необхідними для антигенного зв'язування одиничним імуноглобуліновим варіабельним доменом (тобто де імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен зв'язується з незалежним від антигену додатковими варіабельними доменами). "Доменне антитіло" або "dAb" так саме є "імуноглобуліновим одиничним варіабельним доменом", здатним зв'язуватися з антигеном у межах застосування тут цього терміну. Імуноглобуліновий одиничний варіабельний домен може бути варіабельним доменом антитіла людини, але також це можуть бути одиничні варіабельні домени від інших видів тварин, як-то гризунів (наприклад, як наведено у WO 00/29004), акули - няньки або dAb VHH верблюдів. VHH верблюдів є поліпептидами імуноглобулінового одиничного варіабельного домену, отриманими від видів, що, в тому числі, охоплюють верблюда, ламу, альпаку, дромадера та гуанако, які продукують важколанцюгові антитіла, природно позбавлені легких ланцюгів. Подібні домени VHH можуть бути гуманізовані за допомогою наявних у цій галузі стандартних способів та вони все одно будуть вважатися "доменними антитілами" відповідно до винаходу. Як тут застосовано, "VH охоплюють домени VHH верблюдів". Іншим типом імуноглобулінового одиничного варіабельного домену є NARV, знайдений у хрящових риб, в тому числі, у акули-няньки. Ці домени також відомі, як "нова антигенна рецепторна варіабельна ділянка" (звичайно у вигляді аббревіатури V(NAR) або NARV). Додаткові деталі див. у Mol. Immunol. 44, 656-665 (2006) та US20050043519A.

Термін "домен зв'язування епітопу" має відношення до домену, що специфічно зв'язується з антигеном або епітопом незалежно від іншої V ділянки або домену. Це може бути доменне антитіло (dAb), наприклад одиничний варіабельний домен імуноглобуліну людини, верблюдів або акули або це може бути домен, який є похідною каркасної структури, вибраної з групи, що охоплює CTLA-4 (Evibody); ліпокаїн; молекули - похідні білка A, як-то Z- домен білка A (Affibody, SpA), A - домен (Avimer/Maxibody); білки теплового шоку, як-то GroEI та GroES; трансферин (trans-body); білок з анкіриновим повтором (DARPin); пептидний аптамер; лектиновий домен C-типу (тетранектин);  $\gamma$ -кристалін та убіквітин людини (афіліні); домени PDZ; домени Куніц-типу інгібіторів протеази людини, що походять з токсину скорпіона та фібронектин (аднектин), що був підданий дії білкової інженерії для отримання зв'язування з іншим лігандом, крім природного.

CTLA-4 (цитотоксичний, пов'язаний з Т-лімфоцитами антиген 4) є рецептором родини CD28, що експресується у більшості CD4+ Т-клітин. Його зовнішньоклітинний домен має згортання ланцюга, подібне до варіабельного домену. Петлі, відповідні до CDR антитіл можуть бути заміщені гетерологічною послідовністю для надання різних властивостей зв'язування. Молекули CTLA-4, що були сконструйовані саме для надання різних властивостей зв'язування, також відомі під торгівельною маркою EviBodies. Додаткові деталі див. у Journal of Immunological Methods 248 (1-2), 31-45 (2001).

Ліпокаїни є родиною позаклітинних білків, що транспортують маленькі гідрофобні молекули, як-то стероїди, біліни, ретиноїди та ліпіди. Вони мають ригідний  $\beta$ -шар вторинної структури з численними петлями на відкритому кінці конічної структури, які можуть бути штучно створені для зв'язування з різними інтересуючими антигенами. Антикаліни були отримані від ліпокаїнів та мають розмір приблизно у 160-180 амінокислот. Додаткові деталі див. у Biochim Biophys Acta 1482: 337-350 (2000), US7250297B1 та US20070224633

Білок Affibody є каркасною структурою, отриманою від білка Staphylococcus aureus, яка також може бути піддана конструюванню для зв'язування з антигеном. Його домен складається з трьох спіральних вузлів у приблизно 58 амінокислот. Шляхом рандомізації поверхневих залишків були отримані бібліотеки. Додаткові деталі див. у Protein Eng. Des. Sel. 17, 455-462 (2004) та EP1641818A1

Авімери є мультидоменими білками, отриманими від родини А-доменої основи. Нативні домени приблизно у 35 амінокислот приймають визначену дисульфідними зв'язками структуру. Різноманітність цих білків породжується колюванням природного варіанту, яке має місце у родині А-доменив. Додаткові деталі див. у Nature Biotechnology 23(12), 1556-1561 (2005) та Expert Opinion on Investigational Drugs 16(6), 909-917 (June 2007)

Трансферин є мономерним сироватковим транспортним глікопротеїном. Трансферини можуть бути побудовані для зв'язування різних інтересуючих антигенів шляхом вставки пептидної послідовності у пермісивну поверхневу петлю. Приклади сконструйованих каркасних структур трансферину охоплюють Trans-body. Додаткові деталі див. у J. Biol. Chem 274, 24066-24073 (1999).

Розроблені білки з анкіриновим повтором (DARPin) отримані від анкіринів, які є родиною білків, що опосередковують прикріплення інтегрованих мембранних білків до цитоскелету. Одиничним анкіриновим повтором є характерна послідовність з 33 залишків, що складається з двох спіральних ділянок та  $\beta$ -вигину. Вони також можуть бути штучно побудовані для

зв'язування різних інтересуючих антигенів шляхом рандомізації залишків у першій спирали та  $\beta$ -вигині кожного повтору. Їх зв'язувальний інтерфейс може бути підвищений за рахунок збільшення кількості модулів (спосіб дозрівання спорідненості). Додаткові деталі див. у J. Mol. Biol. 332, 489-503 (2003), PNAS 100(4), 1700-1705 (2003) та J. Mol. Biol. 369, 1015-1028 (2007) та US20040132028A1.

Фібронектин є каркасною структурою, що також може бути штучно побудована для зв'язування з антигеном. Аднектини містять природну каркасну амінокислотну послідовність десятого домену з 15 повторюючихся одиниць людського фібронектину типу III (FN3). Три петлі на одному кінці  $\beta$ -сандвіча можуть бути побудовані для надання аднектину можливості специфічно впізнавати інтересуючу терапевтичну ціль. Додаткові деталі див. у Protein Eng. Des. Sel. 18, 435-444 (2005), US20080139791, WO2005056764 та US6818418B1.

Пептидні аптамери є комбінаторними молекулами розпізнавання, що містять сталий каркасний білок, звичайно тіоредоксин (TrxA), що містить вставлену у активний сайт закріплену варіабельну пептидну петлю. Додаткові деталі див. у Expert Opin. Biol. Ther. 5, 783-797 (2005).

Мікротіла (microbodies) отримують з природних мікробілків з довжиною у 25-50 амінокислот та 3-4 цистеїновими "мітками". Приклади мікробілків охоплюють Kalata BI, конотоксин та кнотини. Мікробілки мають петлю, що може бути перебудована для розміщення до 25 амінокислот без впливу на загальну структуру мікробілка. Додаткові деталі стосовно змінених кнотинових доменів, див. у WO2008098796.

Інші домени зв'язування з епітопом охоплюють білки, застосовані у якості каркасних конструкцій для отримання різних інтересуючих антиген - зв'язувальних властивостей, як-то  $\gamma$ -кристалін та убіквітин людини (афіліни), домени Куніц - типу інгібіторів протеази людини, домени PDZ Ras - зв'язуючого білка AF-6, токсини скорпіона (харибдотоксин), лектиновий домен C-типу (тетранектини) розглянуті у Chapter 7 - Non-Antibody Scaffolds from Handbook of Therapeutic Antibodies (2007, edited by Stefan Dubel) and Protein Science 15:14-27 (2006). Домени зв'язування епітопів заявленого винаходу можуть бути отримані від будь-яких цих альтернативних білкових доменів.

Як тут застосовано, термін "сайт зв'язування антигену" має відношення до ділянки білка, що здатна специфічно зв'язуватися з антигеном. Це може бути одиничний домен, наприклад, домен, що зв'язується з епітопом або може являти собою спарені домени VH/VL, які можна знайти у звичайних антитілах. У певному втіленні винаходу, сайти зв'язування антигену можуть бути надані одноланцюговими доменами Fv (ScFv).

Терміни "mAbdAb" та "dAbmAb", що тут застосовані, мають відношення до антиген-зв'язуючих білків заявленого винаходу. Ці два терміни можуть бути взаємозамінно застосовані та призначені мати таке саме значення, як тут застосовано.

Як тут застосовано, термін "антиген-зв'язуючий білок" має відношення до антитіл, фрагментів антитіл, наприклад, доменних антитіл (dAb), ScFv, FAb, FAb2 та інших білкових конструкцій. Антиген-зв'язуючі молекули, наприклад, антитіла, доменні антитіла (dAb), Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, ScFv, діатіла, mAbdAb, білки Affibody, гетерокон'югатні або біспецифічні антитіла можуть містити принаймні один варіабельний домен Ig. У одному втіленні, антиген-зв'язуюча молекула є антитілом. У іншому втіленні, антиген-зв'язуюча молекула є dAb, тобто імуноглобуліновим одиничним варіабельним доменом, як-то VH, VHH або VL, що специфічно зв'язується з антигеном або епітопом незалежно від іншої V-ділянки або домену. Антиген-зв'язуючі молекули можуть мати здатність зв'язуватися з двома об'єктами, тобто вони можуть бути білками подвійної спрямованості. Антиген-зв'язуючі молекули можуть являти собою комбінації антитіл та антиген-зв'язуючих фрагментів, як-то, наприклад, одного або декількох доменних антитіл та/або одного або декількох ScFv, з'єднаних з моноклональним антитілом. Також антиген-зв'язуючі молекули можуть містити домен, що не є доменом Ig, наприклад, який є похідною каркасної структури, вибраної з групи, що охоплює CTLA-4 (Evibody); ліпокаїн; молекули - похідні білка A, як-то Z- домен білка A (Affibody, SpA), A-домен (Avimer/Maxibody); білки теплового шоку, як-то GroEl та GroES; трансферин (trans-body); білок з анкіриновим повтором (DARPin); пептидний аптамер; лектиновий домен C-типу (тетранектин);  $\gamma$ -кристалін та убіквітин людини (афіліни); домени PDZ; домени Куніц-типу інгібіторів протеази людини, що походять з токсину скорпіона та фібронектин (аднектин), що був підданий дії білкової інженерії для отримання зв'язування з OSM. "Антиген-зв'язуючий білок", як тут застосовано, є здатним до протидії та/або нейтралізації дії OSM людини. На додачу, антиген-зв'язуючий білок може інгібувати та/або блокувати активність OSM шляхом зв'язування з ним та запобігання виникнення природного ліганду в результаті зв'язування та/або активування рецептора gp130.

Термін "ефекторна функція", як тут застосовано, має відношення до однієї або декількох видів залежної від антитіл клітинно - опосередкованої цитотоксичної активності (ADCC),

залежних від комплементу, опосередкованих цитотоксичною активністю (CDC) відповідей, Fc-опосередкованого фагоцитозу та рециклінгу антитіла за допомогою рецептора FcRn. Ефекторні функції антитіла IgG, в тому числі ADCC та ADCP, опосередковані взаємодією сталої ділянки важкого ланцюга з рецепторами родини Fcγ, що існують на поверхні імунних клітин (у людини це, відповідно, рецептори FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) та FcγRIII (CD16)). Взаємодія між

антиген-зв'язуючим білком, приєднаним з антигеном та утворення комплексу Fc / Fcγ викликають різноманітні ефекти, в тому числі цитотоксичність, активацію імунної клітини, фагоцитоз та вивільнення запальних цитокінів.

Вважається, що взаємодія між сталою ділянкою антиген-зв'язуючого білка та різних рецепторів Fc (FcR) опосередковує ефекторні функції антиген-зв'язуючого білка. Наслідками ефекторної функціональності можуть бути різні значні біологічні ефекти, що охоплюють, зокрема, залежну від антитіл клітинну цитотоксичність (ADCC), фіксацію комплементу (комплемент-залежна цитотоксичність або CDC) та час напіввиведення/виведення антиген-зв'язуючого білка. Звичайно, здатність опосередковувати ефекторні функції вимагає зв'язування антиген-зв'язуючого білка з антигеном та не всі антиген-зв'язуючі білки будуть опосередковувати кожну ефекторну функцію.

Ефекторні функції можна виміряти кількома шляхами, в тому числі, наприклад, за допомогою зв'язування FCYRI з природними клітинами-кілерами або зв'язування FcγRI з моноцитами/макрофагами для вимірювання ефекторної функції ADCC. Наприклад, ефекторні функції ADCC антиген-зв'язуючого білка заявленого винаходу можна оцінити у аналізі природних клітин-кілерів. Приклади таких аналізів можна знайти у Shields et al, 2001 The Journal of Biological Chemistry , Vol. 276, p6591-6604; Chappel et al, 1993 The Journal of Biological Chemistry, Vol 268, p25124-25131; Lazar et al, 2006 PNAS, 103; 4005-4010.

Приклади аналізів визначення функцій CDC охоплюють описані у 1995 J. Imm. Meth. 184:29-38.

Деякі ізоформи сталих ділянок людини, зокрема, ізоформи IgG4 та IgG2, є суттєво позбавленими функцій а) активування комплементу класичним шляхом та б) залежної від антитіл клітинної цитотоксичності. Можна також здійснити різні модифікації сталої ділянки важкого ланцюга антиген-зв'язуючих білків у залежності від бажаної ефекторної властивості. Сталі ділянки IgG1, що містять специфічні мутації, як було окремо описано, зменшують зв'язування з рецепторами Fc, отже, зменшують ADCC та CDC (Duncan et al. Nature 1988, 332; 563-564; Lund et al. J. Immunol, 1991 , 147; 2657-2662; Chappel et al. PNAS 1991 , 88; 9036-9040; Burton та Woof, Adv. Immunol, 1992, 51 ;1-84; Morgan et al., Immunology 1995, 86; 319-324; Hezareh et al., J. Virol. 2001 , 75 (24); 12161-12168).

У одному втіленні заявленого винаходу передбачено антиген-зв'язуючий білок, що містить таку сталу ділянку, що антиген-зв'язуючий білок має зменшену ADCC та/або зменшене активування комплементу або ефекторну функціональність. У одному такому втіленні, стала ділянка важкого ланцюга може містити природно відключену сталу ділянку ізоформу IgG2 або IgG4 або піддану мутації сталу ділянку IgG1. Приклади прийнятних модифікацій описані у EP0307434. Один такий приклад стосується заміщення аланінового залишку у положеннях 235 та 237 (індекс нумерації ЄВ).

Описано, що сталі ділянки IgG1 людини, які містять специфічні мутації або змінене глікозилювання у залишку Asn297 також підсилюють зв'язування з рецепторами Fc. У деяких випадках було показано, що ці мутації також підсилюють ADCC та CDC (Lazar et al. PNAS 2006, 103; 4005-4010; Shields et al. J Biol Chem 2001, 276; 6591 -6604; Nechansky et al. Mol. Immunol, 2007, 44; 1815-1817).

У одному втіленні заявленого винаходу, подібні мутації знаходяться у одному або у декількох положеннях, вибраних від 239, 332 та 330 (IgG1) або у еквівалентних положеннях інших ізоформ IgG. Прикладами прийнятних мутацій є S239D, I332E та A330L. У одному втіленні, описаний тут антиген-зв'язуючий білок винаходу має мутації у положеннях 239 та 332, наприклад S239D та I332E або, у додатковому втіленні, він має мутації у трьох або більше положеннях, вибраних від 239, 332 та 330, наприклад, S239D, I332E та A330L. (Індекс нумерації ЄВ).

У альтернативному втіленні заявленого винаходу передбачено антиген-зв'язуючий білок, що містить сталу ділянку важкого ланцюга зі зміненим таким чином профілем глікозилювання, що антиген-зв'язуючий білок отримує підсилені ефекторні функції, наприклад, таке змінення, що антиген-зв'язуючий білок отримує підсилену ефекторну функцію ADCC або CDC або обидві з них разом. Приклади прийнятних способів отримання антиген-зв'язуючих білків зі зміненим профілем глікозилювання описані у WO2003011878, WO2006014679 та EP1229125, всі з яких можуть бути включені до антиген-зв'язуючих білків заявленого винаходу .

Заявлений винахід також передбачає спосіб отримання антиген-зв'язуючого білка відповідно до винаходу, що містить наступні етапи:

а) культивування рекомбінантних клітин-хазяїв, що містять вектор експресії, який містить, як тут описано, виділену нуклеїнову кислоту, де ген FUT8, що кодує альфа-1,6-фукозилтрансферазу у рекомбінантних клітинах-хазяях є інактивованим; та

б) відновлення антиген-зв'язуючого білка.

Подібні способи отримання антиген-зв'язуючих білків можна здійснити, наприклад, з застосуванням системи з технологією POTELLIGENT™ від BioWa, Inc. (Princeton, NJ), де клітини CHOK1 SV, позбавлені функціональної копії гена FUT8 продукують моноклональні антитіла з підсиленою залежною від антитіл клітинно - опосередкованою цитотоксичною (ADCC) активністю, яка є збільшеною порівняно з ADCC ідентичних моноклональних антитіл, отриманих у клітинах з функціональним геном FUT8. Аспекти системи з технологією POTELLIGENT™ описані у US7214775, US6946292, WO0061739 та WO0231240, всі з яких є включеними сюди шляхом посилання. Пересічним фахівцем у цій галузі також відомі інші відповідні системи.

У одному втіленні заявленого винаходу передбачено антиген-зв'язуючий білок, що містить химерну сталу ділянку важкого ланцюга, наприклад, антиген-зв'язуючий білок, що містить химерну сталу ділянку важкого ланцюга з принаймні одним доменом CH2 від IgG3, який має підсилену ефекторну функцію, наприклад, він має підсилену ефекторну функцію ADCC або CDC або обидві з них разом. У одному подібному втіленні, антиген-зв'язуючий білок може містити один домен CH2 від IgG3 або обидва домени CH2 можуть походити від IgG3.

Також передбачено спосіб отримання антиген-зв'язуючого білка відповідно до винаходу, що містить наступні етапи:

а) культивування рекомбінантних клітин-хазяїв, що містять вектор експресії, який містить, як тут описано, виділену нуклеїнову кислоту, де вектор експресії містить послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує домен Fc, що має амінокислотні залишки обох доменів IgG1 та IgG3 Fc; та

б) відновлення антиген-зв'язуючого білка.

Подібні способи отримання антиген-зв'язуючих білків можна здійснити, наприклад, з застосуванням системи з технологією POTELLIGENT™ від BioWa, Inc. (Princeton, NJ) та Kyowa Hakko Kogyo (зараз наявну від Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.) Co., Ltd., де рекомбінантні клітини-хазяї, що містять вектор експресії, у якому послідовність нуклеїнової кислоти кодує химерний домен Fc, що має обидва амінокислотних залишки IgG1 та IgG3 цього домену, підданих експресії для отримання антиген-зв'язуючого білка, що має підсилену залежну від комплексу цитотоксичну активність (CDC), яка є збільшеною у порівнянні з іншими ідентичними антиген-зв'язуючими білками, позбавленими подібного химерного домену Fc. Аспекти системи з технологією COMPLEGENT описані у WO2007011041 та у US20070148165, кожна з яких є включеною сюди шляхом посилання. У альтернативному втіленні, CDC активність може бути підвищена шляхом введення специфічних до послідовності мутацій у Fc ділянку ланцюга IgG. Пересічним фахівцем у цій галузі також відомі інші відповідні системи.

Фахівцем зрозуміло, що подібні модифікації можуть не тільки бути застосовані окремим чином, але й те, що вони можуть бути застосовані одна з одною у комбінації для додаткового підсилення ефекторної функції.

У одному подібному втіленні заявленого винаходу передбачено антиген-зв'язуючий білок, який містить сталу ділянку важкого ланцюга, що містить піддану мутації та химерну сталу ділянку важкого ланцюга, наприклад, де антиген-зв'язуючий білок містить принаймні один домен CH2 від IgG3 та один домен CH2 від IgG1, де домен CH2 від IgG1 має одну або декілька мутацій у положеннях, вибраних від 239, 332 та 330 (наприклад, мутації можуть бути вибрані від S239D, I332E та A330L) таким чином, що антиген-зв'язуючий білок отримає підсилену ефекторну функцію, наприклад, одну або декілька наступних функцій, підсилення ADCC або підсилення CDC, наприклад, він має підсилення ADCC та CDC. У одному втіленні, домен CH2 від IgG1 має мутації S239D та I332E.

У альтернативному втіленні заявленого винаходу передбачено антиген-зв'язуючий білок, що містить химерну сталу ділянку важкого ланцюга та має змінений профіль гликозилювання. У одному подібному втіленні, стала ділянка важкого ланцюга містить принаймні один домен CH2 від IgG3 та один домен CH2 від IgG1 та має профіль гликозилювання, змінений таким чином, що співвідношення фукози до манози дорівнює 0.8:3 або менше, наприклад, де антиген-зв'язуючий білок є дефукозилований таким чином, що вказаний антиген-зв'язуючий білок отримує підсилену ефекторну функцію у порівнянні з еквівалентним антиген-зв'язуючим білком з імуноглобуліновою сталою ділянкою важкого ланцюга, позбавленою вказаних мутацій та зміненого профілю гликозилювання, наприклад, де він має одну або декілька наступних функцій, підсилення ADCC або підсилення CDC, наприклад, він має підсилення ADCC та CDC. У

альтернативному втіленні, антиген-зв'язуючий білок має принаймні один домен CH2 від IgG3 та принаймні один сталий домен важкого ланцюга від IgG1, де обидва домени CH2 від IgG зазнали мутації у відповідності з наведеними тут обмеженнями.

У одному аспекті винаходу передбачено спосіб отримання антиген-зв'язуючого білка, описаного тут відповідно до винаходу, що містить наступні етапи:

а) культивування рекомбінантних клітин-хазяїв, що містять вектор експресії, який містить виділену, як тут описано, нуклеїнову кислоту, де вказаний вектор експресії ще додатково містить послідовність Fc нуклеїнової кислоти, що кодує химерний домен Fc, який має обидва амінокислотних залишки IgG1 та IgG3 домену Fc та де ген FUT8, що кодує альфа -1 ,6-фукозилтрансферазу повинен бути інактивованим у рекомбінантних клітинах-хазяях; та

б) відновлення антиген-зв'язуючого білка.

Подібні способи отримання антиген-зв'язуючих білків можна здійснити, наприклад, за допомогою системи з технологією ACCRETAMAB™ від BioWa, Inc. (Princeton, NJ), де для отримання антиген-зв'язуючого білка, що має підсилені ADCC та CDC активності, які є збільшеними у порівнянні з іншими ідентичними моноклональними антитілами, позбавленими химерного домену Fc та мають фукозу у складі олігосахариду застосовано поєднання систем з технологіями POTEILLIGENT™ та COMPLEGENT™.

У іншому втіленні заявленого винаходу передбачено антиген-зв'язуючий білок, який містить химерну сталу ділянку важкого ланцюга, що зазнала мутації, де вказаний антиген-зв'язуючий білок має профіль гликозилювання, змінений таким чином, що антиген-зв'язуючий білок отримує підсилену ефекторну функцію, наприклад, де він має одну або декілька наступних функцій підсилення ADCC або CDC. У одному втіленні, мутації є вибраними від положень 239, 332 та 330, наприклад, мутації є вибраними від S239D та I332E та A330L. У додатковому втіленні, стала ділянка важкого ланцюга містить принаймні один домен CH2 від IgG3 та один домен CH2 від IgG1. У одному втіленні, стала ділянка важкого ланцюга має профіль гликозилювання, змінений таким чином, що співвідношення фукози до манози дорівнює 0.8:3 або менше, наприклад, де антиген-зв'язуючий білок є дефукозилований таким чином, що вказаний антиген-зв'язуючий білок отримує підсилену ефекторну функцію у порівнянні з еквівалентним антиген-зв'язуючим білком з імуноглобуліновою сталою ділянкою важкого ланцюга, позбавленою вказаних мутацій та зміненого профілю гликозилювання.

Інші засоби модифікування антиген-зв'язуючих білків заявленого винаходу охоплюють підвищення часу періоду напівжиття подібних білків шляхом змінення імуноглобулінового сталого домену або зв'язувального домену FcRn (неонатального Fc рецептора) .

Рецептор FcRn, також відомий, як неонатальний Fc рецептор, відіграє ключову роль у підтриманні сироваткових рівнів антитіл в організмі дорослих ссавців шляхом дії у якості захисного рецептора, що зв'язується з антитілами ізо типу IgG та рятує їх від деградації. Молекули IgG піддаються ендоцитозу ендотеліальними клітинами та якщо вони зв'язані з FcRn, вони знову повертаються у обіг. На відміну від цього, не зв'язані з FcRn молекули IgG проникають у клітини та стають об'єктом ліпосомального шляху, де вони деградуєть.

Вважається, що неонатальний рецептор FcRn є залученим до виведення антитіл та до трансцитозу крізь тканини (див. Junghans R.P (1997) Immunol, Res 16. 29-57 та Ghetie et al (2000), Annu. Rev. Immunol. 18, 739-766). Визначено, що залишки IgG1 людини безпосередньо взаємодіють з людським FcRn, що містить Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 та His435. Змінення будь-якого з цих положень може привести до підвищення сироваткового часу напівжиття та/або змінення ефекторних властивостей антиген-зв'язуючих білків винаходу.

Антиген-зв'язуючі білки заявленого винаходу можуть мати амінокислотні модифікації, що підвищують спорідненість сталого домену або його фрагменту до FcRn. Підвищення часу напівжиття терапевтичних та діагностичних IgG та інших біоактивних молекул несе багато переваг, в тому числі, скорочення кількості та/або частоти дозування цих молекул. У одному втіленні, внаслідок цього передбачено антигенне зв'язування відповідно до наведеного тут винаходу або отримання злитого білка, що містить весь зміст або частину (частину, що відповідає за зв'язування FcRn) сталого домену IgG, що має одну або декілька цих амінокислотних модифікацій та білок, який не є IgG або небілкову молекулу, приєднану до подібного модифікованого сталого домену IgG, де присутній модифікований сталий домен IgG підвищує in vivo час напівжиття антиген-зв'язуючого білка.

PCT Publication NO. WO 00/42072 присвячена поліпептиду, що містить варіантну Fc ділянку зі зміненою зв'язувальною спорідненістю FcRn та містить амінокислоту модифікацію у будь-якому одному або у декількох положеннях амінокислот Fc ділянки, вибраних з 238, 252, 253, 254, 255, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 386, 388, 400, 413, 415, 424, 433, 434, 435, 436, 439 та 447, де нумерація залишків у Fc

ділянці наведена згідно з індексом ЄС (Kabat et al).

PCT Publication NO. WO 02/060919 A2 присвячена модифікованому IgG, що містить стабільний домен IgG з однією або декількома амінокислотними модифікаціями порівняно до сталого домену IgG дикого типу, де модифікований IgG має підвищений час напівжиття порівняно з часом напівжиття IgG, що мають стабільний домен IgG дикого типу та де один або декілька амінокислотних модифікацій знаходяться у одному або декількох положеннях, вибраних з 251, 253, 255, 285-290, 308-314, 385-389, та 428-435.

Shields et al. (2001, J Biol Chem; 276:6591-604) застосували аланін - скануючий мутагенез для змінення залишків у Fc ділянці антитіл IgG1 людини з наступною оцінкою зв'язування з людським FcRn. Амінокислотні положення, що ефективно скасовували зв'язування з FcRn при заміщенні на аланін охоплювали I253, S254, H435 та Y436. Інші амінокислотні положення, що показали менш виражене зменшення зв'язування охоплювали E233-G236, R255, K288, L309, S415 та H433. Певні амінокислотні положення при заміщенні на аланін показали проявляє покращення зв'язування FcRn; дуже примітними з них є P238, T256, E272, V305, T307, Q311, D312, K317, D376, E380, E382, S424 та N434. Багато інших амінокислотних положень надають тільки легке покращення зв'язування FcRn (D265, N286, V303, K360, Q362, та A378) або відсутність змінення (S239, K246, K248, D249, M252, E258, T260, S267, H268, S269, D270, K274, N276, Y278, D280, V282, E283, H285, T289, K290, R292, E293, E294, Q295, Y296, N297, S298, R301, N315, E318, K320, K322, S324, K326, A327, P329, P331, E333, K334, T335, S337, K338, K340, Q342, R344, E345, Q345, Q347, R356, M358, T359, K360, N361, Y373, S375, S383, N384, Q386, E388, N389, N390, K392, L398, S400, D401, K414, R416, Q418, Q419, N421, V422, E430, T437, K439, S440, S442, S444 та K447).

Найбільш виражений ефект був знайдений для комбінацій варіантів з підвищеним зв'язуванням з FcRn. При pH 6.0, варіант E380A/N434 показав більш, ніж восьмиразове покращення зв'язування з FcRn у порівнянні з нативними IgG1. Відповідно, варіант E380A показав дворазове покращення зв'язування та варіант N434A показав 3,5 разове покращення. Додавання до цього T307A спричинило 12-разове покращення зв'язування у порівнянні з нативним IgG1. У одному втіленні, антиген-зв'язуючий білок винаходу містить мутації E380A/N434A та має підвищене зв'язування з FcRn.

Dall'Acqua et al. (2002, J Immunol.;169:5171-80) описали випадковий (рандомний) мутагенез та перевірку фаг-дисплейних бібліотек фрагмента петельного - Fc IgG1 людини проти мишачих FcRn. Дослідники описали випадковий мутагенез у положеннях 251, 252, 254-256, 308, 309, 311, 312, 314, 385-387, 389, 428, 433, 434, та 436. Значні покращення стійкості комплексу IgG1 - FcRn людини відбувалися при заміщенні залишків, розташованих у групі по всьому Fc-FcRn інтерфейсу (M252, S254, T256, H433, N434 та Y436) та, меншою мірою, шляхом заміщення залишків на периферії, як-то V308, L309, Q311, G385, Q386, P387 та N389. Варіанти з найбільшою спорідненістю до людського FcRn були отримані шляхом поєднання мутацій M252Y/S254T/T256E та H433K/N434F/Y436H та показали 57-разове підвищення спорідненості у порівнянні з IgG1 дикого типу. Поведінка подібних IgG1 людини, що мають мутацію демонструє близько 4-х разове підвищення часу напівжиття у сироватці макак - крабоїдів *in vivo* порівняно з IgG1 дикого типу.

Отже, заявлений винахід стосується варіанту антиген-зв'язуючого білка з оптимізованим зв'язуванням з FcRn. У бажаному втіленні, вказаний варіант антиген-зв'язуючого білка містить принаймні одну амінокислотну модифікацію у Fc ділянці вказаного антиген-зв'язуючого білка, де вказана модифікація є вибраною з групи, що охоплює положення 226, 227, 228, 230, 231, 233, 234, 239, 241, 243, 246, 250, 252, 256, 259, 264, 265, 267, 269, 270, 276, 284, 285, 288, 289, 290, 291, 292, 294, 297, 298, 299, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 315, 317, 320, 322, 325, 327, 330, 332, 334, 335, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 350, 352, 354, 355, 356, 359, 360, 361, 362, 369, 370, 371, 375, 378, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 403, 404, 408, 411, 412, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 424, 426, 428, 433, 434, 438, 439, 440, 443, 444, 445, 446 та 447 у Fc ділянці порівняно з вказаним батьківським поліпептидом, де нумерація амінокислот у Fc ділянці наведена згідно з індексом ЄС (Kabat et al).

У додатковому аспекті винаходу, модифікації являють собою M252Y /S254T/ T256E.

На додачу до цього, у різних публікаціях також описані способи отримання фізіологічно активних молекул, час напівжиття яких є зміненим або за рахунок введення у молекули FcRn-зв'язуючого поліпептиду (WO 97/43316; U.S. Patent N° 5,869,046; U.S. Patent N° 5,747,035; WO 96/32478; WO 91/14438) або шляхом злиття молекул з антитілами, FcRn- зв'язуюча спорідненість яких зберігається, але спорідненість до інших Fc рецепторів значно скорочується (WO 99/43713) або шляхом злиття з FcRn - зв'язуючими доменами антитіл (WO 00/09560; U.S.



Patent N°4, 703,039).

Додатково, також передбачені способи отримання антиген-зв'язуючого білка з пониженим біологічним часом напівжиття. Варіант IgG, у якому His435 є заміщений шляхом мутації на аланін демонструє селективну втрату зв'язування FcRn та значно зменшує сироватковий час напівжиття (Firan et al. 2001, International immunology 13:993). У U.S.Pat.NO.6,165,745 описано спосіб отримання антиген-зв'язуючого білка з пониженим біологічним часом напівжиття, що полягає у введенні мутації у сегмент ДНК, який кодує антиген-зв'язуючий білок. Ця мутація включає в себе амінокислотні заміщення у положеннях 253, 310, 311, 433 або 434 Fc-петельного домену.

Застосований тут термін "не-людинне антитіло або фрагмент цього антитіла" має відношення до антитіл або їх фрагментів, що походять від будь-яких інших видів, ніж людина, де "людські антитіла" також охоплюють химерні.

Термін "донорне антитіло" має відношення до антитіла (моноклонального та/або рекомбінантного), що надає амінокислотні послідовності своїх варіабельних доменів, CDR або інших функціональних фрагментів або їх аналоги першому імуноглобуліновому партнеру з отриманням таким чином зміненої імуноглобулінової кодувальної ділянки та експресії змінених антитіл з антигенною специфічністю та нейтралізуючою активністю характерного донорного антитіла.

Термін "акцепторне антитіло" має відношення до антитіла (моноклонального та/або рекомбінантного), гетерологічного до донорного антитіла, що надає всі (або будь-яку частину, але переважно всі) амінокислотні послідовності, які кодують його каркасні ділянки важкого та/або легкого ланцюга та/або сталі ділянки їх важкого та/або легкого ланцюга першому імуноглобуліновому партнеру. Антитіло людини є акцепторним антитілом. Термін "людська акцепторна послідовність", як тут застосовано, має відношення до каркасної ділянки антитіла або до фрагмента цього антитіла, що містить амінокислотну послідовність каркасної ділянки VH або VL, отриману від антитіл людини або фрагментів цих антитіл або каркасну ділянку консенсусної послідовності людини, до якої можуть бути включені CDR не-людинного походження.

Як тут застосовано, термін "включення" CDR або гіперваріабельних ділянок охоплює будь-який засіб, за допомогою якого не-людинні CDR розташовують у акцепторній ділянці людини. Слід мати на увазі, що це може бути досягнуто різними способами, наприклад, нуклеїнові кислоти, що кодують бажану амінокислотну послідовність можуть бути отримані за допомогою мутації нуклеїнових кислот, що кодують послідовність варіабельного не-людинного домену таким чином, що залишки його каркасної ділянки заміщують залишками акцепторної каркасної ділянки людини або шляхом внесення таких мутацій у нуклеїнову кислоту, яка кодує послідовність варіабельного домену, що спричинює заміщення CDR не-людинними залишками або шляхом синтезу нуклеїнових кислот, що кодують бажану послідовність. У одному втіленні, кінцеву послідовність отримують in silico (шляхом комп'ютерного моделювання).

Даний винахід описано нижче за допомогою прикладу. Додана до нього Формула Винаходу може містити у своєму складі узагальнення одного або декількох таких прикладів.

Приклади.

Приклад 1. Отримання та відбір моноклональних антитіл.

Моноклональні антитіла анти-OSM людини S168110G08(1)1A09 ("10G8") ідентифікували від гібридом, отриманих від мишей, імунізованих рекомбінантним глікозилованим OSM людини (K598). Мишей SJL жіночої статі (n=2, Harlan, UK, HOST SP06-06031) імунізували внутрішньочеревно загальноприйнятим чином з застосуванням білка у загальній кількості 10 мкг разом з ад'ювантом, подібним до AS02. Бустерні імунізації проводили з 5 мкг білка. Тестові кровопускання проводили після кожної бустерної ін'єкції та найкращу мишачу відповідь (168#4) вибрали для гібридомного злиття (R16092/177-198). Селезінку вирізали, зруйнували та отримали викликане дією PEG1500 злиття соматичних клітин з клітинами мишачої мієломи X63 AG 8 653.GFP.Bcl-2.11 (BioCat 1 12754; R17209/58). Отримане злиття нанесли на 10 x 96 - лункових планшетів та на 5 чашок Nunc Omnitray з метилцелюлозою, що містили напівтверде середовище. Колонії з цього напівтвердого середовища відібрали на 5 x 96 - лункових планшетів.

Первинний скринінг анти-OSM допоміжних антитіл мав за основу відбір гібридомного матеріалу, здатного зв'язувати OSM людини та, для відбору анти - сайт II молекул, інгібувати OSM людини та макаки-краб'їда відносно зв'язування рецептора gp130. Для відбору гібридом з найкращим зв'язуванням, позитивні гібридомні супернатанти, отримані в ході цих перевірок аналізували шляхом дослідження кінетичних характеристик швидкості дисоціації на BIAcore.

Понад 3000 клонів були відновлені від злить, 86 показали помітне зв'язування з OSM

людини за допомогою ІФА. Аналіз анти - сайт II активності проводили з позитивними гібридомами за допомогою ІФА gr130 з OSM людини та макаки-крабоїда. Гібридомні клони, що інгібують OSM людини та макаки-крабоїда відносно зв'язування рецептора gr130 людини аналізували шляхом дослідження кінетичних характеристик швидкості дисоціації на BIACore. В результаті цього аналізу, найкращі чотири зв'язувача OSM, 10G8, 9G2, 3E3 та 2B7 були моноклоновані та знову перевірені. Ніякої різниці даних, отриманих за допомогою BIACore та ІФА відносно зв'язувальної активності або інгібування gr130 між моноклонами від кожної гібридоми відмічено не було. Дочірні клони 10G8.A9, 9G2.C1, 2B7.A6 та 3E3.A1 були піддані кріоконсервуванню та застосовані для вільного від сироватки підрозування та очищення з наступним просуванням до другої стадії перевірки.

Вторинна перевірка, що становила за мету ранжування чотирьох дочірніх клонів, 10G8/A9, 9G2/C1, 2B7/A6 та 3E3/A1, охоплювала порівняльний аналіз кінетичних характеристик OSM людини / макаки-крабоїда (BIACore); ІФА gr130 людини з OSM людини / макаки-крабоїда; аналіз нейтралізації клітин KB з OSM людини / макаки-крабоїда. На додачу до цього, була оцінена реактивність проти людського LIF та відмічено, що здатність до нейтралізації ендogenous, отриманого з нейтрофілів OSM людини, зберігається у 25% сироватки АВ людини.

Аналіз BIACore показав, що 10G8, 9G2, 3E3 та 2B7 мали найвищі значення спорідненості до OSM людини, ніж альтернативні неконкурентні анти-OSM мишачі антитіла (15E10) (Таблиця 1). 10G8 показав найвищу спорідненість до OSM людини (~550 pM) та макаки-крабоїда (~310 pM). На відміну від 15E10, 10G8 мав восьмиразове / 0.9 log підвищення спорідненості до OSM людини та одинадцятиразове / 1 log підвищення спорідненості до OSM макаки-крабоїда. Обидва клони, 10G8 та 9G2, демонстрували більш високу спорідненість до OSM макаки-крабоїда, ніж до OSM людини.

Таблиця 1

Кінетичні характеристики, отримані за допомогою BIACore: чотири допоміжних анти-OSM провідних антитіла 10G8, 9G2, 3E3 та 2B7 у порівнянні з 15E10

Моноклональне антитіло	OSM	Ka (швидкість асоціації)	Kd (швидкість дисоціації)	KD (стала рівноваги) nM
10G8	людина	1.12E + 05	6.14E - 05	0.55
	макака-крабоїд	9.69E + 04	2.99E - 05	0.308
9G2	людина	7.52E + 04	1.21E - 04	1.60
	макака-крабоїд	6.14E + 04	4.76E - 05	0.75
3E3	людина	1.95E + 05	2.53E - 04	1.30
	макака-крабоїд	1.71E + 05	5.60E - 04	3.28
2B7	людина	1.21E + 05	2.54E - 04	2.09
	макака-крабоїд	1.00E + 05	9.33E - 04	9.31
15E10	людина	1.94E + 05	8.69E - 04	4.48
	макака-крабоїд	1.77E + 05	5.97E - 04	3.37

У ІФА-аналізі gr130 людини дослідники застосували відносно високі рівні OSM (25 нг/мл), знижуючи його здатність відокремлювати антитіла з високою спорідненістю від антитіл з меншою спорідненістю, якщо ліганд є у надлишку. Протягом чотирьох повторів цього аналізу було показано, що найбільш сильнодіючим антитілом у блокуванні зв'язування OSM людини та макаки-крабоїда з рецептором gr130 було антитіло 10G8 (Фіг.1; Таблиця 2).



Таблиця 2

ІФА-аналіз gr130 людини-підсумки результатів чотирьох повторів ІФА-аналізу gr130 людини з метою ранжування активності антитіл 10G8, 9G2, 3E3 та 2B7 відносно OSM людини та макаки-крабоїда. З порівняльною метою, до експерименту додали неконкурентні мишачі антитіла 15E10 та набір антитіл негативного контролю

Ранжування OSM людини	Антитіло	OSM людини Середня IC50 мкг/мл±SD	OSM макаки-крабоїда Середня IC50 мкг/мл±SD (ранжування OSM макаки-крабоїда)
1	10G8	0.06±0.01 (400 пМ)	0.01±0.00(1) (40 пМ)
2	2B7	0.08±0.02 (533 пМ)	0.14±0.04(6) (993 пМ)
3	9G2	0.16±0.04 (1.1нМ)	0.03±0.04(4) (200 пМ)
4	15E10	0.19±0.07 (1.3 нМ)	0.03±0.05(3) (200 пМ)
5	3E3	0.19±0.04 (1.3 нМ)	0.06±0.07(5) (400 пМ)

IC50 - 50% пригнічення цитопатичної дії; SD - стандартне відхилення.

- 5 Аналіз gr130 людини також повторили у присутності 25% сироватки АВ людини. У двох повторях цього аналізу було показано, що всі чотири головних антитіла 10G8, 9G2, 3E3 та 2B7 разом з антитілом 15E10 зберігають свою здатність до блокування зв'язування OSM людини та макаки-крабоїда з gr130 (дані не показані).

- 10 OSM також викликає вивільнення IL-6 з клітин KB (клітинна лінія епітеліальних клітин людини, що експресує мРНК для рецепторів gr130 та OSM). Стисло кажучи, клітини KB стимулювали 1 нг/мл OSM +/- різні концентрації антитіл протягом 16-18 годин при 37°C та вивільнення IL - 6 досліджували за допомогою ІФА. Якщо порівнювати з аналізом gr130, то для аналізу нейтралізації клітин KB потрібна менша кількість OSM (1 нг/мл порівняно з 25 нг/мл), що робить його більш розбірливим аналізом для розділення нейтралізаторів з високою спорідненістю від нейтралізаторів з низькою спорідненістю. У порівнянні з антитілами 15E10, 10G8 був у 15 разів/ 1.2 log сильнішим щодо OSM людини у аналізі нейтралізації клітин KB. У всіх трьох повторях, 10G8 посідав перше місце зі середнім значенням IC50 проти OSM людини у 8 нг/мл та з середнім значенням IC50 проти OSM макаки-крабоїда у 6 нг/мл (Фіг. 2; Таблиця 3). Друге місце у цьому аналізі посідало антитіло 9G2 з відповідними значеннями IC50 проти OSM людини та макаки-крабоїда у 18 нг/мл та 15 нг/мл.

Таблиця 3

Аналіз нейтралізації клітин KB - підсумки результатів трьох повторів аналізу нейтралізації клітин KB з метою ранжування активності антитіл 10G8, 9G2, 3E3 та 2B7 відносно OSM людини та макаки-крабоїда. З порівняльною метою, до експерименту додали неконкурентні мишачі антитіла 15E10 та набір антитіл негативного контролю

Ранжування OSM людини	Антитіло	OSM людини Середня IC50 мкг/мл±SD	OSM макаки-крабоїда Середня IC50 мкг/мл±SD (ранжування OSM макаки-крабоїда)
1	10G8	0.008±0.03 (53 пМ)	0.006±0.002 (1) (40 пМ)
2	9G2	0.018±0.08 (120 пМ)	0.015±0.006 (2) (100 пМ)
3	2B7	0.049±0.003 (327пМ)	0.344±0.186 (6) (2.3 нМ)
4	3E3	0.054±0.034 (360 пМ)	0.150±0.013 (5) (1 нМ)
6	15E10	0.279±0.161 (1.9 нМ)	0.035±0.013 (4) (233 пМ)

- 25 У присутності 25% сироватки людини АВ, антитіла 10G8, 9G2 та 3E3 зберігають свою здатність до нейтралізації OSM людини та макаки-крабоїда (Фіг. 3). При застосуванні антитіл 15E10 та 2B7 не вдалося отримати прийнятні криві необхідної якості для обчислення значень IC50. Як і у випадку з аналізом клітин KB без додавання людської сироватки, найбільш сильнотіючим антитілом було 10G8, а антитіло 9G2 посідало друге місце. У присутності 25% сироватки АВ також спостерігалось певне зменшення активності. У якійсь мірі, це може бути пов'язано з втручанням сироватки АВ у цей аналіз зчитування даних. У цьому аналізі, порівняно

з сироваткою не-людського походження, спостерігали більш високі фонові рівні IL-6.

Всі чотири головних антитіла, 10G8, 9G2, 3E3 та 2B7, а також антитіло 15E10 показали інгібування ендogenous OSM людини від чотирьох окремих донорів (Фіг. 4). Цей нативний OSM отримали за допомогою GM-CSF- стимулювання здорових нейтрофілів людини.

5 LIF людини є найближчим спорідненим членом людського OSM у родині IL-6. Початкові дослідження показали відсутність реактивності між антитілами 10G8, 9G2, 3E3, 2B7 та LIF людини, що вказує на те, що ці антитіла є OSM-специфічними (Фіг. 5).

10 Було показано, що всі чотири головних антитіла 10G8, 9G2, 3E3 та 2B7 нейтралізують OSM мармозетки у аналізі нейтралізації клітин KB (Фіг. 6). Антитіло 15E10 та група з трьох додаткових антитіл анти-OSM людини 10D3DLE, OM4.11.17 та OM4.11.31 були неспроможні нейтралізувати OSM мармозетки. Враховуючи два повтори аналізу, найбільш сильнодіючим нейтралізатором OSM мармозетки було антитіло 10G8, а антитіло 9G2 посідало друге місце.

15 Вважаючи те, що антитіло 10G8 було на першому місці у всіх перелічених вище аналізах, його вибрали з групи, що охоплювала чотири антитіла у якості головного антитіла для химеризації. Антитіло 9G2 також вибрали для химеризації в якості резервної молекули у разі виникнення труднощів при гуманізації.

20 Варіабельні гени для чотирьох вибраних моноклональних амінокислот 2B7, 3E3, 9G2 та 10G8 були паралельно виділені та секвеновані для отримання відповідних химерних антитіл. Загальну РНК екстрагували від гібридомних клітинних конгломератів. Кодуючі послідовності важкого та легкого ланцюга V-гена ампліфікували або шляхом ПЛР зі зворотною транскрипцією або шляхом швидкої ампліфікації 5' кінців кДНК (5'RACE), після чого TA- клонували для аналізу послідовності. Ампліфікацію V-гена проводили двічі для кожного антитіла для забезпечення подальшої перевірки вірних послідовностей від двох незалежних реакцій. Для всіх чотирьох гібридомних клонів була отримана послідовність варіабельного важкого та варіабельного легкого ланцюгів. Вирівнювання послідовності білка показало, що антитіла мали високий рівень тотожності послідовності у обох ділянках варіабельного важкого та легкого ланцюгів. (Фіг. 7 & 8). Послідовності варіабельних ділянок важкого та легкого ланцюгів цих антитіл наведені у SEQ ID NO.26-48. (див. Таблицю А.). Порівняння послідовності між чотирма головними моноклональними антитілами та антитілом 15E10 показало тільки 50-60% тотожності з легким (Фіг. 9) або з важким (Фіг. 10) ланцюгами. Це вказує на те, що ці антитіла зв'язують епітопи, які відрізняються від тих, що впізнаються антитілом 15E10.

30 Обидва антитіла 10G8 та 9G2 були отримані у вигляді химерних антитіл шляхом щеплення описаних вище мишачих V<sub>H</sub> та V<sub>L</sub> ділянок у кодон-оптимізовану  $\gamma$ -1Fc людини дикого типу та  $\kappa$ - (каппа) стали ділянку людини, відповідно. Химерні антитіла застосували у цих дослідженнях для підтвердження функціональності клонованих мишачих V-ділянок, а також їх очистили та застосували у якості референсного зразка при тестуванні гуманізованих конструкцій. ПЛР-праймери були розроблені на основі 5' та 3' послідовностей ДНК, визначених у Прикладі 2 з включенням сайтів рестрикції, необхідних для клонування у векторах експресії у клітинах ссавців Rlx або рТТ5. Були також розроблені праймери для заміни нативної сигнальної послідовності на сигнальну послідовність Campath. Сайти рестрикції Hind III та Spe I були створені для обрамлення V<sub>H</sub> домену з тим, щоб дозволити здійснити клонування у модифікованому векторі Rid або рТТ5, що містить  $\gamma$ -1C ділянку людини. Введення сайту Spe I у послідовність каркасної ділянки 4 призводить до одиначної амінокислотної заміни у FR4 у положенні 108. Для V<sub>H</sub>- ділянки 9G2, де на 5'-кінці послідовності ДНК знаходиться внутрішній сайт рестрикції SpeI, був розроблений ПЛР-праймер для химерного антитіла 9G2 для видалення цього внутрішнього сайту. Сайти рестрикції Hind III та BsiWI були створені для обрамлення V<sub>L</sub> домену з тим, щоб дозволити здійснити клонування у модифікованому векторі Rln або рТТ5, що містить  $\kappa$ C ділянку людини. Клоні з належними послідовностями V<sub>H</sub> та V<sub>L</sub> були ідентифіковані та плазміди були підготовлені для експресії у клітинах CHO або НЕК.

50 Плазмідами Rid та Rln, що кодують химерні V<sub>H</sub> та V<sub>L</sub> домени 10G8 та 9G2, відповідно, ко-трансфікували клітини CHOE1 шляхом електропорації та отримали їх експресію у поліклональній клітинній культурі. Плазмідами рТТ, що кодують химерні V<sub>H</sub> та V<sub>L</sub> домени 10G8 та 9G2 ко-трансфікували клітини НЕК293 з застосуванням способу трансфекції ліпідів для отримання транз'єнтної епісомальної експресії, де трансфекція у епісомальній системі експресії може потенційно дати вихід кількостей антитіл у міліграмах. Отримані химерні антитіла (10G8с та 9G2с) були очищені від клітинних культуральних супернатантів шляхом афінної хроматографії з білок А-сефарозою. Очищені антитіла були кількісно визначені за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію по Лемлі та гел-хроматографії.

60 Обидва химерних антитіла 10G8 та 9G2 успішно зв'язуються з OSM людини у більшій мірі,

ніж химера 15E10 (15E10с) (Фіг. 11), що було досліджено за допомогою прямого ІФА-аналізу, де OSM людини покривали у г/мл та зв'язані антитіла визначали з застосуванням анти-людинного IgG.

Аналіз BIAcore показав наявність невеликого або безвтратного зв'язування OSM людини або макаки-крабоїда химерними молекулами 10G8 та 9G2 у порівнянні з мишачими батьківськими антитілами (Таблиця 4). Химерне антитіло 10G8 показало найкращий результат (654 пМ), випередивши химерне антитіло 9G2 (1.33 нМ). Всі антитіла показали більш високу спорідненість до OSM макаки-крабоїда, ніж до OSM людини.

Таблиця 4

Кінетичні характеристики, отримані за допомогою BIAcore- кінетичні характеристики зв'язування антитіл 10G8, 9G2 та химерних антитіл 10G8 та 9G2

	OSM макаки-крабоїда			OSM людини		
	Ka (константа асоціації) (M <sup>-1</sup> ·c <sup>-1</sup> )	Kd (константа дисоціації)(c <sup>-1</sup> )	KD (константа рівноваги) (нМ)	Ka (константа асоціації) (M <sup>-1</sup> ·c <sup>-1</sup> )	Kd (константа дисоціації)(c <sup>-1</sup> )	KD (константа рівноваги) (нМ)
Химерні антитіла 10G8	2.37E+5	1.14E-4	0.480	2.33E+5	1.52E-4	0.654
Мишачі антитіла 10G8	9.69e+4	2.99e-5	0.308	1.12e+5	6.14e-5	0.549
Химерні антитіла 9G2	1.27E+5	9.99E-5	0.787	1.26E+5	1.68E-4	1.333
Мишачі антитіла 9G2	6.14e+4	4.76e-5	0.775	7.52e+4	1.21e-4	1.50

У ІФА-аналізі gr130 людини були застосовані відносно високі рівні OSM (25 нг/мл), що знижує його здатність відокремлювати антитіла з високою спорідненістю від антитіл з меншою спорідненістю, якщо ліганд є в надлишку. Впродовж трьох повторів цього аналізу, найбільш ефективним антитілом у інгібуванні зв'язування OSM людини та макаки-крабоїда з рецептором gr130 було химерне антитіло 10G8. Отримані дані батьківських мишачих та химерних антитіл 10G8 у цьому аналізі були дуже схожими (Фіг. 12; Таблиця 5). Також не спостерігалось значної різниці між антитілом 9G2 та його химерою.

Таблиця 5: .

Таблиця 5

ІФА gr130 людини-підсумки результатів трьох повторів ІФА gr130 людини з метою ранжування активності антитіл 10G8, 9G2 та химерних антитіл 10G8 та 9G2 відносно OSM людини та макаки-крабоїда. Антитіла 15E10 додали з порівняльною метою. У якості негативного контролю застосовані антитіла інструменту досліджень

Ранжування OSM людини	Антитіло	OSM людини Середня IC50 мкг/мл±SD	OSM макаки-крабоїда Середня IC50 мкг/мл±SD (ранжування OSM макаки-крабоїда)
1	химерне 10G8	0.037±0.035 (247 пМ)	0.016±0.015 (1) (107 пМ)
2	9G2	0.038±0.04 (253 пМ)	0.049±0.059 (5) (327 пМ)
3	10G8	0.044±0.034 (293 пМ)	0.017±0.013 (2) (113 пМ)
4	химерне 9G2	0.078±0.102 (520 пМ)	0.028±0.033 (3) (187 пМ)
5	15E10	0.250±0.403 (1.7 нМ)	0.071±0.096 (6) (473 пМ)

Аналіз gr130 людини для OSM людини та макаки-крабоїда також повторили у присутності сироватки АВ людини. Всі молекули зберігали свою активність у 25% сыворотці. Найбільш сильнотіючим по відношенню до OSM людини та макаки-крабоїда було химерне антитіло 10G8, випередивши мишаче батьківське антитіло 10G8, хоча значення IC50 для цих двох антитіл були подібними. Значної різниці між химерним антитілом 9G2, що посідав третє місце та мишачим батьківським антитілом 9G2 не спостерігалось (дані не представлені). У дослідженні нейтралізації клітин KB, батьківські мишачі антитіла 10G8 поводитися подібно химерним антитілам (Фіг. 13; Таблиця 6). Батьківські мишачі антитіла 9G2 та химерні антитіла 9G2 у цьому аналізі отримали, відповідно, третє та четверте місце.

Таблиця 6

Аналіз нейтралізації клітин KB - підсумки результатів трьох повторів аналізу нейтралізації клітин KB з метою ранжування активності антитіл 10G8, 9G2 та химерних антитіл 10G8 та 9G2 відносно OSM людини та макаки-крабоїда. Антитіло 15E10 додали з порівняльною метою. У якості негативного контролю застосовані антитіла інструменту досліджень

Ранжування OSM людини	Антитіло	OSM людини Середня IC50 мкг/мл±SD	OSM макаки-крабоїда Середня IC50 мкг/мл±SD (ранжування OSM макаки-крабоїда)
1	химерне 10G8	0.021±0.008 (140 пМ)	0.008±0.007 (1) (53 пМ)
2	10G8	0.054±0.066 (360 пМ)	0.034±0.047 (3) (227 пМ)
3	9G2	0.163±0.197 (1.1нМ)	0.046±0.025 (4) (307 пМ)
4	химерне 9G2	0.231±0.287 (1.5 нМ)	0.031±0.008 (2) (207 пМ)
5	15E10	неприйнятне значення	0.057±0.036 (5) (380 пМ)

Антитіла 10G8, 9G2 та химерні антитіла 10G8 та 9G2 зберігають свою здатність нейтралізувати OSM людини та макаки-крабоїда у присутності 25% сироватки АВ людини (Фіг. 14), хоча й спостерігається певне зниження активності. Хоча при початковій концентрації антитіл у 1 мкг/мл значення IC50 не можуть бути обчислені, у всіх антитілах, за виключенням неспорідненого негативного контролю, спостерігали отриманий чітким титруванням ефект нейтралізації. Вищезгадане зниження активності у певній мірі може бути пов'язано з втручанням сироватки АВ у цей аналіз зчитування даних. У цьому аналізі, порівняно з сироваткою не-людинного походження, спостерігали більш високі фонові рівні IL-6.

Антитіла 10G8, 9G2 та химерні антитіла 10G8 та 9G2 інгібують ендogenous OSM людини від двох окремих донорів (Фіг. 15). Відносно цих двох донорів, перше місце розділили разом антитіло 10G8 та химерне антитіло 10G8, тоді як 9G2 та його химерна похідна, відповідно, зайняли третє та четверте місце (Таблиця 7). Нативний OSM отримали шляхом GM-CSF-стимуляції здорових нейтрофілів людини.

Таблиця

Аналіз gr130 ендogenous OSM людини - підсумки результатів ІФА gr130 від двох нейтрофільних донорів з метою оцінки активності антитіл 10G8, 9G2 та химерних антитіл 10G8 та 9G2 відносно ендogenous OSM людини. У якості негативного контролю застосовані антитіла інструменту досліджень

Ранжування	Моноклональне антитіло	IC50 мкг/мл±SD
1=	10G8	0.009±0.001 (60пМ)
1=	химерне 10G8	0.009±0.000 (60пМ)
3	химерне 9G2	0.017±0.001 (113пМ)
4	9G2	0.020±0.004 (133пМ)

LIF людини є найближчим спорідненим членом людського OSM у родині IL-6. Три повтори аналізу LIF людини з клітин KB показали, що антитіла 10G8, 9G2 та химерні антитіла 10G8 та

9G2 не нейтралізують LIF людини, хоча наявні у продажу анти-людинні LIF антитіла нейтралізували LIF у цьому аналізі (Фіг. 16). Це є доказом того, що вищенаведені антитіла є OSM-специфічними.

#### Приклад 2: Гуманізація.

Після BLAST-аналізу баз даних людського V-гена зародкової лінії, у якості бажаної акцепторної каркасної ділянки для гуманізації вибрали зародкову лінію людини IGHV3\_7, що мала 74% тотожності (в тому числі, CDR) з мишачою послідовністю 10G8. V-ділянку зародкової лінії об'єднали *in silico* з прийнятим FR4, у цьому випадку мініген JH2 (Kabat Vol. II) визначають, спираючись на подібність послідовностей. Перші шість залишків мінігену JH2 потрапляють у ділянку CDR3, що була замінена на вхідний CDR донорного антитіла. На основі порівняння послідовності та можливого впливу на функцію антитіл були отримані три варіанти гуманізованого важкого ланцюга. Конструкція H0 була отримана шляхом безпосереднього щеплення мишачих CDR 10G8 (з застосуванням визначення по Kabat) у вибрану вище акцепторну каркасну послідовність людини. Конструкції H1 та H2 були отримані на основі H0, де обидві з них містили одну додаткову мутацію у каркасній ділянці, що відрізнялася у кожній конструкції; відповідно, у положеннях 2 та 105.

Після BLAST-аналізу баз даних людського V-гена зародкової лінії, у якості бажаної акцепторної каркасної ділянки для гуманізації легкого ланцюга людини вибрали зародкову лінію людини IGKV4\_1, що мала 64% тотожності (в тому числі, CDR) з мишачою варіабельною послідовністю легкого ланцюга 10G8. V-ділянку зародкової лінії об'єднали *in silico* з прийнятим FR4, у цьому випадку J-ділянку мінігену каппа-4 (Kabat Vol. II) визначають, спираючись на подібність послідовностей. Перші два залишки мінігену JK-4 потрапляють у ділянку CDR3 та є ідентичними двом останнім залишкам у CDR3 мишачої послідовності 10G8 легкого ланцюга. На основі порівняння послідовності та можливого впливу на функцію антитіл було отримано п'ять гуманізованих легкolanцюгових варіантів. Конструкція L0 була отримана шляхом безпосереднього щеплення мишачих CDR 10G8 (з застосуванням визначення по Kabat) у вибрану вище акцепторну каркасну послідовність людини. Конструкції L1, L2 та L3 були отримані на основі L0, де кожна з них містила одну додаткову мутацію у каркасній ділянці, що відрізнялася у кожній конструкції; відповідно, у положеннях 46, 84 та 103. Конструкція L4 містила всі чотири зворотні мутації.

Для отримання гуманізованих векторів, послідовності ДНК гуманізованих варіабельних ділянок були оптимізовані з застосуванням програмного забезпечення LETO 1.0 (Entelechon GmbH) та синтезовані *de novo* шляхом створення перекриваючогося олігонуклеотиду та ПЛР-ампліфікації. Праймери містили сайти рестрикції для клонування у векторах експресії у клітинах ссавців та імуноглобулінові сигнальні послідовності людини для секреції. Гуманізовані варіабельні важкі ділянки H0-H2 клонували за допомогою сайтів рестрикції HindI 11 та SpeI у вектори експресії у клітинах ссавців, що містили сталу ділянку  $\gamma$  1 (гамма один) людини. Паралельно з цим, гуманізовані варіабельні легкі ділянки L0-L4 клонували за допомогою сайтів рестрикції HindI 111 та BsiWI у вектори експресії у клітинах ссавців, що містили сталу ділянку K (каппа) людини.

Для скринінгу та обмеження групи гуманізованих варіантів (3 важких ланцюга x 5 легких ланцюгів = 15), антитіла експресували у клітинах НЕК та дослідили за допомогою BIAcore, ІФА та функціонального аналізу. Скринінг второго етапу з метою ранжування перелічених у Таблиці 9 гуманізованих антитіл 10G8 охоплював аналіз кінетичних характеристик відносно OSM людини на BIAcore; ІФА gp130 людини з OSM людини / макаки-крабоїда; аналіз нейтралізації клітин KB з OSM людини / макаки-крабоїда, а також оцінку здатності блокування gp130 у 25% сироватці АВ людини.

В результаті первинного аналізу супернатантів трансфекції за допомогою BIAcore було виявлено, що гуманізовані варіанти L1 та L4 мали більш високу спорідненість до OSM людини, ніж гуманізовані варіанти L0, L2 та L3 (Таблиця 8). Ці мутації легкого ланцюга підвищують спорідненість у порівнянні з прямим щепленням без мутацій (H0L0) та химерним антитілом 10G8. Важкolanцюгові варіанти H1 та H2 мали невеликий вплив на спорідненість антитіл у порівнянні з прямим щепленням H0. Аналіз збільшеного масштабу очищених варіантів L1 та L4 показав, що існує дуже мало відмінностей між спорідненостями цих моноклональних антитіл до OSM людини та макаки-крабоїда (Таблиця 9).

Таблиця 8

Кінетичні характеристики, отримані за допомогою BIACore- кінетичні характеристики зв'язування OSM людини п'ятнадцятьма супернатантами трансфекції допоміжних гуманізованих анти-OSM 10G8 антитіл у порівнянні з химерними антитілами 10G8

	Ka (константа асоціації) ( $M^{-1} \cdot s^{-1}$ )	Kd (константа дисоціації) ( $s^{-1}$ )	KD (константа рівноваги) (нМ)
H0L0	3.69E+5	1.60E-4	0.435
H0L1	3.98E+5	9.95E-5	0.250
H0L2	3.65E+5	1.37E-4	0.375
H0L3	3.74E+5	1.45E-4	0.388
H0L4	4.13E+5	1.11E-4	0.268
H1L0	3.81E+5	1.62E-4	0.425
H1L1	4.00E+5	9.99E-5	0.250
H1L2	3.65E+5	1.63E-4	0.445
H1L3	3.71E+5	1.27E-4	0.344
H1L4	3.77E+5	1.30E-4	0.344
H2L0	3.63E+5	1.45E-4	0.398
H2L1	3.94E+5	1.13E-4	0.286
H2L2	3.68E+5	1.42E-4	0.387
H2L3	3.76E+5	1.50E-4	0.398
H2L4	4.48E+5	1.01E-4	0.226
супернатант химерного антитіла 10G8	2.52E+5	1.03E-4	0.407
очищене химерне антитіло 10G8	2.57E+5	1.05E-4	0.407

Таблиця 9

Кінетичні характеристики, отримані за допомогою BIACore - кінетичні характеристики зв'язування OSM людини та макаки-крабоїда очищеними зразками варіантів L1 та L4 анти-OSM гуманізованих антитіл 10G8 у порівнянні з химерними антитілами 10G8

	OSM макаки-крабоїда			OSM людини		
	Ka (константа асоціації) ( $M^{-1} \cdot s^{-1}$ )	Kd (константа дисоціації) ( $s^{-1}$ )	KD (константа рівноваги) (нМ)	Ka (константа асоціації) ( $M^{-1} \cdot s^{-1}$ )	Kd (константа дисоціації) ( $s^{-1}$ )	KD (константа рівноваги) (нМ)
H0L1	4.26E+5	1.07E-4	0.251	3.87E+5	1.37E-4	0.355
H1L1	4.28E+5	1.10E-4	0.258	3.75E+5	1.66E-4	0.443
H2L1	4.14E+5	1.24E-4	0.299	3.83E+5	1.40E-4	0.365
H0L4	4.18E+5	1.01E-4	0.242	3.74E+5	1.40E-4	0.374
H1L4	4.21E+5	1.11E-4	0.264	3.65E+5	1.35E-4	0.370
H2L4	4.41E+5	9.01E-5	0.205	3.80E+5	1.35E-4	0.356
химерне антитіло 10G8	2.53E+5	9.95E-5	0.394	2.41E+5	1.25E-4	0.518
15E10h	5.26E+5	3.10E-4	0.590	4.29E+5	6.15E-4	1.43

- На відміну від аналізу gr130, у аналізі нейтралізації клітин KB застосовували значно меншу кількість OSM (1 нг/мл замість 25 нг/мл), що робить його більш розбірливим аналізом для розділення нейтралізаторів з високою спорідненістю від нейтралізаторів з низькою спорідненістю. За допомогою аналізу клітин KB були перевірені початкові варіанти конструкцій H0, H1, H2, L0, L1, L2, L3 та L4 та виявлена перевага конструкцій L1 (дані не наведені). Ці конструкції, разом з варіантами L4, що показали себе добре у BIAcore аналізі, були отримані для додаткових аналізів у вигляді більш великих партій. З трьох повторів аналізу, гуманізовані

варіанти 10G8 L1 посіли перше місце з середніми значеннями IC50 у 14 нг/мл (проти OSM людини) та 10 нг/мл (проти OSM макаки-крабоїда) (Фіг. 17; Таблиця 10).

Таблиця 10

Аналіз нейтралізації клітин KB - підсумки результатів трьох повторів нейтралізації клітин KB з метою ранжування активності варіантів гуманізованих антитіл 10G8 L1 та L4 відносно OSM людини та макаки-крабоїда

Ранжування OSM людини	Антитіло	OSM людини Середня IC50 мкг/мл±SD	OSM макаки-крабоїда Середня IC50 мкг/мл±SD (ранжування OSM макаки-крабоїда)
1	H1L1	0.013±0.001 (83 пМ)	0.010±0.002 (3) (67 пМ)
2	H2L1	0.014±0.007 (93 пМ)	0.013±0.003 (6) (14 пМ)
3	H0L1	0.015±0.009 (102 пМ)	0.007±0.002 (1) (21 пМ)
4	H1L4	0.016±0.015 (107 пМ)	0.011±0.007 (4) (10 пМ)
5	H0L4	0.018±0.012 (360 пМ)	0.012±0.009 (5) (49 пМ)
6	H2L4	0.022±0.015 (116 пМ)	0.016±0.015 (7) (58 пМ)
7	химерне антитіло 10G8	0.022±0.022 (144 пМ)	0.008±0.005 (2) (100 пМ)

5 Гуманізовані варіанти 10G8 L1 вибрали для додаткової перевірки, тому що у аналізі клітин KB вони показали вищу біологічну активність, ніж варіанти L4. Варіанти L4 мали дуже низький вихід продукту у системі CHO-E1 та мають бути відсторонені для додаткового розвитку.

10 У ІФА-аналізі gr130 людини були застосовані відносно високі рівні OSM (25 нг/мл), що скорочує його здатність до розділення антитіл з високою спорідненістю від антитіл з низькою спорідненістю, якщо ліганд є у надлишку. Після трьох повторів цього аналізу з гуманізованими варіантами 10G8 L1 було показано, що всі три варіанти у цьому аналізі були рівнозначними у блокуванні OSM людини та макаки-крабоїда від зв'язування з рецептором gr130 (Фіг. 18). Аналіз gr130 людини також проводили у присутності 25% сироватки АВ людини. Два повтори цього аналізу показали, що всі антитіла, гуманізовані антитіла 10G8 H0L1, H1L1 та варіанти H2L1 зберегли свою здатність блокувати OSM людини та макаки-крабоїда від зв'язування з gr130 (дані не наведені).

15 Фрагменти Fab батьківських антитіл 10G8 отримали шляхом розщеплення імобілізованим на гранулах папаїном (Pierce 20341) впродовж 20 годин при 37°C у буфері, що містив 20 мМ фосфатний буфер pH 7, 10 мМ EDTA та 10 мМ L-цистеїн. Після розчинення гранули видалили за допомогою одноразової пластикової колонки, після чого забруднюючі фрагменти Fc та нерозчинені антитіла відокремили від фрагментів Fab з застосуванням хроматографії з білком А (MabSelect, GE Healthcare 17-5438-03). Незв'язану фракцію, що містила фрагменти Fab додатково очистили шляхом гель-хроматографії (SEC) на колонці Superdex 200pg (GE Healthcare 17-1069-01) з застосуванням рухомої фази у вигляді 25мМ HEPES pH 7.7 та 150 мМ буферу NaCl. Комплекс отримали змішуванням 11,5 мг очищених фрагментів Fab (GRITS30249) з 5,75 мг рекомбінантного OSM (GRITS23122), молярне співвідношення 1:1 з наступним інкубуванням протягом 1,5 год. при 4°C. Потім отриманий комплекс очистили від незв'язаного матеріалу з застосуванням колонки Superdex 200pg SEC. Отриманий комплекс сконцентрували до значення концентрації загального білка у 44 мг/ мл (вихід 9.2 мг) з застосуванням центрифужного пристрою для концентрації, обладнаного мембраною з 10K MWCO (номінальний відсік по молекулярній масі) (Vivaspin VS2002). Компоненти комплексу були підтверджені за допомогою N-кінцевого секвенування, мас-спектрометрії та електрофорезу в поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію по Лемлі. Функціональну зв'язуючу активність фрагментів Fab підтвердили шляхом аналізу інгібування gr130 (дані не наведені).

35 Фрагменти 10G8 OSM Fab утворювали комплекс з OSM, який піддавали кристалізації при 20°C з застосуванням ПЕГ 3500 у якості преципітату. Кристалізацію оптимізували, зразки надіслали для аналізу до дослідницького синхротронного комплексу ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) та отримали результати дифракції до розділення у 3.5 Å. Моноклональні антитіла 10G8 зв'язують спіралі OSM В та С з доброю поверхневою компліментарністю та блокують сайт II OSM від зв'язування з рецептором gr130, створюючи просторові перешкоди без безпосередньої взаємодії з будь-яким залишком сайту II. У Таблиці

11 та Фіг. 19 наведені тільки ті залишки, що безпосередньо залучені до зв'язування (відстань, менша, ніж 5 Å) при розділенні у 3.5 Å. Легкий ланцюг несе відповідальність за більшу частину цього блокуючого ефекту. Чотири CDR (CDRH2, CDRH3, CDRL1 та CDRL3) зв'язують спіралі OSM B та C або безпосередньо або через опосередковані водою взаємодії. При зв'язуванні моноклонального антитіла 10G8 також не було відмічено значних деформацій молекули OSM. Якщо два CDR (CDRH1 та CDRL2) залишаються незв'язаними, то можна отримати варіанти антитіл, де одна або обидві ці ділянки можна замінити первісною послідовністю людини. Це може привести до виникнення менш імуногенної молекули, ніж безпосередньо гуманізований результат щеплення.

Таблиця 11

Залишки OSM	№ залишку (тип)	Атом	Залишки антитіла	№ залишку (тип)	Атом	Відстань у ангстремах
A	82 (LEU)	C	H	104 (THR)	CG2	3.45
A	82 (LEU)	O	H	104 (THR)	CG2	3.47
A	83 (HIS)	CA	H	59 (TYR)	OH	3.20
A	83 (HIS)	CB	H	59 (TYR)	OH	3.37
A	83 (HIS)	CE1	H	103 (THR)	CG2	3.43
A	83 (HIS)	NE2	H	106 (TRP)	CH2	3.44
A	83 (HIS)	CD2	H	59 (TYR)	OH	3.30
A	83 (HIS)	C	H	59 (TYR)	OH	3.26
A	83 (HIS)	O	H	59 (TYR)	OH	2.62
A	84 (ARG)	NH1	H	57 (PHE)	CE1	3.47
A	90 (GLN)	OE1	H	60 (TYR)	O	3.30
A	90 (GLN)	NE2	H	65 (ARG)	NH2	3.08
A	94 (LYS)	NZ	H	62 (ASP)	OD2	3.38
A	115 (ARG)	NE	H	104 (THR)	OG1	3.19
A	115 (ARG)	NH2	H	105 (PHE)	CD1	3.49
A	115 (ARG)	NH2	H	105 (PHE)	CE1	3.25
A	115 (ARG)	NH2	H	104 (THR)	O	3.21
A	122 (ARG)	NH2	H	103 (THR)	OG1	3.14
A	152 (THR)	OG1	H	58 (THR)	OG1	3.19
A	112 (GLN)	O	L	96 (ARG)	NH2	3.08
A	115 (ARG)	NH2	L	96 (ARG)	O	3.30
A	123 (ASN)	CG	L	34 (TYR)	OH	3.18
A	123 (ASN)	ND2	L	34 (TYR)	OH	2.56

У отриманій у лабораторних умовах кристалічної структури моноклональних антитіл анти-OSM 10G8 у комплексі з OSM, ідентифіковані ділянки CDRH1 та CDRL2 не є безпосередньо залученими до зв'язування антигену. Для заміщення цих CDR з мишачих зародкових ліній були вибрані прийнятні CDR зародкової лінії людини. Дві послідовності CDRH1 та дві CDRL2 зародкової лінії людини послідовності були перевірені відносно їх дії на зв'язування антигену. Для обох важко- та легколанцюгових послідовностей CDR від оригінальної зародкової лінії людини перевіряли акцепторні каркасні ділянки (IGHV3\_7 та IGKV4\_1 відповідно), а також дві додаткові послідовності зародкової лінії людини, що були вибрані на основі гомології до CDR та флангової каркасної ділянки (IGHV3\_23 та IGKV1\_5). Послідовності зародкової лінії людини CDRH1 та CDRL2 замінили на відповідні мишачі CDR у гуманізованих V-ділянках H0 та L1. Нові V-ділянки синтезували de novo шляхом створення перекриваючогося олігонуклеотиду та ПЛР-ампліфікації подібно до Прикладу 1. Аналіз BiACore трансфекційних супернатантів від різних гуманізованих конструкцій 10G8 H0L1 CDRH1 та CDRL2 показав, що єдиним антитілом з попередньо відібраних моноклональних антитіл - кандидатів, яке повністю зберігало спорідненість до OSM людини була молекула H0(IGHV3\_23)L1 (Таблиця 12). Ця конструкція, а також дві інші молекули з наступними кращими значеннями KD (H0L1 (IGKV4\_1) та H0(IGHV3\_23)L1 (IGK4\_1) були розмножені та очищені для додаткових досліджень.



Таблиця 12

Кінетичні характеристики, отримані за допомогою BIAcore - кінетичні характеристики зв'язування OSM людини та макаки-крабоїда супернатантами трансфекції анти-OSM допоміжних гуманізованих варіантних антитіл 10G8 H0L1 CDRH1 та CDRL2 у порівнянні з химерними антитілами 10G8

	OSM макаки-крабоїда			OSM людини		
	Ka (константа асоціації) (M <sup>-1</sup> · c <sup>-1</sup> )	Kd (константа дисоціації) (c <sup>-1</sup> )	KD (константа рівноваги) (нМ)	Ka (константа асоціації) (M <sup>-1</sup> · c <sup>-1</sup> )	Kd (константа дисоціації) (c <sup>-1</sup> )	KD (константа рівноваги) (нМ)
H0 IGHV3_7+L1	3.37E+7	0.8146	24.2	9.10E+4	9.67E-4	10.6
H0 IGHV3_23+L1	3.52E+5	1.09E-4	0.310	3.61E+5	1.58E-4	0.437
H0+L1 IGKV4_1	1.50E+5	2.12E-4	1.41	1.61E+5	2.21E-4	1.37
H0+L1 IGKV1_5	6.75E+4	5.57E-4	8.26	6.87E+4	6.40E-4	9.33
H0 IGHV3_7+L1 IGKV4_1	5.07E+4	1.77E-3	34.9	3.68E+4	1.63E-3	44.4
H0 IGHV3_7+L1 IGKV1_5	низький рівень захоплення			низький рівень захоплення		
H0 IGHV3_23+L1 IGKV4_1	1.52E+5	2.23E-4	1.47	1.59E+5	2.47E-4	1.56
H0 IGHV3_23+L1 IGKV1_5	6.67E+4	5.93E-4	8.89	7.11E+4	6.60E-4	9.27
H0+L1	3.45E+5	1.04E-4	0.301	3.32E+5	1.53E-4	0.461
H0L1 очищені	3.38E+5	1.15E-4	0.341	3.40E+5	1.51E-4	0.445

Аналіз нейтралізації клітин KB виявив, що гуманізована конструкція 10G8 H0(IGHV3\_23)L1 (позначена, як H0(CDRH1)L1) демонструє ефективність, дуже подібну до батьківського гуманізованого моноклонального антитіла 10G8 H0L1 (позначене, як H0L1). Будь-яке реверсивне перетворення не-зв'язувального CDRL2 знов на послідовність людини веде до зниження нейтралізаційної активності, як можна побачити з даних аналізу антитіл H0L1 (IGKV4\_1) (позначене, як H0L1(huCDRL2)) та H0(IGHV3\_23)L1 (IGK4\_1) (позначене, як H0(huCDRH1)L1 (huCDRL2)) (Фіг. 20, Таблиця 13).

Таблиця 13

Аналіз нейтралізації клітин KB - підсумки результатів трьох повторів нейтралізації клітин KB з метою ранжування активності гуманізованих варіантів 10G8 H0L1 CDRH1 та CDRL2 відносно OSM людини та макаки-крабоїда

Ранжування OSM людини	Антитіло	OSM людини Середня IC50 мкг/мл±SD	OSM макаки-крабоїда Середня IC50 мкг/мл±SD (ранжування OSM макаки- крабоїда)
1	H0 (huCDRH1)L1	0.008±0.005 (53пМ)	0.007±0.000 (1) (47пМ)
2	H0L1	0.009±0.002 (60пМ)	0.007±0.002 (2) (47пМ)
3	H0L1(huCDRL2)	0.054±0.024 (360пМ)	0.081±0.004 (4) (540пМ)
4	H0(huCDRH1)L1(huCDRL2)	0.077±0.038 (513пМ)	0.114±0.045 (5) (760пМ)

На основі цих даних, гуманізований варіант 10G8 H0(huCDRH1)L1 вибрали у якості головного попереднього моноклонального антитіла - кандидату для повного характеристичного аналізу.

Аналіз BIAcore проводили з очищеними моноклональними антитілами H0(IGHV3\_23)L1 та ранжували їх відносно химерних антитіл 10G8 та гуманізованих батьківських моноклональних антитіл 10G8 H0L1. Не спостерігалось ніякої різниці у спорідненості до OSM людини та макаки-крабоїда між моноклональними антитілами H0(IGHV3\_23)L1 та батьківськими моноклональними антитілами H0L1 або ця спорідненість була дуже малою (Таблиця 6). Моноклональні антитіла H0(IGHV3\_23)L1 мають 6.5-разове (0.8 log) підвищення спорідненості до OSM людини порівняно з альтернативними неконкурентними анти-OSM гуманізованими антитілами 15E10h. У цих дослідженнях була застосована нова партія OSM, що привело до деякого зниження значень KD, проте, відмінності між гуманізованими варіантами та неконкурентними антитілами залишалися однаковими.

Таблиця 14

Кінетичні характеристики, отримані за допомогою BIAcore - кінетичні характеристики зв'язування OSM людини та макаки-крабоїда очищеними моноклональними антитілами H0(IGHV3\_23)L1 у порівнянні з химерними антитілами 10G8, гуманізованими батьківськими антитілами 10G8 H0L1 та альтернативними неконкурентними анти-OSM гуманізованими антитілами 15E10h

	OSM макаки-крабоїда			OSM людини		
	Ka (константа асоціації) (M <sup>-1</sup> · c <sup>-1</sup> )	Kd (константа дисоціації) (c <sup>-1</sup> )	KD (константа рівноваги) (пМ)	Ka (константа асоціації) (M <sup>-1</sup> · c <sup>-1</sup> )	Kd (константа дисоціації) (c <sup>-1</sup> )	KD (константа рівноваги) (пМ)
химерне антитіло 10G8	2.50E+0.5	6.63E-0.5	266	4.27E+0.5	7.87E-0.5	184
H0(IGHV3_23)L1	4.23E+0.5	8.39E-0.5	199	7.09E+0.5	9.65E-0.5	136
H0L1	4.27E+0.5	8.31E-0.5	195	7.12E+0.5	8.90E-0.5	125
15E10h	5.07E+0.5	3.24E-0.4	640	7.36E+0.5	6.49E-0.4	882

Для визначення загальної спорідненості анти-OSM антитіл H0(huCDRH1)L1 та гуманізованих антитіл 15E10 ( неспоріднених OSM антитіл) до OSM людини, макаки-крабоїда, макаки-резуса та мармозетки дослідники застосували кінетичний ексклюзійний аналіз KinExA® (Sapidyne Instruments 3200) спорідненості фази розчину (Таблиця 15). Гуманізовані антитіла 15E10 додали з порівняльною метою.

Гранули OSM отримали або шляхом адсорбції (гранули поліметилметакрилату - ПММА) або амінного зв'язування (NHS-активовані сефарозні гранули). Діапазон досліджуваних молекул OSM вимагав необхідності отримання гранул, покритих різними концентраціями цієї речовини. Для частини фази розчину досліджень фіксовану концентрацію антитіл інкубували широким діапазоном концентрацій OSM з досягненням рівноваги шляхом інкубування при кімнатній температурі впродовж принаймні двох годин перед початком аналізу. Потім, шляхом зв'язування вільних антитіл з гранулярним носієм OSM ці гранули застосували для визначення кількості вільних антитіл у зразках розчинної фази за допомогою відповідних допоміжних антитіл (або анти-людинних або анти-мишачих у залежності від конструкції, яку перевіряли), помічених флуоресцентним барвником. Криві зв'язування були узгоджені за допомогою притаманного цьому приладу аналітичного програмного забезпечення Kinexa Pro. Далі було проведено декілька серій досліджень з застосуванням різних початкових концентрацій антитіл, які були піддані аналізу за допомогою програмного забезпечення для аналізу n-кривої для отримання більш точного визначення спорідненості.

Найвищу спорідненість до OSM людини, як вже було попередньо оцінено за допомогою аналізу на біосенсорі BIAcore, показало антитіло H0(huCDRH1)L1. На відміну від BIAcore, де антитіла були зв'язаними з поверхнею чипа, у аналізі KinExA® були застосовані вільні антитіла та ліганди у рідкій фазі для оцінки спорідненості, яка є більш наближеною до природного стану.

Таблиця 15

Кінетичні характеристики зв'язування OSM людини, макаки-крабоїда, макаки-резуса та мармозетки очищеними анти-OSM допоміжними антитілами H0(huCDRH1)L1 та гуманізованими антитілами 15E10, отримані за допомогою аналізу KinExA®

Конструкція	Антиген	KD (константа рівноваги), (пМ)	95% вище (пМ)	95% нижче (пМ)
H0(huCDRH1)L1	OSM людини	38	62	22
H0(huCDRH1)L1	OSM макаки-крабоїда	53	82	31
H0(huCDRH1)L1	OSM мармозетки	21	31	14
H0(huCDRH1)L1	OSM макаки-резуса	122	161	90
гуманізоване 15E10	OSM людини	727	1000	499
гуманізоване 15E10	OSM макаки-крабоїда	102	157	61
гуманізоване 15E10	OSM мармозетки	**6100	468000	<22.5
гуманізоване 15E10	OSM макаки-резуса	102	181	52

5 \*\* спорідненість до OSM мармозетки була дуже низькою, що у цьому керованому рецептором експерименті означало потрібність у антитілах з концентрацією, більшою, ніж 40 пМ для застосування OSM у мікромольних кількостях. Загальним висновком є те, що зв'язування гуманізованих антитіл 15E10 з OSM мармозетки є значно слабшим, ніж зв'язування з OSM людини .

10 Для ІФА gr130 людини ІФА застосовують OSM у надлишку (25 нг/мл), тим самим зменшуючи його здатність до розділення антитіл з високою спорідненістю від антитіл з низькою спорідненістю. Після трьох повторів аналізу gr130 було підтверджено, що у цьому аналізі, всі з нижченаведених антитіл (батьківські мишачі антитіла 10G8, химерні антитіла 10G8, гуманізовані батьківські антитіла 10G8 H0L1 (H0L1) та антитіла H0(huCDRH1)L1) показали високу активність у блокуванні зв'язування OSM людини та макаки-крабоїда з рецептором gr130 (Фіг. 21). Завдяки  
15 високим рівням антигену у цьому аналізі, чіткого та здатного до розрізнення ранжування отримано не було. Аналіз gr130 людини також повторили у присутності 25% сироватки АВ людини та 25% об'єднаної синовіальної рідини людини. Три повтори цього аналізу для кожного зразка показали, що всі з нижченаведених антитіл (батьківські мишачі антитіла 10G8, химерні антитіла 10G8, гуманізовані батьківські антитіла 10G8 H0L1 (H0L1) та антитіла H0(huCDRH1)L1)  
20 разом з антитілами 15E10h зберігають здатність до блокування зв'язування OSM людини та макаки-крабоїда з рецептором gr130 (дані не наведені).

Завдяки низьким (1нг/мл) рівням застосованого OSM, аналіз нейтралізації клітин KB має більшу, ніж аналіз gr130, здатність розрізнити нейтралізатори з високою спорідненістю від нейтралізаторів з низькою спорідненістю для їх подальшого розділення. У трьох повторях  
25 аналізу, антитіла (H0(huCDRH1)L1) показали середнє значення IC50 у 30 нг/мл проти OSM людини, у 41 нг/мл проти OSM макаки-крабоїда та 36 нг/мл проти OSM мармозетки (Фіг. 22; Таблиця 17).

Таблиця 17

Аналіз нейтралізації клітин KB - підсумки результатів трьох повторів нейтралізації клітин KB з метою ранжування активності антитіл H0(huCDRH1)L1 проти OSM людини, макаки-крабоїда та мармозетки. Антитіла 15E10h додали з порівняльною метою

Ранжування OSM людини	Антитіло	OSM людини Середня IC50 мкг/мл±SD	OSM макаки-крабоїда Середня IC50 мкг/мл±SD (ранжування OSM макаки-крабоїда)	OSM мармозетки Середня IC50 мкг/мл±SD (ранжування OSM мармозетки)
1	10G8	0.0026±0.0009 (17nM)	0.0017±0.0006 (3) (11nM)	0.0017±0.0003 (1) (11nM)
2	H0L1	0.0028±0.0004 (19nM)	0.0014±0.0003 (2) (9nM)	0.0017±0.0008 (2) (11nM)
3	(H0 (huCDRH1)L1	0.0030±0.0015 (20nM)	0.0041±0.0025 (4) (27nM)	0.0036±0.0024 (3) (24 nM)
4	химерне 10G8	0.0052±0.0064 (35nM)	0.0011±0.0004 (1) (7nM)	0.0271±0.0450 (4) (181nM)
5	15E10h	0.0391±0.0207 (261nM)	0.0054±0.020 (5) (36nM)	нейтралізація відсутня

Антитіла (H0(huCDRH1)L1 та 15E10h також зберігали свою здатність до нейтралізації OSM людини та макаки-крабоїда (Фіг. 23) у присутності 25% сироватки АВ людини або 25% об'єднаної синовіальної рідини людини, хоча у таких умовах спостерігалось певне зниження активності, найбільш вірогідно завдяки втручанню цих домішок у аналіз зчитування даних. Також у цьому аналізі спостерігали появу більш високих, ніж у нормальному аналізі, фонових рівнів IL-6. У аналізі нейтралізації клітин KB було показано, що, на відміну від 15E10h, антитіла H0(huCDRH1)L1 нейтралізують OSM мармозетки. Група з трьох додаткових антитіл анти-OSM людини, 10D3DLE, OM4.11.17 та OM4.11.31 також була неспроможна нейтралізувати OSM мармозетки.

Батьківські мишачі антитіла 10G8, химерні антитіла 10G8, гуманізовані батьківські антитіла 10G8 H0L1 (H0L1) та антитіла H0(huCDRH1)L1, а також антитіла 15E10h інгібують ендogenous OSM людини від чотирьох окремих донорів (Фіг. 24). Згідно з результатами, отриманими від цих чотирьох донорів, існує дуже мала різниця між батьківськими моноклональними антитілами H0L1 та моноклональними антитілами H0(huCDRH1)L1; вони мають більш високі показники, ніж батьківські мишачі антитіла 10G8 та їх химерні похідні (Таблиця 18). Антитіла H0(huCDRH1)L1 мають приблизно 12-разове (1.09 log) підвищення ефективності у порівнянні з антитілами 15E10h. Нативний OSM отримали шляхом GM- CSF-стимуляції здорових нейтрофілів людини.

Таблиця 18

Ендogenous аналіз OSM gp130 людини-підсумки результатів ІФА gp130, отриманих від чотирьох донорів з метою оцінки активності батьківських мишачих антитіл 10G8, химерних антитіл 10G8, гуманізованих батьківських антитіл 10G8 H0L1 (H0L1) та антитіл H0(huCDRH1)L1 проти ендogenous OSM людини. Антитіла 15E10h додали з порівняльною метою. Неспоріднені антитіла були застосовані в якості негативного контролю

Ранжування	Моноклональне антитіло	IC50 (мкг/мл±SD)
1	H0L1	0.0058±0.0019 (39nM)
2	H0(huCDRH1)L1	0.0062±0.0023 (41nM)
3	10G8	0.0090±0.0020 (60nM)
4	химерні 10G8	0.0091±0.0004 (61nM)
5	15E10h	0.0760±0.0181 (507nM)

LIF людини є найближчим спорідненим членом людського OSM у родині IL-6. Три повтори аналізу LIF людини з клітин KB показали, що батьківські мишачі антитіла 10G8, химерні антитіла 10G8, гуманізовані батьківські антитіла 10G8 H0L1 (H0L1) та антитіла H0(huCDRH1)L1 або

15E10h не здатні до нейтралізування LIF людини. Антитіла 15E10h були додані з порівняльною метою. Наявні у продажу анти-людинні LIF антитіла також були не здатні до нейтралізування LIF у цьому аналізі (Фіг. 25). Отримані результати підтверджують думку про OSM- специфічність цих антитіл.

5 Первинні гепатоцити людини є чутливими до OSM та у відповідь на стимуляцію цим глікопротеїном вивільнюють білки гострої фази, як-то SAA та CRP. Антитіла H0(huCDRH1) L1 в залежності від дози інгібують викликане дією OSM людини вивільнення білків SAA (Фіг. 26) та CRP (Фіг. 27) гепатоцитами від трьох різних донорів. Гуманізовані антитіла 15E10 були додані з порівняльною метою .

10 Еквівалентні аналізи проводили з застосуванням інших первинних клітинних типів людини, що охоплювали ендотеліальні клітини пупкової вени; подібні до фібробластів людини синовіоцити, отримані від пацієнтів, хворих на ревматоїдний артрит; легеневі фібробласти людини, отримані від здорових людей та пацієнтів, хворих на ідіоматичний легеневий фіброз (дані не наведені). У попередніх аналізах, антитіла H0(huCDRH1)L1 демонструють відмінну  
15 нейтралізацію OSM, більшу, ніж у випадку з гуманізованими антитілами 15E10. Кратність різниці ефективності антитіл H0(huCDRH1)L1 та гуманізованих антитіл 15E10 змінюється у залежності від клітинної лінії та концентрації OSM.

Базовий біофізичний профіль H0(huCDRH1)L1 досліджували разом з гуманізованими батьківськими моноклональними антитілами 10G8 H0L1. У цих дослідженнях, антитіла піддали дії екологічних стресів, як-то:

- температурний стрес, шляхом 14-денного інкубування при 4°C або 37°C;
- п'ять циклів заморожування-відтавання;
- прискорене дезамінування шляхом інкубування з 1 % бікарбонатом амонію протягом 48 годин при 37°C.

25 Після вищенаведених процедур, жодне з антитіл не зазнало втрат впродовж біофізичної деформації або втрати активності.

Для конструювання варіантних гуманізованих антитіл CDRH3 було здійснено заміщення кожного залишку CDRH3 (SEQ ID NO:3) альтернативним амінокислотним залишком з застосуванням повнорозмірної послідовності SEQ ID NO.75 (варіабельна послідовність SEQ ID NO:74) важкого ланцюга HO (IGHV3\_23) у плазміді рТТ зі зміненим полілінкером (MCS), що була застосована у вигляді базової молекули (від Національної дослідницької ради Канади). Для того, щоб розроблені олігонуклеотиди несли послідовність NNK (де N = A/T7G/C; K = G або T) у положенні амінокислотного заміщення, була застосована технологія сайт-спрямованого мутагенезу (SDM). Для отримання нових плазмід зі зміненнями дослідники застосували полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР), а для ідентифікування клонів з амінокислотними заміщеннями було застосовано ДНК-секвенування. Таким шляхом були отримані варіанти, що мали 10-17 різних амінокислот у кожному з 12 положень CDRH3. Варіантні антитіла CDRH3 були отримані шляхом спільної трансфекції (ко-трансфекції) векторів рТТ, що містили варіант HO (IGHV3\_23) з легким ланцюгом L1 (SEQ ID NO: 72) та супернатанти тестування для зв'язування. Взагалі у наступному аналізі було отримано та перевірено 164 варіанта CDRH3 (див. 2.6.2 та 2.6.3).

Плазміді рТТ, що кодують варіанти CDRH3 важкого ланцюга (HO (IGHV3\_23)) та легкий ланцюг L1 транзійтно ко-трансфікували у клітини HEK 293 6E та експресували у малому обсязі для отримання антитіл. Антитіла оцінювали безпосередньо з супернатанту культури тканин.

45 Початковий аналіз кінетичних характеристик для перевірки CDRH3 проводили на приладі ProteOn XPR36 (Biorad Laboratories) та окремі супернатанти відібрали для більш точного аналізу на приладі BiaCore T100.

Для аналізу на приладі ProteOn, анти-людинні антитіла IgG (GE Healthcare/Biacore BR-1008-39) імобілізували на чіпі GLM (Biorad Laboratories 176-5012) шляхом реакції приєднання первинного аміну. Варіанти CDRH3 безпосередньо захоплювали поверхнею цього чіпу, а рекомбінантний OSM з концентраціями у 256, 64, 16, 4 та 1 nM ін'єкція самого лише буферу (тобто 0 nM) проходили через поверхню з захопленими антитілами людини зі звичайною подвійною оцінкою кривих зв'язування. Після події зв'язування OSM, поверхні для захоплення відновлювали 3M MgCl<sub>2</sub> з усуненням попередньо захоплених антитіл та отриманням поверхні, готової для іншого циклу захоплення та аналізу зв'язування. Потім дані були узгоджені до моделі 1:1 (з масопереносом), притаманній програмному забезпеченню для аналізу на обладнанні ProteOn. Запуск проводили з застосуванням буферу HBS-EP (Biacore/GE-Healthcare BR-1006-69) при температурі у 25°C.

60 Подібний спосіб також застосували для аналізу конструкцій за допомогою приладу Biacore T100, де анти-людинні антитіла IgG (GE Healthcare/Biacore BR-1008-39) імобілізували на чіпі

CM5 (GE Healthcare/Biacore BR-1006-68) шляхом реакції приєднання первинного аміну. Антитіла захоплювали поверхню цього чіпу, а рекомбінантний OSM з концентраціями у 256, 64, 16, 4 та 1 нМ ін'єкція одного буферу (тобто 0 нМ) проходили через поверхню з захопленими антитілами людини зі звичайною подвійною оцінкою кривих зв'язування. Регенерацію проводили з застосуванням пульсів 3М  $MgCl_2$  або 100 мМ фосфорної кислоти або з застосуванням обох реагентів. Дані були узгоджені до моделі 1:1, притаманній програмному забезпеченню для аналізу на обладнанні Biacore T100. Запуск проводили з застосуванням буферу HBS-EP (Biacore/GE-Healthcare BR-1006-69) при температурі аналізу у 25°C. Результати зв'язування див. у Фіг. 33.

Таблиця А

## Стислий опис послідовностей

Опис	Амінокислотна послідовність	Полінуклеотидна послідовність
10G8 CDRH1	SEQ ID NO:1	n /a
10G8 CDRH2	SEQ ID NO:2	n /a
10G8 CDRH3	SEQ ID NO:3	n /a
10G8 CDRL1	SEQ ID NO:4	n /a
10G8 CDRL2	SEQ ID NO:5	n /a
10G8 CDRL3	SEQ ID NO:6	n /a
3E3 CDRH1	SEQ ID NO:7	n /a
3E3 CDRH2	SEQ ID NO:8	n /a
3E3 CDRH3	SEQ ID NO:9	n /a
3E3 CDRL1	SEQ ID NO:10	n /a
3E3 CDRL2	SEQ ID NO:11	n /a
3E3 CDRL3	SEQ ID NO:12	n /a
2B7 CDRH1	SEQ ID NO:13	n /a
2B7CDRH2	SEQ ID NO:14	n /a
2B7CDRH3	SEQ ID NO:15	n /a
2B7CDRL1	SEQ ID NO:16	n /a
2B7 CDRL2	SEQ ID NO:17	n /a
2B7 CDRL3	SEQ ID NO:18	n /a
9G2 CDRH1	SEQ ID NO:19	n /a
9G2 CDRH2	SEQ ID NO:20	n /a
9G2 CDRH3	SEQ ID NO:21	n /a
9G2 CDRL1	SEQ ID NO:22	n /a
9G2 CDRL2	SEQ ID NO:23	n /a
9G2 CDRL3	SEQ ID NO:24	n /a
10G8 V <sub>H</sub> домен (мишачий)	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:25
10G8 V <sub>L</sub> домен (мишачий)	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:27
3E3 V <sub>H</sub> домен (мишачий)	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:29
3E3 V <sub>L</sub> домен (мишачий)	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:31
2B7 V <sub>H</sub> домен (мишачий)	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:33
2B7 V <sub>L</sub> домен (мишачий)	SEQ ID NO:36	SEQ ID NO:35
9G2 V <sub>H</sub> домен (мишачий)	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:37
9G2 V <sub>L</sub> домен (мишачий)	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:39
10G8 V <sub>H</sub> домен (химерний)	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:41
10G8 V <sub>L</sub> домен (химерний)	SEQ ID NO:44	SEQ ID NO:43
9G2 V <sub>H</sub> домен (химерний)	SEQ ID NO:46	SEQ ID NO:45
9G2 V <sub>L</sub> домен (химерний)	SEQ ID NO:48	SEQ ID NO:47
варіабельна важколанцюгова акцепторна нуклеотидна послідовність зародкової клітинної лінії людини IGHV3_7	SEQ ID NO:50	SEQ ID NO:49
варіабельна легколанцюгова акцепторна нуклеотидна послідовність зародкової клітинної лінії людини IGKV4_1	SEQ ID NO:52	SEQ ID NO:51

## Стислий опис послідовностей

Опис	Амінокислотна послідовність	Полінуклеотидна послідовність
H0 V <sub>H</sub> гуманізованого антитіла 10G8*	SEQ ID NO:54	SEQ ID NO:53
H1 V <sub>H</sub> гуманізованого антитіла 10G8*	SEQ ID NO:56	SEQ ID NO:55
H2 V <sub>H</sub> гуманізованого антитіла 10G8*	SEQ ID NO:58	SEQ ID NO:57
L0 V <sub>L</sub> гуманізованого антитіла 10G8*	SEQ ID NO:60	SEQ ID NO:59
L1 V <sub>L</sub> гуманізованого антитіла 10G8*	SEQ ID NO:62	SEQ ID NO:61
L2 V <sub>L</sub> гуманізованого антитіла 10G8*	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:63
L3 V <sub>L</sub> гуманізованого антитіла 10G8*	SEQ ID NO:66	SEQ ID NO:65
L4 V <sub>L</sub> гуманізованого антитіла 10G8*	SEQ ID NO:68	SEQ ID NO:67
зріла послідовність H0 важкого ланцюга*	SEQ ID NO:70	SEQ ID NO:69
зріла послідовність L1 легкого ланцюга*	SEQ ID NO:72	SEQ ID NO:71
H0 V <sub>H</sub> гуманізованого варіанту (IGHV3_23 CDRH1)*	SEQ ID NO:74	SEQ ID NO:73
зріла послідовність H0 важкого ланцюга (IGHV3_23 CDRH1)*	SEQ ID NO:76	SEQ ID NO:75
послідовність важкого ланцюга зародкової клітинної лінії людини IGHV3_23 CDRH1	SEQ ID NO:77	n /a
послідовність легкого ланцюга зародкової клітинної лінії людини IGKV1_5 CDRL2	SEQ ID NO:78	n /a
послідовність важкого ланцюга 15E10h	SEQ ID NO:79	n /a
послідовність легкого ланцюга 15E10h	SEQ ID NO:80	n /a
послідовність VH B3 гуманізованого 15E10	SEQ ID NO:81	n /a
послідовність VL L2 гуманізованого 15E10	SEQ ID NO:82	n /a
OSM людини	SEQ ID NO:84	SEQ ID NO:83

\* - нуклеотидна послідовність піддана кодон-оптимізації за допомогою програмного забезпечення Leto (від Entelechon Inc.).

- 5 Перелік послідовностей.  
 SEQ ID NO:1 - CDRH1 антитіла 10G8  
 NYAMS  
 SEQ ID NO:2 - CDRH2 антитіла 10G8  
 TISDGGSTFTYYLDNVRG
- 10 SEQ ID NO:3 - CDRH3 антитіла 10G8  
 DVGHTTFWYFDV  
 SEQ ID NO:4 - CDRL1 антитіла 10G8  
 RASKSVSAAGYNFMH  
 SEQ ID NO:5 - CDRL2 антитіла 10G8
- 15 YASNLES  
 SEQ ID NO:6 - CDRL3 антитіла 10G8  
 LHSREFPFT  
 SEQ ID NO:7 - CDRH1антитіла 3E3  
 SYAMS
- 20 SEQ ID NO:8 - CDRH2 антитіла 3E3  
 TISDGGSTFTYYFANIQQ  
 SEQ ID NO:9 - CDRH3 антитіла 3E3  
 DVGLTTFWYFDV  
 SEQ ID NO:10 - CDRL1 антитіла 3E3
- 25 RASKSVSPSGYDFMH  
 SEQ ID NO:11 - CDRL2 антитіла 3E3  
 YASELES  
 SEQ ID NO:12 - CDRL3 антитіла 3E3  
 QHSREFPFT
- 30 SEQ ID NO:13 - CDRH1 антитіла 2B7

NYAMS  
 SEQID NO:14 - CDRH2 антитіла 2B7  
 TISDGGGYTYYLNDNGQG  
 SEQID NO:15 - CDRH3 антитіла 2B7  
 5 DVGLTTFWYFDV  
 SEQID NO:16 - CDRL1 антитіла 2B7  
 RASKSVSPSSYNFMH  
 SEQID NO:17 - CDRL2 антитіла 2B7  
 YASNLES  
 10 SEQ ID NO:18 - CDRL3 антитіла 2B7  
 QHSREFPFT  
 SEQ ID NO:19 - CDRH1 антитіла 9G2  
 NYAMS  
 SEQ ID NO:20 - CDRH2 антитіла 9G2  
 15 TISDGGSTYYLDNVKG  
 SEQ ID NO:21 - CDRH3 антитіла 9G2  
 DVGHTTFWYFDV  
 SEQ ID NO:22 - CDRL1 антитіла 9G2  
 RASKSVSASGYNFMH  
 20 SEQ ID NO:23 - CDRL2 антитіла 9G2  
 YASNLES  
 SEQ ID NO:24 - CDRL3 антитіла 9G2  
 QHSREFPFT  
 SEQ ID NO: 25 - нуклеотидна послідовність  $V_H$  10G8  
 25 GAAATGCAACTGGTGGAGTCTGGGGAAGGCTTAGTGGAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCT  
 CCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTTCAGTAACTATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGGAA  
 AAGAGCCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTGATGGTGGTAGTTTCACCTACTATCTAGACAATGT  
 AAGGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAACCTGTATTTGCAAATGAGCCATT  
 TGAAGTCTGACGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGAGATGTGGGACATACTACCTTTTGGTAC  
 30 TTCGATGTCTGGGGCTCAGGGACCGCGGTCACCGTCTCCTCA  
 SEQ ID NO:26 - амінокислотна послідовність  $V_H$  10G8  
 EMQLVESGEGLVEPGGSLKLSCAASGFTFSNYAMSWVRQTPEKSLEWVATISDGGSTYYLDNV  
 RGRFTISRDNANKNNLYLQMSHLKSDDTAMYCARDVGHTTFWYFDVWWSGTAVTVSS  
 SEQ ID NO: 27 - нуклеотидна послідовність  $V_L$  10G8  
 35 GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGTTTTCTTAGTTGTATCTCTGGGGCAGAGGGGCCACCAT  
 CTCCTGTAGGGCCAGCAAAAGTGTCACTGCAGTGGCTATAATTTTCATGCACTGGTACCAACAGA  
 AACCAGGACAGCCGCCCAAAGTCTCATCAAGTATGCATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGC  
 CAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAG  
 GATGCTGTAACATATTACTGTCTGCACAGTAGGGAGTTTCCGTTTCACGTTCCGAGGGGGGACCA  
 40 ACCTGGAAATAAAA  
 SEQ ID NO: 28 - амінокислотна послідовність  $V_L$  10G8  
 DIVLTQSPVFLVSLGQRATISCRASKSVSAAGYNFMHWYQQKPGQPPKVLIKYASNLESGVPAR  
 FS GSGSGDTFTLNIHPVEEEDAVTYCLHSREFPFTFGGGTNLEIK  
 SEQ ID NO: 29 - нуклеотидна послідовність  $V_H$  3E3  
 45 GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTAGTGAAACCTGGAGGGTCCCTGAAACTCT  
 CCTGTGTACCCTCTGGATTCACTTTTCAGTAGTTATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGGAA  
 AAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTGATGGTGGTAGTTTCACCTACTATTTTGCCAATAT  
 ACAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATACCAAGAACAACCTATACCTGCAAATGAACCATC  
 TGAAGTCTGAGGACGCAGGCATGTATTACTGTGCAAGAGATGTGGGCCTTACTACGTTTTTGGTAT  
 50 TTCGATGTCTGGGGCACAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA  
 SEQ ID NO: 30 - амінокислотна послідовність  $V_H$  3E3  
 EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCVPSGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVATISDGGSTYYFANI  
 QG RFTISRDNNTKNNLYLQMNHLKSEDAGMYCARDVGHTTFWYFDVWGTGTTTVTVSS  
 SEQ ID NO: 31 - нуклеотидна послідовність  $V_L$  3E3  
 55 GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAACCTATATCTCTGGGGCAGAGGGGCCACCAT  
 CTCCTGCAGGGCCAGCAAAAGTGTCACTCCATCTGGCTATGATTTTCATGCACTGGTATCAACAGA  
 AGCCAGGACAGCCGCCCAAACCTCCTCATCAAGTATGCATCCGAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGG  
 CAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGATTTACCCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAAGAA  
 GATGCTGCAACATATTTCTGTCAAGCAGTAGGGAGTTTCCGTTTCACGTTCCGAGGGGGGACCA  
 60 AGCTGGAAATAAAA



SEQ ID NO: 32 - амінокислотна послідовність V<sub>L</sub> 3E3  
 DIVLTQSPASLTISLGQRATISCRASKSVSPSGYDFMHWYQQKPGQPPLIKYASELESGVPGRF  
 SG SGSGTDFTLNHPVEEEDAATYFCQHSREFPFTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:33 - нуклеотидна послідовність V<sub>H</sub> 2B7

5 GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAACCTGGAGGGTCCCTGAAACTCT  
 CCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTTCAGTAACTATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGGAA  
 AAGAGGCTGGAGTGGGTGCGGACCATTAAGTATGGTGGTGGTTACACCTACTATTTAGACAATG  
 GACAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAACCTGTACCTGCAGATGAGCCA  
 TCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGAGATGTGGGACTTACTACGTTTTGGT  
 10 ACTTCGATGTCTGGGGCACAGGGACCGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:34 - амінокислотна послідовність V<sub>H</sub> 2B7

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSNYAMSWVRQTPEKRLEWVATISDGGGYTYLDN  
 GGRFTISRDNKNNLYLQMSHLKSEDTAMYYCARDVGLTTFWYFDVWGTGTTVTVSS

SEQ ID NO:35 - нуклеотидна послідовність V<sub>L</sub> 2B7

15 GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGTTTCCTTAGTTATATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCAT  
 CTCCTGCAGGGCCAGCAAAAGTGTCAAGTCCATCTAGCTATAATTTTCATGCACTGGTACCAACAGA  
 GACCAGGACAGCCGCCCAAACTCCTCATCAGTATGCTTCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGC  
 CAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAAGAG  
 GATGCTGCAACATATTACTGTCAGCACAGTAGGGAGTTTCCGTTACGTTCCGAGGGGGGACCA  
 20 GGC TGGAAATAAAA

SEQ ID NO:36 - амінокислотна послідовність V<sub>L</sub> 2B7

DIVLTQSPVSLVISLGQRATISCRASKSVSPSSYNFMHWYQQRPGQPPLIKITYASNLESGVPARF  
 SG SGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQHSREFPFTFGGGTRLEIK

SEQ ID NO:37 - нуклеотидна послідовність V<sub>H</sub> 9G2

25 GAAGTACAAGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCT  
 CCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTTCAGTAACTATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGGAA  
 AAGAGGCTGGAGTGGGTGCGAACCATTAGTATGGTGGTAGTTTCACCTACTATCTAGACAATGT  
 AAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAACCTGTATTTGCAAATGAGCCATT  
 TGAAGTCTGACGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGAGATGTGGGACATACTACGTTTTGGTAC  
 30 TTCGATGTCTGGGGCACAGGGACCGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:38 - амінокислотна послідовність V<sub>H</sub> 9G2

EVQLVESGGGLVPEPGGSLKLSAASGFTFSNYAMSWVRQTPEKRLEWVATISDGGSTYYLDNV  
 KGRFTISRDNKNNLYLQMSHLKSDDTAMYYCARDVGHTTFWYFDVWGTGTTVTVSS

SEQ ID NO:39 - нуклеотидна послідовність V<sub>L</sub> 9G2

35 GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGTTTCTTAGTTATATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATC  
 TCCTGCAGGGCCAGCAAAAGTGTCAAGTGCATCTGGCTATAATTTTCATGCACTGGTACCAACAGAA  
 ACCAGGACAGCCGCCCAAAAGTCTCATCAAGTATGCATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCC  
 AGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAG  
 GATGCTGTAACATATTACTGTCAGCACAGTAGGGAGTTTCCGTTACGTTCCGAGGGGGGACCA  
 40 AGCTGGAAATAAAA

SEQ ID NO:40 - амінокислотна послідовність V<sub>L</sub> 9G2

DIVLTQSPVFLVISLGQRATISCRASKSVSASGYNFMHWYQQKPGQPPLIKITYASNLESGVPARF  
 SG SGSGTDFTLNHPVEEEDAVTYCQHSREFPFTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:41 - нуклеотидна послідовність V<sub>H</sub> химерного антитіла 10G8

45 GAAATGCAACTGGTGGAGTCTGGGGAAGGCTTAGTGAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCT  
 CCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTTCAGTAACTATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGGAA  
 AAGAGCCTGGAGTGGGTGCGAACCATTAGTATGGTGGTAGTTTCACCTACTATCTAGACAATGT  
 AAGGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAACCTGTATTTGCAAATGAGCCATT  
 TGAAGTCTGACGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGAGATGTGGGACATACTACCTTTTGGTAC  
 50 TTCGATGTCTGGGGCTCAGGGACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCCAGC  
 GTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCT  
 GGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGG  
 CGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGAC  
 CGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAA  
 55 CACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTG  
 CCTGCCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCTGTTCCCCCACAAGCCTAAGGACAC  
 CCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCC  
 TGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAG  
 GGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACAGGATTG  
 60 GCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCTATCGAGAAA

ACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGA  
GATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACA  
TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGC  
TGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCA  
5 GGGCAACGTGTTACAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACCCCAGAAGAGC  
CTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

SEQ ID NO:42 - амінокислотна послідовність V<sub>H</sub> химерного антитіла 10G8

EMQLVESGEGLVEPGGSLKLSCAASGFTFSNYAMSWVRQTPEKSLEWVATISDGGSTYYLDNV  
RGRFTISRDNANKNNLYLQMSHLKSDDTAMYCARDVGHTTFWYFDVWGSGLTVTVSSASTKGPSVF  
10 PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS  
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC  
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK  
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT  
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

15 SEQ ID NO: 43 - нуклеотидна послідовність V<sub>L</sub> химерного антитіла 10G8

GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGTTTTCTTAGTTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCAT  
CTCCTGTAGGGCCAGCAAAAGTGTACGTGCAGCTGGCTATAATTTTCATGCACTGGTACCAACAGA  
AACCAGGACAGCCGCCCAAAGTCTCATCAAGTATGCATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGC  
CAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAG  
20 GATGCTGTAACATATTACTGTCTGCACAGTAGGGAGTTTCCGTTACGTTCCGAGGGGGGACCA  
ACCTGGAATAAAACGTACGGTGGCCGCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCA  
GCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAA  
GGTGCAGTGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGC  
AGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACG  
25 AGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGA  
GCTTCAACCGGGGCGAGTGC

SEQ ID NO:44 - амінокислотна послідовність V<sub>L</sub> химерного антитіла 10G8

DIVLTQSPVFLVVS LGQRATISCRASKSVSAAGYNFMHWYQQKPGQP PKVLIKYASNLESGV PAR  
FSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAVTYICLHSREFPFTFGGGTNLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA  
30 SVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT  
HQLLSSPVT KSFNRGEC

SEQ ID NO:45 - нуклеотидна послідовність V<sub>H</sub> химерного антитіла 9G2

GAAGTACAACCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGGAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCT  
CCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTACAGTAACATATGCCATGTCTTGGGTTCCGACACTCCGGAA  
35 AAGAGGCTGGAGTGGGTGCGAACCATTAAGTATGATGGTGGTAGTTTACCTACTACTAGACAATGT  
AAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAACCTGTATTGCAAATGAGCCATT  
TGAAGTCTGACGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGAGATGTGGGACATACTACGTTTTGTAC  
TTCGATGTCTGGGGCACAGGGACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGC  
GTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCT  
40 GGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGG  
CGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGC  
CGTGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAA  
CACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTG  
CCCTGCCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCTGTTCCCCCACAAGCCTAAGGACAC  
45 CCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCC  
TGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCAG  
GGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGACCCAGGATTG  
GCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCTATCGAGAAA  
ACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGA  
50 GATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACA  
TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGC  
TGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCA  
GGGCAACGTGTTACAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACCCCAGAAGAGC  
CTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

55 SEQ ID NO:46 - амінокислотна послідовність V<sub>H</sub> химерного антитіла 9G2

EVQLVESGGGLVEPGGSLKLSCAASGFTFSNYAMSWVRQTPEKRLEWVATISDGGSTYYLDNV  
KGRFTISRDNANKNNLYLQMSHLKSDDTAMYCARDVGHTTFWYFDVWGTGLTVTVSSASTKGPSVF  
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS  
60 GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC  
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK

ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT  
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:47 - нуклеотидна послідовність V<sub>L</sub> химерного антитіла 9G2

5 GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGTTTTCTTAGTTATATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATC  
TCCTGCAGGGCCAGCAAAAGTGTCAGTGCATCTGGCTATAATTTTCATGCACTGGTACCAACAGAA  
ACCAGGACAGCCGCCCAAAGTCCTCATCAAGTATGCATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCC  
AGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAG  
GATGCTGTAACATATTACTGTCAGCACAGTAGGGAGTTTCCGTTTCACGTTCCGAGGGGGGACCA  
AGCTGGAATAAAACGTACGGTGGCCGCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCA  
10 GCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAA  
GGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGC  
AGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACG  
AGAAGCACAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGA  
GCTTCAACCGGGGCGAGTGC

15 SEQ ID NO:48 - амінокислотна послідовність V<sub>L</sub> химерного антитіла 9G2

DIVLTQSPVFLVISLGQRATISCRASKSVSASGYNFMHWYQQKPGQPPLIKYASNLESVGPAPRF  
SGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAVTYQCQHSREFPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA  
SVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVT  
HQLSSPVTKSFNRGEC

20 SEQ ID NO:49 - акцепторна нуклеотидна V<sub>H</sub> послідовність IGHV3\_7 зародкової клітинної лінії людини

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC  
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAGCTATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAG  
GGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTC  
25 TGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTATCTGCAAATGAACA  
GCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

SEQ ID NO:50 - акцепторна амінокислотна V<sub>H</sub> послідовність IGHV3\_7 зародкової клітинної лінії людини

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVD  
30 SVK GRFTISR DHK KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

SEQ ID NO:51 - акцепторна нуклеотидна V<sub>L</sub> послідовність IGKV4\_1 зародкової клітинної лінії людини

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCA  
TCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATACAGCTCCAACAATAAGAACTACTTAGCTTGGTAC  
35 CAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGGGAATCCGGGG  
TCCGTGACCGATTCAAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA  
GGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTGAGCAATATTATAGTACT

SEQ ID NO:52 - акцепторна амінокислотна V<sub>L</sub> послідовність IGKV4\_1 зародкової клітинної лінії людини

40 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIWASTRESGVP  
DR FSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQYYST

SEQ ID NO:53 - Leto- кодон-оптимізована V<sub>H</sub> нуклеотидна послідовність H0 гуманізованого антитіла 10G8

GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTCCAGCCCGGCGGGAGCCTGAGACT  
45 CTCTTGCGCCGCTAGCGGCTTCACCTTCAGCAACTACGCCATGAGCTGGGTGAGGCAGGCCCC  
CGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCCACCATCAGCGACGGCGGCAGCTTCACCTACTATCTGGA  
CAACGTGAGGGGCGAGTTACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGAT  
GAACAGCCTGAGGGCCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACGTGCGCCACACCAC  
CTTCTGGTACTTCGACGTCTGGGGCAGGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

50 SEQ ID NO:54 - V<sub>H</sub> амінокислотна послідовність H0 гуманізованого антитіла 10G8

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVATISDGGSTYYLDN  
VRGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVGHHTTFWYFDVWGRGLTVTVSS

SEQ ID NO:55 - Leto- кодон-оптимізована V<sub>H</sub> нуклеотидна послідовність H1 гуманізованого антитіла 10G8

55 GAGATGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTCCAGCCCGGCGGGAGCCTGAGACTC  
TCTTGCGCCGCTAGCGGCTTCACCTTCAGCAACTACGCCATGAGCTGGGTGAGGCAGGCCCC  
GGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCCACCATCAGCGACGGCGGCAGCTTCACCTACTATCTGGAC  
AACGTGAGGGGCGAGTTACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATG  
AACGCCTGAGGGCCGAGGATACCGCGTGTACTACTGCGCCAGGGACGTGCGCCACACCAC  
60 TTCTGGTACTTCGACGTCTGGGGCAGGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

SEQ ID NO:56 - V<sub>H</sub> амінокислотна послідовність H1 гуманізованого антитіла 10G8  
EMQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVATISDGGGSFTYYLDN  
VRGRFTISRDNALNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVGHTTFWYFDVWGRGLTVTVSS

5 SEQ ID NO:57 - Leto- кодон-оптимізована V<sub>H</sub> нуклеотидна послідовність H2 гуманізованого антитіла 10G8

GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTCCAGCCCCGGCGGGAGCCTGAGACT  
CTCTTGCGCCGCTAGCGGCTTCACCTTCAGCAACTACGCCATGAGCTGGGTGAGGCAGGCCCC  
CGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCCACCATCAGCGACGGCGGCAGCTTCACCTACTATCTGGA  
CAACGTGAGGGGCGAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGAT  
10 GAACAGCCTGAGGGCCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACGTCGGCCACACCAC  
CTTCTGGTACTTCGACGTCTGGGGCTCCGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

SEQ ID NO:58 - V<sub>H</sub> амінокислотна послідовність H2 гуманізованого антитіла 10G8  
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVATISDGGGSFTYYLDN  
VRGRFTISRDNALNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVGHTTFWYFDVWGSGLTVTVSS

15 SEQ ID NO:59 - Leto- кодон-оптимізована V<sub>L</sub> L0 нуклеотидна послідовність гуманізованого антитіла 10G8

GACATCGTGATGACTCAGAGCCCCGATAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAAAGGGGCCACCA  
TCAACTGCAGGGCCAGCAAGAGCGTGAGCGCTGCCGGCTACAACCTTCATGCACTGGTACCAGC  
AGAAGCCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTACGCCTCCAACCTGGAGAGCGGCGTGC  
20 CAGACAGGTTACGCGGATCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCAAGCCTGCAGG  
CCGAGGACGTGCGCGTGTACTACTGCCTGCACAGCAGGGAGTTCCCTTCACCTTTGGCGGCG  
GC ACCAAGGTGGAGATCAAG

SEQ ID NO:60 - V<sub>L</sub> амінокислотна послідовність L0 гуманізованого антитіла 10G8

25 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSAAGYNFMHWYQQKPGQPPKLLIYYASNLESQVPD  
RFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCLHSREFPFTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:61 - Leto- кодон-оптимізована V<sub>L</sub> нуклеотидна послідовність L1 гуманізованого антитіла 10G8

GACATCGTGATGACTCAGAGCCCCGATAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAAAGGGGCCACCA  
TCAACTGCAGGGCCAGCAAGAGCGTGAGCGCTGCCGGCTACAACCTTCATGCACTGGTACCAGC  
30 AGAAGCCCCGGCCAGCCCCCAAGGTGCTGATCTACTACGCCTCCAACCTGGAGAGCGGCGTGC  
CAGACAGGTTACGCGGATCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCAAGCCTGCAGG  
CCGAGGACGTGCGCGTGTACTACTGCCTGCACAGCAGGGAGTTCCCTTCACCTTTGGCGGCG  
GC ACCAAGGTGGAGATCAAG

SEQ ID NO:62 - V<sub>L</sub> амінокислотна послідовність L1 гуманізованого антитіла 10G8

35 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSAAGYNFMHWYQQKPGQPPKLLIYYASNLESQVPD  
RFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCLHSREFPFTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:63 - Leto- кодон-оптимізована V<sub>L</sub> нуклеотидна послідовність L2 гуманізованого антитіла 10G8

40 GACATCGTGATGACTCAGAGCCCCGATAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAAAGGGGCCACCA  
TCAACTGCAGGGCCAGCAAGAGCGTGAGCGCTGCCGGCTACAACCTTCATGCACTGGTACCAGC  
AGAAGCCCCGGCCAGCCCCCAAGGTGCTGATCTACTACGCCTCCAACCTGGAGAGCGGCGTGC  
CAGACAGGTTACGCGGATCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCAAGCCTGCAGG  
CCGAGGACGTGCGTGGTGTACTACTGCCTGCACAGCAGGGAGTTCCCTTCACCTTTGGCGGCG  
45 GC ACCAAGGTGGAGATCAAG

SEQ ID NO:64 - V<sub>L</sub> амінокислотна послідовність L2 гуманізованого антитіла 10G8

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSAAGYNFMHWYQQKPGQPPKLLIYYASNLESQVPD  
RFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCLHSREFPFTFGGGTKVEIK

50 SEQ ID NO:65 - Leto- кодон-оптимізована V<sub>L</sub> нуклеотидна послідовність L3 гуманізованого антитіла 10G8

GACATCGTGATGACTCAGAGCCCCGATAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAAAGGGGCCACCA  
TCAACTGCAGGGCCAGCAAGAGCGTGAGCGCTGCCGGCTACAACCTTCATGCACTGGTACCAGC  
AGAAGCCCCGGCCAGCCCCCAAGGTGCTGATCTACTACGCCTCCAACCTGGAGAGCGGCGTGC  
55 CAGACAGGTTACGCGGATCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCAAGCCTGCAGG  
CCGAGGACGTGCGCGTGTACTACTGCCTGCACAGCAGGGAGTTCCCTTCACCTTTGGCGGCG  
GC ACCAAGGTGGAGATCAAG

SEQ ID NO:66 - V<sub>L</sub> амінокислотна послідовність L3 гуманізованого антитіла 10G8

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSAAGYNFMHWYQQKPGQPPKLLIYYASNLESQVPD  
RFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCLHSREFPFTFGGGTNVEIK

60 SEQ ID NO:67 - Leto- кодон-оптимізована V<sub>L</sub> нуклеотидна послідовність L4 гуманізованого

антитіла 10G8

GACATCGTGATGACTCAGAGCCCCGATAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAAAGGGGCCACCA  
TCAACTGCAGGGCCAGCAAGAGCGTGAGCGCTGCCGGCTACAACCTTCATGCACTGGTACCAGC  
AGAAGCCCCGGCCAGCCCCCAAGGTGCTGATCTACTACGCCTCCAACCTGGAGAGCGGCGTGC  
5 CAGACAGGTTTACGCGGATCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCTGACCATCTCAAGCCTGCAGG  
CCGAGGACGTCTGTGGTGTACTACTGCCTGCACAGCAGGGAGTTCCCTTACCTTTGGCGGCG  
GC ACCAACGTGGAGATCAAG

SEQ ID NO:68 - V<sub>L</sub> амінокислотна послідовність L4 гуманізованого антитіла 10G8

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSAAGYNFMHWYQQKPGPPKVLIIYASNLESGVPD  
10 RFS GSGSGTDFLTITSSSLQAEDWVYYCLHSREFPFTFGGGTNVEIK

SEQ ID NO:69 - Leto- кодон-оптимізована зріла нуклеотидна послідовність важкого ланцюга H0

GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTCCAGCCCCGGCGGGAGCCTGAGACT  
CTCTTGCGCCGCTAGCGGCTTCACCTTCAGCAACTACGCCATGAGCTGGGTGAGGCAGGCCCC  
15 CGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCCACCATCAGCGACGGCGGCAGCTTCACCTACTATCTGGA  
CAACGTGAGGGGCGAGGTTTACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGAT  
GAACAGCCTGAGGGCCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACGTGCGGCCACACCAC  
CTTCTGGTACTTCGACGTCTGGGGCAGGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAA  
GGGCCCCAGCGTGTTCCTTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCC  
20 TGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCC  
TGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCA  
GCGTGGTGACCGTGGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACA  
AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCT  
GC

CCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCCAAGCCT  
AAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCCAC  
GAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACC  
AAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGTCAC  
30 CAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCTA  
TCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCC  
CTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCC  
CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCC  
CCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGA  
TGGCAGCAGGGCAACGTGTTTACGTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCC  
35 AGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

SEQ ID NO:70 - зріла амінокислотна послідовність важкого ланцюга H0

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVATISDGGSFYYLDN  
VRGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVGHHTTFWYFDVWGRGLTVTVSSASTKGPSV  
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS  
40 LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT  
CVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK  
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT  
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:71 - Leto- кодон-оптимізована зріла нуклеотидна послідовність легкого ланцюга L1

GACATCGTGATGACTCAGAGCCCCGATAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAAAGGGGCCACCA  
TCAACTGCAGGGCCAGCAAGAGCGTGAGCGCTGCCGGCTACAACCTTCATGCACTGGTACCAGC  
AGAAGCCCCGGCCAGCCCCCAAGGTGCTGATCTACTACGCCTCCAACCTGGAGAGCGGCGTGC  
50 CAGACAGGTTTACGCGGATCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCTGACCATCTCAAGCCTGCAGG  
CCGAGGACGTCTGCGGTGTACTACTGCCTGCACAGCAGGGAGTTCCCTTACCTTTGGCGGCG  
GCACCAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCCAGCG  
ATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGG  
AGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTG  
ACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCTGAGCAAGGCC  
55 GACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTG  
ACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

SEQ ID NO:72 - зріла амінокислотна послідовність легкого ланцюга L1

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSAAGYNFMHWYQQKPGPPKVLIIYASNLESGVPD  
RFSGSGSGTDFLTITSSSLQAEDVAVYYCLHSREFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT  
60 ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACE

VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:73 - Leto- кодон-оптимізована нуклеотидна послідовність гуманізованого V<sub>H</sub> варіанту H0 (IGHV3\_23 CDRH1)

5 GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTCCAGCCCGGCGGGAGCCTGAGACT  
CTCTTGCGCCGCTAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTGAGGCAGGCCCC  
CGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCCACCATCAGCGACGGCGGCAGCTTCACCTACTATCTGGA  
CAACGTGAGGGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGAT  
GAACAGCCTGAGGGCCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACGTCGGCCACACCAC  
CTTCTGGTACTTCGACGTCTGGGGCAGGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

10 SEQ ID NO:74 - амінокислотна послідовність гуманізованого V<sub>H</sub> варіанту H0 (IGHV3\_23 CDRH1)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWWRQAPGKGLEWVATISDGGSTYYLDN  
VRGRFTISRDNANKSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVGHTTFWYFDVWGRGTLVTVSS

15 SEQ ID NO:75 - Leto- кодон-оптимізована зріла нуклеотидна послідовність важкого ланцюга H0 (IGHV3\_23 CDRH1)

GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTCCAGCCCGGCGGGAGCCTGAGACT  
CTCTTGCGCCGCTAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTGAGGCAGGCCCC  
CGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCCACCATCAGCGACGGCGGCAGCTTCACCTACTATCTGGA  
CAACGTGAGGGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGAT  
20 GAACAGCCTGAGGGCCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACGTCGGCCACACCAC  
CTTCTGGTACTTCGACGTCTGGGGCAGGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAA  
GGGCCCCAGCGTGTTCCTCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCC  
TGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCC  
TGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCA  
25 GCGTGGTGACCGTGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACA  
AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCT  
GC  
CCCCCTGCCCTGCCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCCAAGCCT  
AAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCCAC  
30 GAGGACCCTGAGGTGAAGTTCACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACC  
AAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCAC  
CAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCA  
TCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCC  
CTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCC  
35 CAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAATAACAAGACCACCCC  
CCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGA  
TGGCAGCAGGGCAACGTGTTCACTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCC  
AGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

40 SEQ ID NO:76 - зріла амінокислотна послідовність важкого ланцюга H0 (IGHV3\_23 CDRH1)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWWRQAPGKGLEWVATISDGGSTYYLDN  
VRGRFTISRDNANKSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVGHTTFWYFDVWGRGTLVTVSSASTKGPSV  
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS  
45 LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT  
CVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK  
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT  
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

50 SEQ ID NO:77 - послідовність IGHV3\_23 CDRH1 важкого ланцюга зародкової клітинної лінії людини

SYAMS

55 SEQ ID NO:78 - послідовність IGKV1\_5 CDRL2 легкого ланцюга зародкової клітинної лінії людини

KASSLES

60 SEQ ID NO: 79 - амінокислотна послідовність важкого ланцюга гуманізованого антитіла 15E10

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLTNYGVHWRQAPGKGLEWVAVIWRGGSTDYNA  
FMSRFTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYVYFDVWGRGTLVTVSSASTKGPSV  
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS  
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT  
60 CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN

KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT  
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 80 - амінокислотна послідовність легкого ланцюга гуманізованого антитіла 15E10

5 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSGSSSVSYMYWYQQKPGQAPRLIEDTSNLAGIPARFSGSG  
SGTDYTLTISNLEPEDFAVYYCQQWSSYPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC  
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
LSS PVTLSFNREGEC

SEQ ID NO: 81 - послідовність VH B3 гуманізованого антитіла 15E10

10 QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRGGSTDYNA  
FMSRFTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWFYFDVWGRGLV (TVSS)

SEQ ID NO: 82 - послідовність VL L2 гуманізованого антитіла 15E10

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSGSSSVSYMYWYQQKPGQAPRLIEDTSNLAGIPARFSGSG  
SGT DYTLTISNLEPEDFAVYYCQQWSSYPPTFGQGTKLEIK

15 SEQ ID NO: 83 - полінуклеотидна послідовність OSM людини

ATGGGGGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCCTGCACTCCTGTTTCCAAG  
CATGGCGAGCATGGCGGCTATAGGCAGCTGCTCGAAAGAGTACCGCGTGCTCCTTGGCCAGCT  
CCAGAAGCAGACAGATCTCATGCAGGACACCAGCAGACTCCTGGACCCCTATATACGTATCCAA  
GGCCTGGATGTTCTAACTGAGAGAGCACTGCAGGGAGCGCCCCGGGGCCTTCCCCAGTGAG  
20 GAGACCCTGAGGGGGCTGGGCAGGCGGGGCTTCTGCAGACCCTCAATGCCACACTGGGCTG  
CGTCCTGCACAGACTGGCCGACTTAGAGCAGCGCCTCCCCAAGGCCAGGATTTGGAGAGGTC  
TGGGCTGAACATCGAGGACTTGGAGAAGCTGCAGATGGCGAGGCCGAACATCCTCGGGCTCAG  
GAACAACATCTACTGCATGGCCAGCTGCTGGACAACCTCAGACACGGCTGAGCCACGAAGGCT  
GGCCGGGGGGCCTCTCAGCCGCCACCCCCACCCCTGCCTCGGATGCTTTTCAGCGCAAGCTG  
25 GAGGGCTGCAGGTTCTGTCATGGCTACCATCGCTTCATGCACTCAGTGGGGCGGGTCTTCAGCA  
AGTGGGGGGAGAGCCCCGAACCGGAGCCGGAGACACAGCCCCCACCAGGCCCTGAGGAAGGGG  
GTGCGCAGGACCAGACCCTCCAGGAAAGGCAAGAGACTCATGACCAGGGGACAGCTGCCCCGG  
TAG

SEQ ID NO: 84 - амінокислотна послідовність OSM людини

30 MGVLTLQRTLLSLVLALLFSPMASMAAIGSCSKEYRVLLGQLQKQTDLMQDTSRLDPYIRIQGLDVPKLRH  
CRERPGAFPSEETLRGLRGRGFLQTLNATLGCVLHRLADLEQRLPKAQDLERSGLNIEDLEKLQMARPNILGLRN  
NIYCMAQLLDNSDTAERTKAGRGASQPPTPTPASDAFQRKLEGCRFLHGYHRFMHSVGRVFSKWGESPNRSRR  
HSPHQALRKGVRRTRPSRKGRKRLMTRGQLPR.

### 35 ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Антигензв'язувальний білок, що специфічно зв'язується з OSM та інгібує зв'язування OSM з  
рецептором gr130, але безпосередньо не взаємодіє із залишками сайту II, де  
антигензв'язувальний білок включає: CDRH3 послідовності SEQ ID NO:3; CDRH2 послідовності  
40 SEQ ID NO:2; CDRL1 послідовності SEQ ID NO:4; CDRL3 послідовності SEQ ID NO:6; CDRH1  
послідовності SEQ ID NO:77 та CDRL2 послідовності SEQ ID NO:5.

2. Антигензв'язувальний білок за п. 1, де каркасна ділянка важкого ланцюга включає наступні  
залишки:

положення 2 Val, Ile або Gly,

45 положення 4 Leu або Val,

положення 20 Leu, Ile, Met або Val,

положення 22 Cys,

положення 24 Thr, Ala, Val, Gly або Ser,

положення 26 Gly,

50 положення 29 Ile, Phe, Leu або Ser,

положення 36 Trp,

положення 47 Trp,

положення 48 Ile, Met, Val або Leu,

положення 69 Ile, Leu, Phe, Met або Val,

55 положення 71 Arg,

положення 78 Ala, Leu, Val, Tyr або Phe,

положення 80 Leu, Met,

положення 90 Tyr або Phe,

положення 92 Cys,

60 положення 94 Arg, Lys, Gly, Ser, His або Asn.

3. Антигензв'язувальний білок за будь-яким з пп. 1-2, що включає варіабельну ділянку важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:74 та варіабельну ділянку легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:72.

4. Антигензв'язувальний білок за будь-яким з пп. 1-3, де антигензв'язувальний білок являє собою гуманізоване антитіло.

5. Антигензв'язувальний білок за п. 4, де антитіло належить до класу IgG1.

6. Антигензв'язувальний білок за будь-яким з пп. 1-5, де антигензв'язувальний білок додатково зв'язується з нелюдським OSM приматів.

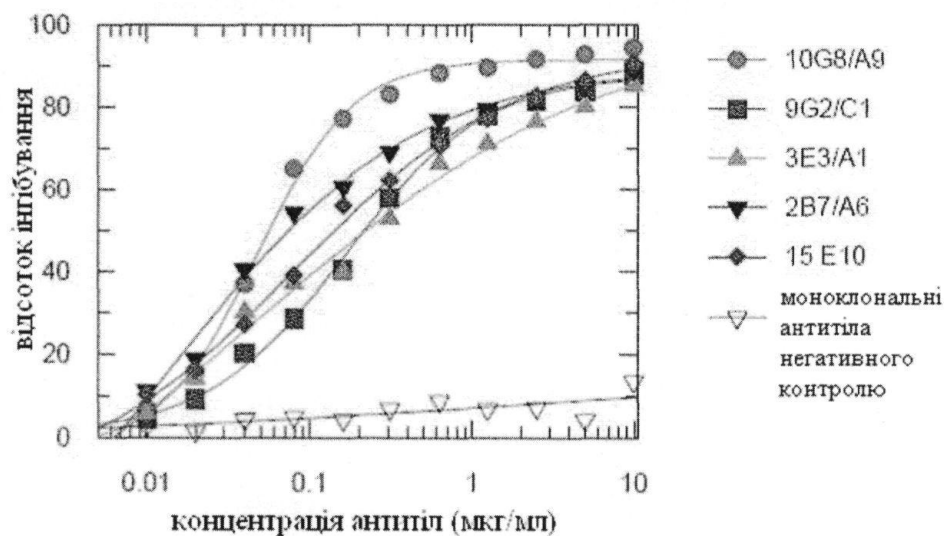
7. Антигензв'язувальний білок за будь-яким з пп. 1-6, де антигензв'язувальний білок зв'язується з OSM із афінністю, меншою ніж 40 пМ.

8. Фармацевтична композиція, що містить антигензв'язувальний білок за будь-яким з пунктів 1-7 та фармацевтично прийнятний носій.

9. Застосування антигензв'язувального білка за будь-яким з пунктів 1-7 або фармацевтичної композиції за пунктом 8 у виробництві лікарського засобу для лікування стану пацієнта, що є людиною, яка страждає від запального розладу або захворювання.

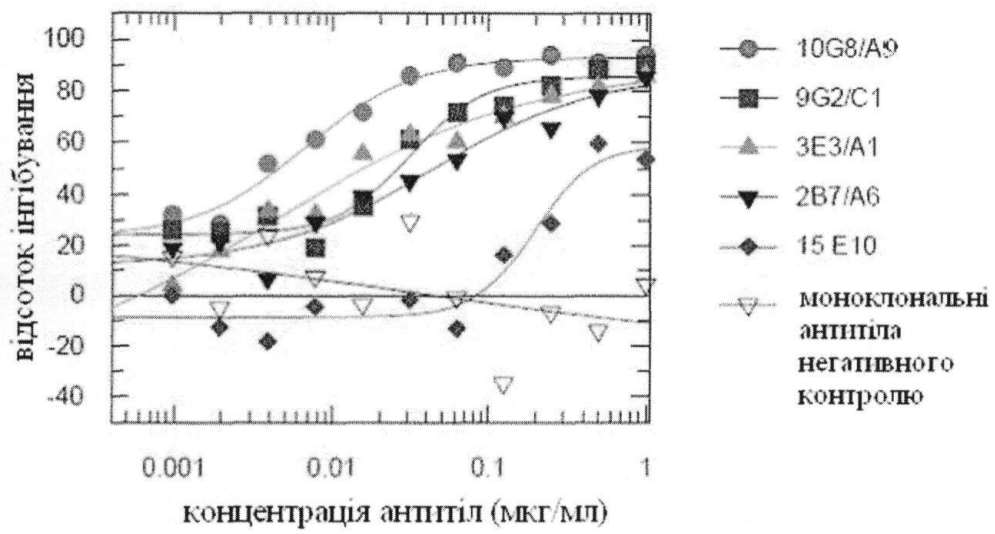
10. Застосування за п. 9, де вказаний запальний розлад або захворювання являє собою запальну артропатію, ревматоїдний артрит, остеоартрит, ідіопатичний легеневий фіброз (IPF), системний склероз, синдром Шегрена, склеродерму та/або псоріаз.

**Фіг. 1. ІФА – аналіз gp130 людини**

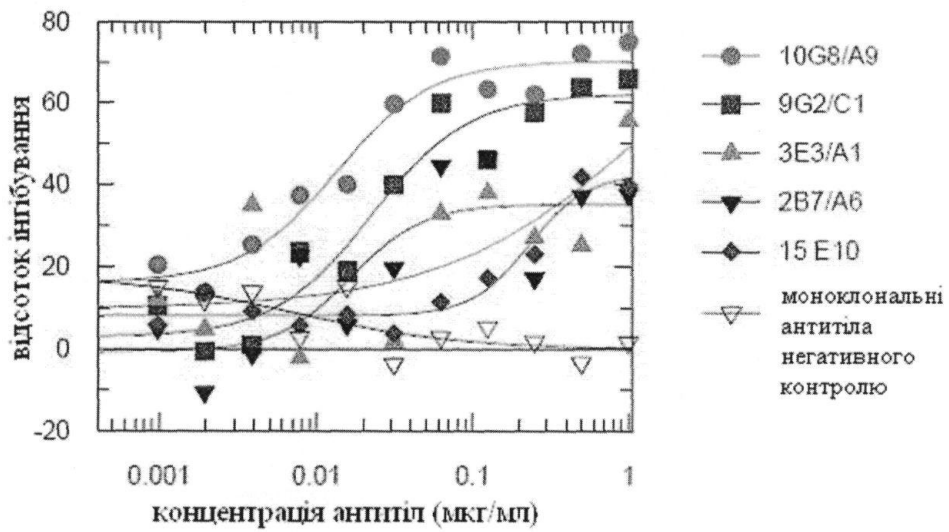




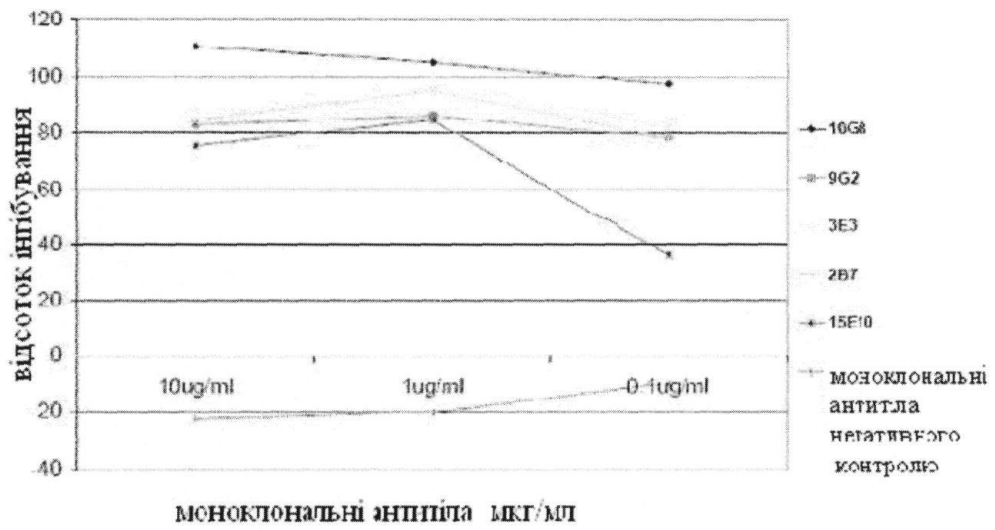
Фіг. 2. аналіз клітин KB



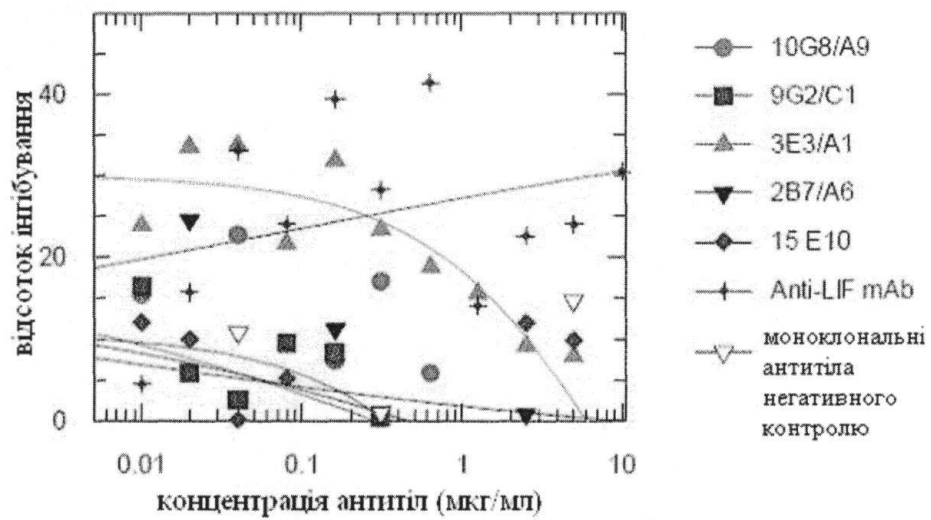
Фіг. 3. аналіз клітин KB



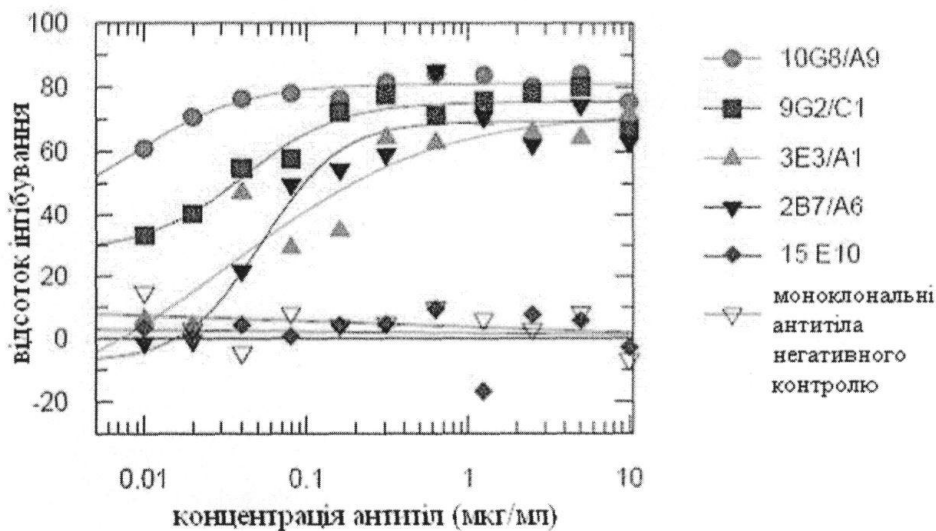
Фіг. 4. аналіз ендogenous OSM та gp130 людини



Фіг. 5. аналіз клітин KB



Фіг. 6. аналіз клітин KB



Фіг. 7

	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	E	P	G	G	S	L	K	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S		Більшість	
1	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	E	P	G	G	S	L	K	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S		2B7 VH білок	
1	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	E	P	G	G	S	L	K	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S		3E3 VH білок	
1	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	E	P	G	G	S	L	K	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S		9G2 VH білок	
	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	E	P	G	G	S	L	K	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S		10G8 VH білок	
	N	Y	A	N	S																											Більшість	
31	N	Y	A	N	S																											2B7 VH білок	
31	N	Y	A	N	S																											3E3 VH білок	
31	N	Y	A	N	S																											9G2 VH білок	
31	N	Y	A	N	S																											10G8 VH білок	
	L	D	N	V	Q	G																										Більшість	
61	L	D	N	V	Q	G																										2B7 VH білок	
61	L	D	N	V	Q	G																										3E3 VH білок	
61	L	D	N	V	Q	G																										9G2 VH білок	
61	L	D	N	V	Q	G																										10G8 VH білок	
	T	A	M	Y	Y	C	A	R																								Більшість	
91	T	A	M	Y	Y	C	A	R																								2B7 VH білок	
91	T	A	M	Y	Y	C	A	R																								3E3 VH білок	
91	T	A	M	Y	Y	C	A	R																								9G2 VH білок	
91	T	A	M	Y	Y	C	A	R																								10G8 VH білок	
																																	Більшість
121																																	2B7 VH білок
121																																	3E3 VH білок
121																																	9G2 VH білок
121																																	10G8 VH білок

у рамці наведені залишки, що відрізняються від консенсусних

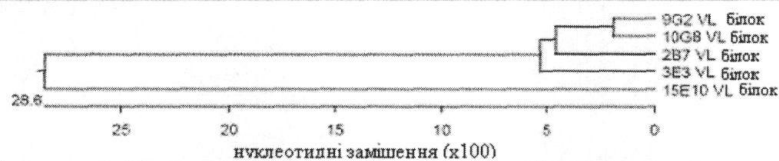
у рамці наведені залишки, що відрізняються від консенсусних

Фіг. 8



Фіг. 9.

філогенетичне дерево резервних VH послідовностей у порівнянні з VL послідовністю антибіа 15E10, отримане з застосуванням комп'ютерної програми ClustalW (матриця порівняння амінокислот по Gonnet, повільні/точні параметри парного вирівнювання) 10 грудня 2007

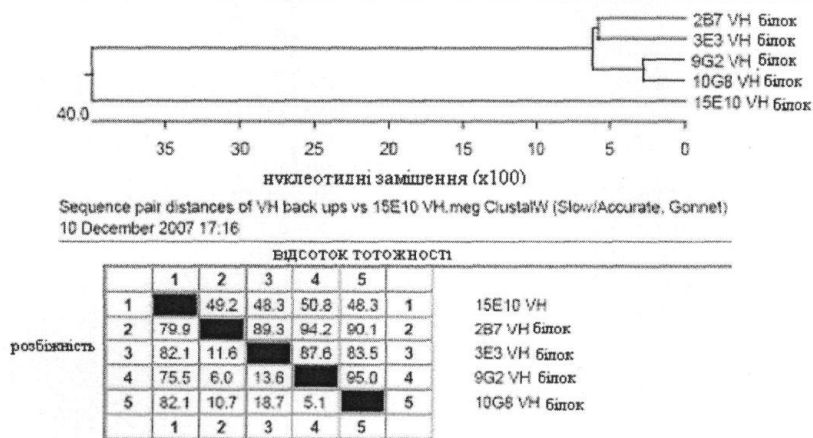


Sequence pair distances of VH back ups vs 15E10 VL.meg ClustalW (Slow/Accurate, Gonnet)  
10 December 2007 17:23

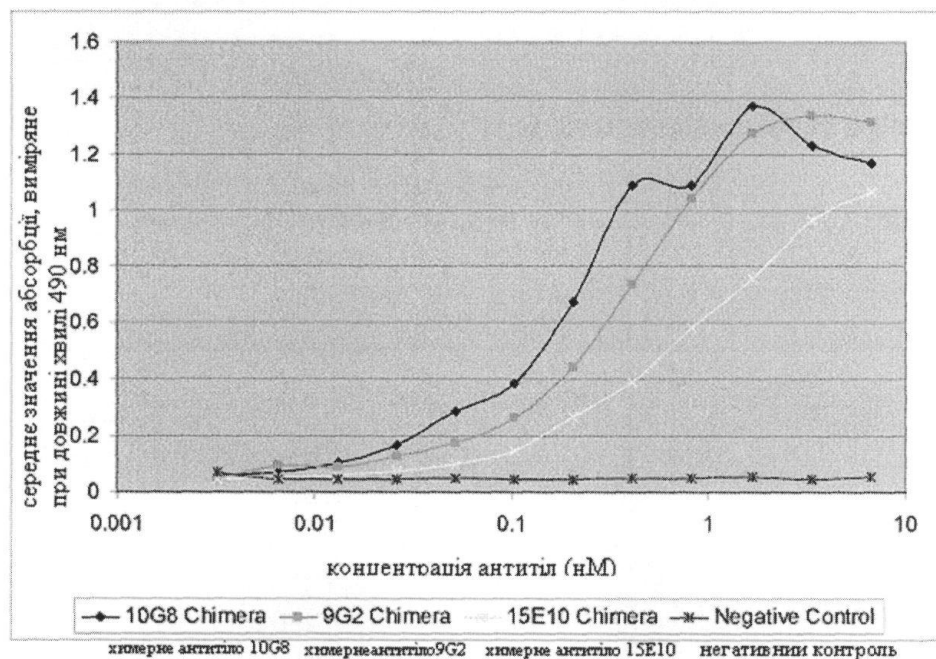
		Відсоток тотожності						
		1	2	3	4	5		
розбіжність	1		59.4	58.5	59.4	57.5	1	15E10 VL
	2	55.8		91.0	92.8	90.1	2	2B7 VL білок
	3	57.7	9.6		91.0	87.4	3	3E3 VL білок
	4	55.8	7.6	9.6		96.4	4	9G2 VL білок
	5	59.7	10.7	13.8	3.7		5	10G8 VL білок
		1	2	3	4	5		

Фіг. 10.

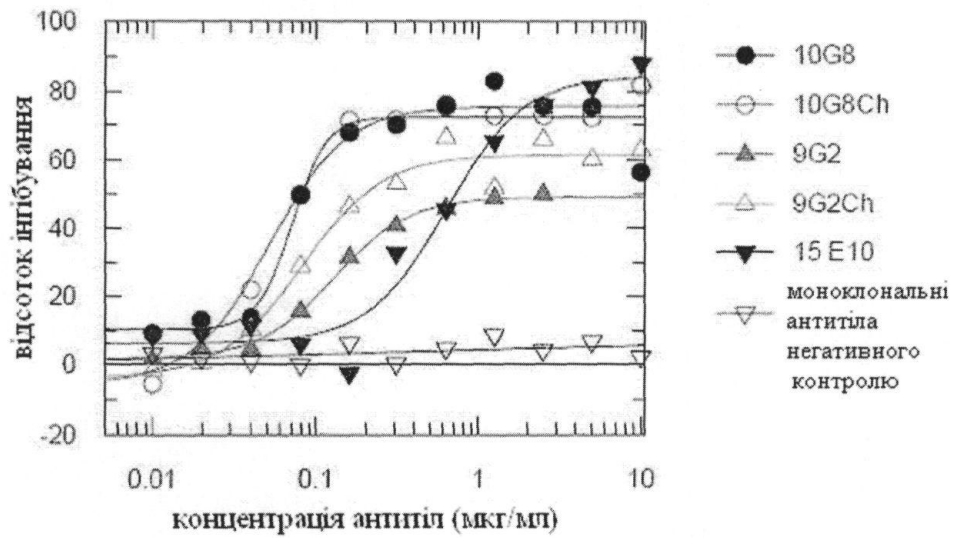
філогенетичне дерево резервних VH послідовностей у порівнянні з VL послідовністю антибіла 15E10, отримане з застосуванням комп'ютерної програми ClustalW (матриця порівняння амінокислот по Gonnet, повільні/точні параметри парного вирівнювання) 10 грудня 2007



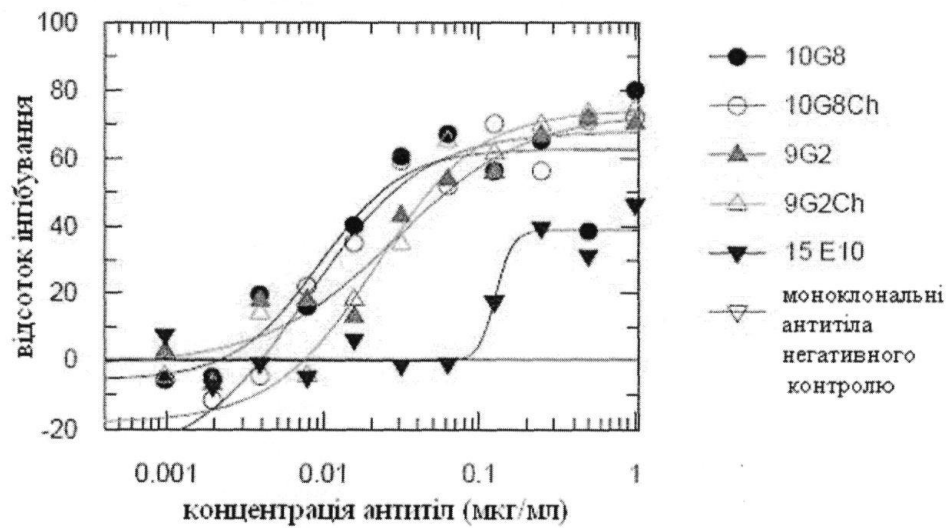
Фіг.11. безпосередній ІФА – аналіз зв'язування OSM людини



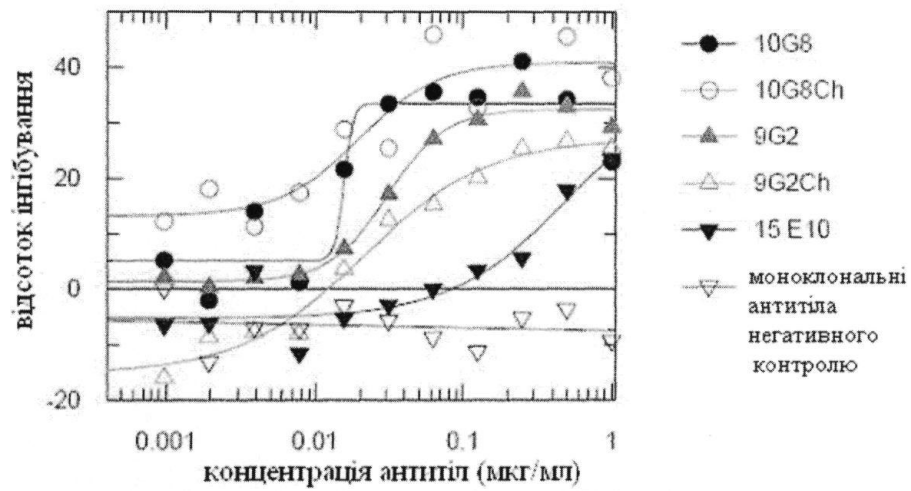
Фіг.12. ІФА – аналіз gr130 людини



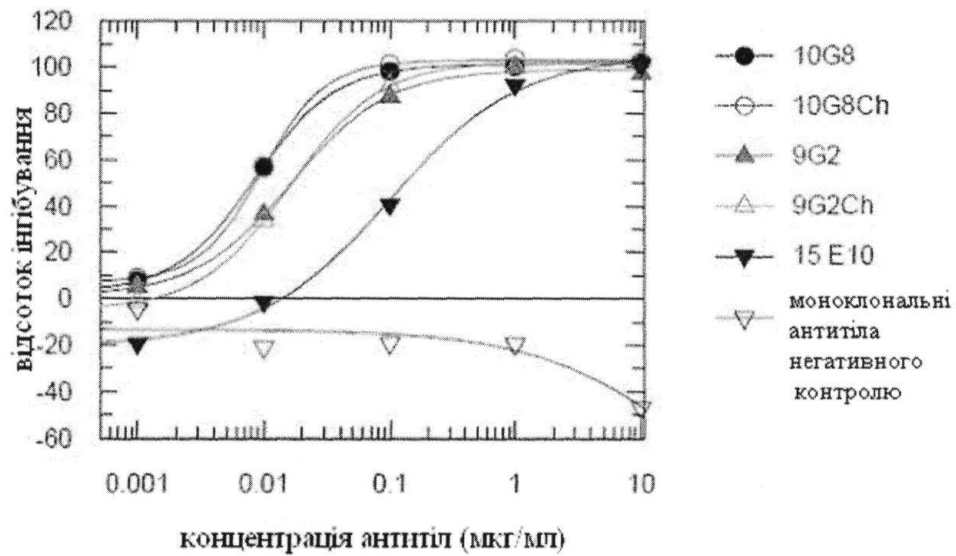
Фіг.13. аналіз клітин KB



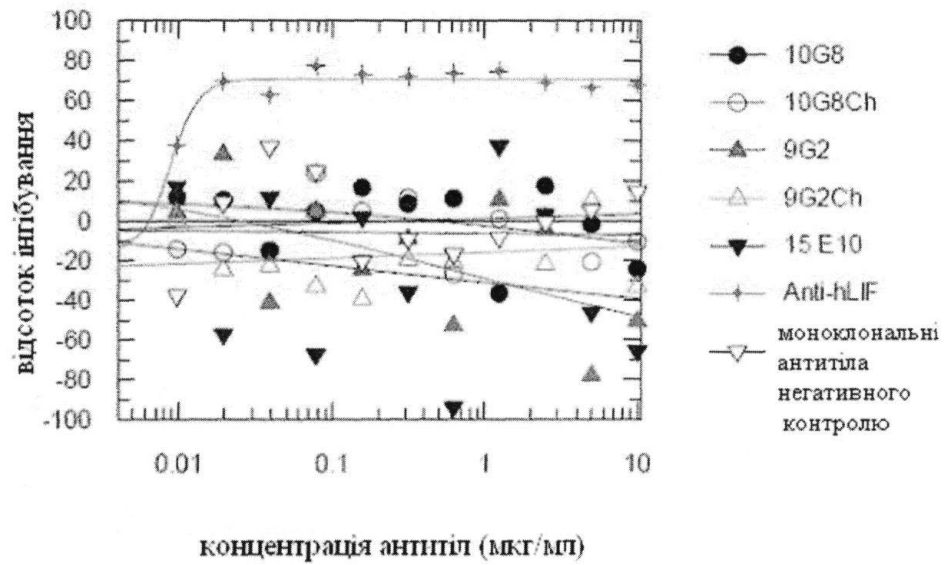
Фіг.14. аналіз клітин KB



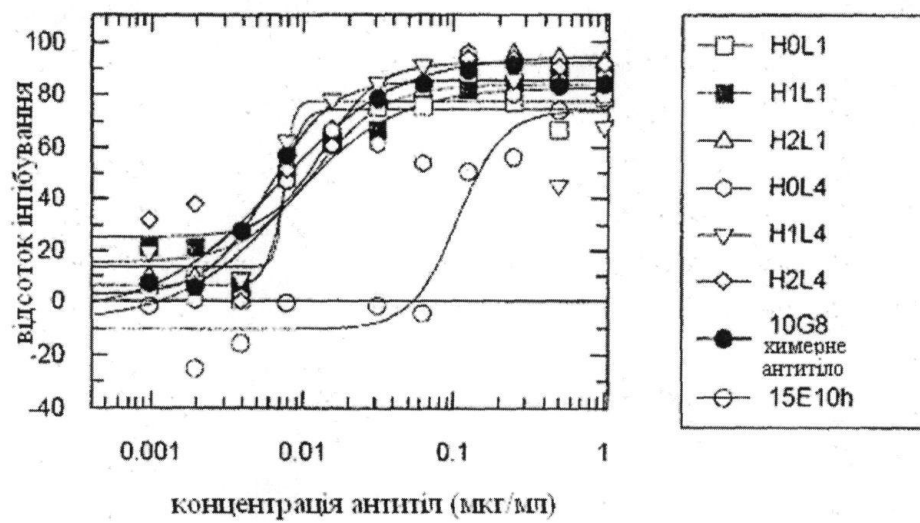
Фіг.15. аналіз ендогенного OSM та gp130 людини



Фіг.16. аналіз LIF людини клітин KB

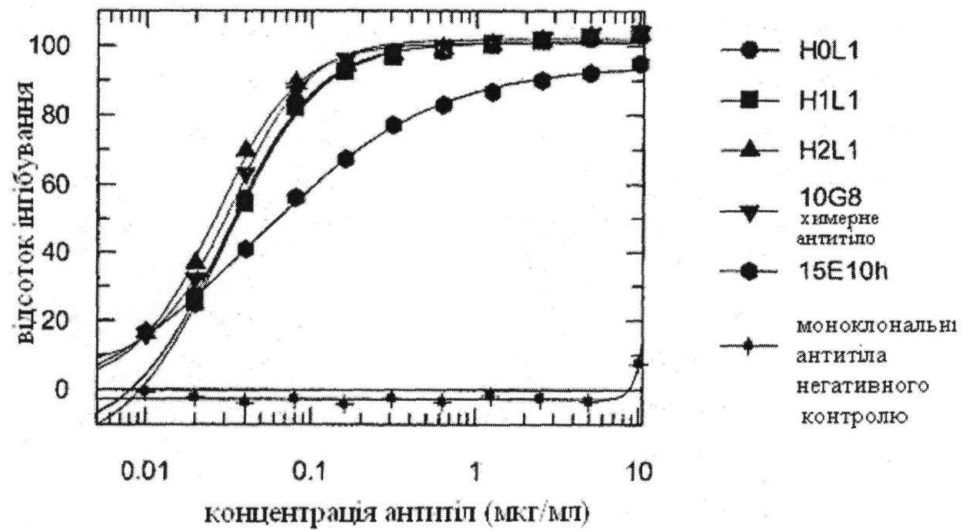


Фіг.17. аналіз клітин KB

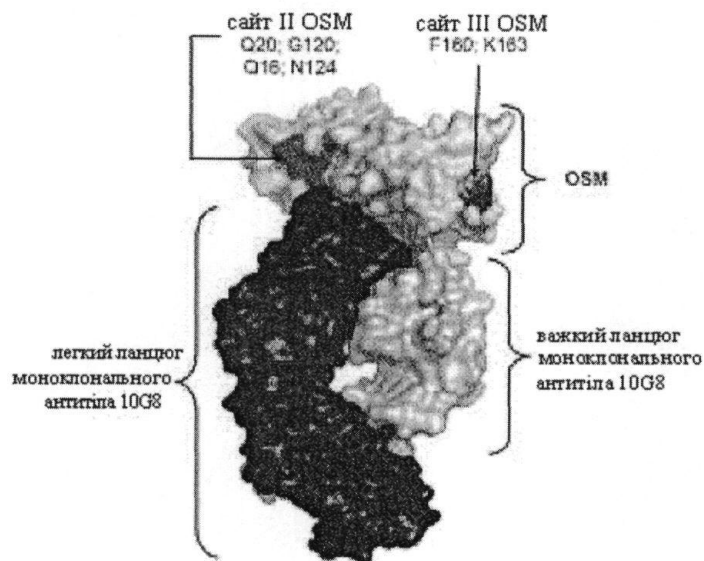




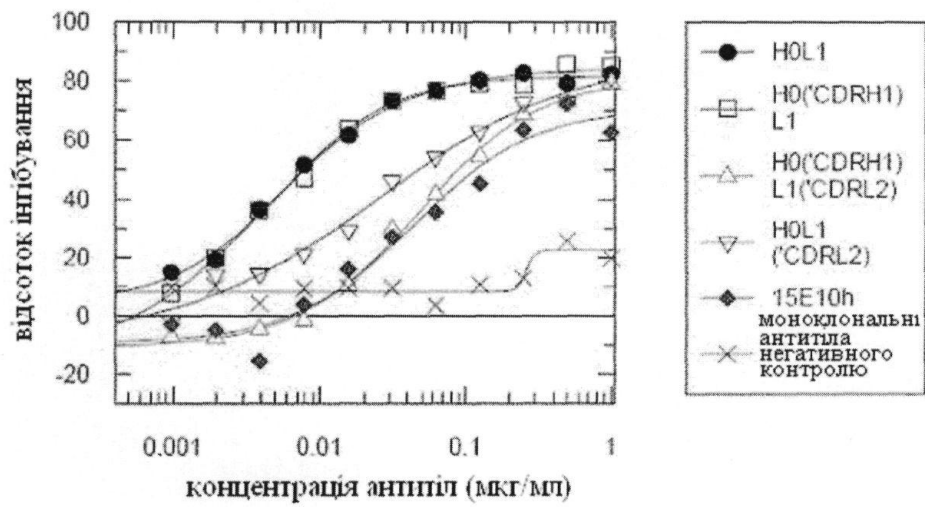
Фіг.18. ІФА – аналіз gp130 людини



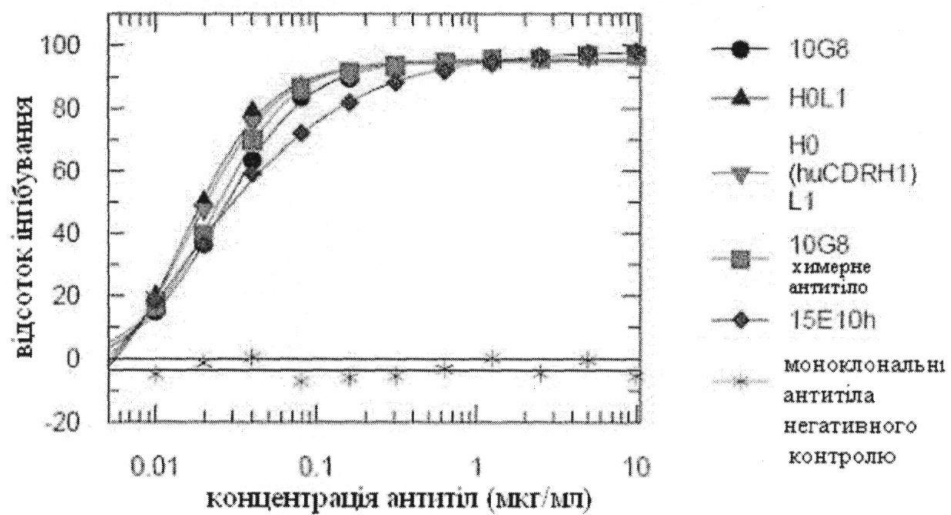
Фіг.19. Комплекс зв'язування моноклонального антитіла 10G8 з OSM людини



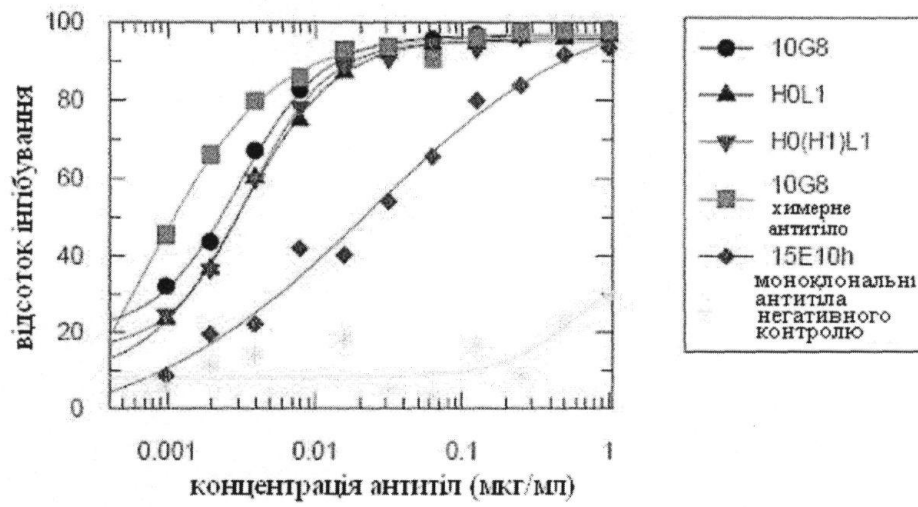
Фіг.20. аналіз клітин KB



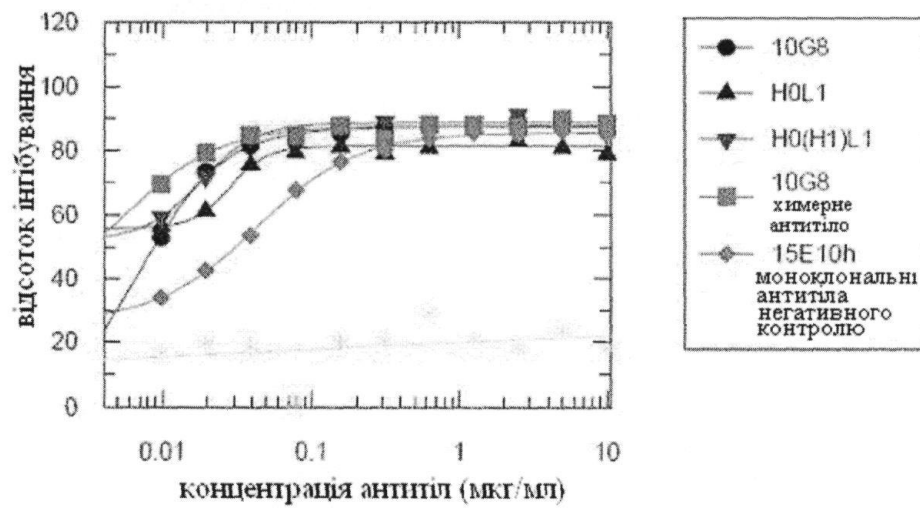
Фіг.21. ІФА – аналіз gr130 людини



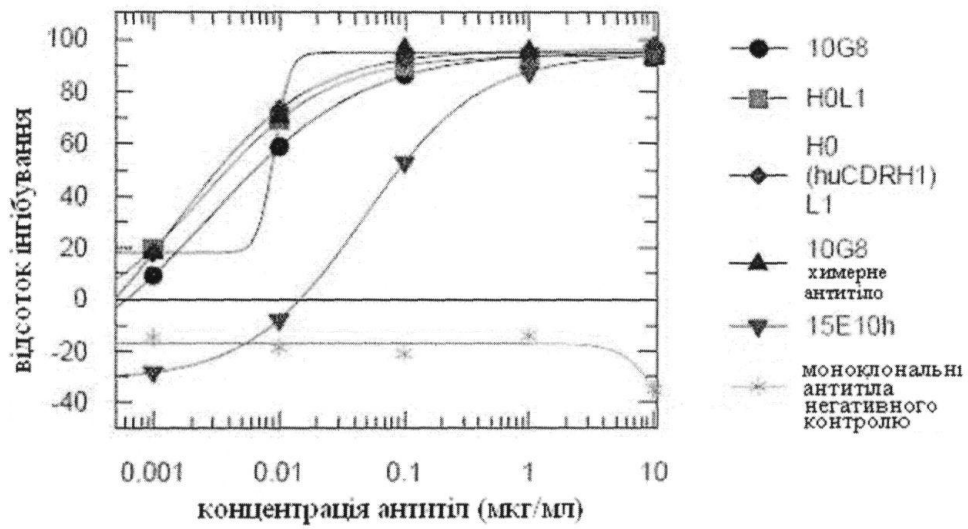
Фіг.22. аналіз клітин KB



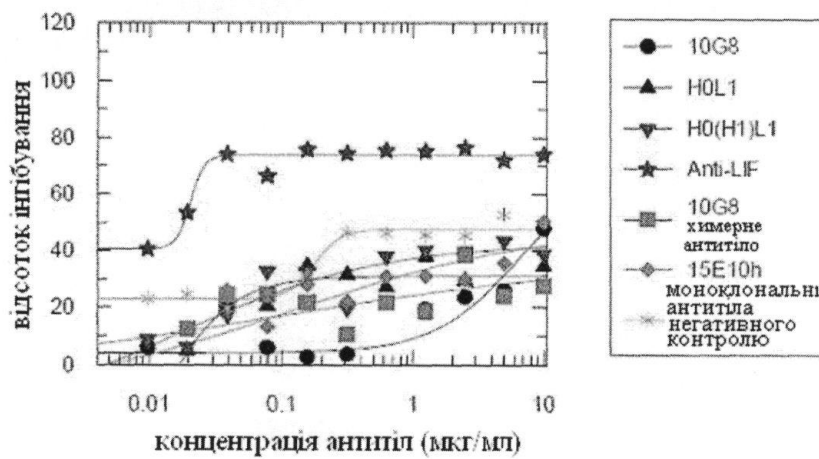
Фіг.23. аналіз клітин KB



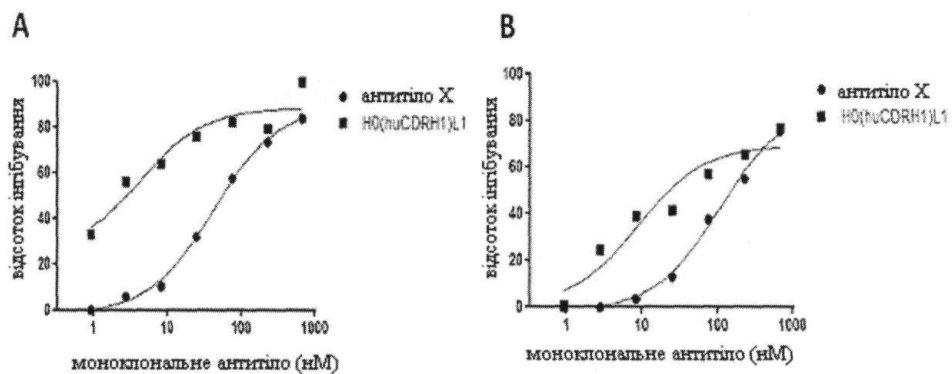
Фіг.24.



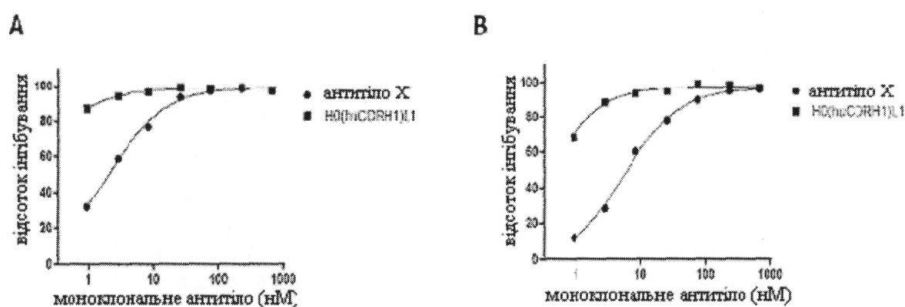
Фіг.25.



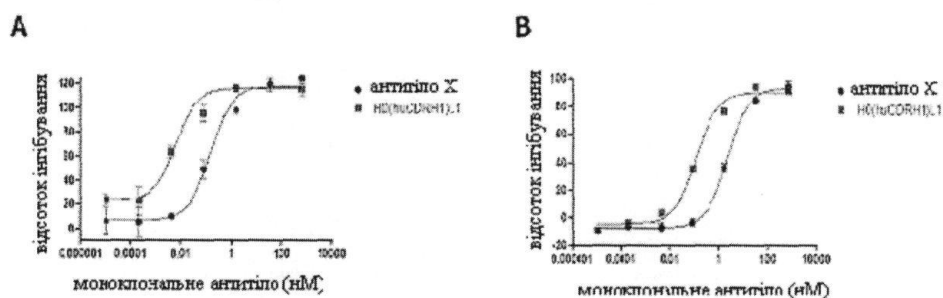
Фіг.26. аналіз гепатоцитів людини - SAA



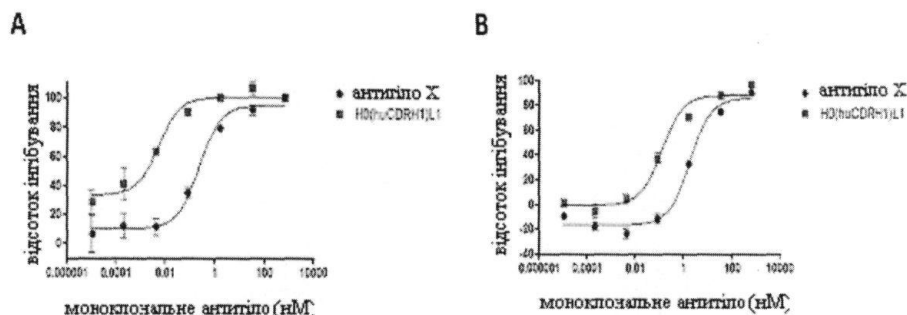
Фіг.27. аналіз гепатоцитів людини - CRP



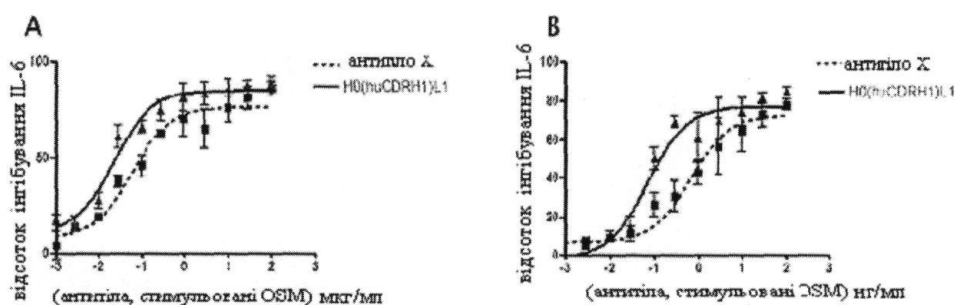
Фіг.28. Аналіз синовіоцитів, подібних до фібробластів людини IL-6



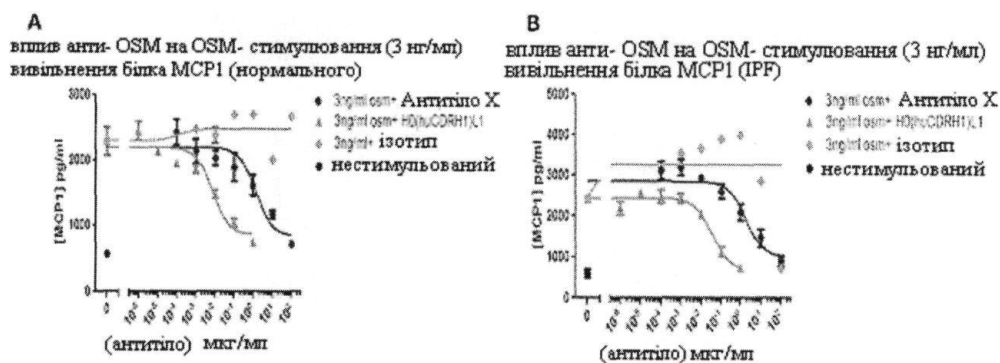
Фіг.29. Аналіз синовіоцитів, подібних до фібробластів людини MCP



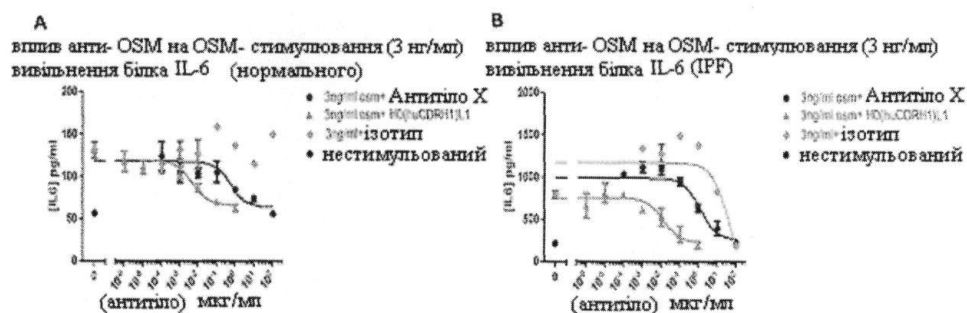
Фіг.30. Аналіз ендотеліальних клітин пупкової вени людини



Фіг.31. аналіз легеневих фіброblastів людини –MCP-1



Фіг.32. аналіз легеневих фіброblastів людини – IL-6



Φir.33

Pos	95	96	97	98	99	100	100A	100B	100C	100D	101	102
Ala	5.76 E-10	5.72 E-10	4.86 E-10	6.59 E-10	5.41 E-10	8.55 E-09	8.10 E-09	4.81 E-09	3.94 E-10	8.69 E-10	1.55 E-09	3.38 E-10
Cys		6.64 E-10	6.51 E-10	1.50 E-09	7.08 E-10	8.95 E-09	8.92 E-09	8.12 E-09		5.86 E-10		
Asp	4.42 E-10			4.94 E-10	4.24 E-09		4.27 E-08	2.32 E-08		6.72 E-10	3.55 E-10	
Glu	7.85 E-10		1.10 E-09		1.28 E-09			4.91 E-10	4.82 E-10	6.88 E-10	4.26 E-10	
Phe		6.1 E-10	6.37 E-10	3.25 E-10	2.54 E-07		4.47 E-10	3.37 E-09	3.65 E-10	4.50 E-10	2.60 E-09	4.25 E-10
Gly	5.17 E-10	4.88 E-10	3.07 E-10	1.11 E-09	5.25 E-09	1.81 E-08	6.31 E-08	2.21 E-08	3.88 E-10	6.61 E-10	7.10 E-10	4.06 E-10
His	4.99 E-10	4.80 E-10		1.74 E-10	1.56 E-08		3.97 E-08	3.62 E-08	1.20 E-09			
Ile				7.18 E-09	1.69 E-09	1.87 E-08	2.46 E-08	4.55 E-08				
Lys		6.71 E-10		2.45 E-08	4.06 E-09	4.31 E-09		4.71 E-08		8.73 E-10	2.83 E-09	
Leu	5.68 E-10	5.55 E-10	2.19 E-09	7.42 E-10	1.56 E-09	4.20 E-08	3.35 E-09	1.62 E-08	4.24 E-10			4.26 E-10
Met	6.49 E-10		8.09 E-10	6.93 E-09	1.62 E-09		5.19 E-09	4.03 E-09				
Asn					1.33 E-09		6.58 E-09	4.02 E-08				
Pro	4.42 E-10	2.35 E-09	3.15 E-08	9.86 E-10	5.53 E-10	3.65 E-08		1.14 E-08		1.05 E-09	5.01 E-09	4.11 E-10
Gln	5.70 E-10			7.29 E-10			1.46 E-08	3.35 E-09	1.17 E-09		1.10 E-09	3.37 E-10

Arg	6.84 E-09	1.56 E-08	1.85 E-09	3.02 E-09	6.80 E-09			2.13 E-08	1.09 E-09	1.34 E-09	2.18 E-09	5.33 E-10	
Ser	7.60 E-10	4.67 E-10	6.32 E-10	1.09 E-09	8.27 E-10	1.65 E-09	1.83 E-08	7.74 E-09	1.20 E-09	6.61 E-10	7.72 E-10	4.44 E-10	
Thr	6.32 E-10	4.97 E-10	3.64 E-09	1.66 E-09	3.99 E-10	4.57 E-10	3.34 E-08	8.57 E-09	1.09 E-09	5.91 E-10	7.07 E-10		
Val	5.70 E-10	4.88 E-10	2.01 E-09	1.00 E-09	7.14 E-10	1.45 E-08	9.05 E-09	4.12 E-08	5.60 E-10	6.75 E-10	4.40 E-10	4.26 E-10	
Trp	1.86 E-08	9.79 E-10	1.67 E-09	3.17 E-10	4.99 E-09			6.90 E-09	4.95 E-10	6.87 E-10	7.11 E-10	2.07 E-10	5.33 E-10
Tyr		6.78 E-10		2.07 E-09	4.44 E-10		1.41 E-08	6.76 E-09	3.64 E-10	5.09 E-10			



зв'язування відсутнє

незаштриховане залишок WT

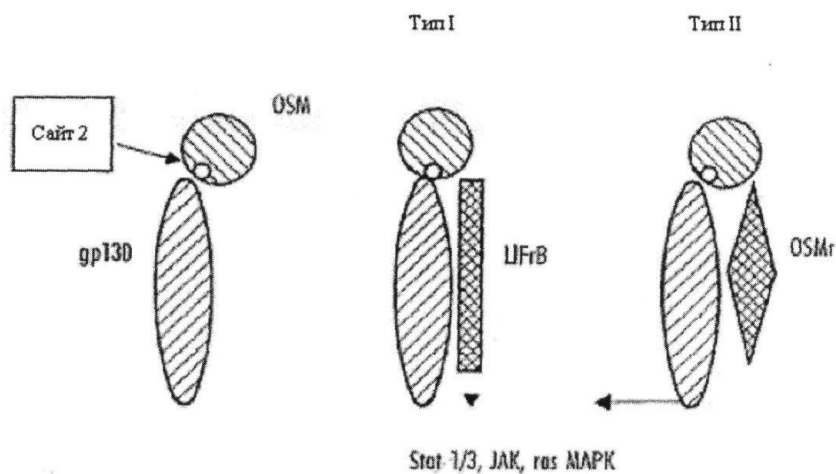


трьохкратне зниження зв'язування



дані отримані у ході окремого експерименту

Фіг.34



Комп'ютерна верстка А. Крулевський

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