



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **111322** (13) **C2**  
(51) МПК (2016.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**A61P 35/00**

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2012 08177</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Дімоудіс Ніколаос (GR/DE), Фертіг Георг (DE), Фідлер Александер (AT/DE), Калуца Клаус (DE), Пікль Марлене (DE), Ріс Карола (DE), Зебер Штефан (DE)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>07.12.2010</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>Ф. ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ, Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel, Switzerland (CH)</b>
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>25.04.2016</b>	<b>(74)</b> Представник: <b>Петров Андрій Володимирович, реєстр. №139</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>09015310.7, 10173407.7</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: <b>«MCSF Receptor antibody (ab10676)», від 2008, XP002570334, Abcam, [Інтернет-публікація] URL: <a href="http://www.abcam.com/MCSF-Receptor-antibody-ab10676.html">http://www.abcam.com/MCSF-Receptor-antibody-ab10676.html</a>&gt; (знайдено 11.03.2015) WO 2009/112245 A1, 17.09.2009 WO 2009/026303 A1, 26.02.2009</b>
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>10.12.2009, 19.08.2010</b>	
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>EP, EP</b>	
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку: <b>10.10.2012, Бюл.№ 19</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.04.2016, Бюл.№ 8</b>	
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: <b>РСТ/EP2010/069090, 07.12.2010</b>	

**(54) АНТИТІЛО, ЩО ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ ПЕРЕВАЖНО З ПОЗАКЛІТИННИМ ДОМЕНОМ 4 ЛЮДСЬКОГО CSF-1R, І ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ**

**(57) Реферат:**

Винахід стосується антитіла, що зв'язується з людським CSF-1R, варіабельна ділянка важкого ланцюга якого має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 7, і варіабельна ділянка легкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 8.

UA 111322 C2



Даний винахід відноситься до антитіл в людському CSF-1R (антитіла до CSF-1R), способів їх одержання, фармацевтичним композиціям, які містять зазначені антитіла, і варіантів їх застосування.

Передумови створення винаходу

5 Рецептор людського CSF-1 (CSF-1R; рецептор колонієстимулюючого фактора 1; синоніми: рецептор M-CSF; рецептор макрофагального колонієстимулюючого фактора 1, протоонкоген Fms, c-fms, SEQ ID NO: 62) відомий з 1986 г. (Coussens L. та ін., Nature 320, 1986, сс. 277-280). CSF-1R являє собою фактор росту і кодується протоонкогеном c-fms (див., наприклад, огляд Roth P. і Stanley E.R., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 181, 1992, сс. 141-67).

10 CSF-1R являє собою рецептор CSF-1 (колонієстимулюючий фактор 1, який позначають також як M-CSF, макрофагальний колонієстимулюючий фактор 1) і опосередковує біологічні дії зазначеного цитокіну (Sherr C.J. та ін., Cell 41, 1985, сс. 665-676). Клонування рецептора колонієстимулюючого фактора 1 (CSF-1R) (який позначають також як c-fms) вперше описано у Roussel M.F. та ін., Nature 325, 1987, сс. 549-552. В цій публікації описано, що CSF-1R має трансформуючий потенціал, що залежить від змін в С-кінцевому "хвості" білка, включаючи втрату здатності інгібувати фосфорилування тирозину 969, який зв'язується з канабіоїдним рецептором Cbl, і тим самим регулює знижуючу регуляцію рецептора (Lee P.S. та ін., Embo J. 18, 1999, сс. 3616-3628). В останні роки ідентифікований другий ліганд для CSF-1R, позначений як інтерлейкін-34 (IL-34) (Lin H. та ін., Science, 320, 2008, сс. 807-811).

20 Цитокін CSF-1 (колонієстимулюючий фактор 1, який позначають також як M-CSF, макрофагальний колонієстимулюючий фактор 1) присутній поза клітиною у вигляді зв'язаного дисульфідним мостиком гомодимеру (Stanley E.R. та ін., Journal of Cellular Biochemistry 21, 1983, сс. 151-159; Stanley E.R. та ін., Stem Cells 12, додаток 1, 1995, сс. 15-24).

25 Основними біологічними діями, зв'язаними з передачею сигналів CSF-1R, є диференціація, проліферація, міграція і виживання гематопоетичних клітин-попередників лінії диференціації макрофагів (включаючи остеокласти). Активація CSF-1R опосередковується його лігандами, тобто CSF-1 (M-CSF) і IL-34. Зв'язування CSF-1 (M-CSF) з CSF-1R індукує утворення гомодимерів і активацію кінази шляхом фосфорилування тирозину (Li W. та ін., EMBO Journal 10, 1991, сс. 277-288; Stanley E.R. та ін., Mol. Reprod. Dev. 46, 1997, сс. 4-10).

30 Біологічно активний гомодимер CSF-1 зв'язується з CSF-1R в субдоменах D1-D3 позаклітинного домену рецептора CSF-1 (CSF-1R-ECD). CSF-1R-ECD містить п'ять імуноглобулін-подібних субдоменів (позначені як D1-D5). Субдомени D4-D5 позаклітинного домену (CSF-1R-ECD) не беруть участь в зв'язуванні CSF-1 (Wang Z. та ін., Molecular and Cellular Biology 13, 1993, сс. 5348-5359). Субдомен D4 бере участь в димеризації (Yeung Y-G. та ін., Molecular & Cellular Proteomics 2, 2003, сс. 1143-1155; Pixley F. J. та ін., Trends Cell Biol 14, 2004, сс. 628-638).

35 Крім того передача сигналів опосередковується р85-субодиницею PI3K і Grb2, зв'язаними з шляхами PI3K/AKT і Ras/MAPK відповідно. Зазначені два важливих шляхи передачі сигналів можуть регулювати проліферацію, виживання і апоптоз. Інші сигнальні молекули, які зв'язуються з фосфорильованим внутрішньоклітинним доменом CSF-1R, являють собою STAT1, STAT3, PLC $\gamma$  і Cbl (Bourette R.P. і Rohrschneider L.R., Growth Factors 17, 2000, сс. 155-166).

40 Передача сигналів CSF-1R має фізіологічне значення для імунних відповідей, для ремоделювання кістки і для репродуктивної системи. Встановлено, що тварини, у яких "виключений" або CSF-1 (Pollard J.W., Mol. Reprod. Dev. 46, 1997, сс. 54-61), або CSF-1R (Dai X.M. та ін., Blood, 99, 2002, сс. 111-120), мають такі остеопетрозні, гематопоетичні фенотипи, фенотипи тканинних макрофагів і репродуктивної системи, які свідчать про роль CSF-1R в відповідних типах клітин.

45 Sherr C.J. з співавторами в: Blood, 73, 1989, сс. 1786-1793 описали деякі антитіла до CSF-1R, які інгібують активність CSF-1 (див. Sherr C.J. та ін., Blood, 73, 1989, сс. 1786-1793). Ashmun R.A. та ін., Blood, 73, 1989, сс. 827-837 описали антитіла до CSF-1R. Lenda, D. та ін., Journal of Immunology, 170, 2003, сс. 3254-3262 описали зниження рекрутмента, проліферації і активації макрофагів у мишей з дефіцитом CSF-1, що призводило до зниженого апоптозу в трубочках при запаленні нирок. Kitaura H. та ін., Journal of Dental Research, 87, 2008, сс. 396-400 описали антитіло до CSF-1, яке інгібує ортодонтичне переміщення зубів. В WO 2001/030381 згадані інгібітори активності CSF-1, що включають антисмислові нуклеотиди і антитіла, але описані тільки антисмислові нуклеотиди CSF-1. В WO 2004/045532 описано попередження метастазів і втрати кісткової тканини і лікування метастатичного раку за допомогою антагоніста CSF-1, при цьому описані тільки антагоністичні антитіла до CSF-1. В WO 2005/046657 описано лікування запального захворювання кишечника за допомогою антитіл до CSF-1. В US 2002/0141994

описані інгібітори колонієстимулюючих факторів. В WO 2006/096489 описано лікування ревматоїдного артриту за допомогою антитіл до CSF-1. В WO 2009/026303 і WO 2009/112245 описані конкретні антитіла до CSF-1R, що зв'язуються з CSF-1R, в перших трьох субдоменах (D1-D3) позаклітинного домену (CSF-1R-ECD).

5 Сстислий виклад суті винаходу

Даний винахід відноситься до антитіла, що зв'язується з людським CSF-1R, яке відрізняється тим, що антитіло зв'язується з фрагментом людського CSF-1R delD4 (SEQ ID NO: 65) і з позаклітинним доменом людського CSF-1R (SEQ ID NO: 64) в співвідношенні 1:50 або менше.

10 Винахід відноситься також до антитіла, запропонованого в винаході, яке відрізняється тим, що

а) варіабельна ділянка важкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 7, і варіабельна ділянка легкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 8,

15 б) варіабельна ділянка важкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 15, і варіабельна ділянка легкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 16,

в) варіабельна ділянка важкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 75, і варіабельна ділянка легкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 76,

г) варіабельна ділянка важкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 83, і варіабельна ділянка легкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 84,

20 або до його гуманізованої версії.

Винахід відноситься також до антитіла, запропонованого в винаході, яке відрізняється тим, що

а) варіабельна ділянка важкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 7, і варіабельна ділянка легкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 8,

25 б) варіабельна ділянка важкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 15, і варіабельна ділянка легкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 16,

або до його гуманізованої версії.

В одному з варіантів здійснення винаходу антитіло, запропоноване в винаході, відрізняється тим, що

30 а) варіабельна ділянка важкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 23, і варіабельна ділянка легкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 24, або

б) варіабельна ділянка важкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 31, і варіабельна ділянка легкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 32, або

35 в) варіабельна ділянка важкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 39, і варіабельна ділянка легкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 40, або

г) варіабельна ділянка важкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 47, і варіабельна ділянка легкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 48, або

д) варіабельна ділянка важкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 55, і варіабельна ділянка легкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 56.

40 Винахід відноситься також до антитіла, запропонованого в винаході, яке відрізняється тим, що

а) варіабельна ділянка важкого ланцюга містить CDR3-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 1, CDR2-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 2, і CDR1-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 3, і варіабельна ділянка легкого ланцюга містить CDR3-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 4, CDR2-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 5, і CDR1-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 6, або

45 б) варіабельна ділянка важкого ланцюга містить CDR3-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 9, CDR2-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 10, і CDR1-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 11, і варіабельна ділянка легкого ланцюга містить CDR3-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 12, CDR2-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 13, і CDR1-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 14, або

50 в) варіабельна ділянка важкого ланцюга містить CDR3-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 17, CDR2-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 18, і CDR1-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 19, і варіабельна ділянка містить CDR3-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 20, CDR2-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 21, і CDR1-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 22, або





а) варіабельна ділянка важкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 7, і варіабельна ділянка легкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 8,

б) варіабельна ділянка важкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 15, і варіабельна ділянка легкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 16,

5 в) варіабельна ділянка важкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 75, і варіабельна ділянка легкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 76,

г) варіабельна ділянка важкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 83, і варіабельна ділянка легкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 84,

або його гуманізовану версію.

10 Наступним варіантом здійснення винаходу є нуклеїнова кислота, що кодує антитіло, запропоноване в винаході, яке відрізняється тим, що

а) варіабельна ділянка важкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 23, і варіабельна ділянка легкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 24, або

15 б) варіабельна ділянка важкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 31, і варіабельна ділянка легкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 32, або

в) варіабельна ділянка важкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 39, і варіабельна ділянка легкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 40, або

г) варіабельна ділянка важкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 47, і варіабельна ділянка легкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 48, або

20 д) варіабельна ділянка важкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 55, і варіабельна ділянка легкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 56.

Винахід відноситься також до експресійних векторів, які містять нуклеїнову кислоту, запропоновану в винаході, які мають здатність експресувати зазначену нуклеїнову кислоту в прокаріотичній або еукаріотичній клітині-хазяїні, і до клітин-хазяїнів, які містять зазначені вектори, призначені для одержання методом рекомбінації антитіла, запропонованого в винаході.

Винахід відноситься також до прокаріотичної або еукаріотичної клітини-хазяїну, яка містить вектор, запропонований в винаході.

30 Винахід відноситься також до способу одержання рекомбінантного людського або гуманізованого антитіла, запропонованого в винаході, яке відрізняється тим, що експресують нуклеїнову кислоту, запропоновану в винаході, в прокаріотичній або еукаріотичній клітині-хазяїні і виділяють антитіло з клітини або супернатанту клітинної культури. Винахід відноситься також до антитіла, одержаному методом рекомбінації.

35 Антитіла, запропоновані в винаході, виявляють сприятливу дію на пацієнтів, які потребують направленої на CSF-1R терапії. Антитіла, запропоновані в винаході, мають також високу антипроліферативну активність по відношенню до незалежної від ліганду і залежної від ліганду проліферації і тому їх особливо краще застосовувати для лікування раку і метастазів.

40 Винахід відноситься також до способу лікування пацієнта, що страждає на рак, який полягає в тому, що пацієнту, у якого діагностовано наявність зазначеного захворювання (і який тому потребує такої терапії), вводять в ефективній кількості антитіло, запропоноване в винаході. Антитіло вводять краще в складі фармацевтичної композиції.

Наступним варіантом здійснення винаходу є спосіб лікування пацієнта, що страждає на рак, який відрізняється тим, що вводять пацієнту антитіло, запропоноване в винаході.

45 При створенні винаходу несподівано було встановлено, що, використовуючи фрагмент людського CSF-1R delD4, в якому D4-субдомен людського CSF-1R-ECD видалений в результаті делеції (SEQ ID NO: 65), можна відбирати нові антитіла до CSF-1R. Ці антитіла мають цінні якості, такі як дуже високе залежне від ліганду інгібування клітинного росту і в той же час незалежне від ліганду інгібування росту клітин лінії NIH 3T3, інфікованих ретровірусним експресійним вектором, що несе або повнорозмірний CSF-1R дикого типу (SEQ ID NO: 62), або

50 мутант CSF-1R L301S Y969F (SEQ ID NO: 63), при цьому рекомбінантні клітини, що несуть мутантний CSF-1R, мають здатність формувати сфероїди незалежно від ліганду CSF-1. Крім того, антитіла, запропоновані в винаході, інгібують диференціацію макрофагів як у людини, так і у яванського макаки-крабоїда (циномолгус) (у обох видів), оскільки вони інгібують виживаність моноцитів людини і мавпи цинномолгус.

55 Докладний опис винаходу

Винахід відноситься до антитіла, що зв'язується з людським CSF-1R, яке відрізняється тим, що антитіло зв'язується з фрагментом людського CSF-1R delD4 (який містить позаклітинні субдомени D1 -D3 і D5) (SEQ ID NO: 65) і з позаклітинним доменом людського CSF-1R (CSF-1R-ECD) (який містить позаклітинні субдомени D1 -D5) (SEQ ID NO: 64) в співвідношенні 1:50 або

60 менше.











CDR2-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 29, і CDR1-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 30, або

5 в) варіабельна ділянка важкого ланцюга містить CDR3-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 33, CDR2-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 34, і CDR1-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 35, і варіабельна ділянка легкого ланцюга містить CDR3-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 36, CDR2-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 37, і CDR1-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 38, або

10 г) варіабельна ділянка важкого ланцюга містить CDR3-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 41, CDR2-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 42 і CDR1-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 43, і варіабельна ділянка легкого ланцюга містить CDR3-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 44, CDR2-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 45, і CDR1-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 46.

15 Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу антитіло, запропоноване в винаході, відрізняється тим, що

20 варіабельна ділянка важкого ланцюга містить CDR3-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 17, CDR2-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 18, і CDR1-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 19, і варіабельна ділянка легкого ланцюга містить CDR3-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 20, CDR2-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 21, і CDR1-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 22.

Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу антитіло, запропоноване в винаході, відрізняється тим, що

25 варіабельна ділянка важкого ланцюга містить CDR3-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 25, CDR2-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 26, і CDR1-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 27, і варіабельна ділянка легкого ланцюга містить CDR3-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 28, CDR2-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 29, і CDR1-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 30.

Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу антитіло, запропоноване в винаході, відрізняється тим, що

35 варіабельна ділянка важкого ланцюга містить CDR3-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 33, CDR2-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 34, і CDR1-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 35, і варіабельна ділянка легкого ланцюга містить CDR3-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 36, CDR2-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 37, і CDR1-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 38.

Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу антитіло, запропоноване в винаході, відрізняється тим, що

40 варіабельна ділянка важкого ланцюга містить CDR3-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 41, CDR2-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 42, і CDR1-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 43, і варіабельна ділянка легкого ланцюга містить CDR3-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 44, CDR2-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 45, і CDR1-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 46.

Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу антитіло, яке зв'язується з людським CSF-1R, відрізняється тим, що антитіло зв'язується з фрагментом людського CSF-1R delD4 (SEQ ID NO: 65) і з людським CSF-1R-ECD (SEQ ID NO: 64) в співвідношенні 1:50 або менше, і відрізняється також тим, що не зв'язується з фрагментом людського CSF-1R D1-D3 (SEQ ID NO: 66).

50 Поняття "антитіло" відноситься до різних форм антитіл, включаючи (але не обмежуючись ними) повні антитіла, фрагменти антитіл, людські антитіла, гуманізовані антитіла, химерні антитіла, антитіла з виснаженими Т-клітинними епітопами і, крім того, створені за допомогою генної інженерії антитіла, якщо вони зберігають відмітні ознаки, запропоновані в винаході. Поняття "фрагменти антитіла" відноситься до частини повнорозмірного антитіла, краще до його варіабельної ділянки або принаймні до його антигензв'язувального центру. Прикладами фрагментів антитіл є димерні антитіла (діабоди), молекули одноланцюгових антитіл і мультиспецифічні антитіла, утворені з фрагментів антитіл. Антитіла формату scFv описані, наприклад, у Houston J.S., Methods in Enzymol. 203, 1991, сс. 46-88. Крім того, до фрагментів

антитіла відносяться одноланцюгові поліпептиди, які мають характеристики  $V_H$ -ділянки, що зв'язуються з CSF-1R, а саме, мають здатність об'єднуватися з  $V_L$ -ділянкою, або  $V_L$ -ділянки, що зв'язуються з CSF-1R, а саме, мають здатність об'єднуватися з  $V_H$ -ділянкою з утворенням функціонального антигензв'язувального центру а, отже, є такими, що мають потрібну властивість.

Поняття "моноклональне антитіло" або "композиція моноклонального антитіла" в контексті даного опису відносяться до препарату молекул антитіла, які мають однаковий склад амінокислот.

Поняття "химерне антитіло" відноситься до моноклонального антитіла, що містить мишачу варіабельну ділянку, тобто зв'язувальну ділянку, і принаймні одну частину константної ділянки з іншого джерела або інших видів, як правило, одержаного за допомогою методів рекомбінантної ДНК. Химерні антитіла, які містять мишачу варіабельну ділянку і людську константну ділянку, є найкращими. Такі щурячі/людські химерні антитіла являють собою продукт експресованих генів імуноглобуліну, які містять ДНК-сегменти, які кодують варіабельні ділянки щурячого імуноглобуліну, і ДНК-сегменти, які кодують константні ділянки людського імуноглобуліну. Інші форми "химерних антитіл", які підпадають під обсяг даного винаходу, являють собою такі форми, в яких клас або підклас модифікований або змінений відносно вихідного антитіла. Такі "химерні" антитіла позначають також як "антитіла переключеного класу". Методи одержання химерних антитіл включають загальноприйняті методи, засновані на застосуванні рекомбінантної ДНК і генної трансфекції, які в даний час добре відомі в даній галузі (див., наприклад, Morrison S.L. та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1984, сс. 6851-6855; US 5202238 і US 5204244).

Поняття "гуманізоване антитіло" відноситься до антитіл, в яких каркасна ділянка або "гіперваріабельні ділянки" (CDR) модифіковані таким чином, що вони містять CDR імуноглобуліну з інших видів у порівнянні з батьківським імуноглобуліном. В кращому варіанті здійснення винаходу мишачий CDR трансплантує в каркасну ділянку людського антитіла, одержуючи "гуманізоване антитіло" (див., наприклад, Riechmann L. та ін., Nature 332, 1988, сс. 323-327; і Neuberger M.S. та ін., Nature 314, 1985, сс. 268-270). Необов'язково каркасну ділянку можна модифікувати за допомогою додаткових мутацій. CDR також можна модифікувати за допомогою однієї або декількох мутацій з одержанням антитіл, запропонованих в винаході, наприклад, за допомогою мутагенезу, заснованого на молекулярному моделюванні, який описаний у Riechmann L. та ін., Nature, 332, 1988, сс. 323-327 і Queen C. та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1989, сс. 10029-10033, або у інших авторів. Найкращі CDR відповідають CDR, які мають репрезентативні послідовності, що розпізнають антигени, зазначені вище для химерних антитіл. "Гуманізована версія антитіла, запропонованого в винаході" (яке, наприклад, походить з організму мишей), відноситься до антитіла, основою якого є послідовності мишачого антитіла, в яких  $V_H$  і  $V_L$  гуманізовані стандартними методами (включаючи трансплантацію CDR і необов'язково наступний мутагенез певних амінокислот в каркасній ділянці і CDR). Краще зазначена гуманізована версія є химеризованою за допомогою людської константної ділянки (див., наприклад, послідовності SEQ ID NO: 57-61).

Іншими формами "гуманізованих антитіл", що підпадають під обсяг даного винаходу, є антитіла, в яких константна ділянка додатково модифікована або змінена відносно вихідного антитіла з одержанням властивостей, зазначених в винаході, насамперед стосовно C1q-зв'язування і/або зв'язування з Fc-рецептором (FcR).

В наведених нижче прикладах поняття "МАт" і "muМАт" відносяться до мишачих моноклональних антитіл, таких як МАт 2F11 або МАт 2E10, а поняття "hМАт" відноситься до гуманізованих моноклональних версій зазначених мишачих антитіл, таких як hМАт 2F11-c11, hМАт 2F11-d8, hМАт 2F11-e7, hМАт 2F11-f12 і т.д.

В контексті даного опису мається на увазі, що поняття "людське антитіло" включає антитіла, які мають варіабельну і константну ділянки, виведені з послідовностей імуноглобуліну людської зародкової лінії. Людські антитіла добре відомі в даній галузі (van Dijk M.A. і van de Winkel J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5, 2001, сс. 368-374). Людські антитіла можна одержувати також в трансгенних тваринах (наприклад, мишах), які мають здатність після імунізації виробляти повний спектр або певний набір людських антитіл за відсутності вироблення ендогенних імуноглобулінів. Перенесення набору генів імуноглобулінів людської зародкової лінії у зазначених мишей мутантною зародковою лінією може призводити до утворення людських антитіл після антигенної стимуляції (див., наприклад, Jakobovits A. та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1993, сс. 2551-2555; Jakobovits A. та ін., Nature, 362, 1993, сс. 255-258; Brueggemann M. та ін., Year Immunol. 7, 1993, сс. 33-40). Людські антитіла можна одержувати також за допомогою фагових дисплейних бібліотек (Hoogenboom H.R. і Winter G.J. Mol. Biol., 227, 1992,

сс. 381-388; Marks J.D. та ін., J. Mol. Biol., 222, 1991, сс. 581-597). Для одержання людських моноклональних антитіл можна застосовувати також методи, розроблені Cole з співавторами і Boerner з співавторами (Cole S.P.C. та ін., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, под ред. Alan R. Liss, 1985, с. 77; і Boerner P. та ін., J. Immunol. 147, 1991, сс. 86-95). Як уже відзначалося  
 5 для химерних і гуманізованих антитіл, відповідно до даного винаходу в контексті даного опису поняття "людське антитіло" відноситься також до таких антитіл, які модифіковані в константній ділянці для надання їм властивостей, запропонованих в винаході, насамперед стосовно C1q-зв'язування і/або FcR-зв'язування, наприклад, шляхом "переключення класу", тобто зміни або мутації Fc-ділянок (наприклад, шляхом заміни IgG1 на IgG4 і/або IgG1/IgG4-мутації).

10 Мається на увазі, що поняття "рекомбінантне людське антитіло" в контексті даного опису включає всі людські антитіла, які одержують, експресують, створюють або виділяють методами рекомбінації, такі як антитіла, виділені з клітини-хазяїна, такої як NS0- або CHO-клітина, або з тварини (наприклад, з миші), яке є трансгенним по відношенню до генів людського імунoglobulinу, або антитіла, які експресуються за допомогою рекомбінантного експресійного  
 15 вектора, яким трансфектують клітину-хазяїна. Такі рекомбінантні людські антитіла мають варіабельну і константну ділянки в перетвореній формі. Рекомбінантні людські антитіла, запропоновані в винаході, піддавали *in vivo* соматичній гіпермутації. Так, амінокислотні послідовності V<sub>H</sub>- і V<sub>L</sub>-ділянок рекомбінантних антитіл являють собою послідовності, які, хоча і виведені з послідовностей V<sub>H</sub>- і V<sub>L</sub>-ділянок людської зародкової лінії і є спорідненими до них,  
 20 але можуть не зустрічатися в існуючому в природних умовах *in vivo* спектрі зародкових ліній людського антитіла.

Антитіла, запропоновані в винаході, включають також зазначені антитіла, що несуть "консервативні модифікації послідовностей", тобто модифікації нуклеотидних і амінокислотних послідовностей, які не впливають або не змінюють зазначені вище характеристики антитіл,  
 25 запропонованих в винаході. Модифікації можна інтродукувати за допомогою стандартних методів, відомих в даній галузі, таких як сайт-направлений мутагенез і ПЛР-опосередкований мутагенез. Консервативні амінокислотні заміни включають заміни, при яких один амінокислотний залишок замінюють іншим амінокислотним залишком зі схожим бічним ланцюгом. Сімейства амінокислотних залишків, що мають схожі бічні ланцюги, визначені в даній  
 30 галузі. Ці сімейства включають амінокислотні залишки з основними бічними ланцюгами (наприклад, лізин, аргінін, гістидин), кислотними бічними ланцюгами (наприклад, аспарагінова кислота, глутамінова кислота), незарядженими полярними бічними ланцюгами (наприклад, гліцин, аспарагін, глутамін, серин, треонін, тирозин, цистеїн, триптофан), неполярними бічними ланцюгами (наприклад, аланін, валін, лейцин, ізолейцин, пролін, фенілаланін, метіонін), бета-розгалуженими бічними ланцюгами (наприклад, треонін, валін, ізолейцин) і ароматичними бічними ланцюгами (наприклад, тирозин, фенілаланін, триптофан, гістидин). Таким чином,  
 35 певний залишок замінюваної амінокислоти в людському антитілі до CSF-1R можна краще замінити на інший амінокислотний залишок з бічним ланцюгом з того ж сімейства бічних ланцюгів.

40 Амінокислотні заміни можна здійснювати за допомогою мутагенезу, заснованого на молекулярному моделюванні, який описаний у Riechmann L. та ін., Nature 332, 1988, сс. 323-327 і Queen C. та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 1989, сс. 10029-10033.

Людський CSF-1R (рецептор CSF-1; синоніми: рецептор M-CSF; рецептор макрофагального колонієстимулюючого фактора 1, протоонкоген Fms, c-fms, SEQ ID NO: 22) відомий з 1986 г.  
 45 (Coussens L. та ін., Nature 320, 1986, сс. 277-280). CSF-1R являє собою фактор росту і кодується протоонкогеном c-fms (див., наприклад, огляд Roth P. і Stanley E.R., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 181, 1992, сс. 141-167).

CSF-1R являє собою рецептор CSF-1 (колонієстимулюючий фактор 1, який позначають також як M-CSF) і IL-34, і він опосередковує біологічні дії зазначених цитокінів (Sherr C.J. та ін.,  
 50 Cell 41, 1985, сс. 665-676; Lin H. та ін., Science, 320, 2008, сс. 807-811). Клонування рецептора колонієстимулюючого фактора 1 (CSF-1R) (який позначають також як c-fms) вперше описано у Roussel M.F. та ін., Nature 325, 1987, сс. 549-552. В цій публікації було продемонстровано, що CSF-1R має трансформуючий потенціал, що залежить від змін в С-кінцевому "хвості" білка, включаючи втрату здатності інгібувати фосфорилування тирозину 969, який зв'язується з Cbl, і тим самим регулює знижуючу регуляцію рецептора (Lee P.S. та ін., Embo J. 18, 1999, сс. 3616-3628).  
 55

CSF-1R являє собою одоланцюговий трансмембранний тирозинкіназний рецептор (RTK) і є представником сімейства RTK, що містять імунoglobulinовий (Ig) мотив, які відрізняються наявністю 5 повторюваних Ig-подібних субдоменів D1-D5 в позаклітинному домені (ECD)  
 60 рецептора (Wang Z. та ін., Molecular and Cellular Biology 13, 1993, сс. 5348-5359). Позаклітинний

домен людського CSF-1R (CSF-1R-ECD) (SEQ ID NO: 64) містить всі п'ять позаклітинних Ig-подібних субдоменів D1-D5. Фрагмент людського CSF-1R delD4 (SEQ ID NO: 65) містить позаклітинні Ig-подібні субдомени D1-D3 і D5, але в ньому відсутній субдомен D4. Фрагмент людського CSF-1R D1-D3 (SEQ ID NO: 66) містить відповідні субдомени D1-D3. Представлені

5 послідовності не містять сигнальний пептид MGSGPGVLLL LLVATAWHGQ G (SEQ ID NO: 67).

Внутрішньоклітинний протеїнтірозинкіназний домен переривається унікальним доменом-вставкою, який присутній також в інших представниках споріднених RTK класу III, до яких відносяться рецептори тромбоцитарного фактора росту (PDGFR), рецептор фактора росту стоволових клітин (c-Kit) і fms-подібний цитокиновий рецептор (FLT3). Незважаючи на структурну

10 гомологію, характерну для цього сімейства рецепторів факторів росту, вони мають різні тканинспецифічні функції.

CSF-1R експресуються головним чином на клітинах лінії диференціації моноцитів і в жіночих статевих шляхах і в плаценті. Крім того, експресія CSF-1R описана в клітинах Лангерганса, які присутні в шкірі, підгрупі клітин гладкої мускулатури (Inaba T. та ін., J. Biol. Chem., 267, 1992, сс. 5693-5699), в В-клітинах (Baker A.H. та ін., Oncogene 8, 1993, с. 371-378) і в мікроглії (Sawada M. та ін., Brain Res. 509, 1990, сс. 119-124). Для клітин з мутантним людським CSF-1R (SEQ ID NO: 23) відома здатність до проліферації, яка не залежить від стимуляції лігандами.

В контексті даного опису поняття "зв'язується з людським CSF-1R" або "специфічно зв'язує з людським CSF-1R" відносяться до антитіла, що специфічно зв'язується з людським антигеном CSF-1R, при цьому афінність зв'язування при 35 °C характеризується величиною KD, що становить  $1,0 \times 10^{-8}$  моль/л або нижче, в одному з варіантів здійснення винаходу величина KD при 35 °C становить  $1,0 \times 10^{-9}$  моль/л або нижче. Афінність зв'язування визначають при 35 °C за допомогою стандартного аналізу зв'язування, такого як поверхневий плазмонний резонанс (SPR) (Biacore®, фірма GE-Healthcare Упсала, Швеція). Метод визначення величин KD, що характеризують афінність зв'язування, описаний в прикладі 9. Таким чином, в контексті даного опису поняття "антитіло, що зв'язується з людським CSF-1R" відноситься до антитіла, яке специфічно зв'язується з людським антигеном CSF-1R, афінність зв'язування якого характеризується величиною KD, що становить при 35 °C  $1,0 \times 10^{-8}$  моль/л або нижче (краще  $1,0 \times 10^{-8}$  моль/л -  $1,0 \times 10^{-12}$  моль/л), краще величиною KD, що становить при 35 °C  $1,0 \times 10^{-9}$  моль/л або нижче (краще  $1,0 \times 10^{-9}$  моль/л -  $1,0 \times 10^{-12}$  моль/л).

Відповідно до даного винаходу "зв'язування з фрагментом людського CSF-1R delD4 (SEQ ID NO: 65) і позаклітинним доменом людського CSF-1R (SEQ ID NO: 64)" оцінюють за допомогою методу поверхневого плазмонного резонансу (Biacore-аналіз), який описаний в прикладі 4. Фрагмент людського CSF-1R delD4 (SEQ ID NO: 65) або позаклітинний домен людського CSF-1R (SEQ ID NO: 64) відповідно іммобілізує на поверхні (кожний на різній поверхні) і додають тестовані антитіла (здійснюючи для кожного різні вимірювання) і визначають відповідні сигнали зв'язування (одиниці відповіді (RU)). Віднімають референс-сигнали ("пуста" поверхня). Якщо сигнали для незв'язуваних тестованих антитіл трохи нижче 0, то їх величини приймають за 0. Потім визначають співвідношення відповідних сигналів зв'язування (сигнал зв'язування (RU) з фрагментом людського CSF-1R delD4/сигнал зв'язування (RU) з позаклітинним доменом людського CSF-1R (CSF-1R-ECD)). Для антитіл, запропонованих в винаході, характерно співвідношення сигналів зв'язування (RU(delD4)/RU(CSF-1R-ECD)), що становить 1:50 або нижче, краще 1:100 або нижче (найнижче значення включає кінцеве значення, що дорівнює 0 (наприклад, якщо величина RU дорівнює 0, то співвідношення становить 0:50 або 0:100)).

Це означає, що зазначені антитіла до CSF-1R, запропоновані в винаході, не зв'язуються з фрагментом людського CSF-1R delD4 (типу антитіла до CCR5, позначеного як m<CCR5>Pz03.1C5 (депоновано під реєстраційним номером DSM ACC 2683 18.08.2004 г. в DSMZ), і їх сигнали зв'язування, що характеризують зв'язування з фрагментом людського CSF-1R delD4, відповідають сигналам антитіла до CCR5 m<CCR5>Pz03.1C5, які становлять менше 20 RU (одиниці відповіді), краще менше 10 RU при аналізі методом поверхневого плазмонного резонансу (Biacore-аналіз), викладеного в прикладі 4.

Поняття "зв'язування з фрагментом людського CSF-1R D1-D3" відноситься до визначення афінності зв'язування за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (Biacore-аналіз). Тестоване антитіло іммобілізують на поверхні і додають фрагмент людського CSF-1R D1-D3 (SEQ ID NO: 66), визначають відповідні афінності зв'язування. Поняття "відсутність зв'язування з фрагментом людського CSF-1R D1-D3" означає, що при застосуванні зазначеного аналізу виявлений сигнал знаходився в зоні, що не перевищувала більше ніж в 1,2 рази фоновий сигнал, і тому не можна визначити ані наявність значущої афінності зв'язування, ані відсутність зв'язування (див. приклад 10).

Одним з варіантів здійснення винаходу є спосіб скринінгу, який призначений для селекції антитіл, запропонованих в винаході, який полягає в тому, що здійснюють наступні стадії, на яких:

а) визначають сигнал зв'язування (в одиницях відповіді (RU)) антитіл до CSF-1R з фрагментом людського CSF-1R delD4 (SEQ ID NO: 65) і позаклітинним доменом людського CSF-1R (CSF-1R-ECD) (SEQ ID NO: 64) методом поверхневого плазмонного резонансу (Biacore-аналіз),

б) відбирають антитіла, для яких виявлено співвідношення сигналів зв'язування (фрагмент людського CSF-1R t delD4/позаклітинний домен людського CSF-1R (CSF-1R-ECD)), що становить 50:1 або нижче.

В одному з варіантів здійснення винаходу визначення здійснюють при 25 °C.

В одному з варіантів здійснення винаходу спосіб скринінгу полягає також в тому, що здійснюють додаткові стадії, на яких вимірюють зв'язування антитіла до CSF-1R з фрагментом людського CSF-1R D1-D3 (SEQ ID NO: 66) (D1-D3) і відбирають антитіла, які не зв'язуються з зазначеним фрагментом.

Поняття "епітоп" відноситься до білкової детермінанти людського CSF-1R, яка має здатність специфічно зв'язуватися з антитілом. Епітопи, як правило, складаються з хімічно активних поверхневих груп молекул, таких як амінокислоти або бічні ланцюги цукрів, і, як правило, епітопи мають специфічні тримірні структурні характеристики, а також специфічні характеристики заряду. Конформаційні і неконформаційні епітопи відрізняються тим, що зв'язування з першими, на відміну від зв'язування з останніми, втрачається в присутності денатуруючих розчинників. Краще антитіло, запропоноване в винаході, зв'язується специфічно з нативним і з денатурованим CSF-1R.

Поняття "варіабельна ділянка" (варіабельна ділянка легкого ланцюга ( $V_L$ ), варіабельна ділянка важкого ланцюга ( $V_H$ )) в контексті даного опису в кожному випадку означає кожну з пари ділянок легких і важких ланцюгів, які безпосередньо беруть участь в зв'язуванні антитіла з антигеном. Домени варіабельних ділянок легких і важких ланцюгів мають деяку загальну структуру, і кожний домен містить 4 каркасних ділянки (FR), послідовності яких є висококонсервативними, зв'язаних трьома "гіперваріабельними ділянками" (або визначаючими комплементарність ділянками, CDR). Каркасні ділянки адаптовані до  $\beta$ -складчастої конформації, а CDR-ділянки можуть формувати петлі, що з'єднують  $\beta$ -складчасту структуру. CDR в кожному ланцюзі підтримують у вигляді тримірної структури за допомогою каркасних ділянок і формують з CDR-ділянками іншого ланцюга антигензв'язувальний центр. CDR3-ділянки важкого і легкого ланцюга антитіла відіграють дуже важливу роль в специфічності зв'язування /афінності антитіл, запропонованих в винаході, і внаслідок цього є додатковим об'єктом винаходу.

Поняття "антигензв'язувальна ділянка (центр) антитіла" в контексті даного опису відноситься до амінокислотних залишків антитіла, які відповідальні за зв'язування з антигеном. Антигензв'язувальна ділянка антитіла містить амінокислотні залишки з "гіперваріабельних ділянок" або "CDR". "Каркасні" або "FR"-ділянки являють собою ділянки варіабельної ділянки, залишки яких відмінні від залишків гіперваріабельної ділянки, як вони визначені в даному описі. Таким чином, варіабельні ділянки легких і важких ланцюгів антитіла містять у напрямку від N- до C-кінця домени FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 і FR4. CDR3 важкого ланцюга являє собою основну ділянку, яка забезпечує головним чином зв'язування з антигеном і визначає властивості антитіла. До CDR- і FR-ділянок відносяться ділянки, які визначають відповідно до стандартного принципу Кебота та ін. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е вид., вид-ня Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991) і/або залишки з "гіперваріабельної петлі".

Поняття "нуклеїнова кислота" або "молекула нуклеїнової кислоти" в контексті даного опису відносяться до молекул ДНК і молекул РНК. Молекула нуклеїнової кислоти може бути одноланцюговою або дволанцюговою, але краще являє собою дволанцюгову ДНК.

Поняття "амінокислота" в контексті даного опису означає групу карбокси- $\alpha$ -амінокислот, що зустрічаються в природних умовах, таких як аланін (трибуквений код: ala, однокбуквений код: A), аргінін (arg, R), аспарагін (asn, N), аспарагінова кислота (asp, D), цистеїн (cys, C), глутамін (gln, Q), глутамінова кислота (glu, E), гліцин (gly, G), гістидин (his, H), ізолейцин (ile, I), лейцин (leu, L), лізин (lys, K), метіонін (met, M), фенілаланін (phe, F), пролін (pro, P), серин (ser, S), треонін (thr, T), триптофан (trp, W), тирозин (tyr, Y) і валін (val, V).

Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу антитіла, запропоновані в винаході, інгібують зв'язування CSF-1 з CSF-1R. Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу значення  $IC_{50}$  становить 200 нг/мл або нижче, відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу значення  $IC_{50}$  становить 50 нг/мл або нижче. Значення  $IC_{50}$ , що характеризує



інгібування зв'язування CSF-1 з CSF-1R, можна визначати відповідно до методу, описаного в прикладі 2.

Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу антитіла, запропоновані в винаході, інгібують індукване CSF-1 фосфорилування CSF-1R (в рекомбінантних клітинах лінії NIH3T3-CSF-1R).

Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу значення  $IC_{50}$  становить 800 нг/мл або нижче, відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу значення  $IC_{50}$  становить 600 нг/мл або нижче, відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу значення  $IC_{50}$  становить 250 нг/мл або нижче. Значення  $IC_{50}$ , що характеризує інгібування індукованого CSF-1 фосфорилування CSF-1R, можна визначати відповідно до методу, описаного в прикладі 3.

Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу антитіла, запропоновані в винаході, інгібують ріст рекомбінантних NIH3T3-клітин, які експресують людський CSF-1R (SEQ ID NO: 62). Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу значення  $IC_{50}$  становить 10 мкг/мл або нижче, відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу значення  $IC_{50}$  становить 5 мкг/мл або нижче, відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу значення  $IC_{50}$  становить 2 мкг/мл або нижче. Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу значення  $IC_{30}$  становить 10 мкг/мл або нижче, відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу значення  $IC_{30}$  становить 5 мкг/мл або нижче, відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу значення  $IC_{30}$  становить 2 мкг/мл або нижче. Значення  $IC_{50}$ , значення  $IC_{30}$  або % інгібування росту визначають відповідно до методів, описаних в прикладі 5.

Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу антитіла, запропоновані в винаході, інгібують ріст рекомбінантних NIH3T3-клітин, які експресують людський мутантний CSF-1R L301S Y969F (SEQ ID NO: 63). Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу значення  $IC_{50}$  становить 15 мкг/мл або нижче, відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу значення  $IC_{50}$  становить 10 мкг/мл або нижче. Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу значення  $IC_{30}$  становить 10 мкг/мл або нижче, відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу значення  $IC_{50}$  становить 5 мкг/мл або нижче, відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу значення  $IC_{50}$  становить 2 мкг/мл або нижче. Значення  $IC_{50}$ , значення  $IC_{30}$  або % інгібування росту визначають відповідно до методам, описаним в прикладі 5.

Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу антитіла, запропоновані в винаході, інгібують ріст пухлинних клітин лінії BeWo (ATCC CCL-98) на 65 % або більше (при застосуванні антитіла в концентрації 10 мкг/мл і в порівнянні з варіантом без антитіла). Інгібування росту (в %) визначають відповідно до методу, описаного в прикладі 8. Наприклад, встановлено, що МАТ 2F11 інгібує ріст пухлинних клітин лінії BeWo на 70 %.

Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу антитіла, запропоновані в винаході, інгібують диференціацію макрофагів як людини, так і мавпи циномолгус (тобто обох видів) (що визначають за інгібуванням виживання моноцитів людини і мавпи циномолгус відповідно до методу, описаного в прикладах 7 і 8). Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу антитіла, запропоновані в винаході, інгібують виживання людських моноцитів, що характеризується значенням  $IC_{50}$ , що становить 0,15 мкг/мл або нижче, відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу значенням  $IC_{50}$ , що становить 0,10 мкг/мл або нижче. Інгібування виживання людських моноцитів визначають відповідно до методу, описаного в прикладі 7. Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу антитіла, запропоновані в винаході, інгібують виживання моноцитів мавпи циномолгус на 80 % або більше, відповідно до одного з варіантів здійснення на 90 % або більше (при застосуванні антитіла в концентрації 5 мкг/мл і в порівнянні з варіантом без антитіла). Інгібування виживання моноцитів мавпи циномолгус визначають відповідно до методу, описаного в прикладі 8.

Наступним варіантом здійснення винаходу є спосіб одержання антитіла до CSF-1R, який полягає в тому, що вбудовують послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує важкий ланцюг антитіла класу IgG1, яке зв'язується з людським CSF-1R, запропонованої в винаході (зазначеної модифікованої нуклеїнової кислоти), і нуклеїнової кислоти, яка кодує легкий ланцюг зазначеного антитіла, в один або два експресійний(і) вектор(и), зазначений(і) вектор(и) вбудовують в еукаріотичну клітину-хазяїн, експресують кодований білок і виділяють з клітини-хазяїна або супернатанту.

Антитіла, запропоновані в винаході, краще одержують методами рекомбінації. При цьому антитіло краще являє собою виділене моноклональне антитіло. Такі методи рекомбінації широко відомі в даній галузі і вони полягають в тому, що здійснюють експресію білків в прокаріотичних і еукаріотичних клітинах з наступним виділенням поліпептиду антитіла і, як правило, очищення до фармацевтично прийнятної чистоти. Для експресії білка нуклеїнові

кислоти, які кодують легкі і важкі ланцюги або їх фрагменти, вбудовують в експресійні вектори стандартними методами. Експресію здійснюють в придатних прокаріотичних або еукаріотичних клітинах-хазяїнах типу CHO-клітин, NS0-клітин, SP2/0-клітин, HEK293-клітин, COS-клітин, клітин дріжджів або клітин *E.coli*, і антитіло виділяють з клітин (супернатант або клітини після лізису).

5 Рекомбінантне одержання антитіл добре відомо в даній галузі і описано, наприклад, в оглядових статтях Makrides S.C., *Protein Expr. Purif.* 17, 1999, сс. 183-202; Geisse S. та ін., *Protein Expr. Purif.* 8, 1996, сс. 271-282; Kaufman R.J., *Mol. Biotechnol.* 16, 2000, сс. 151-161; Werner R.G. та ін., *Drug Res.*, 48, 1998, сс. 870-880.

10 Антитіла можуть бути присутніми в цілих клітинах, в клітинному лізаті або в частково очищеній або повністю очищеній формі. Очищення здійснюють для видалення інших клітинних компонентів або інших забруднювачів, наприклад, інших клітинних нуклеїнових кислот або білків, стандартними методами, які включають обробку лугом/ДЧН, CsCl-бендинг, хроматографію на колонках, електрофорез в агарозному гелі і інші методи, добре відомі в даній галузі (див. *Current Protocols in Molecular Biology*, під ред. Ausubel F. та ін., вид-во Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, 1987).

15 Експресія в NS0-клітинах описана, наприклад, у Barnes L.M. та ін., *Cytotechnology* 32, 2000, сс. 109-123; і Barnes L.M. та ін., *Biotech. Bioeng.* 73, 2001, сс. 261-270. Короткочасна експресія описана, наприклад, у Durocher Y. та ін., *Nucl. Acids. Res.* 30, 2002, с. E9. Клонування варіабельних ділянок описано у Orlandi R. та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1989, сс. 3833-3837; Carter P. та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1992, сс. 4285-4289; і Norderhaug L. та ін., *J. Immunol. Methods* 204, 1997, сс. 77-87. Краща система короткочасної експресії (HEK 293) описана у Schlaeger E.-J. і Christensen K. в *Cytotechnology* 30, 1999, сс. 71-83 і у Schlaeger E.-J. в *J. Immunol. Methods* 194, 1996, сс. 191-199.

25 Контролюючі послідовності, придатні для прокаріотичних організмів, являють собою, наприклад, промотор, необов'язково послідовність оператора і сайт зв'язування рибосом. Відомо, що для еукаріотичних клітин застосовують промотори, енхансери і сигнали поліаденілювання.

Нуклеїнова кислота "функціонально зв'язана", коли вона знаходиться в функціональному зв'язку з іншою нуклеотидною послідовністю. Наприклад, ДНК передпослідовності або лідерної секреторної послідовності функціонально зв'язана з ДНК поліпептиду, якщо при її експресії утворюється передбілок, який бере участь в секреції поліпептиду; промотор або енхансер функціонально зв'язаний з кодуючою послідовністю, якщо він впливає на транскрипцію послідовності; або сайт зв'язування рибосом функціонально зв'язаний з додуючою послідовністю, якщо він розташований так, що полегшує трансляцію. як правило, поняття "функціонально зв'язані" означає, що послідовності ДНК, будучи зв'язаними, є суміжними, а в випадку лідерної секреторної послідовності, є суміжними і знаходяться в рамці зчитування. Проте, для енхансерів не є необхідним, щоб вони були суміжними. Зв'язування здійснюють шляхом лігування в відповідних сайтах рестрикції. Якщо такі сайти не існують, то згідно з прийнятою практикою застосовують синтетичні олігонуклеотидні адаптори або лінкери.

40 Моноклональні антитіла можна відокремлювати від культурального середовища за допомогою загальноприйнятих методів очищення імуноглобулінів, таких, наприклад, як, хроматографія на білок А-сефарозі, хроматографія на гідроксилапатиті, гель-електрофорез, діаліз або афінна хроматографія. ДНК і РНК, які кодують моноклональні антитіла, можна легко виділяти і секвенувати за допомогою загальноприйнятих методів. Клітини гібридом можуть служити джерелом таких ДНК і РНК. Після виділення ДНК можна вбудовувати в експресійні вектори, яким потім трансфектують клітини-хазяїни, такі як клітини HEK 293, CHO-клітини або клітини мієломи, які по-іншому не можуть продукувати білок імуноглобуліну, для синтезу рекомбінантних моноклональних антитіл в клітинах-хазяїнах.

45 В контексті даного опису поняття "клітина", "клітинна лінія" і "клітинна культура" використовуються взаємозамінюванню, і всі такі визначення включають потомство. Так, поняття "трансформанти" і "трансформовані клітини" відносяться до первинної розглядуваної клітини і одержаних з неї культур безвідносно до кількості пересівів. Слід розуміти також, що все потомство може не бути повністю ідентичним за складом ДНК через навмисні або випадкові мутації. Під обсяг винаходу підпадає варіант потомства, що має таку ж функцію або біологічну активність, яка виявлена у вихідній трансформованій клітині.

50 "Fc-фрагмент" антитіла не бере участь безпосередньо в зв'язуванні антитіла з антигеном, але має різні ефекторні функції. Поняття "Fc-фрагмент антитіла" добре відоме спеціалісту в даній галузі і його визначають на основі розщеплення антитіла папаїном. Залежно від амінокислотної послідовності константної ділянки важких ланцюгів антитіла або імуноглобуліни розділяють на наступні класи: IgA, IgD, IgE, IgG і IgM і деякі з них можна додатково підрозділяти

на підкласи (ізотипи), наприклад, IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4, IgA1 і IgA2. На основі будови константних ділянок важких ланцюгів різні класи імуноглобулінів позначають як  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\mu$  і  $\gamma$  відповідно. Fc-фрагмент антитіла безпосередньо бере участь в ADCC (антитіло-зумовлена клітиннозалежна цитотоксичність) і CDC (комплементзалежна цитотоксичність) в результаті активації комплементу, зв'язування C1q і зв'язування Fc-рецептора. Активація комплементу (CDC) ініціюється зв'язуванням фактора системи комплементу C1q з Fc-фрагментом більшості антитіл підкласів IgG. Хоча вплив антитіла на систему комплементу залежить від певних умов, зв'язування з C1q зумовлене певними сайтами зв'язування в Fc-фрагменті. Такі сайти зв'язування відомі в даній галузі і описані, наприклад, у Boakle R.J. та ін., Nature 282, 1979, сс. 742-743; Lukas T.J. та ін., J. Immunol. 127, 1981, сс. 2555-2560; Brunhouse R. і Cebra J.J., Mol. Immunol. 16, 1979, сс. 907-917; Burton D.R. та ін., Nature 288, 1980, сс. 338-344; Thommesen J.E. та ін., Mol. Immunol. 37, 2000, сс. 995-1004; Idusogie E.E. та ін., J. Immunol. 164, 2000, сс. 4178-4184; Hezareh M. та ін., J. Virology 75, 2001, сс. 12161-12168; Morgan A. та ін., Immunology 86, 1995, сс. 319-324; EP 0307434. Зазначені сайти зв'язування являють собою, наприклад, L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 і P329 (нумерація відповідно до EU-нумерації за Кеботом, див. нижче). Антитіла підкласів IgG1, IgG2 і IgG3, як правило, зумовлюють активацію комплементу і зв'язування C1q і C3, в той час як IgG4 не активує систему комплементу, не зв'язується з C1q і C3.

Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу антитіло, запропоноване в винаході, містить Fc-фрагмент людського походження і краще всі інші ділянки людських константних ділянок. В контексті даного опису поняття "Fc-фрагмент людського походження" відноситься до Fc-фрагмента, який являє собою або Fc-фрагмент людського антитіла підкласу IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4, краще Fc-фрагмент людського підкласу IgG1, або мутантний Fc-фрагмент людського підкласу IgG1 (краще з мутацією L234A+L235A), або Fc-фрагмент людського підкласу IgG4, або мутантний Fc-фрагмент людського підкласу IgG4 (краще з мутацією S228P). Найкращими є константні ділянки людського важкого ланцюга, послідовності яких представлені в SEQ ID NO: 58 (людський підклас IgG1), SEQ ID NO: 59 (людський підклас IgG1 з мутаціями L234A і L235A), SEQ ID NO: 60 людський підклас IgG4) або SEQ ID NO: 61 (людський підклас IgG4 з мутацією S228P).

Краще антитіло, запропоноване в винаході, являє собою людський імуноглобулін підкласу IgG1 або людський імуноглобулін підкласу IgG4. В одному з варіантів здійснення винаходу воно являє собою людський імуноглобулін підкласу IgG1. В одному з варіантів здійснення винаходу воно являє собою людський імуноглобулін підкласу IgG4.

Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу антитіло, запропоноване в винаході, відрізняється тим, що містить людські константні ланцюги. Зазначені константні ланцюги добре відомі в даній галузі і описані, наприклад, у Kabat E.A. (див., наприклад, Johnson G. і Wu, T.T., Nucleic Acids Res., 28, 2000, сс. 214-218). Наприклад, прийнятна людська константна ділянка важкого ланцюга містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 58. Наприклад, прийнятна людська константна ділянка легкого ланцюга містить амінокислотну послідовність константної ділянки легкого капа-ланцюга SEQ ID NO: 57.

Іншим об'єктом винаходу є антитіло, яке зв'язується з людським CSF-1R, яке відрізняється тим, що

а) варіабельна ділянка важкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 7, і варіабельна ділянка легкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 8,

б) варіабельна ділянка важкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 15, і варіабельна ділянка легкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 16, або його гуманізована версія.

Іншим об'єктом винаходу є антитіло, яке зв'язується з людським CSF-1R, яке відрізняється тим, що

а) варіабельна ділянка важкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 7, і варіабельна ділянка легкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 8,

б) варіабельна ділянка важкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 15, і варіабельна ділянка легкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 16,

в) варіабельна ділянка важкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 75, і варіабельна ділянка легкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 76,

г) варіабельна ділянка важкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 83, і варіабельна ділянка легкого ланцюга має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 84, або його гуманізована версія.

Іншим об'єктом винаходу є антитіло, яке зв'язується з людським CSF-1R, яке відрізняється тим, що





5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

варіабельна ділянка важкого ланцюга містить CDR3-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 25, CDR2-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 26, і CDR1-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 27, і варіабельна ділянка легкого ланцюга містить CDR3-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 28, CDR2-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 29, і CDR1-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 30.

Іншим об'єктом винаходу є антитіло, яке зв'язується з людським CSF-1R, яке відрізняється тим, що

варіабельна ділянка важкого ланцюга містить CDR3-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 33, CDR2-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 34, і CDR1-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 35, і варіабельна ділянка легкого ланцюга містить CDR3-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 36, CDR2-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 37, і CDR1-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 38.

Іншим об'єктом винаходу є антитіло, яке зв'язується з людським CSF-1R, яке відрізняється тим, що

варіабельна ділянка важкого ланцюга містить CDR3-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 41, CDR2-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 42, і CDR1-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 43, і варіабельна ділянка легкого ланцюга містить CDR3-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 44, CDR2-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 45, і CDR1-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 46.

Винахід відноситься також до способу лікування пацієнта, який потребує такої терапії, яке відрізняється тим, що вводять пацієнту в терапевтично ефективній кількості антитіло, запропоноване в винаході. Винахід відноситься також до застосування антитіла, запропонованого в винаході, для зазначеної терапії.

Одним з кращих варіантів здійснення винаходу є антитіла до CSF-1R, запропоновані в даному винаході, які застосовують для лікування "опосередкованих CSF-1R захворювань", або антитіла до CSF-1R, запропоновані в даному винаході, які застосовують для приготування лікарського засобу, призначеного для лікування "опосередкованих CSF-1R захворювань", які можна описати за допомогою представлених нижче характеристик:

Відомо три різних механізми, за допомогою яких передача сигналів CSF-1R, ймовірно, бере участь в рості і метастазах пухлин. Перший з них пов'язаний з тим, що експресія CSF-ліганду і рецептора виявлена в пухлинних клітинах жіночої статеві системи (молочна залоза, яєчник, ендометрій, шийка матки) (Scholl S.M. та ін., J. Natl. Cancer Inst., 86, 1994, сс. 120-126; Kacinski B.M., Mol. Reprod. Dev., 46, 1997, сс. 71-74; Ngan H.Y. та ін., Eur. J. Cancer 35, 1999, сс. 1546-1550; Kirma N. та ін., Cancer Res, 67, 2007, сс. 1918-1926), і експресія асоційована з ростом ксенотрансплантату раку молочної залози, а також з поганим прогнозом для які страждають на рак молочної залози пацієнтів. В одному з досліджень дві точкові мутації виявлені в CSF-1R приблизно у 10-20 % пацієнтів, які страждають на гострий мієлолейкоз, хронічний мієлолейкоз і мієлодисплазію, і одна з цих мутацій, як встановлено, призводила до порушення оновлення рецептора (Ridge S.A. та ін., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 87, 1990, сс. 1377-1380). Проте, частота зустрічаємості мутацій не була підтверджена в більш пізніх дослідженнях (Abu-Duhier F.M. та ін., Br. J. Haematol., 120, 2003, сс. 464-470). Мутації виявлені також в ряді випадків печінковоклітинного раку (Yang D.H. та ін., Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int., 3, 2004, сс. 86-89) і ідіопатичного мієлофіброзу (Abu-Duhier F.M. та ін., Br. J. Haematol., 120, 2003, сс. 464-470). На даний час у клітинній лінії GDM-1, одержаної з організму пацієнта, що страждає мієломонобластним лейкозом, ідентифікована мутація Y571D в CSF-1R (Chase A. та ін., Leukemia, 23, 2009, сс. 358-364).

Пігментований вілонодулярний синовіт (PVNS) і теносиновіальні гігантоклітинні пухлини (TGCT) можуть виникати в результаті транслокації, що призводить до злиття гена M-CSF з геном колагену COL6A3 і наступної надекспресії M-CSF (West R.B. та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103, 2006, сс. 690-695). Передбачається, що умови оточуючого середовища впливають на масу утвореної пухлини, яка складається з моноцитів, залучених клітинами, які експресують M-CSF. TGCT являють собою пухлини меншого розміру, які відносно легко можна видаляти з пальців, де вони найчастіше зустрічаються. PVNS являє собою більш агресивне захворювання, оскільки може зачіпати крупні суглоби і його складно контролювати хірургічним шляхом.

Другий механізм заснований на блокаді передачі сигналів через M-CSF/CSF-1R в зонах метастазів в кістці, які викликають остеокластогенез, резорбцію кістки і остеолітичні ушкодження кістки. Рак молочної залози, множинна мієлома і рак легені є прикладами типів раку, при яких

можуть утворюватися метастази в кістку і які можуть викликати остеолітичну хворобу кістки, ускладненнями якої є порушення скелета. M-CSF, що вивільняється з пухлинних клітин і стромы, індукує диференціацію попередників гематопоетичних мієлоїдних моноцитів в зрілі остеокласти разом з лігандом рецептора-активатора ядерного фактора капа-В (RANKL). В зазначеному процесі M-CSF діє як "дозволяючий" фактор, передаючи сигнал виживання остеокластам (Tanaka S. та ін., J. Clin. Invest. 91, 1993, сс. 257-263). Інгібування активності CSF-1R в процесі диференціації остеокластів і визрівання в присутності антитіла до CSF-1R, ймовірно, попереджає несбалансовану активність остеокластів, яка викликає остеолітичну хворобу і асоційовані з нею споріднені порушення скелету при метастатичному захворюванні. В той час як рак молочної залози, легені і множинна мієлома, як правило, призводять до остеолітичним ушкодженням, метастази в кісткову тканину при раку передміхурової залози на самому початку мають остеобластний прояв, при якому підвищена активність по відношенню до утворення кістки призводить до "переплетеної кістки", яка відрізняється від типової пластинчастої структури здорової кістки. З розвитком хвороби ушкодження кістки набувають виражений остеолітичний компонент, а також високі рівні в сироватці маркерів резорбції кістки, і передбачається, що при цьому може виявитися корисною антирезорбтивна терапія. Встановлено, що бісфосфонати інгібують утворення остеолітичних ушкоджень і знижують кількість зв'язаних з ушкодженням скелета випадків тільки у чоловіків зі стійким до гормонів метастатичним раком передміхурової залози, проте, при цьому їх вплив на остеобластні ушкодження є дискусійним, і відповідно до одержаних до даного часу даних бісфосфонати не виявляють корисної дії по відношенню до попередження кісткових метастазів або чутливого до гормонів раку передміхурової залози. На даний час в клінічних умовах проводиться вивчення впливу антирезорбтивних засобів при змішаному остеолітичному/остеобластному раку передміхурової залози (Choueiri M.B. та ін., Cancer Metastasis Rev., 25, 2006, сс. 601-609; Vessella R.L. і Corey E., Clin. Cancer Res., 12 (20 Pt 2), 2006, сс. 6285-6290).

Третій механізм заснований на сучасних даних про те, що рівень асоційованих з пухлиною макрофагів (TAM), виявлених в щільних пухлинах при раку молочної залози, передміхурової залози, яєчника і шийки матки, корелював з поганим прогнозом (Bingle L. та ін., J. Pathol., 196, 2002, сс. 254-265; Pollard J.W., Nat. Rev. Cancer, 4, 2004, сс. 71-78). Рекрутмент макрофагів в пухлину відбувається за допомогою M-CSF і інших хемокинів. Макрофаги можуть брати участь в розвитку пухлин за допомогою секреції ангіогенних факторів, протеаз і інших факторів росту і цитокінів і можуть блокуватися шляхом інгібування передачі сигналів CSF-1R. На даний час Zins з співавторами (Zins K. та ін., Cancer Res., 67, 2007, сс. 1038-1045) встановили, що експресія siPHK фактора некрозу пухлини-альфа (TNF-альфа), M-CSF або їх комбінації може знижувати ріст пухлин на мишачій моделі з використанням ксенотрансплантату на 34-50 % після внутрішньопухлинній ін'єкції відповідної siPHK. SiPHK, мішенню якої є TNF-альфа, секретований людськими клітинами лінії SW620, знижувала рівні мишачого M-CSF і призводила до зниження рівня макрофагів в пухлині. Крім того, обробка ксенотрансплантатів пухлини MCF7 антигензв'язувальним фрагментом, мішенню якого є M-CSF, призводила до 40 %-ного інгібування росту пухлин, усунення стійкості до хіміотерапевтичних засобів і покращеній виживаності мишей при застосуванні разом з хіміотерапевтичними засобами (Paulus P. та ін., Cancer Res., 66, 2006, сс. 4349-4356).

TAM є тільки одним прикладом вияву зв'язку між хронічним запаленням і раком. Відомі інші докази зв'язку між запаленням і раком, оскільки багато хронічних захворювань асоційовані з підвищеним ризиком виникнення раку, рак виникає в місцях хронічного запалення, хімічні медіатори запалення виявлені при багатьох видах раку; усунення клітинних або хімічних медіаторів запалення інгібує розвиток деяких створених експериментальним шляхом типів раку і пролонговане застосування протизапальних засобів знижує ризик виникнення деяких видів раку. Зв'язок з раком відомий для ряду запальних станів, серед яких індукований H.pylori гастрит у випадку раку шлунку, шистозоміас у випадку раку сечового міхура, HHVX у випадку саркоми Капоші, ендометріоз у випадку раку яєчника і простатит у випадку раку передміхурової залози (Balkwill F. та ін., Cancer Cell, 7 2005, сс. 211-217). Макрофаги являють собою основні клітини при хронічному запаленні, і вони реагують по-різному на їхнє мікрооточення. Відомо два типи макрофагів, які розглядаються як такі, що мають вирішальне значення для цілого ряду функціональних станів: M1-макрофаги беруть участь в реакціях типу 1. Ці реакції включають активацію продуктами мікробного походження і наступне знищення патогенних мікроорганізмів, що призводить до утворення як проміжних продуктів реактивних форм кисню. З іншого боку, до таких, що мають вирішальне значення, відносяться M2-макрофаги, які беруть участь в реакціях типу 2, які підсилюють клітинну проліферацію, регулюють запалення і адаптивний імунітет і підсилюють ремоделювання, ангіогенез і репарацію тканин (Mantovani A. та ін., Trends Immunol.,



25, 2004, сс. 677-686). Хронічне запалення, що призводить до розвитку неоплазм, як правило, асоціюється з M2-макрофагами. Основним цитокином, що опосередковує запальні реакції, є TNF-альфа, який відповідно до своєї назви може стимулювати протипухлинний імунітет і геморагічний некроз при застосуванні в високих дозах, але також, як встановлено в останні роки, може експресуватися пухлинними клітинами і діяти як промотор пухлини (Zins K. та ін., Cancer Res., 67, 2007, сс. 1038-1045; Balkwill F., Cancer Metastasis Rev., 25, 2006, сс. 409-416). Специфічна роль макрофагів по відношенню до пухлин ще потребує подальшого вивчення, включаючи дослідження потенційної просторової і тимчасової залежності їх функцій і зв'язку з конкретними типами пухлин.

Таким чином, одним з варіантів здійснення винаходу є антитіла до CSF-1R, запропоновані в даному винаході, призначені для застосування при лікуванні раку. Поняття "рак" в контексті даного опису може означати, наприклад, рак легені, недрібноклітинний рак легені (NSCL), бронхоальвеолярний рак легені, рак кістки, рак підшлункової залози, рак шкіри, рак голови або шиї, шкірну або внутрішньоочну меланому, рак матки, рак яєчника, ректальний рак, рак анальної ділянки, рак шлунку, гастральний рак, рак ободової кишки, рак молочної залози, рак матки, карциному фалопієвих труб, карциному ендометрію, карциному шийки матки, карциному піхви, карциному вульви, хворобу Ходжкіна, рак стравоходу, рак тонкого кишечника, рак ендокринної системи, рак щитовидної залози, рак паращитовидної залози, рак надниркової залози, саркому м'яких тканин, рак сечовипускального каналу, рак пенісу, рак передміхурової залози, рак сечового міхура, рак нирки або сечоводу, нирковоклітинну карциному, карциному ниркової миски, мезотеліому, печінковоклітинний рак, рак жовчних протоків, неоплазми центральної нервової системи (ЦНС), пухлини спинних хребців, гліому стовбура головного мозку, мультиформну гліобластому, астроцитому, шваноми, епендимони, медулобластоми, менінгіоми, плоскоклітинні карциноми, аденому гіпофізу, лімфому, лімфоцитарний лейкоз, включаючи сталі варіанти будь-якого з зазначених вище видів раку, або комбінацію будь-яких з зазначених вище видів раку. Краще рак являє собою рак молочної залози, рак яєчника, рак шийки матки, рак легені або рак передміхурової залози. Краще зазначені види раку відрізняються також експресією або надекспресією CSF-1 або CSF-1R. Ще одним варіантом здійснення винаходу є антитіла до CSF-1R, запропоновані в даному винаході, призначені для застосування для одночасного лікування первинних пухлин і нових метастазів.

Таким чином, ще одним варіантом здійснення винаходу є антитіла до CSF-1R, запропоновані в даному винаході, призначені для застосування для лікування періодонтиту, гістоцитозу Х, остеопорозу, хвороби кістки Педжета (PDB), втрати кісткової тканини через протиракову терапію, перипростетичного остеолізу, індукованого глюкокортикоїдами остеопорозу, ревматоїдного артриту, псоріатичного артриту, остеоартриту, запальних артритидів і запалення.

В статті Rabello D. та ін., Biochem. Biophys. Res. Commun., 347, 2006, сс. 791-796 продемонстровано, що SNP в гені CSF-1 позитивно асоційовані з агресивністю періодонтиту: запального захворювання тканин періодонту, яке викликає втрату зубів через резорбції альвеолярної кістки.

Гістоцитоз Х (який називають також гістозитозом з клітин Лангерганса, LCH) являє собою проліферативне захворювання дендритних клітин Лангерганса, яке проявляється в диференціюванні в остеокласти кістки і збільшенні зв'язаних з LCH кісткових ушкоджень. Клітини Лангерганса мають походження з моноцитів, що знаходяться в кровотоку. Встановлено, що підвищені рівні M-CSF, виявлені в сироватці, і ушкодження корелюють з серйозністю захворювання (da Costa C.E. та ін., J. Exp. Med., 201, 2005, сс. 687-693). Хвороба виникає в основному в дитячому віці і її лікують хіміотерапевтичними засобами, коли хвороба стає системною або є рецидивуючою.

Патофізіологія остеопорозу опосередкована втратою формуючих кістку остеобластів і підвищенням рівня залежної від остеокластів резорбції кістки. Підтверджуючі це дані одержані Cenci з співавторами, які продемонстрували, що ін'єкція антитіла до M-CSF зберігає щільність кісткової тканини і інгібує резорбцію кістки у мишей після оварієктомії (Cenci S. та ін., J. Clin. Invest., 105, 2000, сс. 1279-1287). В останні роки виявлена потенційний зв'язок між втратою кісткової тканини в постменопаузальному періоді через дефіцит естрогену і встановлена присутність продукує TNF-альфа Т-клітин, що впливають на метаболізм кісткової тканини (Roggia C. та ін., Minerva Med., 95, 2004, сс. 125-132). Можливий механізм може включати індукцію in vivo M-CSF за допомогою TNF-альфа. Важлива роль M-CSF в індукованому TNF-альфа остеокластогенезі підтверджена впливом антитіла до M-CSF, яке блокувало індукований TNF-альфа остеоліз у мишей, і з цієї причини інгібітори шляху передачі сигналів CSF-1R є

потенційними мішенями при запальному артриті (Kitaura H. та ін., *J. Clin. Invest.*, 115, 2005, сс. 3418-3427).

Хвороба кістки Педжета (PDB) являє собою друге найбільш розповсюджене порушення кісткового метаболізму після остеопорозу, при якому локальні аномалії підвищеного оновлення кісткової тканини призводять до ускладнень, таких як біль, деформація, патологічні переломи кістки і глухота. Ідентифіковані мутації в чотирьох генах, які регулюють нормальну функцію остеокластів і схильність індивідумів до PDB і споріднених порушень: інсерційні мутації в гені TNFRSF11A, який кодує рецептор-активатора ядерного фактора (NF) капа-В (RANK), регулятор функції остеокластів, що має вирішальне значення, інактивуючі мутації в гені TNFRSF11B, який кодує остеопротегерин (рецептор-пастка для ліганду RANK), мутації гена *sequestosome 1* (SQSTM1), який кодує важливий каркасний білок в шляху NFкапаВ, і мутації в гені валозинвмісного білка (VCP). Цей ген кодує VCP, який відіграє роль в наведеному розщепленні інгібітора NFкапаВ протеосомаю (Daroszewska A. і Ralston S.H., *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.*, 2, 2006, сс. 270-277). Інгібітори, мішенню яких є CSF-1R, непрямо протидіють блокаді порушення регуляції передачі сигналів RANKL, і вони являють собою додатковий шлях лікування поряд з застосовними на даний час бісфосфонатами.

Втрата кісткової тканини, викликана протираковою терапією, насамперед у пацієнтів, які страждають на рак молочної залози і передміхурової залози, є ще одним показанням, при якому інгібітор, мішенню якого є CSF-1R, може попереджати втрату кісткової тканини (Lester J.E. та ін., *Br. J. Cancer*, 94, 2006, сс. 30-35). При покращенні прогнозу по відношенню до ранньої стадії раку молочної залози віддалені дії допоміжних терапій стають більш важливими, оскільки деякі з таких терапій, включаючи хімотерапію, опромінення, застосування інгібіторів ароматази і оварієктомії, впливають на метаболізм кісткової тканини, знижуючи мінеральну щільність кісткової тканини, що призводить до підвищеного ризику розвитку остеопорозу і пов'язаних з ним переломів (Lester J.E. та ін., *Br. J. Cancer*, 94, 2006, сс. 30-35). Еквівалентом допоміжної терапії, заснованої на інгібуванні ароматази, при раку молочної залози є терапія, заснована на зниженні рівня андрогену, при раку передміхурової залози, яка призводить до зниження мінеральної щільності кісткової тканини і значного підвищення ризику пов'язаних з остеопорозом переломів (Stoch S.A. та ін., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86, 2001, сс. 2787-2791).

Цілеспрямоване інгібування передачі сигналів CSF-1R, ймовірно, може виявитися цінним при інших показаннях, а також у тих випадках, коли типи клітин, на які виявляють направлену дію, являють собою остеокласти і макрофаги, наприклад, при лікуванні специфічних ускладнень, пов'язаних з заміною суглоба, наприклад, через ревматоїдний артрит. Порушення імплантату внаслідок перипротетичної втрати кісткової тканини і наступне розшатування протеза є основним ускладненням при заміні суглоба і потребує повторного хірургічного втручання, що супроводжується високим соціоекономічним навантаженням на індивідуального пацієнта і на систему медико-санітарної допомоги. До даного часу відсутня задовільна лікарська терапія попередження або інгібування перипротетичного остеолізу (Drees P. та ін., *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.*, 3, 2007, сс. 165-171).

Індукований глюкокортикоїдами остеопороз (GIOP) являє собою ще одне показання, при якому інгібітор CSF-1R може попереджати втрату кісткової тканини після тривалого застосування глюкокортикоїдів, які використовують при різних станах, в тому числі при хронічному обструктивному захворюванні легень, астмі і ревматоїдному артриті (Guzman-Clark J.R. та ін., *Arthritis Rheum.*, 57, 2007, сс. 140-146; Feldstein A.C. та ін., *Osteoporos. Int.*, 16, 2005, сс. 2168-2174).

Ревматоїдний артрит, псоріатичний артрит і запальні артритиди самі є потенційними показаннями для застосування інгібіторів шляху передачі сигналів CSF-1R, оскільки одним з їх компонентів є макрофаги і для них характерний різний ступінь деструкції кісткової тканини (Ritchlin C.T. та ін., *J. Clin. Invest.*, 111, 2003, сс. 821-831). Остеоартрит і ревматоїдний артрит являють собою запальні аутоімунні захворювання, які викликаються накопиченням макрофагів в сполучній тканині і інфільтрацією макрофагів в синовіальну рідину, що принаймні частково опосередковується M-CSF. В статті Campbell I.K. та ін., *J. Leukoc. Biol.*, 68, 2000, сс. 144-150 продемонстровано, що M-CSF продукується клітинами суглобової тканини людини (хондроцити, синовіальні фібробласти) *in vitro* і присутній в синовіальній рідині пацієнтів, які страждають на ревматоїдний артрит, це дозволяє припустити його участь в проліферації в синовіальній рідині і інфільтрації макрофагів, що асоційовано з патогенезом захворювання. Інгібування передачі сигналів CSF-1R, ймовірно, дозволяє контролювати кількість макрофагів в суглобі і полегшує біль, пов'язаний з деструкцією кісткової тканини. Одним з шляхів мінімізації небажаних явищ і додаткового вивчення ролі передачі сигналів CSF-1R при таких показаннях є специфічне інгібування CSF-1R без впливу на множину інших кіназ, таких як Raf-кіназа.

В сучасній літературі описана кореляція між підвищеним рівнем М-CSF в кровотоку і паганим прогнозом і розвитком атеросклерозу при хронічній ішемічній хворобі серця (Saitoh T. та ін., J. Am. Coll. Cardiol., 35, 2000, сс. 655-665; Ikonomidis I. та ін., Eur. Heart. J., 26, 2005, сс. 1618-1624); М-CSF впливає на процес атеросклерозу, сприяючи утворенню пінистих клітин (макрофаги з захопленим окисненим ЛПНП), які експресують CSF-1R і являють собою початкову бляшку (Murayama T. та ін., Circulation, 99, 1999, сс. 1740-1746).

Експресія і передача сигналів М-CSF і CSF-1R виявлена в активованій мікроглії. Мікроглія, яка являє собою місцезнаходження макрофагів в центральній нервовій системі, може активуватися різними порушеннями, включаючи інфекцію і травматичне ушкодження. М-CSF розглядається як регулятор запальних відповідей в головному мозку, що має вирішальне значення, і рівні М-CSF підвищуються при ВІЛ-1, енцефаліті, хворобі Альцгеймера (AD) і опухлях головного мозку. Мікрогліози, які є результатом аутокринної передачі сигналів М-CSF/CSF-1R, призводять до індукції запальних цитокінів і вивільнення оксидів азоту, що продемонстровано наприклад, за допомогою експериментальної моделі нейронного ушкодження (Hao A.J. та ін., Neuroscience, 112, 2002, сс. 889-900; Murphy G.M. Jr. та ін., J. Biol. Chem., 273, 1998, сс. 20967-20971). Мікроглія, для якої характерні підвищені рівні експресії CSF-1R, виявлена в оточенні бляшок при AD і на створеній на трансгенних мишах, що несуть білок-попередник V717F, моделі AD (Murphy G.M. Jr. та ін., Am. J. Pathol., 157, 2000, сс. 895-904). З іншого боку, у мишей лінії op/op зі зниженим рівнем мікроглії в головному мозку є відкладення фібрил А-бета і втрата нейронів у порівнянні зі здоровими контрольними мишами, що дозволяє припустити, що мікроглія може виконувати нейрозахисну функцію, перешкоджаючи розвитку AD, яка відсутня у мишей лінії op/op (Kaku M. та ін., Brain Res. Brain Res. Protoc., 12, 2003, сс. 104-108).

Експресія і передача сигналів М-CSF і CSF-1R асоційовані з запальним захворюванням кишечника (IBD) (WO 2005/046657). Поняття "запальне захворювання кишечника" відноситься до серйозних хронічних порушень кишечного тракту, що відрізняється хронічним запаленням в різних зонах шлунково-кишкового тракту, і зокрема включає неспецифічний виразковий коліт (UC) і хворобу Крона.

Винахід відноситься до антитіла, яке зв'язується з людським CSF-1R, що відрізняється вищезазначеними особливостями зв'язування з епітопом або в іншому варіанті вищезазначеними амінокислотними послідовностями і фрагментами амінокислотних послідовностей, яке призначене для лікування раку.

Винахід відноситься до антитіла, яке зв'язується з людським CSF-1R, що відрізняється вищезазначеними особливостями зв'язування з епітопом або в іншому варіанті вищезазначеними амінокислотними послідовностями і фрагментами амінокислотних послідовностей, яке призначене для лікування втрати кісткової тканини.

Винахід відноситься до антитіла, яке зв'язується з людським CSF-1R, що відрізняється вищезазначеними особливостями зв'язування з епітопом або в іншому варіанті вищезазначеними амінокислотними послідовностями і фрагментами амінокислотних послідовностей, яке призначене для попередження або лікування метастазів.

Винахід відноситься до антитіла, яке зв'язується з людським CSF-1R, що відрізняється вищезазначеними особливостями зв'язування з епітопом або в іншому варіанті вищезазначеними амінокислотними послідовностями і фрагментами амінокислотних послідовностей, яке призначене для лікування запальних захворювань.

Винахід відноситься до застосування антитіла, яке зв'язується з людським CSF-1R, що відрізняється вищезазначеними особливостями зв'язування з епітопом або в іншому варіанті вищезазначеними амінокислотними послідовностями і фрагментами амінокислотних послідовностей, для лікування раку або в іншому варіанті для приготування лікарського засобу, призначеного для лікування раку.

Винахід відноситься до застосування антитіла, яке зв'язується з людським CSF-1R, що відрізняється вищезазначеними особливостями зв'язування з епітопом або в іншому варіанті вищезазначеними амінокислотними послідовностями і фрагментами амінокислотних послідовностей, для лікування втрати кісткової тканини або в іншому варіанті для приготування лікарського засобу, призначеного для лікування втрати кісткової тканини.

Винахід відноситься до застосування антитіла, яке зв'язується з людським CSF-1R, що відрізняється вищезазначеними особливостями зв'язування з епітопом або в іншому варіанті вищезазначеними амінокислотними послідовностями і фрагментами амінокислотних послідовностей, для попередження або лікування метастазів або в іншому варіанті для приготування лікарського засобу, призначеного для попередження або лікування метастазів.

Винахід відноситься до застосування антитіла, яке зв'язується з людським CSF-1R, що відрізняється вищезазначеними особливостями зв'язування з епітопом або в іншому варіанті вищезазначеними амінокислотними послідовностями і фрагментами амінокислотних послідовностей, для лікування запальних захворювань або в іншому варіанті для приготування

лікарського засобу, призначеного для лікування запальних захворювань.

Наступним варіантом здійснення винаходу є спосіб одержання запропонованого в винаході антитіла до CSF-1R, який відрізняється тим, що послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує важкий ланцюг людського антитіла класу IgG1, що зв'язується з людським CSF-1R, яка являє собою модифіковану нуклеїнову кислоту, і нуклеїнову кислоту, що кодує легкий ланцюг зазначеного антитіла, вбудовують в експресійний вектор, зазначений вектор вбудовують в еукаріотичну клітину-хазяїн, кодований білок експресують і виділяють з клітини-хазяїна або супернатанту.

Антитіла, запропоновані в винаході, краще одержують методами рекомбінації. Зазначені методи добре відомі в даній галузі і передбачають експресію білка в прокаріотичних і еукаріотичних клітинах з наступним виділенням поліпептиду антитіла і, як правило, очищенням до фармацевтично прийнятної чистоти. Для експресії білка нуклеїнові кислоти, які кодують легкі і важкі ланцюги або їх фрагменти, вбудовують в експресійні вектори за допомогою стандартних методів. Експресію здійснюють в прийнятних прокаріотичних або еукаріотичних клітинах-хазяїнах типу CHO-клітин, NS0-клітин, SP2/0-клітин, HEK293-клітин, COS-клітин, PER.C6-клітин, дріжджів або клітин *E.coli*, і антитіло виділяють з клітин (із супернатанту або клітин після лізису).

Рекомбінантне одержання антитіл добре відомо в даній галузі і описано, наприклад, в оглядових статтях Makrides S.C., *Protein Expr. Purif.*, 17, 1999, сс. 183-202; Geisse S. та ін., *Protein Expr. Purif.*, 8, 1996, сс. 271-282; Kaufman R.J., *Mol. Biotechnol.*, 16, 2000, сс. 151-161; Werner, R.G., *Drug Res.* 48, 1998, сс. 870-880.

Антитіла можуть бути присутні в цілих клітинах, в клітинному лізаті або в частково очищеній або практично очищеній формі. Очищення здійснюють для видалення інших клітинних компонентів або інших забруднювачів, наприклад, інших клітинних нуклеїнових кислот або білків, стандартними методами, які включають обробку лугом/ДЧН, CsCl-бендинг, хроматографію на колонках і інші методи, добре відомі в даній галузі (див. в *Current Protocols in Molecular Biology*, під ред. Ausubel F. та ін., вид-во Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, 1987).

Експресія в NS0-клітинах описана, наприклад, у Barnes L.M. та ін., *Cytotechnology* 32, 2000, сс. 109-123; і Barnes L.M. та ін., *Biotech. Bioeng.* 73, 2001, сс. 261-270. Короткочасна експресія описана, наприклад, у Durocher Y. та ін., *Nucl. Acids. Res.* 30, 2002, с. E9. Клонування варіабельних ділянок описано у Orlandi R. та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1989, сс. 3833-3837; Carter P. та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1992, сс. 4285-4289; і Norderhaug L. та ін., *J. Immunol. Methods* 204, 1997, сс. 77-87. Краща система короткочасної експресії (HEK 293) описана у Schlaeger E.-J. і Christensen K. в *Cytotechnology* 30, 1999, сс. 71-83 і у Schlaeger E.-J. в *J. Immunol. Methods* 194, 1996, сс. 191-199.

Молекули нуклеїнових кислот, які кодують варіанти амінокислотних послідовностей антитіла до CSF-1R, одержують різними методами, відомими в даній галузі. Ці методи включають (але не обмежуючись тільки ними) виділення з джерела, що зустрічається в природних умовах (у випадку варіантів амінокислотних послідовностей, що зустрічаються в природних умовах), або одержання за допомогою опосередкованого олігонуклеотидами (або сайтнаправленого) мутагенезу, ПЛР-мутагенезу і касетного мутагенезу раніше одержаної варіантної або неваріантної версії гуманізованого антитіла до CSF-1R.

Варіабельні ділянки важкого і легкого ланцюга, запропоновані в винаході, об'єднують з послідовностями промотора, ініціації трансляції, константної ділянки, з 3'-нетрансльовуваною послідовністю, послідовностями поліаденілювання і термінації транскрипції з одержанням конструкцій експресійних векторів. Конструкції для експресії важкого і легкого ланцюга можна об'єднувати в одному векторі, їх можна застосовувати для котрансфекції, серійної трансфекції або роздільної трансфекції клітин-хазяїнів, які потім можна зливати з одержанням індивідуальної клітини-хазяїна, яка експресує обидва ланцюга.

Наступним об'єктом даного винаходу є композиція, наприклад, фармацевтична композиція, що містить одне або комбінацію моноклональних антитіл або їх антигензв'язувальних ділянок, запропонованих в даному винаході, приготовлена разом з фармацевтично прийнятним носієм.

В контексті даного опису поняття "фармацевтично прийнятний носій" відноситься до будь-якого і до всіх розчинників, диспергуючих середовищ, покриттів, антибактеріальних і протигрибних агентів, агентів, що регулюють ізотонічність і уповільнюють абсорбцію/ресорбцію, і подібних речовин, які є фізіологічно сумісними. Краще носій повинен бути придатним для

ін'єкції або інфузії. Композицію, запропоновану в даному винаході, можна вводити різними методами, відомими в даній галузі. Як повинно бути очевидно спеціалісту в даній галузі, шлях і/або механізм введення повинен варіюватися залежно від потрібних результатів.

5 Фармацевтично прийнятні носії являють собою стерильні водні розчини або дисперсії і стерильні порошки, призначені для приготування стерильних ін'єктованих розчинів або дисперсій. Застосування зазначених середовищ і агентів для фармацевтичних діючих речовин відомо в даній галузі. Окрім води носій може являти собою, наприклад, ізотонічний забуферений фізіологічний розчин.

10 Незалежно від вибраного шляху введення сполуки, запропоновані в даному винаході, які можна застосовувати в прийнятній гідратованій формі, і/або фармацевтичні композиції, запропоновані в даному винаході, готують у вигляді фармацевтично прийнятних лікарських форм за допомогою загальноприйнятих методів, відомих спеціалістам в даній галузі.

15 Фактичні рівні доз діючих речовин в фармацевтичних композиціях, запропонованих в даному винаході, можуть варіюватися так, щоб одержувати кількість діючої речовини, яка є ефективною для одержання потрібної терапевтичної відповіді у конкретного пацієнта при використанні конкретної композиції і шляху введення, не будучи при цьому токсичними для пацієнта (ефективна кількість).

20 Вибраний рівень доз повинен залежати від різноманітних фармакокінетичних факторів, таких як активність конкретних застосованих композицій, запропонованих в даному винаході, або їх складних ефірів, солей або амідів, шлях введення, час введення, швидкість екскреції конкретної застосовної сполуки, інші лікарські засоби, сполуки і/або матеріали, застосовні разом з конкретними композиціями, вік, стать, вага, загальний стан здоров'я і попередня історія хвороби пацієнта, який підлягає лікуванню, і подібних факторів, які добре відомі в медицині.

25 Винахід відноситься також до застосування антитіл, запропонованих в винаході, для лікування пацієнта, що страждає на рак, насамперед рак ободової кишки, легені або підшлункової залози.

Винахід відноситься також до способу лікування пацієнта, що страждає на зазначене захворювання.

30 В винаході запропонований також спосіб приготування фармацевтичної композиції, яка містить антитіло, запропоноване в винаході, в ефективній кількості разом з фармацевтично прийнятним носієм, і застосування антитіла, запропонованого в винаході, в такому способі.

Винахід відноситься також до застосування антитіла, запропонованого в винаході, в ефективній кількості для приготування фармацевтичного агента, краще разом з фармацевтично прийнятним носієм, призначеного для лікування пацієнта, що страждає на рак.

35 Винахід відноситься також до застосування антитіла, запропонованого в винаході, в ефективній кількості для приготування фармацевтичного агента, краще разом з фармацевтично прийнятним носієм, призначеного для лікування пацієнта, що страждає на рак.

40 Представлені нижче приклади, перелік послідовностей і креслення надані з метою кращого розуміння даного винаходу, істинний обсяг якого викладений в формулі винаходу, що додається. Очевидно, що можна здійснювати модифікації в викладених процедурах без відхилень від суті винаходу.

Опис послідовностей

SEQ ID NO: 1 CDR3 важкого ланцюга, МАт 2F11

SEQ ID NO: 2 CDR2 важкого ланцюга, МАт 2F11

45 SEQ ID NO: 3 CDR1 важкого ланцюга, МАт 2F11

SEQ ID NO: 4 CDR3 легкого ланцюга, МАт 2F11

SEQ ID NO: 5 CDR2 легкого ланцюга, МАт 2F11

SEQ ID NO: 6 CDR1 легкого ланцюга, МАт 2F11

SEQ ID NO: 7 варіабельна ділянка важкого ланцюга, МАт 2F11

50 SEQ ID NO: 8 варіабельна ділянка легкого ланцюга, МАт 2F11

SEQ ID NO: 9 CDR3 важкого ланцюга, МАт 2E10

SEQ ID NO: 10 CDR2 важкого ланцюга, МАт 2E10

SEQ ID NO: 11 CDR1 важкого ланцюга, МАт 2E10

SEQ ID NO: 12 CDR3 легкого ланцюга, МАт 2E10

55 SEQ ID NO: 13 CDR2 легкого ланцюга, МАт 2E10

SEQ ID NO: 14 CDR1 легкого ланцюга, МАт 2E10

SEQ ID NO: 15 варіабельна ділянка важкого ланцюга, МАт 2E10

SEQ ID NO: 16 варіабельна ділянка легкого ланцюга, МАт 2E10

SEQ ID NO: 17 CDR3 важкого ланцюга, hМАт 2F11-c11

60 SEQ ID NO: 18 CDR2 важкого ланцюга, hМАт 2F11-c11

SEQ ID NO: 19 CDR1 важкого ланцюга, hMAт 2F11-c11  
 SEQ ID NO: 20 CDR3 легкого ланцюга, hMAт 2F11-c11  
 SEQ ID NO: 21 CDR2 легкого ланцюга, hMAт 2F11-c11  
 SEQ ID NO: 22 CDR1 легкого ланцюга, hMAт 2F11-c11  
 5 SEQ ID NO: 23 варіабельна ділянка важкого ланцюга, hMAт 2F11-c11  
 SEQ ID NO: 24 варіабельна ділянка легкого ланцюга, hMAт 2F11-c11  
 SEQ ID NO: 25 CDR3 важкого ланцюга, hMAт 2F11-d8  
 SEQ ID NO: 26 CDR2 важкого ланцюга, hMAт 2F11-d8  
 SEQ ID NO: 27 CDR1 важкого ланцюга, hMAт 2F11-d8  
 10 SEQ ID NO: 28 CDR3 легкого ланцюга, hMAт 2F11-d8  
 SEQ ID NO: 29 CDR2 легкого ланцюга, hMAт 2F11-d8  
 SEQ ID NO: 30 CDR1 легкого ланцюга, hMAт 2F11-d8  
 SEQ ID NO: 31 варіабельна ділянка важкого ланцюга, hMAт 2F11-d8  
 SEQ ID NO: 32 варіабельна ділянка легкого ланцюга, hMAт 2F11-d8  
 15 SEQ ID NO: 33 CDR3 важкого ланцюга, hMAт 2F11-e7  
 SEQ ID NO: 34 CDR2 важкого ланцюга, hMAт 2F11-e7  
 SEQ ID NO: 35 CDR1 важкого ланцюга, hMAт 2F11-e7  
 SEQ ID NO: 36 CDR3 легкого ланцюга, hMAт 2F11-e7  
 SEQ ID NO: 37 CDR2 легкого ланцюга, hMAт 2F11-e7  
 20 SEQ ID NO: 38 CDR1 легкого ланцюга, hMAт 2F11-e7  
 SEQ ID NO: 39 варіабельна ділянка важкого ланцюга, hMAт 2F11-e7  
 SEQ ID NO: 40 варіабельна ділянка легкого ланцюга, hMAт 2F11-e7  
 SEQ ID NO: 41 CDR3 важкого ланцюга, hMAт 2F11-f12  
 SEQ ID NO: 42 CDR2 важкого ланцюга, hMAт 2F11-f12  
 25 SEQ ID NO: 43 CDR1 важкого ланцюга, hMAт 2F11-f12  
 SEQ ID NO: 44 CDR3 легкого ланцюга, hMAт 2F11-f12  
 SEQ ID NO: 45 CDR2 легкого ланцюга, hMAт 2F11-f12  
 SEQ ID NO: 46 CDR1 легкого ланцюга, hMAт 2F11-f12  
 SEQ ID NO: 47 варіабельна ділянка важкого ланцюга, hMAт 2F11-f12  
 30 SEQ ID NO: 48 варіабельна ділянка легкого ланцюга, hMAт 2F11-f12  
 SEQ ID NO: 49 CDR3 важкого ланцюга, hMAт 2F11-g1  
 SEQ ID NO: 50 CDR2 важкого ланцюга, hMAт 2F11-g1  
 SEQ ID NO: 51 CDR1 важкого ланцюга, hMAт 2F11-g1  
 SEQ ID NO: 52 CDR3 легкого ланцюга, hMAт 2F11-g1  
 35 SEQ ID NO: 53 CDR2 легкого ланцюга, hMAт 2F11-g1  
 SEQ ID NO: 54 CDR1 легкого ланцюга, hMAт 2F11-g1  
 SEQ ID NO: 55 варіабельна ділянка важкого ланцюга, hMAт 2F11-g1  
 SEQ ID NO: 56 варіабельна ділянка легкого ланцюга, hMAт 2F11-g1  
 SEQ ID NO: 57 константна ділянка людського легкого капа-ланцюга  
 40 SEQ ID NO: 58 константна ділянка людського важкого ланцюга, виведена з IgG1  
 SEQ ID NO: 59 константна ділянка людського важкого ланцюга, виведена з IgG1, з мутаціями L234A і L235A  
 SEQ ID NO: 60 константна ділянка людського важкого ланцюга, виведена з IgG4  
 SEQ ID NO: 61 константна ділянка людського важкого ланцюга, виведена з IgG4, з мутацією  
 45 S228P  
 SEQ ID NO: 62 людський CSF-1R дикого типу (wt CSF-1R)  
 SEQ ID NO: 63 людський CSF-1R з мутаціями L301S Y969F  
 SEQ ID NO: 64 позаклітинний домен людського CSF-1R  
 SEQ ID NO: 65 фрагмент людського CSF-1R delD4  
 50 SEQ ID NO: 66 фрагмент людського CSF-1R D1-D3  
 SEQ ID NO: 67 сигнальний пептид  
 SEQ ID NO: 68 праймер  
 SEQ ID NO: 69 CDR3 важкого ланцюга, МАт 1G10  
 SEQ ID NO: 70 CDR2 важкого ланцюга, МАт 1G10  
 55 SEQ ID NO: 71 CDR1 важкого ланцюга, МАт 1G10  
 SEQ ID NO: 72 CDR3 легкого ланцюга, МАт 1G10  
 SEQ ID NO: 73 CDR2 легкого ланцюга, МАт 1G10  
 SEQ ID NO: 74 CDR1 легкого ланцюга, МАт 1G10  
 SEQ ID NO: 75 варіабельна ділянка важкого ланцюга, МАт 1G10  
 60 SEQ ID NO: 76 варіабельна ділянка легкого ланцюга, МАт 1G10

SEQ ID NO: 77 CDR3 важкого ланцюга, МАт 2Н7

SEQ ID NO: 78 CDR2 важкого ланцюга, МАт 2Н7

SEQ ID NO: 79 CDR1 важкого ланцюга, МАт 2Н7

SEQ ID NO: 80 CDR3 легкого ланцюга, МАт 2Н7

5 SEQ ID NO: 81 CDR2 важкого ланцюга, МАт 2Н7

SEQ ID NO: 82 CDR1 важкого ланцюга, МАт 2Н7

SEQ ID NO: 83 варіабельна ділянка важкого ланцюга, МАт 2Н7

SEQ ID NO: 84 варіабельна ділянка легкого ланцюга, МАт 2Н7.

10 Представлені нижче приклади, перелік послідовностей і креслення надані з метою кращого розуміння даного винаходу, істинний обсяг якого викладений в формулі винаходу, що додається. Очевидно, що можна здійснювати модифікації в викладених процедурах без відхилення від суті винаходу.

Опис креслень

На кресленнях показано:

15 на фіг. 1 - дані про інгібування росту пухлинних клітин лінії BeWo у вигляді 3D-культури після обробки різними моноклональними антитілами до CSF-1R при їх застосуванні в концентрації 10 мкг/мл.

Вісь X: життєздатність, виражена у вигляді стандартизованих середніх відносних світлових одиниць (RLU), які відповідають вмісту АТФ в клітинах (CellTiterGlo-аналіз).

20 Вісь Y: досліджені зонди: мінімальне середовище (0,5 % сироватки плоду корови (FBS)), мишачий IgG1 (mIgG1, 10 мкг/мл), мишачий IgG2a (mIgG2a, 10 мкг/мл), тільки CSF-1, МАт 2F11, МАт 2E10, МАт2H7, МАт 1G10 і SC 2-4A5. Найбільш виражене інгібування індукованого CSF-1 росту виявлено при застосуванні антитіл до CSF-1R, запропонованих в винаході;

25 на фіг. 2a - сенсограми, одержані за допомогою Biacore-аналізу, які характеризують зв'язування різних антитіл до CSF-1R з імобілізованим фрагментом людського CSF-1R delD4 (який містить позаклітинні субдомени D1 -D3 і D5) (SEQ ID NO: 65) (на вісі y: сигнали, що характеризують зв'язування, у вигляді одиниць відповіді (RU), вихідний рівень відповідає 0 RU, на вісі x: час в секундах (с)): в той час як для антитіл МАт 3291 і sc 2-4A5 чітко продемонстровано зв'язування з зазначеним delD4-фрагментом, антитіла, запропоновані в винаході, наприклад МАт 2F11 і МАт 2E10, не зв'язувалися з фрагментом CSF-1R delD4. Контрольне антитіло до CCR5 m<CCR5>Pz03.1C5 також не зв'язувалося з фрагментом CSF-1R delD4;

30 на фіг. 2b - сенсограми, одержані за допомогою Biacore-аналізу, що характеризують зв'язування різних антитіл до CSF-1R з імобілізованим позаклітинним доменом людського CSF-1R (CSF-1R-ECD) (який містить позаклітинні субдомени D1-D5) (SEQ ID NO: 64) (на вісі y: сигнали, що характеризують зв'язування, у вигляді одиниць відповіді (RU), вихідний рівень відповідає 0 RU, на вісі x: час в секундах (с)): для всіх антитіл до CSF-1R виявлена здатність зв'язуватися з CSF-1R-ECD. Контрольне антитіло до CCR5 m<CCR5>Pz03.1C5 не зв'язувалося з CSF-1R-ECD;

40 на фіг. 2в: сенсограми, одержані за допомогою Biacore-аналізу, що характеризують зв'язування різних антитіл до CSF-1R з імобілізованим фрагментом людського CSF-1R delD4 (який містить позаклітинні субдомени D1-D3 і D5) (SEQ ID NO: 65) (на вісі y: сигнали, що характеризують зв'язування, у вигляді одиниць відповіді (RU), вихідний рівень відповідає 0 RU, на вісі x: час в секундах (с)): МАт 1G10, МАт 2H7 і гуманізоване антитіло hМАт 2F11-e7 не зв'язувалися з фрагментом CSF-1R delD4. Контрольне антитіло до CCR5 m<CCR5>Pz03.1C5 також не зв'язувалося з фрагментом CSF-1R delD4;

45 на фіг. 2г - сенсограми, одержані за допомогою Biacore-аналізу, що характеризують зв'язування різних антитіл до CSF-1R з імобілізованим позаклітинним доменом людського CSF-1R (CSF-1R-ECD) (який містить позаклітинні субдомени D1-D5) (SEQ ID NO: 64) (на вісі y: сигнали, що характеризують зв'язування, у вигляді одиниць відповіді (RU), вихідний рівень відповідає 0 RU, на вісі x: час в секундах (с)): для всіх антитіл до CSF-1R, таких як МАт 1G10, МАт 2H7 і гуманізоване антитіло hМАт 2F11-e7, виявлена здатність зв'язуватися з CSF-1R-ECD. Контрольне антитіло до CCR5 m<CCR5>Pz03.1C5 не зв'язувалося з CSF-1R-ECD;

50 на фіг. 2д: сенсограми, одержані за допомогою Biacore-аналізу, що характеризують зв'язування різних антитіл до CSF-1R з імобілізованим фрагментом людського CSF-1R delD4 (який містить позаклітинні субдомени D1-D3 і D5) (SEQ ID NO: 65) (на вісі y: сигнали, що характеризують зв'язування, у вигляді одиниць відповіді (RU), вихідний рівень відповідає 0 RU, на вісі x: час в секундах (с)): для всіх антитіл до CSF-1R, таких як 1.2.SM, CXIIIG6, ab10676 і МАт3291, виявлена здатність зв'язуватися з фрагментом CSF-1R. Контрольне антитіло до CCR5 m<CCR5>Pz03.1C5 також не зв'язувалося з фрагментом CSF-1R delD4;

на фіг. 2e - сенсограми, одержані за допомогою Biacore-аналізу, що характеризують зв'язування різних антитіл до CSF-1R з імобілізованим позаклітинним доменом людського CSF-1R (CSF-1R-ECD) (який містить позаклітинні субдомени D1-D5) (SEQ ID NO: 64) (на вісі y: сигнали, що характеризують зв'язування, у вигляді одиниць відповіді (RU), вихідний рівень

5 відповідає 0 RU, на вісі x: час в секундах (с)): для всіх антитіл до CSF-1R, виявлена здатність зв'язуватися з CSF-1R-ECD. Контрольне антитіло до CCR5 m<CCR5>Pz03.1C5 не зв'язувалося з CSF-1R-ECD;

на фіг. 3a-3г - дані про рівні CSF-1 у мавп циномологус після внесення в різних дозах антитіла до CSF-1R, запропонованого в винаході;

10 на фіг. 4 - дані про ефективність *in vivo* - інгібування росту пухлин антитілами до CSF-1R, запропонованими в винаході, при оцінці з використанням ксенотрансплантату раку молочної залози лінії BT20.

#### Приклад 1

Створення клітинної лінії гібридами, що продукує антитіла до CSF-1R

15 Процедура імунізації NMRI-мишей

NMRI-мишей імунізували з використанням експресійного вектора pDisplay™ (фірма Invitrogen, США), кодуючого позаклітинний домен huCSF-1R, шляхом електропорації. Кожну мишу імунізували 4 рази, використовуючи по 100 мкг ДНК. Коли титри в сироватці антитіл до huCSF-1R досягали достатнього рівня, мишей піддавали одній додатковій ревакцинації з

20 використанням 50 мкг суміші 1:1 химери huCSF-1R ECD/huCSF-1R ECDhuFc в 200 мкл 3ФР, яку вводили внутрішньовенно (*i.v.*) за 4 і 3 дні до здійснення злиття.

Специфічний для антигена ELISA

Титри антитіл до CSF-1R в сироватці імунізованих мишей визначали за допомогою специфічного для антигена ELISA.

25 0,3 мкг/мл химери huCSF-1R-huFc (розчинний позаклітинний домен) іммобілізували на сенсibiliзованому стрептавідином планшеті (MaxiSorb; фірма MicroCoat, Німеччина, каталоговий № 11974998/MC1099) за допомогою біотинильованого антитіла до Fc $\gamma$ , взятого в концентрації 0,1 мг/мл (фірма Jackson ImmunoResearch., каталоговий № 109-066-098), і додавали кон'югований з пероксидазою з хрину (HRP) F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент антимишачого IgG (фірма GE Healthcare, Великобританія, каталоговий №.NA9310V), розведений в співвідношенні 1/800 в 3ФР/0,05 % Твін 20/0,5 % БСА. Сироватку, одержану після електропорації, розводили в співвідношенні 1/40 в 3ФР/0,05 % Твін 20/0,5 % БА і серійно розводили аж до 1/1638400. Розведену сироватку вносили в лунки. Сироватку, взятую до здійснення електропорації, застосовували як негативного контролю. Серійні розведення мишачого антитіла до людського

30 CSF-1R MAT3291 (фірма R&D Systems, Великобританія) з концентрацією від 500 до 0,25 нг/мл застосовували як позитивний контроль. Всі компоненти інкубували разом протягом 1,5 год., лунки відмивали 6 разів 3ФРТ (3ФР/0,2 % Твін 20) і здійснювали аналізи з використанням свіжоприготовленого розчину ABTS® (1 мг/мл) (ABTS: 2,2'-азинобіс(3-етилбензтіазолін-6-сульфонові кислоти) протягом 10 хв при КТ. Абсорбцію вимірювали при довжині хвилі 405 нм.

40 Створення гібридом

Мишачі лімфоцити можна виділяти і зливати з клітинною лінією мишачої мієломи, використовуючи засновані на застосуванні ПЕГ стандартні протоколи, з одержанням гібридом. Потім одержані гібридами піддавали скринінгу по відношенню до виробництва антигенспецифічних антитіл. Наприклад, суспензії одиничних клітин спленоцитів, виведених з

45 лімфоцитів, які одержували з імунізованих мишей, зливали з несекретуючими Ag8 клітинами мишачої мієломи лінії P3  $\times$  63Ag8.653 (ATCC, CRL-1580) з використанням 50 % ПЕГ. Клітини висівали з щільністю приблизно  $10^4$  в пласкодонний 96-лунковий титраційний мікропланшет з наступною інкубацією протягом приблизно двох тижнів в селективному середовищі. Потім вміст індивідуальних лунок піддавали скринінгу за допомогою ELISA по відношенню до

50 моноклональних антитіл до CSF-1R типу IgM і IgG. На стадії інтенсивного росту гібридом секретуючі антитіла гібридами пересівали, знову піддавали скринінгу, і якщо вони ще були позитивними по відношенню до моноклональних антитіл до CSF-1R людського IgG-типу, то їх можна було субклонувати за допомогою FACS. Потім стабільні субклони культивували *in vitro* з одержанням антитіла в середовищі для культури тканини для характеристики. Антитіла, запропоновані в винаході, можна відбирати на основі оцінювання зв'язування антитіл до CSF-1R з фрагментом людського CSF-1R delD4 і з позаклітинним доменом людського CSF-1R (CSF-1R-ECD), відповідно до методу, описаного в прикладі 4, а також на основі оцінювання інгібування росту NIH3T3-клітин, трансфектованих CSF-1R дикого типу (залежна від ліганду передача сигналів) або мутантним CSF-1R L301S Y969F (не залежна від ліганду передача

55



сигналів) при обробці моноклональними антитілами до CSF-1R відповідно до методу, описаному в прикладі 5.

#### Культура гібридом

5 Продукуючи туМАт гібридами культивували в середовищі RPMI 1640 (фірма PAN, каталоговий № (кат. №) PO4-17500), доповненому 2мМ L-глутаміном (фірма GIBCO, кат. № 35050-038), 1мМ Na-піруватом (фірма GIBCO, кат. №.11360-039), 1× NEAA (фірма GIBCO, кат. №. 1140-035), 10 % FCS (фірма PAA, кат. № A15-649), 1× Pen Strep (пеніцилін-стрептоміцин) (фірма Roche, кат. №.1074440), 1× Nutridoma-CS (фірма Roche, кат. №1363743), 50мкМ меркаптоетанолом (фірма GIBCO, кат. № 31350-010) і 50 од./мл мишачого IL 6 (фірма Roche, кат. №1 444 581), при 37°C і 5 % CO<sub>2</sub>. Деякі з утворених мишачих антитіл гуманізували (наприклад, МАт 2F11) і експресували рекомбінантно.

#### Приклад 2

##### Інгібування зв'язування CSF-1 з CSF-1R (ELISA)

15 При проведенні зазначеного аналізу насамперед здійснювали зв'язування антитіла до CSF-1R з CSF-1R-ECD, після чого шляхом виявлення ліганду, не зв'язаного з рецептором, можна було оцінювати як антитіла, які розпізнають ліганд, так і антитіла до CSF-1R, які є інгібіторами димеризації. Аналіз здійснювали на 384-лункових титраційних мікропланшетах (фірма MicroCoat, Німеччина, кат. № 464718) при КТ. Після кожної стадії інкубації планшети відмивали тричі 3ФРТ.

20 Насамперед планшети сенсibiliзували за допомогою козячого біотинільованого F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента антитіла до Fcγ (фірма Jackson ImmunoResearch., кат. № 109-006-170) в концентрації 0,5 мг/мл протягом 1 год. (ч).

25 Потім лунки блокували за допомогою 3ФР, доповненого 0,2 % Tween®-20 і 2 % BCA (фірма Roche Diagnostics GmbH, Німеччина), протягом 0,5 год. Химеру huCSF-1R-huFc (75 нг/мл) (яка утворювала димерний розчинний позаклітинний домен huCSF-1R) іммобілізували на планшеті протягом 1 год. Потім розведення очищених антитіл в 3ФР/0,05 % Твін 20/0,5 % BCA інкубували протягом 1 год. Після додавання суміші, що містить 3 нг/мл CSF-1 (фірма Biomol, Німеччина, кат. №.60530), 50 нг/мл біотинільованого клону антитіла до CSF-1 BAF216 (фірма R&D Systems, Великобританія) і розведеного в співвідношенні 1:5000 кон'югату стрептавідину і HRP (фірма Roche Diagnostics GmbH, Німеччина, кат. №11089153001), і витримували протягом 1 год. планшети відмивали 6 разів 3ФРТ. Антитіло до CSF-1R SC 2-4A5 (фірма Santa Cruz Biotechnology, США), яке інгібує взаємодію ліганд-рецептор, застосовували як позитивний контроль. Планшети обробляли свіжоприготовленим розчином субстрату BM blue® POD (BM blue®: 3,3'-5,5'-тетраметилбензидин, фірма Roche Diagnostics GmbH, Німеччина, кат. № 11484281001) протягом 30 хв при КТ. Абсорбцію вимірювали при довжині хвилі 370 нм. Виявляли зниження абсорбції, якщо антитіло до CSF-1R викликало вивільнення CSF-1 з димерного комплексу. Всі антитіла до CSF-1R викликали виражене інгібування взаємодії CSF-1 з CSF-1R (див. таблицю 1). Антитіло до CSF-1R SC 2-4A5 (фірма Santa Cruz Biotechnology, США, див. також у Sherr C.J. та ін., Blood, 73, 1989, сс. 1786-1793), яке інгібує взаємодію ліганд-рецептор, застосовували як референс-контроль.

Таблиця 1

Розраховані значення IC<sub>50</sub>, що характеризують інгібування взаємодії CSF-1/CSF-1R

МАт до CSF-1R	Значення IC <sub>50</sub> , що характеризують інгібування CSF-1/CSF-1R [нг/мл]
МАт 2F11	19,3
МАт 2E10	20,6
МАт 2H7	18,2
МАт 1G10	11,8
SC-2-4A5	35,2

#### Приклад 3

45 Інгібування індукованого CSF-1 фосфорилування CSF-1R в рекомбінантних клітинах лінії NIH3T3-CSF-1R

4,5×10<sup>3</sup> клітин лінії NIH 3T3, заражених ретровірусним експресійним вектором, що несе повнорозмірний CSF-1R, культивували в середовищі DMEM (фірма PAA, кат. № E15-011), доповненому 2мМ L-глутаміном (фірма Sigma, кат. № G7513), 2мМ піруватом натрію, 1×замінними амінокислотами, 10 % FKS (фірма PAA, кат. № A15-649) і 100 мкг/мл PenStrep

- (фірма Sigma, кат. № P4333 (10 мг/мл)), до досягнення конфлюентності. Потім клітини відмивали безсироватковим середовищем DMEM (фірма PAA кат. № 15-011), доповненим селенітом натрію (5 нг/мл) (фірма Sigma, кат. № S9133), трансферином (10 мкг/мл) (фірма Sigma, кат. № T8158), БСА (400 мкг/мл) (фірма Roche Diagnostics GmbH, кат. № 10735078), 4мМ L-глутаміном (фірма Sigma, кат. №G7513), 2мМ піруватом натрію (фірма Gibco, кат. № 11360), 1×замінними амінокислотами (фірма Gibco, кат. № 11140-035), 2-меркаптоетанолом (0,05мМ) (фірма Merck, кат. № M7522), 100 мкг/мл PenStrep (фірма Sigma, кат. № P4333), і інкубували в 30 мкл цього середовища протягом 16 год., в результаті чого відбувалася підвищуюча регуляція рецептора. До клітин додавали 10 мкл розведених антитіл до CSF-1R протягом 1,5 год. Потім клітини стимулювали за допомогою 10 мкл (концентрація 100 нг/мл) huM-CSF-1 (фірма Biomol, кат. №60530) протягом 5 хв. Після інкубації супернатант удаляли, клітини відмивали двічі 80 мкл охолодженого на льоду 3ФР і додавали 50 мкл свіжоприготовленого охолодженого на льоду буфера для лізису (150мМ NaCl/ 20мМ Трис, рН 7,5/1мМ ЕДТК/1мМ ЕГТК/1 % Тритон X-100/1 таблетка інгібітора протеаз (фірма Roche Diagnostics GmbH, кат. №1 836 170) на 10 мл буфера 10 мкл/мл/коктейль інгібіторів фосфатаз 1 (фірма Sigma, кат. № P-2850, 100× маточний розчин)/10 мкл/мл інгібітора протеаз 1 (фірма Sigma, кат. №P-5726, 100× маточний розчин)/10 мкл/мл 1М NaF). Після витримування протягом 30 хв на льоду планшети інтенсивно струшували на шейкері для планшетів протягом 3 хв і потім центрифугували протягом 10 хв при 2200 об/хв (тип Heraeus Megafuge 10).
- Присутність фосфорильованого рецептора CSF-1 і загальну кількість рецепторів аналізували за допомогою ELISA. Для виявлення фосфорильованого рецептора застосовували набір фірми R&D Systems (кат. № DYC3268-2) відповідно до інструкцій постачальника. Для виявлення загальної кількості рецептора CSF-1R 10 мкл лізату іммобілізували на планшеті за допомогою захватного антитіла, яке входить в набір. Потім додавали розведене в співвідношенні 1:750 біотинільоване антитіло до CSF-1R BAF329 (фірма R&D Systems) і розведений в співвідношенні 1:1000 кон'югат стрептавідин-HRP. Через 60 хв планшети обробляли свіжоприготовленим розчином ABTS® і визначали абсорбцію. Дані розраховували у вигляді % відносно позитивного контролю без антитіла і виражали у вигляді співвідношення: кількість фосфорильованого рецептора/загальна кількість рецептора. Як негативний контроль використовували варіант без додавання M-CSF-1. Антитіло до CSF-1R SC 2-4A5 (фірма Santa Cruz Biotechnology, США, див. також Sherr C.J. та ін., Blood, 73, 1989, сс. 1786-1793), яке інгібує взаємодію ліганд-рецептор, застосовували як референс-контроль.

Таблиця 2

Розраховані значення IC<sub>50</sub>, що характеризують інгібування фосфорилування рецептора CSF-1

МАт до CSF-1R	Значення IC <sub>50</sub> , що характеризують інгібування фосфорилування CSF-1R [нг/мл]
МАт 2F11	219,4
МАт 2E10	752,0
МАт 2H7	703,4
МАт 1G10	56,6
SC-2-4A5	1006,6

#### 35 Приклад 4

Оцінювання зв'язування антитіл до CSF-1R з фрагментом людського CSF-1R delD4 і з позаклітинним доменом людського CSF-1R (CSF-1R-ECD)

Одержання позаклітинного домена людського CSF-1R (CSF-1R-ECD) (який містить позаклітинні субдомени D1-D5, hCSF-1R-ECD), послідовність якого представлена в SEQ ID NO: 64:

Плазмідна pCMV-preS-Fc-hCSF-1R-ECD (7836 пар основ) кодує повний ECD людського CSF-1R (SEQ ID NO: 64), злитий на C-кінці з сайтом розщеплення протеазою PreScission, за яким розташований людський IgG1, що складається з амінокислот 100-330, і мітка 6×His, під контролем промотора CMV. Сигнальний пептид, що зустрічається в природних умовах, змінювали шляхом інсерції амінокислот G і S після першого M для створення сайту рестрикції BamHI.

Одержання фрагмента людського CSF-1R delD4 (який містить позаклітинні субдомени D1 - D3 і D5, hCSF-1R-delD4), послідовність якого представлена в SEQ ID NO: 65:

hCSF1R-delD4-V1-PreSc-hFc-His клонували з плазмиди pCMV-preS-Fc-hCSF-1R-ECD відповідно до протоколу сайтнаправленого мутагенезу QuikChange XL фірми Stratagene, використовуючи delD4-for, який має послідовність CACCTCCATGTTCTTCCGGTACCCCCCAGAGGTAAG (SEQ ID NO: 68) як "прямий" праймер і delD4-rev, який має зворотну комплементарну послідовність, як "зворотний" праймер. Перед здійсненням звичайного протоколу фірми Stratagene застосовували варіант протоколу, опублікований в BioTechniques, 26, 1999, с. 680, для видовжування обох праймерів в окремих реакціях з здійсненням трьох циклів:

Готували дві різні реакційні суміші об'ємом 50 мкл відповідно до керівництва виробника, кожна з яких містила 10 нг плазмиди pCMV-preS-Fc-hCSF1R-ECD як матриці і 10пМ один з праймерів delD4-for або delD4-rev і 0,5 мкл ДНК-полімерази Pfu, що входить в набір. Здійснювали три ПЛР-цикли (95°C 30 с/55°C 60 с/68°C 8 хв), після чого по 25 мкл кожної з двох реакційних сумішей об'єднували в новій пробірці і додавали 0,5 мкл свіжоприготовленої ДНК-полімерази Pfu. Здійснювали звичайний ПЛР-протокол, який передбачає застосування 18 температурних циклів відповідно до керівництва з застосування набору фірми Stratagene з наступним кінцевим розщепленням протягом 2 год. за допомогою рестриктази Dpn1, що входить в набір. Клони з делецією виявляли шляхом розщеплення за допомогою Cel II і Not I і підтверджували секвенуванням.

Для одержання білка здійснювали короточасну трансфекцію системи суспензійних клітин Hek293 FreeStyle (фірма Invitrogen) відповідно до специфікації виробника. Через 1 тиждень 500 мл супернатанту відфільтровували і вносили в 1-мілілітрову колонку HiTrap MabSelect Xtra (фірма GE healthcare), заповнену білком А (0,2 мл/хв). Колонку відмивали спочатку 3ФР, потім 50мМ Трис/150мМ NaCl/1мМ ЕДТК/рН 7,3. В колонку вносили 75 мкл протеази PreScission (фірма GE, кат. № 27-0843-01), розведеної в 375 мкл такого ж буфера, і закрити колонку інкубували протягом ночі при 4°C з обертанням. Колонку поміщали на верхню частину 1-мілілітрової колонки GSTrap FF (фірма GE healthcare) і потрібний білок елюювали (0,2 мл/хв, фракції об'ємом 0,2 мл). Об'єднані фракції концентрували, знижуючи об'єм з 1,8 мл до 0,4 мл шляхом центрифужної ультрафільтрації з використанням пристрою 3k Nanosep і хроматографували за допомогою пристрою для гель-фільтрації S200 HR в 3ФР (0,5 мл/хв).

Фрагмент людського CSF-1R delD4 одержували у вигляді двох фракцій у вигляді димерної молекули (пул 1, V=1,5 мл; c=0,30 мг/мл; уявна маса за даними ДСН-ПААГ 83 кДа, в відновлювальних умовах 62 кДа), і у вигляді мономеру (пул 2, V=1,4 мл; c=0,25 мг/мл уявна маса за даними ДСН-ПААГ 62 кДа). В усіх експериментах застосовували димерну форму.

Оцінювання зв'язування антитіл до CSF-1R з фрагментом людського CSF-1R delD4 і з позаклітинним доменом людського CSF-1R (CSF-1R-ECD)

(сигнали зв'язування у вигляді одиниць відповіді (RU):

Пристрій: Biacore T100 (фірма GE Healthcare), програма: T100 Control, версія 2.0.1, T100 Evaluation, версія 2.0.2,

формат аналізу чип: CM5,

температура: 25 °C.

CSF-1R-фрагмент іммобілізували за допомогою амінного сполучення. Для порівняння зв'язування різних антитіл до CSF-1R, запропонованих в винаході, тестоване антитіло ін'єкціювали в одній концентрації. Антитіла до CSF-1R МАт3291 (фірма R&D-Systems) і SC 2-4A5 (фірма Santa Cruz Biotechnology, США, див. також Sherr C.J. та ін., Blood, 73, 1989, сс. 1786-1793) застосовували як референс-контроль, антитіло до CCR5 m<CCR5>Pz03.1C5 (депоновано під номером DSM ACC 2683 18.08.2004 г в DSMZ) застосовували як негативний контроль, всі ці антитіла застосовували в таких же умовах, що і антитіла до CSF-1R, запропоновані в винаході.

Амінне сполучення CSF-1R-фрагментів

Застосовували стандартний метод амінного сполучення відповідно до інструкцій виробника: рухливий буфер: 3ФР-Т (фірма Roche, кат. № 11 666 789+0,05 % Твін20, кат. № 11 332 465), активація за допомогою суміші EDC/NHS, ін'єкція фрагмента людського CSF-1R delD4 (який містить позаклітинні субдомени D1-D3 і D5) (SEQ ID NO: 65) і позаклітинного домена людського CSF-1R (CSF-1R-ECD) (який містить позаклітинні субдомени D1 -D5) (SEQ ID NO: 64) протягом 600 с при швидкості потоку 10 мкл/хв; розведення в буфері для сполучення NaAc, рН 5,0, c=10 мкг/мл; активовані карбоксильні групи, які залишилися в кінці блокували шляхом ін'єкції 1М етаноламіну.

Зв'язування <CSF-1R> МАт 2F11, МАт 2E10, МАт 3291 і sc2-4A5 і інших антитіл до CSF-1R з фрагментом людського CSF-1R delD4 і позаклітинним доменом людського CSF-1R (CSF-1R-ECD) при 25 °C

Рухливий буфер: 3ФР-Т (фірма Roche, кат. № 11 666 789+0,05 % Твін20, кат. №11 332 465),

Аналізований зразок:

Зв'язування оцінювали при швидкості потоку 30 мкл/хв за допомогою однієї ін'єкції аналізованого зразка в концентрації (с), що становила 10нМ (для МАт 1G10, МАт 2H7 і гуманізованого hМАт 2F11-e7 в другому експерименті), Тривалість кожної ін'єкції становила 700 с, тривалість наступної фази дисоціації 180 с. Кінцеву стадію регенерації здійснювали після кожного циклу за допомогою 50мМ NaOH, тривалість контакту 60 с, швидкість потоку 30 мкл/хв.

Сигнали оцінювали в певній призначеній для вимірювання точці через 10 с після закінчення ін'єкції. Референс-сигнали (сигнали від пустої проточної референс-комірки (яку обробляли тільки EDC/NHS і етаноламіном) вираховували з одержанням сигналів зв'язування (у виді RU). Якщо сигнали зв'язування незв'язуваних антитіл були трохи нижче нуля 0 (МАт 2F11 = -3; МАт 2E10 = -2; МАт 1G10 = - 6, МАт 2H7 = -9; і гуманізоване hМАт 2F11-e7 = -7), то значення приймали за нуль.

Таблиця 3а

Зв'язування <CSF-1R> МАт до людського фрагмента CSF-1R delD4 і CSF-1R-ECD і співвідношення при 25 °С, оцінене за допомогою SPR

	Зв'язування з delD4 [RU]	Зв'язування з CSF-1R-ECD [RU]	Співвідношення зв'язування антитіл до CSF-1R з фрагментом CSF-1R delD4/CSF-1R- ECD
МАт 3291	1015	627	1015/627=1,61
sc2-4A5	374	249	374/249=1,50
МАт 2F11	0	176	0/176=0
hМАт 2F11-e7	0	237	0/237=0
МАт 2E10	0	120	0/120=0
МАт 1G10	0	2708	0/2708=0
МАт 2H7	0	147	0/147=0
M<CCR5>Pz03.1C5	2	5	-

У МАт 2F11 і МАт 2E10 виявлена здатність зв'язуватися з позаклітинним доменом людського CSF-1R (CSF-1R-ECD) (див. фіг. 2б); але відсутність здатності зв'язуватися з фрагментом CSF-1R delD4 (див. фіг. 2а).

У Sc2-4A5 і МАт 3291 виявлена здатність зв'язуватися і з CSF-1R-ECD, і з del D4 (див. фіг. 2б і 2а).

Таким чином, співвідношення зв'язування з фрагментом CSF-1R delD4/CSF-1R-ECD антитіл до CSF-1R МАт 2F11 і МАт 2E10 помітно нижче ніж 1:50 (= 0,02), в той час як співвідношення зв'язування МАт 3291 і Sc2-e4A5 становило 1,61 і 1,50 відповідно і істотно перевищувало 1:50 (= 0,02). У застосовного як негативний контроль антитіла m<CCR5>Pz03.1C5 не виявлено жодної здатності зв'язуватися (як і очікувалося).

У МАт 1G10, МАт 2H7 і гуманізованого hМАт 2F11-e7 виявлена здатність зв'язуватися з позаклітинним доменом людського CSF-1R (CSF-1R-ECD) (див. фіг. 2г); але не виявлена здатність зв'язуватися з фрагментом CSF-1R delD4 (див. фіг. 2в). Таким чином, співвідношення зв'язування з фрагментом CSF-1R delD4/CSF-1R-ECD антитіл до CSF-1R МАт 1G10, МАт 2H7 і гуманізованого hМАт 2F11-e7 помітно нижче ніж 1:50 (= 0,02).

В іншому експерименті вивчали антитіла до CSF-1R 1,2.SM (лігандзаміщаюче антитіло до CSF-1R, описане в WO 2009/026303), CXIIIG6 (лігандзаміщаюче антитіло до CSF-1R, описане в WO 2009/112245), козяче поліклональне антитіло до CSF-1R ab10676 (фірма Abcam). Антитіло до CSF-1R МАт 3291 (фірма R&D-Systems) використовували як референс-контроль. Антитіло до CCR5 m<CCR5>Pz03.1C5 (депоновано під номером DSM ACC 2683 18.08.2004 г в DSMZ) застосовували як негативний контроль.

Таблиця 36

Зв'язування <CSF-1R> МАт до людського фрагмента CSF-1R delD4 і CSF-1R-ECD  
і співвідношення при 25 °С, оцінене за допомогою SPR

	Зв'язування з delD4 [RU]	Зв'язування з CSF-1R-ECD [RU]	Співвідношення зв'язування антитіл до CSF-1R з фрагментом CSF-1R delD4/CSF-1R-ECD
MAT3291	1790	1222	1790/1222=1,47
1.2.SM	469	704	469/704=0,67
CXIIIG6	1983	1356	1983/1356=1,46
ab10676	787	547	787/547=1,44
m<CCR5>Pz03.1C5	0	0	-

У антитіл 1.2.SM, CXIIIG6, ab10676 і МАт 3291 виявлена здатність зв'язуватися і з CSF-1R-ECD, і з del D4 (див. фіг. 2e і 2e).

- 5 Співвідношення зв'язування 1.2.SM, CXIIIG6, ab10676 і МАт 3291 істотно перевищувало 1:50 (= 0,02). У застосовного як негативний контроль антитіла m<CCR5>Pz03.1C5 не виявлено жодної здатності зв'язуватися (як і очікувалося).

#### Приклад 5

- 10 Інгібування росту рекомбінантних клітин NIH3T3-CSF-1R в 3D-культурі шляхом обробки моноклональними антитілами до CSF-1R (CellTiterGlo-аналіз)

- Клітини лінії NIH 3T3, заражені за допомогою ретровіруса або експресійним вектором повнорозмірного CSF-1R (SEQ ID NO: 62), або мутантом CSF-1R L301S Y969F (SEQ ID NO: 63), культивували в середовищі DMEM з високим вмістом глюкози (фірма PAA, Пашинг, Австрія), доповненої 2мМ L-глутаміном, 2мМ піруватом натрію і замінними амінокислотами, 10 % фетальної бичої сироватки (фірма Sigma, Тауфкірхен, Німеччина), в сенсibiliзованих полі-HEMA (полі(2-гідроксietилметакрилат)) (фірма Polysciences, Уорингтон, шт. Пенсильванія, США) чашках для попередження прилипання до пластикової поверхні. Клітини висівали в середовище, в якому сироватку заміняли на селеніт натрію (5 нг/мл), трансферин (10 мг/мл), БСА (400 мкг/мл) і 2-меркаптоетанол (0,05мМ). При обробці 100 нг/мл huCSF-1 (фірма Biomol, Гамбург, Німеччина) експресуючі wtCSF-1R клітини формували щільні сфероїди, які росли в трьох напрямках, властивість, яку називають відсутністю залежності від прикріплення. Ці сфероїди in situ дуже нагадували за їхньою трьохмірною будовою і організацією щільні пухлини. Рекомбінантні клітини, що несуть мутантний CSF-1R мали здатність утворювати сфероїди незалежно від ліганду CSF-1. Сфероїдні культури інкубували протягом 3 днів в присутності антитіла в різних концентраціях для визначення значень IC<sub>50</sub> (концентрація, при якій життєздатність клітин інгібувалася на 50 %). CellTiterGlo-аналіз застосовували для оцінювання життєздатності шляхом вимірювання вмісту АТФ в клітинах.

Таблиця 5а

МАт до CSF-1R	wtCSF-1R, IC <sub>50</sub> [мкг/мл]	Мутантний CSF-1R, IC <sub>50</sub> [мкг/мл]
МАт 2F11	1,1	8,0
МАт 2E10	0,49	4,9
МАт 2H7	0,31	5,3
МАт 1G10	0,29	14,2
SC 2-4A5	10,0	10,0

- 30 У застосовного як референс-контроль МАт фірми R&D-Systems 3291 не виявлена здатність інгібувати проліферцію рекомбінантних клітин, що несуть мутант CSF-1R.

- 35 В іншому експерименті вивчали антитіло до CSF-1R, запропоноване в винаході, таке як hМАт 2F11-e7, і антитіла до CSF-1R 1.2.SM (лігандзаміщаюче антитіло до CSF-1R, описане в WO 2009/026303), CXIIIG6 (лігандзаміщаюче антитіло до CSF-1R, описане в WO 2009/112245), козяче поліклональне антитіло до CSF-1R ab10676 (фірма Abcam) і SC 2-4A5 (фірма Santa Cruz Biotechnology, США, див. також Sherr C.J. та ін., Blood, 73, 1989, сс. 1786-1793).

Сфероїдні культури інкубували протягом 3 днів в присутності антитіла в різних концентраціях для визначення значень  $IC_{30}$  (концентрація, при якій життєздатність клітин інгібувалися на 30 %). Максимальна концентрація становила 20 мкг/мл. CellTiterGlo-аналіз застосовували для оцінювання життєздатності шляхом вимірювання вмісту АТФ в клітинах.

5

Таблиця 56

МАт до CSF-1R	wtCSF-1R, $IC_{30}$ [мкг/мл]	Мутант CSF-1R, $IC_{30}$ [мкг/мл]
hМАт 2F11-e7	4,91	0,54
1.2.SM	1,19	> 20 мкг/мл (-19 %-не інгібування при 20 мкг/мл = 19 %-не стимулювання)
CXIIIG6	> 20 мкг/мл (21 %-не інгібування при 20 мкг/мл)	> 20 мкг/мл (-36 %-не інгібування при 20 мкг/мл = 36 %-не стимулювання)
ab10676	14,15	> 20 мкг/мл (0 % інгібування при 20 мкг/мл)
SC 2-4A5	16,62	2,56

## Приклад 6

Інгібування росту пухлинних клітин лінії BeWo в 3D-культурі шляхом обробки моноклональними антитілами до CSF-1R (CellTiterGlo-аналіз)

10 Клітини хоріокарциноми лінії BeWo (ATCC CCL-98) культивували в середовищі F12K (фірма Sigma, Штайнхайм, Німеччина), доповненому 10 % FBS (фірма Sigma) і 2мМ L-глутаміном. Висівали по  $5 \times 10^4$  клітин/лунку в 96-лункові, сенсibiliзовані полі-HEMA (полі(2-гідроксietилметакрилат)) планшети, які містили середовище F12K, доповнене 0,5 % FBS і 5 %

15 БСА. Потім додавали в концентрації 200 нг/мл huCSF-1 і в концентрації 10 мкг/мл різні моноклональні антитіла до CSF-1R і інкубували протягом 6 днів. CellTiterGlo-аналіз застосовували для оцінювання життєздатності шляхом вимірювання вмісту АТФ в клітинах, який виражали в відносних світлових одиницях (RLU). При обробці культур BeWo, що мають форму сфероїдів, різними антитілами до CSF-1R (10 мкг/мл), було виявлено інгібування індукованого CSF-1 росту. Для оцінювання опосередкованого антитілом інгібування середнє значення RLU

20 для нестимульованих BeWo-клітин вираховували з значень, одержаних для всіх зразків. Середні значення RLU клітин, стимульованих CSF-1, приймали за 100 %. Середні значення RLU клітин, стимульованих CSF-1 і оброблених антитілами до CSF-1R, розраховували у вигляді % по відношенню до RLU, одержаних при стимуляції CSF-1. В таблиці 6 представлені розрахункові дані інгібування росту пухлинних клітин лінії BeWo в 3D-культурі після обробки

25 моноклональними антитілами до CSF-1R; на фіг. 1а і б представлені стандартизовані середні значення RLU.

Таблиця 6

МАт до CSF-1R	% інгібування при застосуванні антитіла в концентрації 10 мкг/мл
тільки CSF-1	0
МАт 2F11	70
МАт 2E10	102
МАт 2H7	103
МАт 1G10	99
SC 2-4A5	39

## Приклад 7

30 Інгібування диференціації людських макрофагів шляхом обробки моноклональними антитілами до CSF-1R (CellTiterGlo-аналіз)

Людські моноцити виділяли з периферичної крові за допомогою збагаченого коктейлю людських моноцитів RosetteSep<sup>TM</sup> (фірма StemCell Tech., кат. № 15028). Збагачені популяції моноцитів висівали в 96-лункові титраційні мікропланшети ( $2,5 \times 10^4$  клітин/лунку) в 100 мкл середовища RPMI 1640 (фірма Gibco, кат. № 31870), доповненого 10 % FCS (фірма GIBCO, кат. № 011-090014M), 4мМ L-глутаміном (фірма GIBCO, кат. № 25030) і 1× PenStrep (фірма Roche, кат. № 1 074 440), при 37 °C і 5 % CO<sub>2</sub> в зволоженій атмосфері. При додаванні в середовище huCSF-1 в концентрації 150 нг/мл можна було виявити виражену диференціацію з

перетворенням в прикріплені макрофаги. Цю диференціацію можна інгібувати, додаючи антитіла до CSF-1R. Крім того, був виявлений вплив на виживання моноцитів, який можна аналізувати за допомогою CellTiterGlo (CTG)-аналізу. На основі залежного від концентрації інгібування виживання моноцитів при обробці антитілами розраховували значення  $IC_{50}$  (див. таблицю 7).

Таблиця 7

МАТ до CSF-1R	$IC_{50}$ [мкг/мл]
МАТ 2F11	0,08
МАТ 2E10	0,06
МАТ 2H7	0,03
МАТ 1G10	0,06
SC 2-4A5	0,36

При дослідженні різних гуманізованих версій МАТ 2 F11, наприклад, hМАТ 2F11-c11, hМАТ 2F11-d8, hМАТ 2F11-e7, hМАТ 2F11-f12, виявлені значення  $IC_{50}$ , що становлять 0,07 мкг/мл (hМАТ 2F11-c11), 0,07 мкг/мл (hМАТ 2F11-d8), 0,04 мкг/мл (hМАТ 2F11-e7) і 0,09 мкг/мл (hМАТ 2F11-f12).

## Приклад 8

Інгібування диференціації макрофагів мавпи циномогус шляхом обробки моноклональними антитілами до CSF-1R (CellTiterGlo-аналіз)

Моноцити мавпи циномогус виділяли з периферичної крові за допомогою набору для приматів окрім людини, що включає CD14-мікрогранули (фірма Miltenyi Biotec, кат. № 130-091-097) відповідно до опису виробника. Збагачені популяції моноцитів висівали в 96-лункові титраційні мікропланшети ( $1-3 \times 10^4$  клітин/лунку) в 100 мкл середовища RPMI 1640 (фірма Gibco, кат. № 31870), доповненого 10 % FCS (фірма GIBCO, кат. № 011-090014M), 4мМ L-глутаміном (фірма GIBCO, кат. № 25030) і  $1 \times$  PenStrep (фірма Roche, кат. № 1 074 440), при 37 °C і 5 %  $CO_2$  в зволоженій атмосфері. При додаванні в середовищі huCSF-1 в концентрації 150 нг/мл можна було виявити виражену диференціацію в прикріплені макрофаги. Цю диференціацію можна інгібувати, додаючи антитіла до CSF-1R. Крім того, був виявлений вплив на виживання моноцитів, який можна аналізувати за допомогою CellTiterGlo (CTG)-аналізу. Життєздатність визначали при обробці антитілом в концентрації 5 мкг/мл (див. таблицю 8).

Таблиця 8

МАТ до CSF-1R	% виживання	% інгібування (виживання) = (100 % - % виживання)
МАТ 2F11	4 *	96
МАТ 2E10	17 **	83
МАТ 2H7	8	92
МАТ 1G10	2	98
SC 2-4A5	31	69

\* середнє значення за 4 експериментами (3 експерименти з використанням мишачого, 1 експеримент з використанням химерного МАТ)

\*\* середнє значення за 2 експериментами з використанням тільки мишачого МАТ

## Приклад 9

Оцінювання афінності зв'язування антитіл до CSF-1R з людським CSF-1R

Пристрій: BIACORE® A100,  
чип: CM5 (Biacore BR-1006-68),  
сполучення: амінне сполучення,  
буфер: 3ФР (Biacore BR-1006-72), pH 7,4, 35 °C.

Для оцінювання афінності 36 мкг/мл антитіл до мишачого Fc $\gamma$  (козячі, фірма Jackson Immuno Research, JIR115-005-071) зв'язували з поверхнею чипа для іммобілізації антитіл до CSF-1R. Позаклітинний домен людського CSF-1R (CSF-1R-ECD) (який містить позаклітинні субдомени D1 -D5) (SEQ ID NO: 64) (фірма R&D-Systems, 329-MR або субклоновану плазмиду pCMV-presS-HisAvitag-hCSF-1R-ECD) додавали в розчин в різних концентраціях. Асоціацію вимірювали шляхом ін'єкції CSF-1R протягом 1,5 хв при 35 °C; дисоціацію вимірювали шляхом відмивання

поверхні чипа за допомогою буфера протягом 10 хв при 35 °С. Для розрахунку кінетичних параметрів застосовували модель зв'язування 1:1 Ленгмюра.

Таблиця 9

Дані про афінність, оцінені за допомогою SPR

МАт до CSF-1R	$K_D$ (нМ)	$k_a$ (1/Мс)	$k_d$ (1/с)	$t_{1/2}$ (хв)
МАт 2F11	0,29	$1,77E^{+05}$	$5,18E^{-05}$	223
МАт 2E10	0,2	$1,52E^{+05}$	$2,97E^{-05}$	389
МАт 2H7	0,21	$1,47E^{+05}$	$3,12E^{-05}$	370
МАт 1G10	0,36	$1,75E^{+05}$	$6,28E^{-05}$	184

- 5 В іншому аналізі зв'язування, який здійснювали за допомогою пристрою Biacore з використанням CSF-1R ECD (дані не представлені), виявлена певна конкуренція антитіл МАт 2F11 і МАт 2E10 з антитілом (Ат) SC-2-4A5. Проте МАт 2F11/МАт 2E10 не зв'язувалися з фрагментом людського CSF-1R delD4, в той час як Ат SC-2-4A5 зв'язувалося з зазначеним delD4-фрагментом (див. приклад 4 і фіг. 2а). Таким чином, очевидно, що ділянка зв'язування
- 10 МАт 2F11/МАт 2E10 відрізняється від ділянки зв'язування Ат SC-2-4A5, але, ймовірно, локалізована поблизу неї. При здійсненні зазначеного конкурентного аналізу встановлено, що обидва антитіла МАт 2F11 і МАт 2E10 не конкурували з МАт 3291 фірми R&D-Systems (дані не представлені).

Приклад 10

- 15 Оцінювання зв'язування антитіл до CSF-1R з фрагментом людського CSF-1R D1-D3  
 Пристрій: Biacore T100 (фірма GE Healthcare),  
 програма: T100 Control, версія 1.1.11,  
 B3000 Evaluation, версія 4.01, Scrubber, версія 2.0a формат аналізу: чип CM5  
 Антитіла до CSF-1R "захвчували" за допомогою молекул, іммобілізованих шляхом амінного
- 20 сполучення. Використовуючи один цикл кінетичних досліджень, ін'єктували п'ять зростаючих концентрацій фрагмента людського CSF-1R D1-D3 (SEQ ID NO: 66). Фрагмент людського CSF-1R D1-D3 субклонували в експресійному векторі pCMV-presS-HisAvitag.
- Антитіло до CSF-1R SC 2-4A5 (фірма Santa Cruz Biotechnology, США; Sherr C.J та ін., Blood, 73, 1989, сс. 1786-1793), яке інгібує взаємодію ліганд-рецептор, і МАт 3291 (фірма R&D-Systems) використовували як референс-контролі.
- 25 Молекули для іммобілізації: антитіла до мишачого Fc $\gamma$  (козячі, фірма Jackson Immuno Research, JIR115-005-071) для антитіл, запропонованих в винаході, і контрольне антитіло фірми R&D-Systems МАт 3291 і антитіла до щурячого Fc $\gamma$  (козячі, фірма Jackson Immuno Research, JIR112-005-071) для антитіл, застосованих як референс-контролі і для антитіла до
- 30 CSF-1R SC 2-4A5.

Амінне сполучення для іммобілізації молекул

- Використовували стандартні умови амінного сполучення відповідно до інструкцій виробника: рухливий буфер: буфер HBS-N, активація за допомогою суміші EDC/NHS, потрібна щільність ліганду 2000 RU; призначення для іммобілізації Ат розводили в буфері для сполучення, такому як NaAc, рН 4,5, с=10 мг/мл; залишені в кінці активовані карбоксильні групи блокували ін'єкцією 1М етаноламіну.
- 35 Кінетичні характеристики зв'язування фрагментів людського CSF-1R D1-D3 з МАт <CSF-1R> (МАт до CSF-1R) при 37 °С

Рухливий буфер: 3ФР (Biacore BR-1006-72)

- 40 Іммобілізація МАт <CSF-1R> на проточних комірках 2-4: швидкість потоку 20 мкл/хв, тривалість контакту 90 с, концентрація (Ат<CSF-1R>) = 50нМ, розведення за допомогою рухливого буфера + 1 мг/мл БСА.

Аналізовуваний зразок:

- 45 Вимірювання кінетичних характеристик в одному циклі проводили при швидкості потоку 30 мкл/хв, здійснюючи п'ять послідовних ін'єкцій аналізовуваної речовини в концентраціях (с), що становлять 7,8, 31,25, 125, 500 і 2000нМ, без регенерації. Тривалість кожної ін'єкції становила 30 с, за нею слідувала фаза дисоціації тривалістю 120 с для перших чотирьох ін'єкцій і 1200 с для найвищої концентрації (остання ін'єкція).

- 50 Кінцеву регенерацію здійснювали після кожного циклу, використовуючи 10мМ гліцин, рН 1,5 (Biacore, BR-1003-54), тривалість контакту 60 с, швидкість потоку 30 мкл/хв.



Кінетичні параметри розраховували з використанням загальноприйнятих двох референс-стандартів (референс-контроль: зв'язування аналізовуваної речовини з призначеною для іммобілізації молекулою; проточна комірка: субдомен CSF-1R, концентрація "0" як "пустий" контроль) і розрахунок за допомогою моделі "кінетика титрування при зв'язуванні 1:1 з виділенням".

Таблиця 10

Дані про афінність зв'язування фрагмента CSF-1R D1-D3, оцінені за допомогою SPR

МАт до CSF-1R	Субдомен	K <sub>D</sub> (нМ)	k <sub>a</sub> (1/Мс)	k <sub>d</sub> (1/с)	t <sub>1/2</sub> (хв)
МАт 2F11	D1-D3	відсутність зв'язування			
МАт 2E10	D1-D3	відсутність зв'язування			
МАт 2H7	D1-D3	відсутність зв'язування			
МАт 1G10	D1-D3	відсутність зв'язування			
SC-2-4A5	D1-D3	відсутність зв'язування			
3291 фірми R&D-Systems	D1-D3	5,4	2,2E <sup>+5</sup>	1,2E <sup>-3</sup>	9,6

Встановлено, що у антитіл МАт 2F11, МАт 2E10 і МАт 1G10 відсутнє зв'язування з фрагментом людського CSF-1R D1-D3.

Крім того, застосовне як референс-контроль Ат SC-2-4A5 не зв'язувалося з фрагментом людського CSF-1R D1-D3.

У застосовного як референс-контроль МАт 3291 фірми R&D-Systems виявлена здатність зв'язуватися з фрагментом людського CSF-1R D1-D3.

Приклад 11

Підвищення рівня CSF-1 в процесі інгібування CSF-1R у мавп циномолгус

Рівні сироваткового CSF-1 є фармакодинамічним маркером нейтралізуючої активності по відношенню до CSF-1R антитіла hМАт 2F11-e7, яке являє собою інгібітор димеризації людського CSF-1R. В кожній оброблюваній групі (1 і 10 мг/кг) одному самцю і одній самці мавп циномолгус вводили внутрішньовенно антитіло до CSF-1R hМАт 2F11-e7. Для аналізу рівнів CSF-1 відбирали зразки крові за 1 тиждень до обробки (перед дозуванням), через 2, 24, 48, 72, 96, 168 год. після дозування і щотижня протягом ще двох тижнів. Для оцінювання рівнів CSF-1 використовували набір для ELISA (Quantikine® для людського М-CSF), що надходив у продаж, відповідно до інструкцій виробника (фірма R&D Systems, Великобританія). Рівні CSF-1 в крові мавп визначали шляхом порівняння з застосовними для побудови стандартної кривої зразками CSF-1, що входять у набір.

Введення hМАт 2F11-e7 призводило до різкого підвищення рівня CSF-1 ~ в 1000 раз, яке залежно від введеної дози зберігалось протягом 48 год. (1 мг/кг) або 15 днів (10 мг/кг). Таким чином, інгібітор димеризації CSF-1R має перевагу, яка полягає в відсутності безпосередньої конкуренції з лігандом за зв'язування з рецептором, і для нього характерна різка підвищуюча регуляція, у порівнянні з лігандзаміщаючим антитілом.

Приклад 12

Ефективність in vivo - інгібування росту пухлин антитілами до CSF-1R у SCID-мишей з вродженою відсутністю природних клітин-кілерів, що несуть ксенотрансплантат пухлинних клітин раку молочної залози лінії BT20

Лінія клітин людського раку молочної залози BT-20 експресує людський CSF-1R, але у неї відсутня експресія CSF-1 (Sari E. та ін., Cancer Res, 59, 1999, сс. 5578-5585). Оскільки мишачий CSF-1 не має здатності активувати людський CSF-1R на пухлинних клітинах, мишам вводили рекомбінантний людський CSF-1 (фірма Biomol, Гамбург, Німеччина) за допомогою осмотичних мінінасосів (фірма ALZET, Купертіно, шт. Каліфорнія), які забезпечували швидкість постійної інфузії CSF-1, що становила 2 мкг/день (Martin T.A., Carcinogenesis, 24, 2003, сс. 1317-1323).

Для безпосереднього порівняння ефективності антитіл, що впливають на димеризацію CSF-1R, наряду з лігандзаміщаючим антитілом до CSF-1R при створенні винаходу досліджували химерне антитіло до CSF-1R МАт 2F11 (антитіло, що впливає на димеризацію CSF-1R) і

антитіло 1.2.SM (лігандзаміщаюче антитіло до CSF-1R, описане в WO 2009/026303) на моделі ксенотрансплантату BT-20.

5 SCID-мишам з вродженою відсутністю природних клітин-кілерів (фірма Charles River, Сульцфельд, Німеччина) підшкірно разом ін'єктували  $1 \times 10^7$  клітин лінії BT-20 (ATCC HTB-19) і 100 мкл матригелю. Обробку тварин починали в день довільного розділення на групи, коли середній об'єм пухлин досягав  $100 \text{ мм}^3$ . Мишей обробляли один раз на тиждень і.р. відповідними антитілами (див. фіг. 4) в буфері, що містить 20мМ гістидин, 140мМ NaCl, pH 6,0. Розміри пухлин визначали за допомогою кронциркуля, починаючи з дня визначення стадії, і потім двічі на тиждень протягом всього періоду обробки. Об'єм пухлин розраховували відповідно до протоколу NCI (Національний онкологічний інститут) (маса пухлини =  $1/2ab^2$ , де "a" і "b" являють собою довгий і короткий діаметри пухлини відповідно).

10 Дані аналізу росту пухлин представлені на фіг. 4. Інгібування людського CSF-1R на пухлинних клітинах химерним антитілом до CSF-1R МАт 2F11 виявилось статистично більш ефективним по відношенню до опосередкованого інгібування росту пухлин, ніж ефективність антитіла до CSF-1R 1.2.SM (антитіло до CSF-1R, описане в WO 2009/026303).

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Ф. Хоффманн-Ля Рош АГ

<120> Антитіла до людського CSF-1R і їх застосування

<130> 26143 WO

<150> EP09015310

<151> 2009-12-10

<150> EP10173407

<151> 2010-08-19

<160> 84

<170> PatentIn, версія 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val  
1 5

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Phe Met Ser  
1 5 10 15

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Thr Tyr Asp Ile Ser  
1 5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Gly Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr  
1 5

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 6  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 6

Lys Ala Ser Glu Asp Val Asn Thr Tyr Val Ser  
 1 5 10

<210> 7  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 7

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

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

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

Gly Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Phe Met  
 50 55 60

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

Lys Met Asn Arg Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val  
 85 90 95

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

Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 8  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 8

Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly  
 1 5 10 15

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

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

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

Gly Gly Ser Thr Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala  
65 70 75 80

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

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

<210> 9  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 9

Asp Pro Arg Leu Tyr Phe Asp  
1 5

<210> 10  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 10

Val Ile Trp Thr Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Gly Phe Met Ser  
1 5 10 15

<210> 11  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 11

Ser Phe Asp Ile Ser  
1 5

<210> 12  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 12

Gly Gln Thr Phe Ser Tyr Pro Thr  
1 5

<210> 13  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 13

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 14  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 14

Lys Ala Ser Glu Asp Val Val Thr Tyr Val Ser  
1 5 10

<210> 15  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 15

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

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

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

Gly Val Ile Trp Thr Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Gly Phe Met  
50 55 60

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

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val  
85 90 95

Arg Asp Pro Arg Leu Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 16  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 16

Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly  
1 5 10 15

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

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala  
65 70 75 80

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

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

<210> 17  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> CDR3 важкого ланцюга, hMAт 2F11-c11  
<400> 17

Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val  
1 5

<210> 18  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> CDR2 важкого ланцюга, hMAт 2F11-c11  
<400> 18

Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Phe Met Ser  
1 5 10 15

<210> 19  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> CDR1 важкого ланцюга, hMAт 2F11-c11  
<400> 19

Thr Tyr Asp Ile Ser  
1 5

<210> 20  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> CDR3 легкого ланцюга, hMAт 2F11-c11  
<400> 20

Gly Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr  
1 5

<210> 21  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> CDR2 легкого ланцюга, hMAт 2F11-cl1

<400> 21

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr  
1 5

<210> 22  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> CDR1 легкого ланцюга, hMAт 2F11-cl1

<400> 22

Arg Ala Ser Glu Asp Val Asn Thr Tyr Val Ser  
1 5 10

<210> 23  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> варіабельна ділянка важкого ланцюга, hMAт 2F11-cl1

<400> 23

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

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

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

Gly Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Phe Met  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Thr Lys Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met  
65 70 75 80

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

Arg Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
100 105 110



Thr Val Ser Ser  
115

<210> 24  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> варіабельна ділянка легкого ланцюга, hMAт 2F11-c11

<400> 24

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

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

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

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

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 25  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> CDR3 важкого ланцюга, hMAт 2F11-d8

<400> 25

Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val  
1 5

<210> 26  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> CDR2 важкого ланцюга, hMAт 2F11-d8

<400> 26

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

<210> 27  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Штучна

<220>  
 <223> CDR1 важкого ланцюга, hMAT 2F11-d8

<400> 27

Thr Tyr Asp Ile Ser  
 1 5

<210> 28  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Штучна

<220>  
 <223> CDR3 легкого ланцюга, hMAT 2F11-d8

<400> 28

Gly Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr  
 1 5

<210> 29  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Штучна

<220>  
 <223> CDR2 легкого ланцюга, hMAT 2F11-d8

<400> 29

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr  
 1 5

<210> 30  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Штучна

<220>  
 <223> CDR1 легкого ланцюга, hMAT 2F11-d8

<400> 30

Lys Ala Ser Glu Asp Val Asn Thr Tyr Val Ser  
 1 5 10

<210> 31  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Штучна

<220>  
 <223> варіабельна ділянка важкого ланцюга, hMAT 2F11-d8

<400> 31

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

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

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

Gly Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln  
50 55 60

Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met  
65 70 75 80

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

Arg Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 32  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> варіабельна ділянка легкого ланцюга, hMAT 2F11-d8

<400> 32

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

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

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

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

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 33  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> CDR3 важкого ланцюга, hMAт 2F11-e7

<400> 33

Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val  
1 5

<210> 34  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> CDR2 важкого ланцюга, hMAт 2F11-e7

<400> 34

Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln Gly  
1 5 10 15

<210> 35  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> CDR1 важкого ланцюга, hMAт 2F11-e7

<400> 35

Ser Tyr Asp Ile Ser  
1 5

<210> 36  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> CDR3 легкого ланцюга, hMAт 2F11-e7

<400> 36

Gln Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr  
1 5

<210> 37  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> CDR2 легкого ланцюга, hMAт 2F11-e7

<400> 37

Ala Ala Ser Asn Arg Tyr Thr  
1 5

<210> 38  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>

<223> CDR1 легкого ланцюга, hMAT 2F11-e7

<400> 38

Arg Ala Ser Glu Asp Val Asn Thr Tyr Val Ser  
1 5 10

<210> 39

<211> 116

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> варіабельна ділянка важкого ланцюга, hMAT 2F11-e7

<400> 39

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

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

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

Gly Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln  
50 55 60

Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met  
65 70 75 80

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

Arg Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 40

<211> 106

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> варіабельна ділянка легкого ланцюга, hMAT 2F11-e7

<400> 40

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

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

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

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

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 41  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> CDR3 важкого ланцюга, hMAT 2F11-f12

<400> 41

Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val  
1 5

<210> 42  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> CDR2 важкого ланцюга, hMAT 2F11-f12

<400> 42

Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Phe Met Ser  
1 5 10 15

<210> 43  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> CDR1 важкого ланцюга, hMAT 2F11-f12

<400> 43

Thr Tyr Asp Ile Ser  
1 5

<210> 44  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> CDR3 легкого ланцюга, hMAT 2F11-f12

<400> 44

Gly Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr  
1 5

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> CDR2 легкого ланцюга, hMAт 2F11-f12

<400> 45

Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser  
1 5

<210> 46

<211> 11

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> CDR1 легкого ланцюга, hMAт 2F11-f12

<400> 46

Arg Ala Ser Glu Asp Val Asn Thr Tyr Val Ser  
1 5 10

<210> 47

<211> 116

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> варіабельна ділянка важкого ланцюга, hMAт 2F11-f12

<400> 47

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

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

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

Gly Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Phe Met  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Thr Lys Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met  
65 70 75 80

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

Arg Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 48  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> варіабельна ділянка легкого ланцюга, hMAт 2F11-f12

<400> 48

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

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

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

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

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 49  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> CDR3 важкого ланцюга, hMAт 2F11-g1

<400> 49

Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val  
1 5

<210> 50  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> CDR2 важкого ланцюга, hMAт 2F11-g1

<400> 50

Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Leu Lys Ser  
1 5 10 15



<210> 51  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Штучна

<220>  
 <223> CDR1 важкого ланцюга, hMAт 2F11-g1

<400> 51

Thr Tyr Asp Ile Ser  
 1 5

<210> 52  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Штучна

<220>  
 <223> CDR3 легкого ланцюга, hMAт 2F11-g1

<400> 52

Gly Gln Ser Phe Ser Tyr Pro Thr  
 1 5

<210> 53  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Штучна

<220>  
 <223> CDR2 легкого ланцюга, hMAт 2F11-g1

<400> 53

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
 1 5

<210> 54  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Штучна

<220>  
 <223> CDR1 легкого ланцюга, hMAт 2F11-g1

<400> 54

Arg Ala Ser Glu Asp Val Asn Thr Tyr Leu Ala  
 1 5 10

<210> 55  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Штучна

<220>  
 <223> варіабельна ділянка важкого ланцюга, hMAт 2F11-g1

<400> 55

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

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

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

Gly Val Ile Trp Thr Asp Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Pro Leu Lys  
50 55 60

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

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

Arg Asp Gln Arg Leu Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 56  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> варіабельна ділянка легкого ланцюга, hMAT 2F11-g1

<400> 56

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

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

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

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

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 57  
<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
1 5 10 15

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
50 55 60

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
100 105

<210> 58

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
260 265 270

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

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

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

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

<210> 59  
<211> 330  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> константна ділянка людського важкого ланцюга, виведена з IgG1,  
що несе мутації L234A і L235A

<400> 59

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
260 265 270

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

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

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

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

<210> 60  
<211> 327  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 60

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro  
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys  
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
260 265 270

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
325

<210> 61  
<211> 327  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> константна ділянка людського важкого ланцюга, виведена з IgG4,  
що несе мутацію S228P

<400> 61

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys  
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
260 265 270

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
325

<210> 62  
<211> 972  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 62

Met Gly Pro Gly Val Leu Leu Leu Leu Leu Val Ala Thr Ala Trp His  
1 5 10 15

Gly Gln Gly Ile Pro Val Ile Glu Pro Ser Val Pro Glu Leu Val Val  
20 25 30



Lys Pro Gly Ala Thr Val Thr Leu Arg Cys Val Gly Asn Gly Ser Val  
35 40 45

Glu Trp Asp Gly Pro Pro Ser Pro His Trp Thr Leu Tyr Ser Asp Gly  
50 55 60

Ser Ser Ser Ile Leu Ser Thr Asn Asn Ala Thr Phe Gln Asn Thr Gly  
65 70 75 80

Thr Tyr Arg Cys Thr Glu Pro Gly Asp Pro Leu Gly Gly Ser Ala Ala  
85 90 95

Ile His Leu Tyr Val Lys Asp Pro Ala Arg Pro Trp Asn Val Leu Ala  
100 105 110

Gln Glu Val Val Val Phe Glu Asp Gln Asp Ala Leu Leu Pro Cys Leu  
115 120 125

Leu Thr Asp Pro Val Leu Glu Ala Gly Val Ser Leu Val Arg Val Arg  
130 135 140

Gly Arg Pro Leu Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His  
145 150 155 160

Gly Phe Thr Ile His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln  
165 170 175

Cys Ser Ala Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg  
180 185 190

Leu Lys Val Gln Lys Val Ile Pro Gly Pro Pro Ala Leu Thr Leu Val  
195 200 205

Pro Ala Glu Leu Val Arg Ile Arg Gly Glu Ala Ala Gln Ile Val Cys  
210 215 220

Ser Ala Ser Ser Val Asp Val Asn Phe Asp Val Phe Leu Gln His Asn  
225 230 235 240

Asn Thr Lys Leu Ala Ile Pro Gln Gln Ser Asp Phe His Asn Asn Arg  
245 250 255

Tyr Gln Lys Val Leu Thr Leu Asn Leu Asp Gln Val Asp Phe Gln His  
260 265 270

Ala Gly Asn Tyr Ser Cys Val Ala Ser Asn Val Gln Gly Lys His Ser  
275 280 285

Thr Ser Met Phe Phe Arg Val Val Glu Ser Ala Tyr Leu Asn Leu Ser  
290 295 300

Ser Glu Gln Asn Leu Ile Gln Glu Val Thr Val Gly Glu Gly Leu Asn  
305 310 315 320

Leu Lys Val Met Val Glu Ala Tyr Pro Gly Leu Gln Gly Phe Asn Trp  
325 330 335

Thr Tyr Leu Gly Pro Phe Ser Asp His Gln Pro Glu Pro Lys Leu Ala  
340 345 350

Asn Ala Thr Thr Lys Asp Thr Tyr Arg His Thr Phe Thr Leu Ser Leu  
355 360 365

Pro Arg Leu Lys Pro Ser Glu Ala Gly Arg Tyr Ser Phe Leu Ala Arg  
370 375 380

Asn Pro Gly Gly Trp Arg Ala Leu Thr Phe Glu Leu Thr Leu Arg Tyr  
385 390 395 400

Pro Pro Glu Val Ser Val Ile Trp Thr Phe Ile Asn Gly Ser Gly Thr  
405 410 415

Leu Leu Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Pro Gln Pro Asn Val Thr Trp Leu  
420 425 430

Gln Cys Ser Gly His Thr Asp Arg Cys Asp Glu Ala Gln Val Leu Gln  
435 440 445

Val Trp Asp Asp Pro Tyr Pro Glu Val Leu Ser Gln Glu Pro Phe His  
450 455 460

Lys Val Thr Val Gln Ser Leu Leu Thr Val Glu Thr Leu Glu His Asn  
465 470 475 480

Gln Thr Tyr Glu Cys Arg Ala His Asn Ser Val Gly Ser Gly Ser Trp  
485 490 495

Ala Phe Ile Pro Ile Ser Ala Gly Ala His Thr His Pro Pro Asp Glu  
500 505 510

Phe Leu Phe Thr Pro Val Val Val Ala Cys Met Ser Ile Met Ala Leu  
515 520 525

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Tyr Lys Tyr Lys Gln Lys Pro  
530 535 540

Lys Tyr Gln Val Arg Trp Lys Ile Ile Glu Ser Tyr Glu Gly Asn Ser  
545 550 555 560

Tyr Thr Phe Ile Asp Pro Thr Gln Leu Pro Tyr Asn Glu Lys Trp Glu  
565 570 575

Phe Pro Arg Asn Asn Leu Gln Phe Gly Lys Thr Leu Gly Ala Gly Ala  
580 585 590

Phe Gly Lys Val Val Glu Ala Thr Ala Phe Gly Leu Gly Lys Glu Asp  
595 600 605

Ala Val Leu Lys Val Ala Val Lys Met Leu Lys Ser Thr Ala His Ala  
610 615 620

Asp Glu Lys Glu Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Met Ser His Leu  
625 630 635 640

Gly Gln His Glu Asn Ile Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr His Gly  
645 650 655

Gly Pro Val Leu Val Ile Thr Glu Tyr Cys Cys Tyr Gly Asp Leu Leu  
660 665 670

Asn Phe Leu Arg Arg Lys Ala Glu Ala Met Leu Gly Pro Ser Leu Ser  
675 680 685

Pro Gly Gln Asp Pro Glu Gly Gly Val Asp Tyr Lys Asn Ile His Leu  
690 695 700

Glu Lys Lys Tyr Val Arg Arg Asp Ser Gly Phe Ser Ser Gln Gly Val  
705 710 715 720

Asp Thr Tyr Val Glu Met Arg Pro Val Ser Thr Ser Ser Asn Asp Ser  
725 730 735

Phe Ser Glu Gln Asp Leu Asp Lys Glu Asp Gly Arg Pro Leu Glu Leu  
740 745 750

Arg Asp Leu Leu His Phe Ser Ser Gln Val Ala Gln Gly Met Ala Phe  
755 760 765

Leu Ala Ser Lys Asn Cys Ile His Arg Asp Val Ala Ala Arg Asn Val  
770 775 780

Leu Leu Thr Asn Gly His Val Ala Lys Ile Gly Asp Phe Gly Leu Ala  
785 790 795 800

Arg Asp Ile Met Asn Asp Ser Asn Tyr Ile Val Lys Gly Asn Ala Arg  
805 810 815

Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ser Ile Phe Asp Cys Val Tyr  
820 825 830

Thr Val Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Ile Leu Leu Trp Glu Ile  
835 840 845

Phe Ser Leu Gly Leu Asn Pro Tyr Pro Gly Ile Leu Val Asn Ser Lys  
850 855 860

Phe Tyr Lys Leu Val Lys Asp Gly Tyr Gln Met Ala Gln Pro Ala Phe  
865 870 875 880

Ala Pro Lys Asn Ile Tyr Ser Ile Met Gln Ala Cys Trp Ala Leu Glu  
885 890 895

Pro Thr His Arg Pro Thr Phe Gln Gln Ile Cys Ser Phe Leu Gln Glu  
900 905 910

Gln Ala Gln Glu Asp Arg Arg Glu Arg Asp Tyr Thr Asn Leu Pro Ser  
915 920 925

Ser Ser Arg Ser Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser Ser Glu Leu Glu Glu  
930 935 940

Glu Ser Ser Ser Glu His Leu Thr Cys Cys Glu Gln Gly Asp Ile Ala  
945 950 955 960

Gln Pro Leu Leu Gln Pro Asn Asn Tyr Gln Phe Cys  
965 970

<210> 63  
<211> 972  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> мутант CSF-1R L301S Y969F

<400> 63

Met Gly Pro Gly Val Leu Leu Leu Leu Leu Val Ala Thr Ala Trp His  
1 5 10 15

Gly Gln Gly Ile Pro Val Ile Glu Pro Ser Val Pro Glu Leu Val Val  
20 25 30

Lys Pro Gly Ala Thr Val Thr Leu Arg Cys Val Gly Asn Gly Ser Val  
35 40 45

Glu Trp Asp Gly Pro Pro Ser Pro His Trp Thr Leu Tyr Ser Asp Gly  
50 55 60

Ser Ser Ser Ile Leu Ser Thr Asn Asn Ala Thr Phe Gln Asn Thr Gly  
65 70 75 80

Thr Tyr Arg Cys Thr Glu Pro Gly Asp Pro Leu Gly Gly Ser Ala Ala  
85 90 95

Ile His Leu Tyr Val Lys Asp Pro Ala Arg Pro Trp Asn Val Leu Ala  
100 105 110

Gln Glu Val Val Val Phe Glu Asp Gln Asp Ala Leu Leu Pro Cys Leu  
115 120 125

Leu Thr Asp Pro Val Leu Glu Ala Gly Val Ser Leu Val Arg Val Arg  
130 135 140

Gly Arg Pro Leu Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His  
145 150 155 160

Gly Phe Thr Ile His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln  
165 170 175

Cys Ser Ala Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg  
180 185 190

Leu Lys Val Gln Lys Val Ile Pro Gly Pro Pro Ala Leu Thr Leu Val  
195 200 205

Pro Ala Glu Leu Val Arg Ile Arg Gly Glu Ala Ala Gln Ile Val Cys  
210 215 220

Ser Ala Ser Ser Val Asp Val Asn Phe Asp Val Phe Leu Gln His Asn  
225 230 235 240

Asn Thr Lys Leu Ala Ile Pro Gln Gln Ser Asp Phe His Asn Asn Arg  
245 250 255

Tyr Gln Lys Val Leu Thr Leu Asn Leu Asp Gln Val Asp Phe Gln His  
260 265 270

Ala Gly Asn Tyr Ser Cys Val Ala Ser Asn Val Gln Gly Lys His Ser  
275 280 285

Thr Ser Met Phe Phe Arg Val Val Glu Ser Ala Tyr Ser Asn Leu Ser  
290 295 300

Ser Glu Gln Asn Leu Ile Gln Glu Val Thr Val Gly Glu Gly Leu Asn  
305 310 315 320

Leu Lys Val Met Val Glu Ala Tyr Pro Gly Leu Gln Gly Phe Asn Trp  
325 330 335

Thr Tyr Leu Gly Pro Phe Ser Asp His Gln Pro Glu Pro Lys Leu Ala  
340 345 350

Asn Ala Thr Thr Lys Asp Thr Tyr Arg His Thr Phe Thr Leu Ser Leu  
355 360 365

Pro Arg Leu Lys Pro Ser Glu Ala Gly Arg Tyr Ser Phe Leu Ala Arg  
370 375 380

Asn Pro Gly Gly Trp Arg Ala Leu Thr Phe Glu Leu Thr Leu Arg Tyr  
385 390 395 400

Pro Pro Glu Val Ser Val Ile Trp Thr Phe Ile Asn Gly Ser Gly Thr  
405 410 415

Leu Leu Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Pro Gln Pro Asn Val Thr Trp Leu  
420 425 430

Gln Cys Ser Gly His Thr Asp Arg Cys Asp Glu Ala Gln Val Leu Gln  
435 440 445

Val Trp Asp Asp Pro Tyr Pro Glu Val Leu Ser Gln Glu Pro Phe His  
450 455 460

Lys Val Thr Val Gln Ser Leu Leu Thr Val Glu Thr Leu Glu His Asn  
465 470 475 480

Gln Thr Tyr Glu Cys Arg Ala His Asn Ser Val Gly Ser Gly Ser Trp  
485 490 495

Ala Phe Ile Pro Ile Ser Ala Gly Ala His Thr His Pro Pro Asp Glu  
500 505 510

Phe Leu Phe Thr Pro Val Val Val Ala Cys Met Ser Ile Met Ala Leu  
515 520 525

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Tyr Lys Tyr Lys Gln Lys Pro  
530 535 540

Lys Tyr Gln Val Arg Trp Lys Ile Ile Glu Ser Tyr Glu Gly Asn Ser  
545 550 555 560

Tyr Thr Phe Ile Asp Pro Thr Gln Leu Pro Tyr Asn Glu Lys Trp Glu  
565 570 575

Phe Pro Arg Asn Asn Leu Gln Phe Gly Lys Thr Leu Gly Ala Gly Ala  
580 585 590

Phe Gly Lys Val Val Glu Ala Thr Ala Phe Gly Leu Gly Lys Glu Asp  
595 600 605

Ala Val Leu Lys Val Ala Val Lys Met Leu Lys Ser Thr Ala His Ala  
610 615 620

Asp Glu Lys Glu Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Met Ser His Leu  
625 630 635 640

Gly Gln His Glu Asn Ile Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr His Gly  
645 650 655

Gly Pro Val Leu Val Ile Thr Glu Tyr Cys Cys Tyr Gly Asp Leu Leu  
660 665 670

Asn Phe Leu Arg Arg Lys Ala Glu Ala Met Leu Gly Pro Ser Leu Ser  
675 680 685

Pro Gly Gln Asp Pro Glu Gly Gly Val Asp Tyr Lys Asn Ile His Leu  
690 695 700

Glu Lys Lys Tyr Val Arg Arg Asp Ser Gly Phe Ser Ser Gln Gly Val  
705 710 715 720

Asp Thr Tyr Val Glu Met Arg Pro Val Ser Thr Ser Ser Asn Asp Ser  
725 730 735

Phe Ser Glu Gln Asp Leu Asp Lys Glu Asp Gly Arg Pro Leu Glu Leu  
740 745 750

Arg Asp Leu Leu His Phe Ser Ser Gln Val Ala Gln Gly Met Ala Phe  
755 760 765

Leu Ala Ser Lys Asn Cys Ile His Arg Asp Val Ala Ala Arg Asn Val  
770 775 780

Leu Leu Thr Asn Gly His Val Ala Lys Ile Gly Asp Phe Gly Leu Ala  
785 790 795 800

Arg Asp Ile Met Asn Asp Ser Asn Tyr Ile Val Lys Gly Asn Ala Arg  
805 810 815

Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ser Ile Phe Asp Cys Val Tyr  
820 825 830

Thr Val Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Ile Leu Leu Trp Glu Ile  
835 840 845

Phe Ser Leu Gly Leu Asn Pro Tyr Pro Gly Ile Leu Val Asn Ser Lys  
850 855 860

Phe Tyr Lys Leu Val Lys Asp Gly Tyr Gln Met Ala Gln Pro Ala Phe  
865 870 875 880

Ala Pro Lys Asn Ile Tyr Ser Ile Met Gln Ala Cys Trp Ala Leu Glu  
885 890 895

Pro Thr His Arg Pro Thr Phe Gln Gln Ile Cys Ser Phe Leu Gln Glu  
900 905 910

Gln Ala Gln Glu Asp Arg Arg Glu Arg Asp Tyr Thr Asn Leu Pro Ser  
915 920 925

Ser Ser Arg Ser Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser Ser Glu Leu Glu Glu  
930 935 940

Glu Ser Ser Ser Glu His Leu Thr Cys Cys Glu Gln Gly Asp Ile Ala  
945 950 955 960

Gln Pro Leu Leu Gln Pro Asn Asn Phe Gln Phe Cys  
965 970

<210> 64  
 <211> 493  
 <212> PRT  
 <213> Штучна

<220>  
 <223> позаклітинний домен людського CSF-1R  
 <400> 64

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

Ala Thr Val Thr Leu Arg Cys Val Gly Asn Gly Ser Val Glu Trp Asp  
 20 25 30

Gly Pro Pro Ser Pro His Trp Thr Leu Tyr Ser Asp Gly Ser Ser Ser  
 35 40 45

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

Cys Thr Glu Pro Gly Asp Pro Leu Gly Gly Ser Ala Ala Ile His Leu  
 65 70 75 80

Tyr Val Lys Asp Pro Ala Arg Pro Trp Asn Val Leu Ala Gln Glu Val  
 85 90 95

Val Val Phe Glu Asp Gln Asp Ala Leu Leu Pro Cys Leu Leu Thr Asp  
 100 105 110

Pro Val Leu Glu Ala Gly Val Ser Leu Val Arg Val Arg Gly Arg Pro  
 115 120 125

Leu Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His Gly Phe Thr  
 130 135 140

Ile His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln Cys Ser Ala  
 145 150 155 160

Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg Leu Lys Val  
 165 170 175

Gln Lys Val Ile Pro Gly Pro Pro Ala Leu Thr Leu Val Pro Ala Glu  
 180 185 190

Leu Val Arg Ile Arg Gly Glu Ala Ala Gln Ile Val Cys Ser Ala Ser  
 195 200 205

Ser Val Asp Val Asn Phe Asp Val Phe Leu Gln His Asn Asn Thr Lys  
 210 215 220

Leu Ala Ile Pro Gln Gln Ser Asp Phe His Asn Asn Arg Tyr Gln Lys  
 225 230 235 240

Val Leu Thr Leu Asn Leu Asp Gln Val Asp Phe Gln His Ala Gly Asn



245 250 255

Tyr Ser Cys Val Ala Ser Asn Val Gln Gly Lys His Ser Thr Ser Met  
260 265 270

Phe Phe Arg Val Val Glu Ser Ala Tyr Leu Asn Leu Ser Ser Glu Gln  
275 280 285

Asn Leu Ile Gln Glu Val Thr Val Gly Glu Gly Leu Asn Leu Lys Val  
290 295 300

Met Val Glu Ala Tyr Pro Gly Leu Gln Gly Phe Asn Trp Thr Tyr Leu  
305 310 315 320

Gly Pro Phe Ser Asp His Gln Pro Glu Pro Lys Leu Ala Asn Ala Thr  
325 330 335

Thr Lys Asp Thr Tyr Arg His Thr Phe Thr Leu Ser Leu Pro Arg Leu  
340 345 350

Lys Pro Ser Glu Ala Gly Arg Tyr Ser Phe Leu Ala Arg Asn Pro Gly  
355 360 365

Gly Trp Arg Ala Leu Thr Phe Glu Leu Thr Leu Arg Tyr Pro Pro Glu  
370 375 380

Val Ser Val Ile Trp Thr Phe Ile Asn Gly Ser Gly Thr Leu Leu Cys  
385 390 395 400

Ala Ala Ser Gly Tyr Pro Gln Pro Asn Val Thr Trp Leu Gln Cys Ser  
405 410 415

Gly His Thr Asp Arg Cys Asp Glu Ala Gln Val Leu Gln Val Trp Asp  
420 425 430

Asp Pro Tyr Pro Glu Val Leu Ser Gln Glu Pro Phe His Lys Val Thr  
435 440 445

Val Gln Ser Leu Leu Thr Val Glu Thr Leu Glu His Asn Gln Thr Tyr  
450 455 460

Glu Cys Arg Ala His Asn Ser Val Gly Ser Gly Ser Trp Ala Phe Ile  
465 470 475 480

Pro Ile Ser Ala Gly Ala His Thr His Pro Pro Asp Glu  
485 490

<210> 65

<211> 388

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> фрагмент людського CSF-1R delD4

<400> 65

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

Ala Thr Val Thr Leu Arg Cys Val Gly Asn Gly Ser Val Glu Trp Asp  
20 25 30

Gly Pro Pro Ser Pro His Trp Thr Leu Tyr Ser Asp Gly Ser Ser Ser  
35 40 45

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

Cys Thr Glu Pro Gly Asp Pro Leu Gly Gly Ser Ala Ala Ile His Leu  
65 70 75 80

Tyr Val Lys Asp Pro Ala Arg Pro Trp Asn Val Leu Ala Gln Glu Val  
85 90 95

Val Val Phe Glu Asp Gln Asp Ala Leu Leu Pro Cys Leu Leu Thr Asp  
100 105 110

Pro Val Leu Glu Ala Gly Val Ser Leu Val Arg Val Arg Gly Arg Pro  
115 120 125

Leu Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His Gly Phe Thr  
130 135 140

Ile His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln Cys Ser Ala  
145 150 155 160

Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg Leu Lys Val  
165 170 175

Gln Lys Val Ile Pro Gly Pro Pro Ala Leu Thr Leu Val Pro Ala Glu  
180 185 190

Leu Val Arg Ile Arg Gly Glu Ala Ala Gln Ile Val Cys Ser Ala Ser  
195 200 205

Ser Val Asp Val Asn Phe Asp Val Phe Leu Gln His Asn Asn Thr Lys  
210 215 220

Leu Ala Ile Pro Gln Gln Ser Asp Phe His Asn Asn Arg Tyr Gln Lys  
225 230 235 240

Val Leu Thr Leu Asn Leu Asp Gln Val Asp Phe Gln His Ala Gly Asn  
245 250 255

Tyr Ser Cys Val Ala Ser Asn Val Gln Gly Lys His Ser Thr Ser Met  
260 265 270

Phe Phe Arg Tyr Pro Pro Glu Val Ser Val Ile Trp Thr Phe Ile Asn  
275 280 285

Gly Ser Gly Thr Leu Leu Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Pro Gln Pro Asn  
290 295 300

Val Thr Trp Leu Gln Cys Ser Gly His Thr Asp Arg Cys Asp Glu Ala  
305 310 315 320

Gln Val Leu Gln Val Trp Asp Asp Pro Tyr Pro Glu Val Leu Ser Gln  
325 330 335

Glu Pro Phe His Lys Val Thr Val Gln Ser Leu Leu Thr Val Glu Thr  
340 345 350

Leu Glu His Asn Gln Thr Tyr Glu Cys Arg Ala His Asn Ser Val Gly  
355 360 365

Ser Gly Ser Trp Ala Phe Ile Pro Ile Ser Ala Gly Ala His Thr His  
370 375 380

Pro Pro Asp Glu  
385

<210> 66  
<211> 292  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> фрагмент людського CSF-1R D1-D3

<400> 66

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

Ala Thr Val Thr Leu Arg Cys Val Gly Asn Gly Ser Val Glu Trp Asp  
20 25 30

Gly Pro Pro Ser Pro His Trp Thr Leu Tyr Ser Asp Gly Ser Ser Ser  
35 40 45

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

Cys Thr Glu Pro Gly Asp Pro Leu Gly Gly Ser Ala Ala Ile His Leu  
65 70 75 80

Tyr Val Lys Asp Pro Ala Arg Pro Trp Asn Val Leu Ala Gln Glu Val  
85 90 95

Val Val Phe Glu Asp Gln Asp Ala Leu Leu Pro Cys Leu Leu Thr Asp  
100 105 110

Pro Val Leu Glu Ala Gly Val Ser Leu Val Arg Val Arg Gly Arg Pro  
115 120 125

Leu Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His Gly Phe Thr  
130 135 140

Ile His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln Cys Ser Ala  
145 150 155 160

Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg Leu Lys Val  
165 170 175

Gln Lys Val Ile Pro Gly Pro Pro Ala Leu Thr Leu Val Pro Ala Glu  
180 185 190

Leu Val Arg Ile Arg Gly Glu Ala Ala Gln Ile Val Cys Ser Ala Ser  
195 200 205

Ser Val Asp Val Asn Phe Asp Val Phe Leu Gln His Asn Asn Thr Lys  
210 215 220

Leu Ala Ile Pro Gln Gln Ser Asp Phe His Asn Asn Arg Tyr Gln Lys  
225 230 235 240

Val Leu Thr Leu Asn Leu Asp Gln Val Asp Phe Gln His Ala Gly Asn  
245 250 255

Tyr Ser Cys Val Ala Ser Asn Val Gln Gly Lys His Ser Thr Ser Met  
260 265 270

Phe Phe Arg Val Val Glu Ser Ala Tyr Leu Asn Leu Ser Ser Glu Gln  
275 280 285

Asn Leu Ile Gln  
290

<210> 67  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Штучна

<220>  
<223> сигнальный пептид

<400> 67

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

Trp His Gly Gln Gly  
20

<210> 68  
<211> 36  
<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> праймер

<400> 68

cacctccatg ttcttcggt acccccaga ggtaag 36

<210> 69

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 69

Asp Leu Arg Leu Tyr Phe Asp Val  
1 5

<210> 70

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 70

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

<210> 71

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 71

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Asp Ile Ser  
1 5 10

<210> 72

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 72

Gly Gln Ser Phe Thr Tyr Pro Thr  
1 5

<210> 73

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 73

Gly Ser Ser Asn Arg Tyr Thr  
1 5

<210> 74

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 74

Lys Ala Ser Glu Asp Val Gly Thr Tyr Val Ser  
1 5 10

<210> 75  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 75

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

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

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

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

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

Lys Val Asn Arg Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val  
85 90 95

Arg Asp Leu Arg Leu Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 76  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 76

Lys Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Val Ser Val Gly  
1 5 10 15

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

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala  
65 70 75 80

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

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

<210> 77  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 77

Asp Pro Arg Leu Tyr Phe Asp Val  
1 5

<210> 78  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 78

Val Ile Trp Thr Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Gly Phe Met Ser  
1 5 10 15

<210> 79  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 79

Gly Ser Ser Leu Asp Ser Phe Asp Ile Ser  
1 5 10

<210> 80  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 80

Gly Gln Thr Phe Ser Tyr Pro Thr  
1 5

<210> 81  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 81

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr  
1 5

<210> 82  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 82

Lys Ala Ser Glu Asp Val Val Thr Tyr Val Ser  
1 5 10

<210> 83  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 83

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

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

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

Gly Val Ile Trp Thr Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Gly Phe Met  
50 55 60

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

Lys Met Ser Ser Leu Gln Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val  
85 90 95

Arg Asp Pro Arg Leu Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 84  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 84

Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly  
1 5 10 15

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

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

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

Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Ile Gln Ala  
65 70 75 80



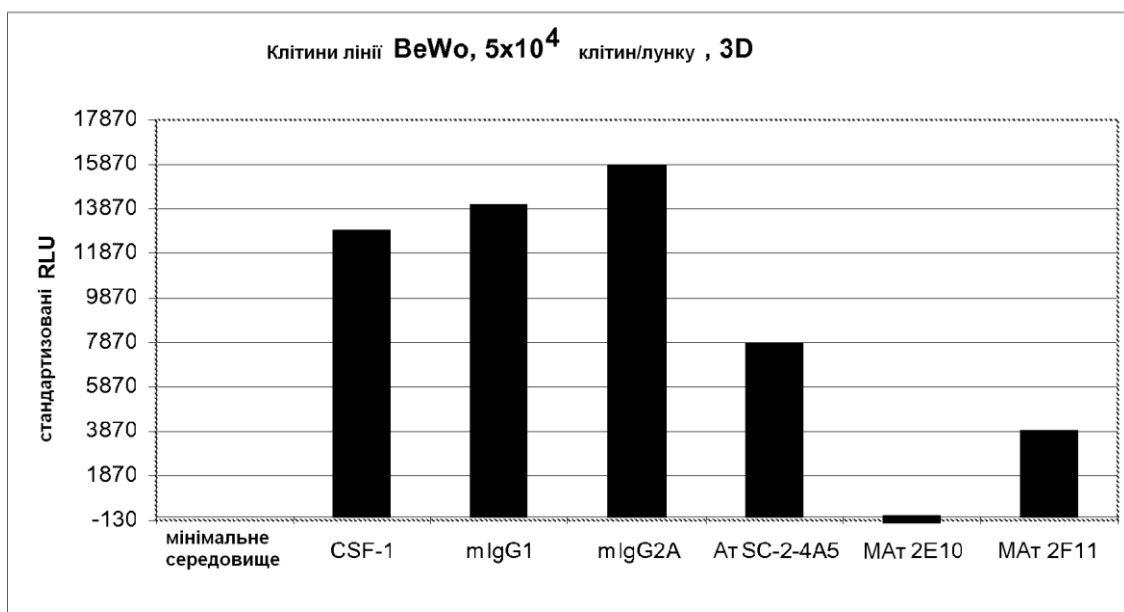
Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Gln Thr Phe Ser Tyr Pro Thr  
85 90 95

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

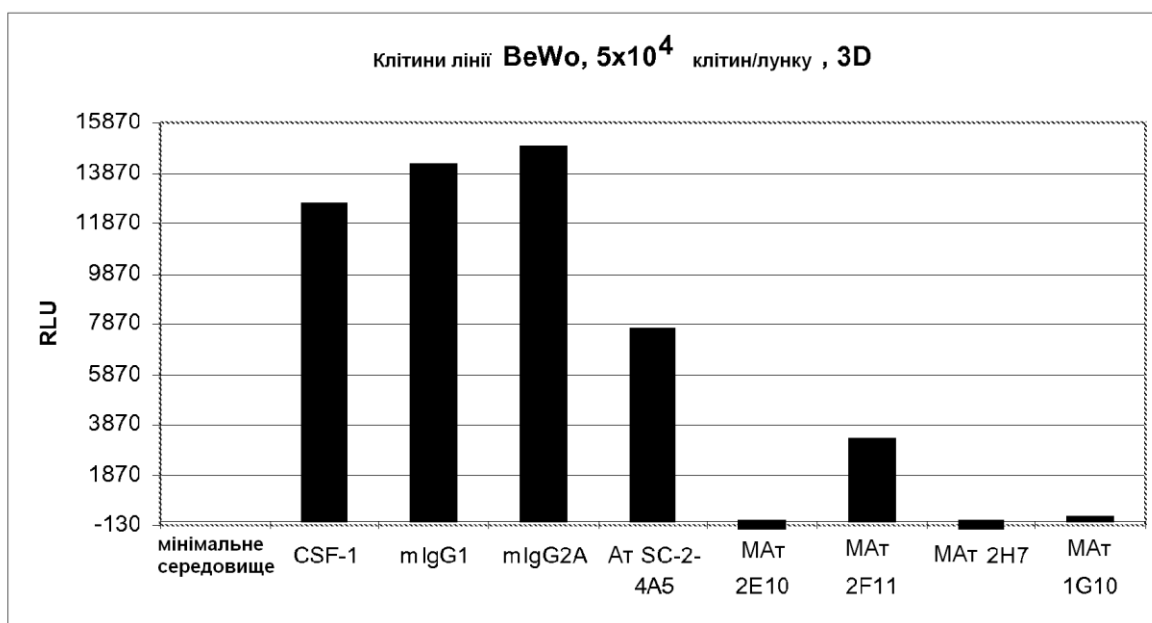
### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- [illegible]

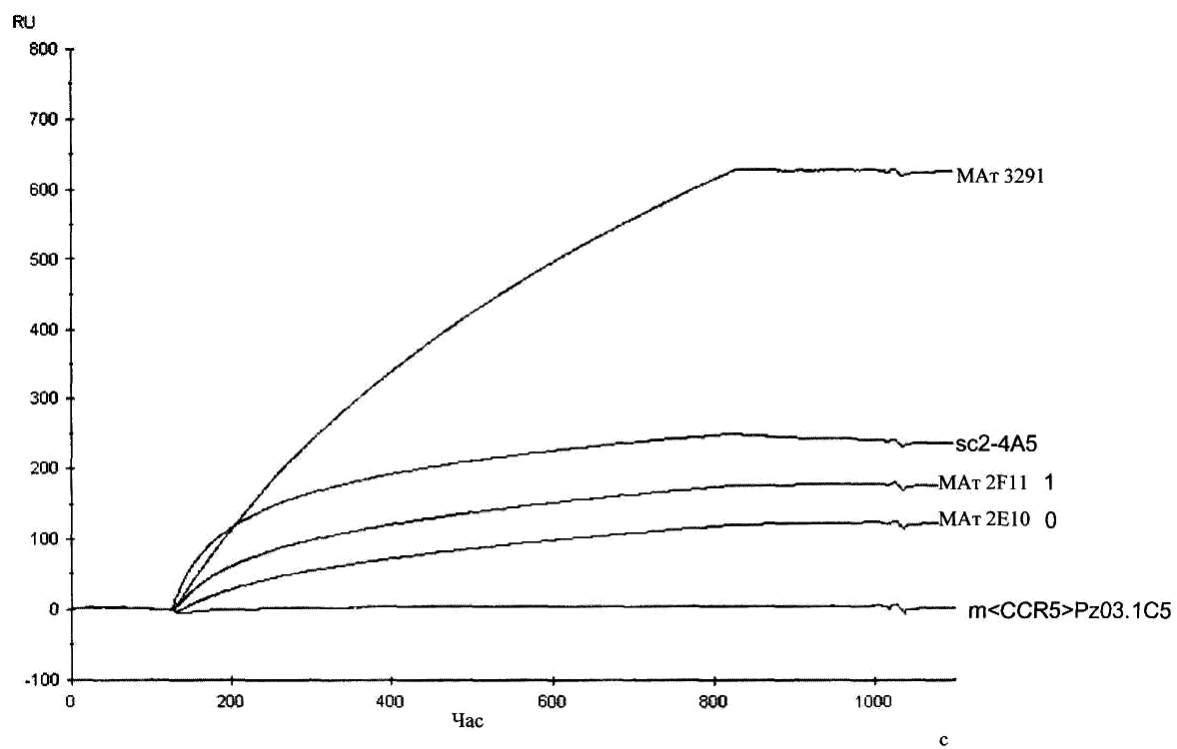
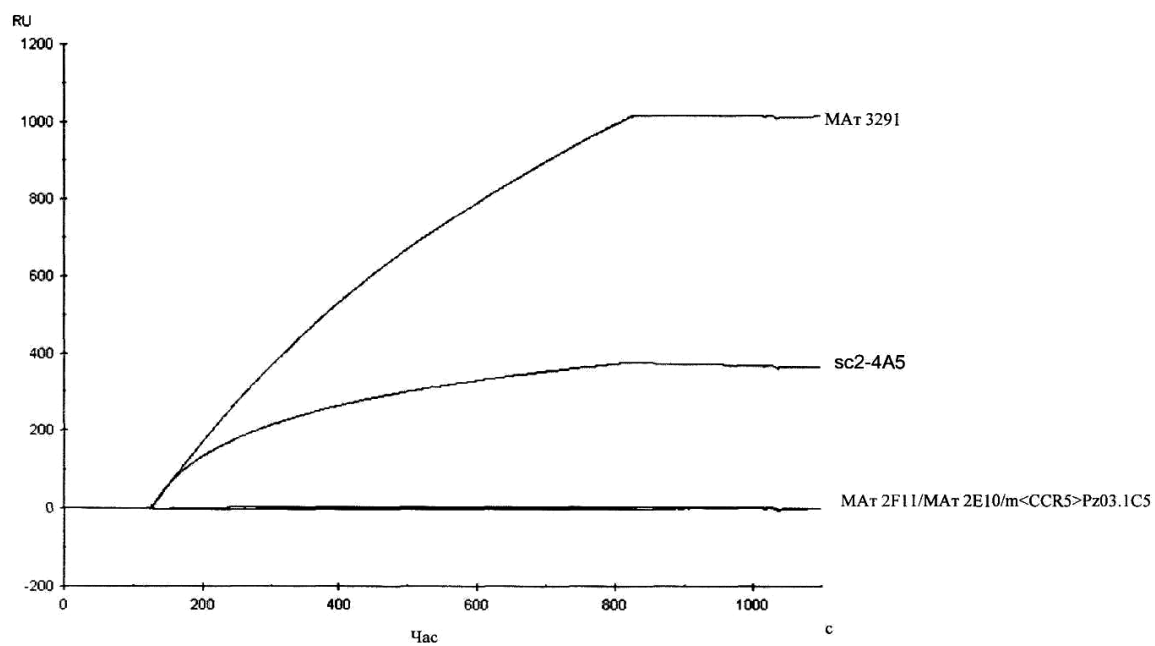
- ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 45, і CDR1-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 46, або
- ж) варіабельна ділянка важкого ланцюга містить CDR3-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 49, CDR2-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 50, і CDR1-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 51, і варіабельна ділянка легкого ланцюга містить CDR3-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 52, CDR2-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 53, і CDR1-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 54.
6. Антитіло за п. 5, яке **відрізняється** тим, що варіабельна ділянка важкого ланцюга містить CDR3-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 25, CDR2-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 26, і CDR1-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 27, і варіабельна ділянка легкого ланцюга містить CDR3-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 28, CDR2-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 29, і CDR1-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 30.
7. Антитіло за п. 5, яке **відрізняється** тим, що варіабельна ділянка важкого ланцюга містить CDR3-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 33, CDR2-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 34, і CDR1-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 35, і варіабельна ділянка легкого ланцюга містить CDR3-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 36, CDR2-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 37, і CDR1-ділянку, послідовність якої представлена в SEQ ID NO: 38.
8. Антитіло за будь-яким з пп. 1-7, яке **відрізняється** тим, що антитіло являє собою людське антитіло підкласу IgG1 або людське антитіло підкласу IgG4.
9. Антитіло за будь-яким з пп. 1-7, яке **відрізняється** тим, що антитіло являє собою людське антитіло підкласу IgG1.
10. Антитіло за будь-яким з пп. 1-7, призначене для лікування раку.
11. Антитіло за будь-яким з пп. 1-7, призначене для лікування втрати кісткової тканини.
12. Антитіло за будь-яким з пп. 1-7, призначене для попередження або лікування метастазів.
13. Антитіло за будь-яким з пп. 1-7, призначене для лікування запальних захворювань
14. Фармацевтична композиція, призначена для лікування опосередкованих CSF-1R захворювань, яка **відрізняється** тим, що містить в ефективній кількості антитіло за будь-яким з пп. 1-7 і прийнятні добавки.
15. Нуклеїнова кислота, що кодує антитіло за будь-яким з пп. 1-7.
16. Експресійний вектор, який **відрізняється** тим, що містить нуклеїнову кислоту за п. 15, для експресії антитіла за будь-яким з пп. 1-7 в прокаріотичній або еукаріотичній клітині-хазяїні.
17. Прокаріотична або еукаріотична клітина-хазяїн для експресії антитіла за будь-яким з пп. 1-7, яка містить вектор за п. 16.
18. Застосування антитіла за будь-яким з пп. 1-7 для приготування лікарського засобу, призначеного для лікування раку.
19. Застосування антитіла за будь-яким з пп. 1-7 для приготування лікарського засобу, призначеного для лікування втрати кісткової тканини.
20. Застосування антитіла за будь-яким з пп. 1-7 для приготування лікарського засобу, призначеного для лікування метастазів.
21. Застосування антитіла за будь-яким з пп. 1-7 для приготування лікарського засобу, призначеного для лікування запальних захворювань.
22. Спосіб одержання рекомбінантного антитіла за будь-яким з пп. 1-7, який **відрізняється** тим, що експресують нуклеїнову кислоту за п. 15 в прокаріотичній або в еукаріотичній клітині-хазяїні і виділяють антитіло із клітини або супернатанту клітинної культури.

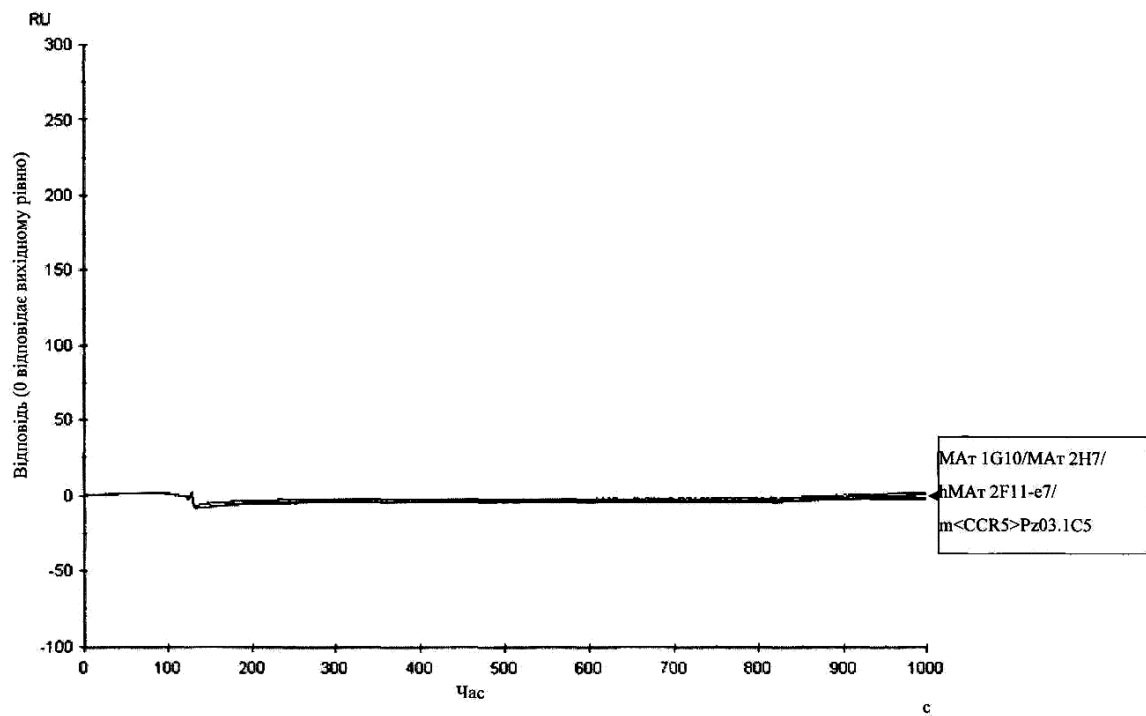


Фіг. 1а

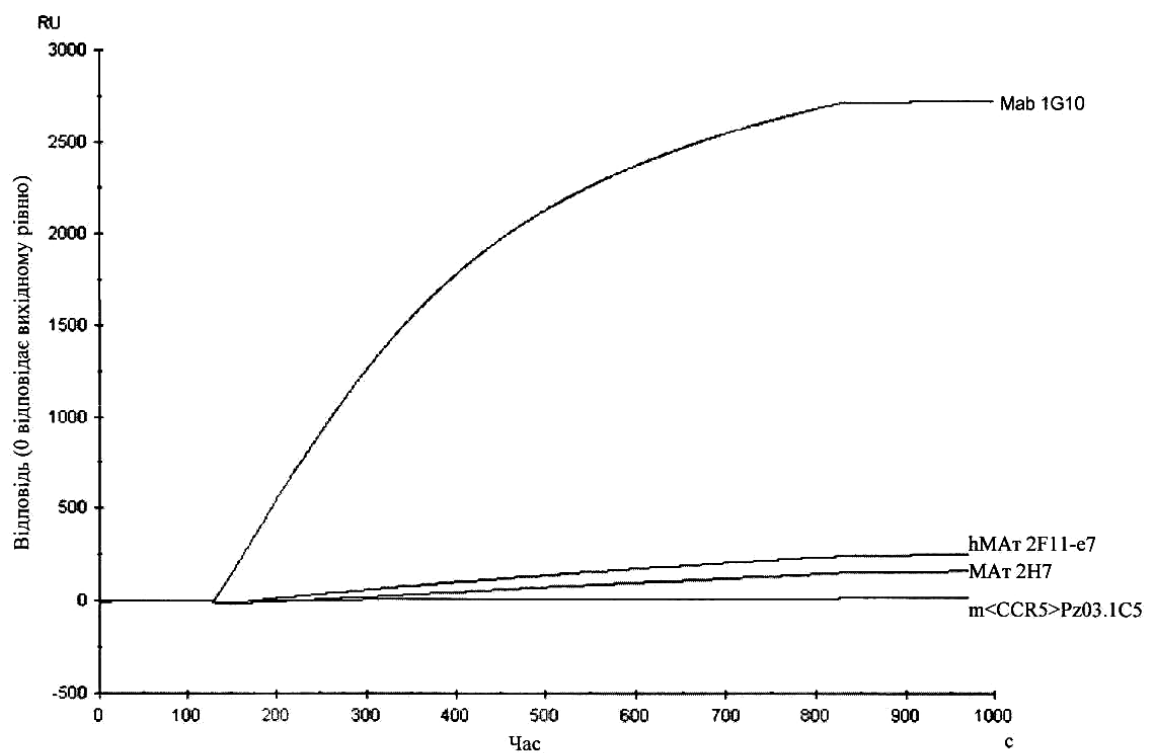


Фіг. 1б

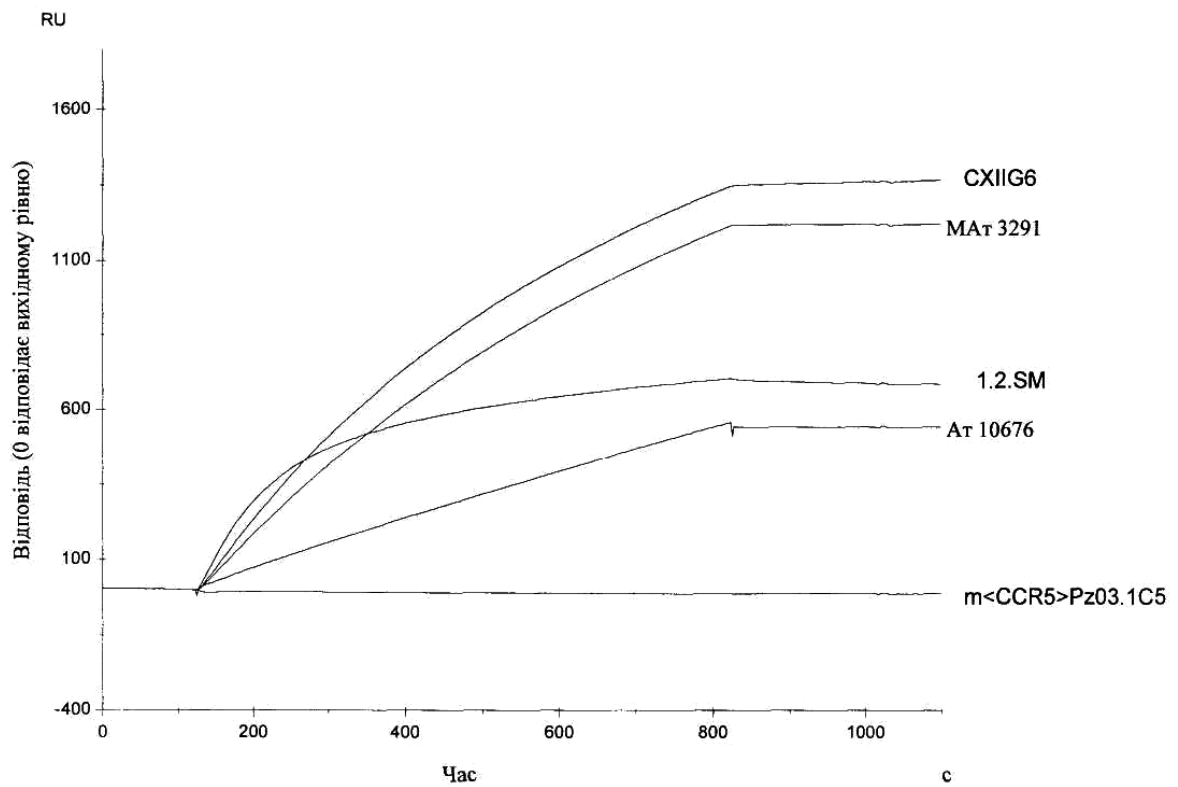
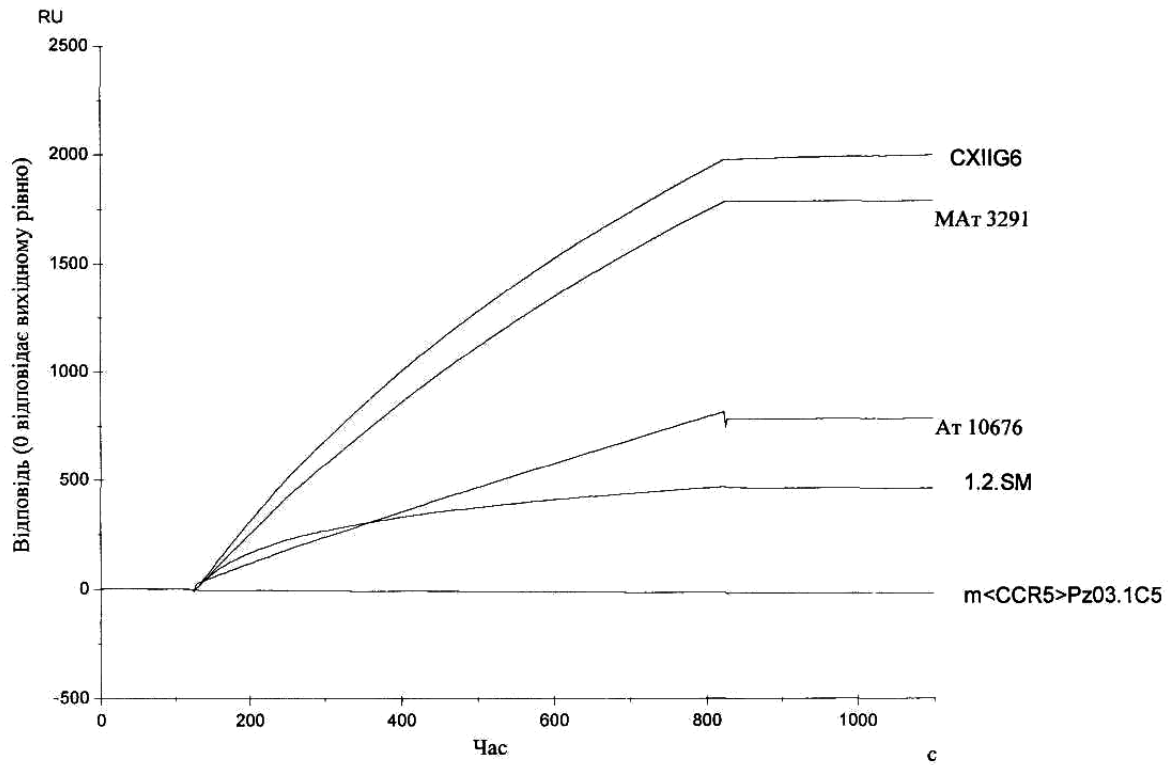


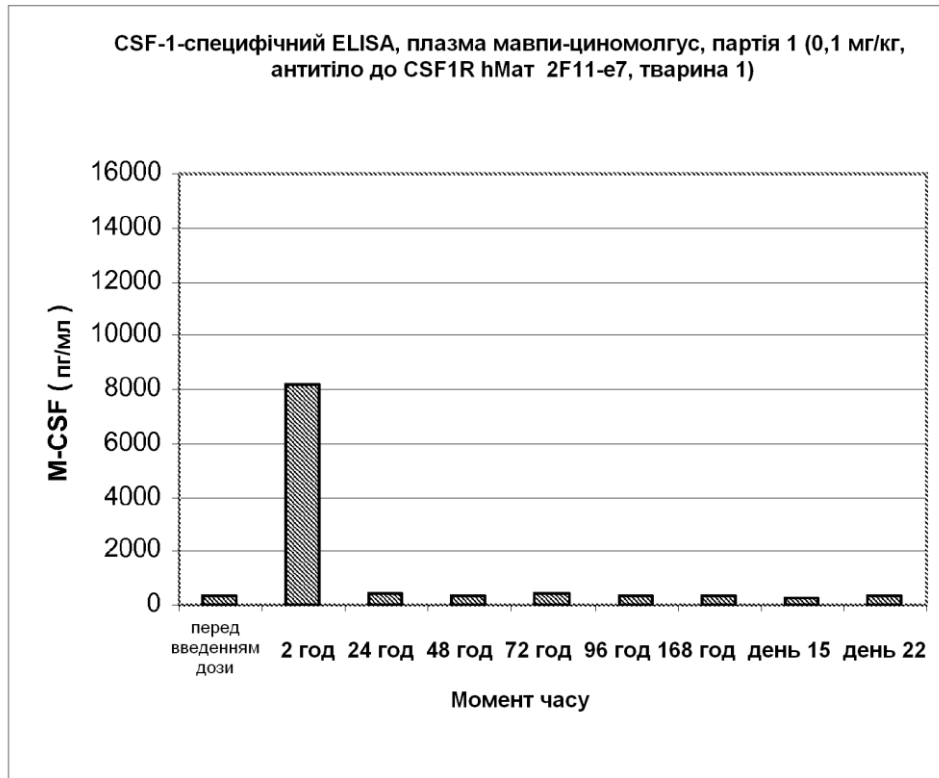


Фіг. 2в

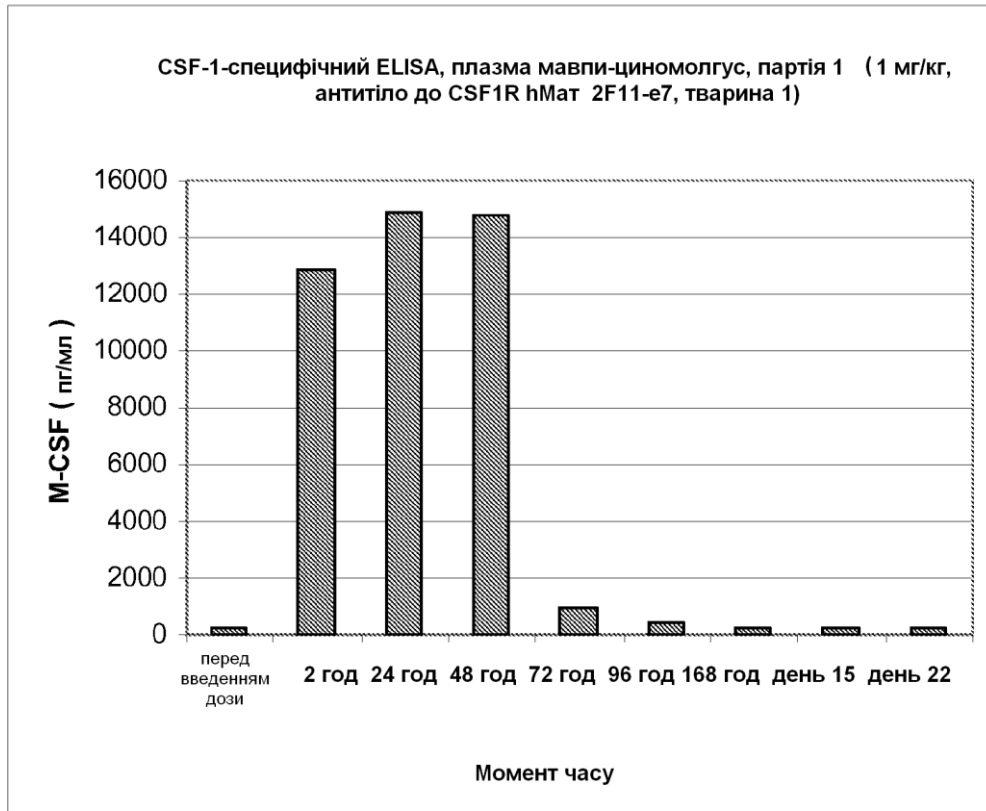


Фіг. 2г

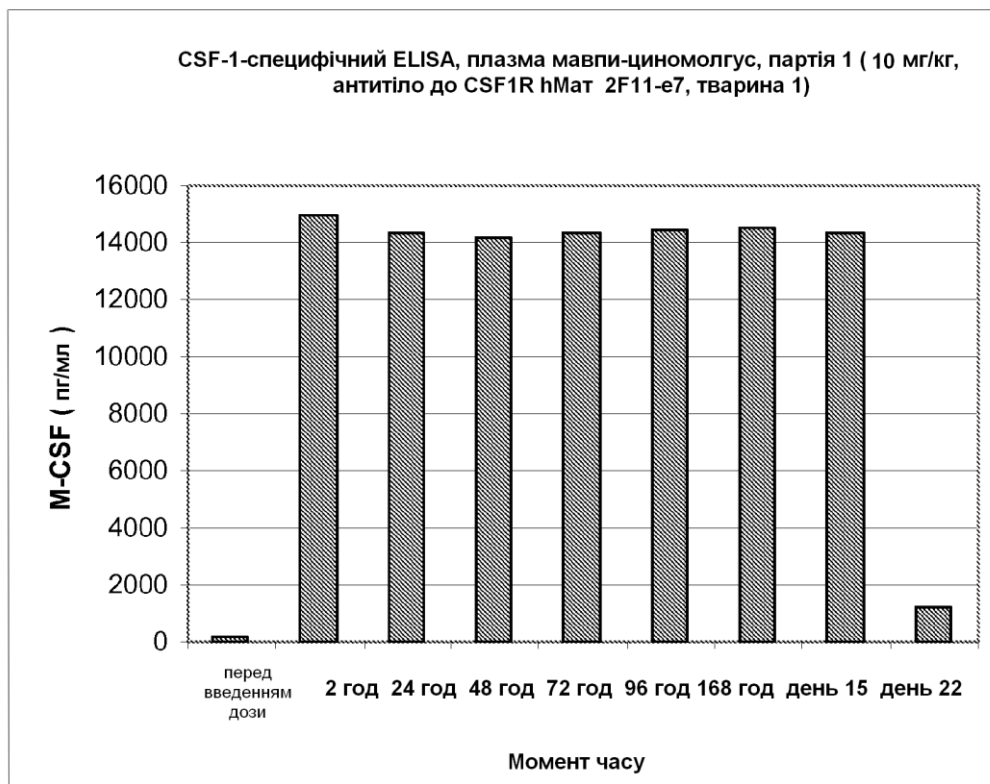




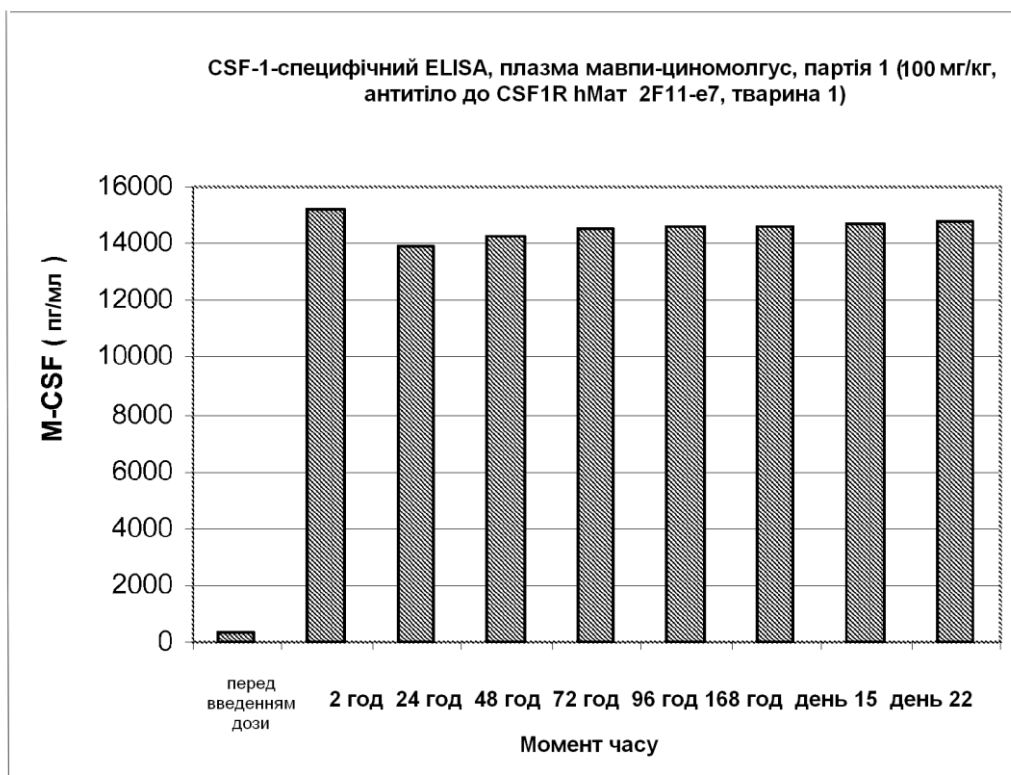
Фіг. 3а



Фіг. 3б

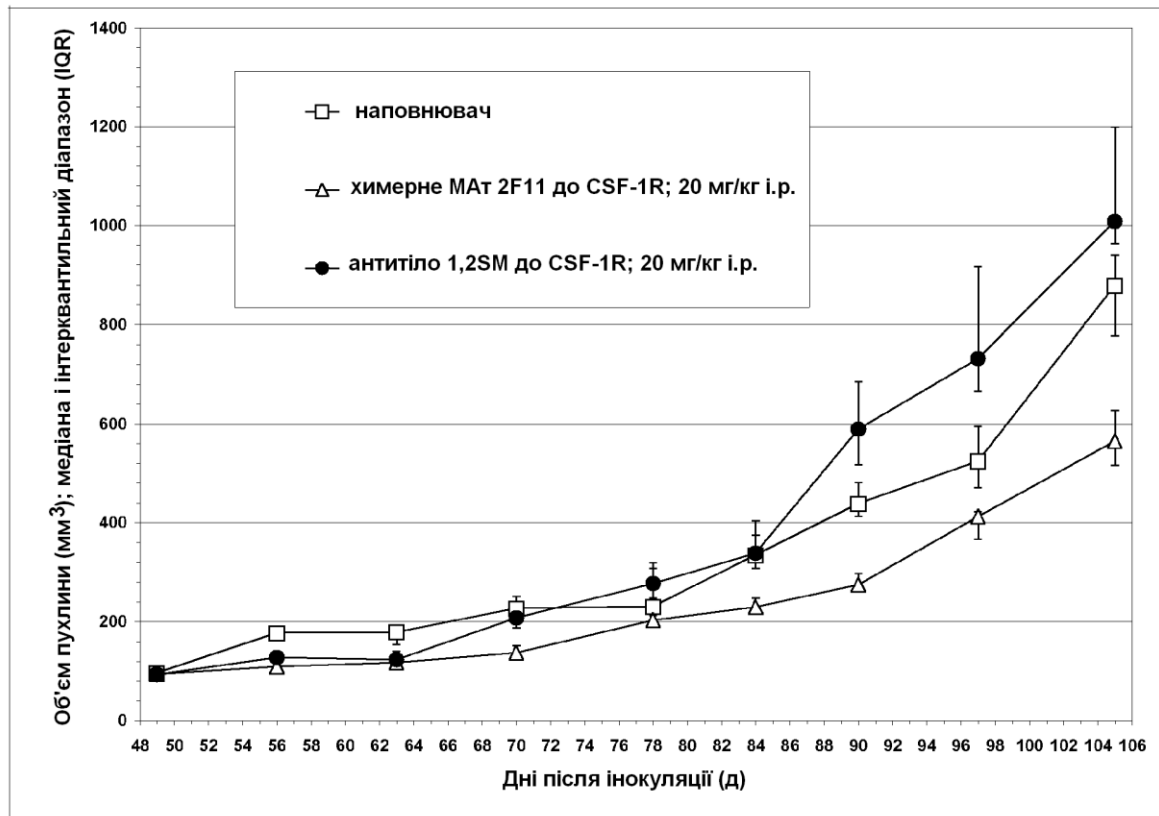


Фіг. 3в



Фіг. 3г





Фіг. 4

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

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