



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **102097** (13) **C2**

(51) МПК (2013.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

A61P 29/00

C07K 16/24 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

| | | | |
|---|--|--|--|
| (21) Номер заявки: | а 2010 14289 | (72) Винахідник(и): | Платер-Зіберк Крістін (FR) |
| (22) Дата подання заявки: | 28.04.2009 | (73) Власник(и): | Амген Рісьорч (Мюнхен) ГмбХ, Staffelseestrasse, 2, D-81477 Munich, Germany (DE) |
| (24) Дата, з якої є чинними права на винахід: | 10.06.2013 | (74) Представник: | Вуліх Олександр Наумович, реєстр. №102 |
| (31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: | 61/125,880 | (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: | WO 2006/066088 A2, 22.06.2006 |
| (32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: | 29.04.2008 | | |
| (33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: | US | | |
| (41) Публікація відомостей про заявку: | 25.02.2011, Бюл.№ 4 | | |
| (46) Публікація відомостей про видачу патенту: | 10.06.2013, Бюл.№ 11 | | |
| (86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ | РСТ/EP2009/055129, 28.04.2009 | | |

(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ЗАПАЛЬНОГО ЗАХВОРЮВАННЯ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ СПОЛУКИ, ЯКА НЕЙТРАЛІЗУЄ GM-CSF, ТА СПОЛУКИ, ЯКА НЕЙТРАЛІЗУЄ IL-17

(57) Реферат:

Винахід стосується способу лікування запального захворювання у пацієнта, який страждає на запальне захворювання, у якому зазначеному пацієнту вводять сполуку, яка нейтралізує гранулоцитарномакрофагальний колонієстимулюючий фактор (далі GM-CSF), а також сполуку, яка нейтралізує інтерлейкін IL-17, причому сполуку, яка нейтралізує GM-CSF вибирають з групи, що включає поліпептид і малу молекулу, і сполуку, яка нейтралізує IL-17, вибирають з групи, що включає поліпептид і малу молекулу.

UA 102097 C2

Винахід стосується лікування хвороб із запальним процесом. З іншого боку цей винахід стосується лікування пухлинних захворювань, включаючи захворювання на рак. Іще один аспект цього винаходу стосується фармацевтичної сполуки для лікування запальних та/або пухлинних захворювань. Залежно від юрисдикції, за якою подається ця заявка, винахід може також

відноситись до використання двох конкретних речовин для виробництва фармацевтичного препарату для лікування зазначених вище захворювань.

Гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор (GM-CSF), спочатку визначений як гематопоетичний ростовий фактор, показаний останнім часом як важливий цитокін при запаленні та аутоімунній реакції. Високі рівні мРНК або білку GM-CSF спостерігаються в ряді місць запалення, у хворих на алергію та псоріаз, артрит та астму.

Багатовислідження *in vivo*, проведені за останні роки, показали, що блокада GM-CSF за допомогою нейтралізуючих антитіл може виступати як профілактика або навіть спосіб лікування запальних процесів при різних моделях запалення, включаючи моделі експериментального аутоімунного енцефаліту з артритом, псоріазу та захворювань легень. GM-CSF відіграє важливу роль у вродженому імунитеті шляхом стимуляції проліферації та активації зрілих нейтрофілів та макрофагів. Крім того, була показана ключова роль GM-CSF у презентації антигену шляхом керування диференціації та дозрівання дендритних клітин *in vitro*. За експериментами *in vivo*, GM-CSF був визначений як такий, що переважно індукує 1 тип прозапальних цитокінів через моноклеари периферійної крові (PBMC), Т-клітини та антиген-презентуючі клітини (APC) людського організму.

Інтерлейкін-17 (IL-17) це сімейство цитокінів набутої імунної системи, що складається з шести членів, від IL-17A до IL-17F. Описано, що IL-17 зв'язується з рецепторами IL-17, родиною, в яку зараз включають п'ять членів, від IL-17RA до IL-17RE, які відзначаються високою гомологією послідовностей відповідно один до одного. Члени родини рецепторів IL-17 являють собою трансмембранні протеїни I типу. Зараз загальноприйнятим вважають те, що рецептори для IL-17 широко експресуються всіма клітинами імунної системи, а стимуляція різних типів клітин за допомогою IL-17A, IL-17F та IL-17D може викликати вироблення інших цитокінів, таких, як IL-1 β , TNF α та IL-6, а також хемокинів IL-8 та MIP-1 α . На відміну від його рецепторів, IL-17 в основному виробляється недавно відкритими клітинами Th 17, і його експресія часто пов'язується з інфекціями та аутоімунними процесами.

Ревматоїдний артрит (РА) є хронічним, запальним, системним аутоімунним захворюванням. Незважаючи на те, що етіологія та патогенез РА до цього часу чітко не з'ясовані, захворювання характеризується агресивною синовіальною гіперплазією (утворенням панусів) та запаленням (синовіт), які спричиняють прогресуючу деструкцію хрящів суглобів та кісток. Ревматоїдний артрит (РА) є результатом комплексної взаємодії багатьох типів клітин та факторів, які належать як до вродженої, так і набутої імунної системи. Наприклад, є свідчення того, що загальне підвищення рівня вироблення різних цитокінів спостерігається у хворих на РА, тобто значно підвищені рівні IL-2, IL-4, IL-5, IL-1, IL-10, IL-13, IFN γ , G-CSF, GM-CSF, MCP-1 та MIP-1 β порівняно до контрольних показників. Крім того, IL-1, TNF α та IL-18 були визначені як виражені фактори запалення, що стимулюють Т-клітини при РА. У друкованих роботах висловлювалася гіпотеза про патогенну роль GM-CSF при РА. В підтримку цієї гіпотези існують результати досліджень, які показують, що (i) GM-CSF виробляється в синовіальній оболонці хворих на РА і що підвищення рівня цього цитокіну може бути виміряне у їхній синовіальній рідині; (ii) лікування нейтралізуючими анти-GM-CSF моноклональними антитілами (mAb) робить перебіг захворювання менш важким у моделі артриту, спричиненого колагеном, на мишах (CIA); (iii) що дефектні за GM-CSF миші мають нижчу сприйнятливості до індукції виникнення хвороби колагеном та mBSA; (iv) що ін'єкційне введення рекомбінантного GM-CSF CIA мишам загострює захворювання, а також (v) що хворі на РА, які отримували GM-CSF після курсу хіміотерапії, демонстрували спалахи тяжкості перебігу артриту.

Крім зазначених вище цитокінів різних типів, IL-17 також вважається залученим в патології РА, тому що рівень IL-17 підвищений при РА у синовіальній оболонці та синовіальній рідині, а блокада IL-17 послаблює запалення суглобів та їхнє руйнування в процесі розвитку артриту на експериментальних моделях. Також миші, дефектні за IL-17, демонструють більш низький рівень розвитку артриту, спричиненого колагеном, а при їхньому схрещуванні з мишами IL-1Ra $^{-/-}$, IL-17 $^{-/-}$ миші зовсім не мали спонтанних нападів поліартриту, який звичайно спостерігається у Balb/c мишей, дефектних за антагоністом рецептора IL-1. Також було показано, що місцева коstimуляція IL-17 та TNF α на мишах в експериментах *in vivo* викликала GM-CSF-залежне накопичення нейтрофілів, у дихальних шляхах через дію як на рекрутинг, так і на виживання нейтрофілів.

Однією з моделей, що використовується для дослідження РА-подібних захворювань людини

на мишах є артрит, спричинений клітинними стінками стрептококів (SCW). У цій моделі як гостра форма захворювання, так і хронічний рецидивуючий артрит може спричинюватися внутрішньо-суглобовими(в/с) ін'єкціями фрагментів бактеріальних клітинних стінок у колінний суглоб мишей. Гострий артрит, при якому вроджений імунітет відіграє головну патогенну роль, викликається однією ін'єкцією фрагментів SCW у колінний суглоб мишей, які раніше не використовувалися у дослідках. Шляхом повторюваних в/с введень фрагментів SCW формується хронічна рецидивуюча модель, при якій медіатори набутого імунітету поступово починають перевищувати первинну домінацію вродженої реакції. Колаген-індукований артрит (CIA) є ще однією широко використовуваною моделлю артриту, що базується на опосередкованій Т-клітинами та антитілами аутоімунній реактивності проти хрящового колагену II типу(CII). Ця модель на мишах має певні клінічні, гістопатологічні та імунологічні спільні риси з РА людини, вона характеризується насамперед запаленням синовіальної оболонки з наступною ерозією хряща та кістки у важкій формі. Нинішні винахідники досліджували терапевтичну ефективність нейтралізації GM-CSF на моделі TNF α -незалежного хронічного SCW артриту та на TNF α -залежній моделі CIA. Вони також вивчали вплив блокування як вродженого, так і набутого імунітету шляхом інгібування сигнальних шляхів GM-CSF та IL-17. Це досягалося нейтралізацією GM-CSF на мишах, дефектних за рецептором IL-17 (IL-17R-KO миші) або комбінованою терапією сполуками, що нейтралізують GM-CSF та IL-17. Здивування винахідників викликало те, що обидва типи запальних захворювань можна лікувати дуже ефективно шляхом комбінованої блокади сигнальних шляхів GM-CSF та IL-17. В моделі CIA комбіноване застосування сполуки, яка інгібує GM-CSF, та сполуки-інгібітора IL-17 значно знижувало медичні показники спричиненого колагеном артриту, в той час як лікування сполукою-інгібітором GM-CSF або сполукою-інгібітором IL-17 окремо не викликало значного полегшення протікання артриту. Крім того, детальний гістологічний аналіз показав синергічний ефект комбінованої терапії при запаленні суглобів та руйнуванні хряща й кістки. Таким чином, комбінована блокада обох сигнальних шляхів спричиняє високоефективний захист від запалення та руйнування суглобів. Ці результати викликали особливо сильне здивування, оскільки до останнього часу висувалася гіпотеза про те, що GM-CSF знаходиться в сигнальному ланцюзі нижче IL-17 (див роботи, наприклад, Kawaguchi M. et al., J. Allergy Clin. Immunol. 114 (2004), 444-450; Starnes T. et al., The Journal of Immunology 169 (2002), 642-646; Laan M. et al., Eur. Respir. J. 21 (2003), 387-393). Додатковий або синергічний ефект не був очікуваним від лікування із комбінованим застосуванням сполук, що нейтралізують GM-CSF та IL-17. Ця заявка є першою, в якій демонструється переваги комбінованого блокування IL-17 та GM-CSF *in vivo*. Наведені у ній дані особливо підкреслюють, що лікування анти-GM-CSF у комбінації із анти-IL-17 дає глибокий терапевтичний ефект не тільки при РА, але й також при інших аутоімунних та запальних захворюваннях, які наводяться далі.

Таким чином, фармацевтичні засоби та способи цього винаходу спеціально направлені на лікування артриту, але можуть також застосовуватися при лікуванні інших запальних захворювань, включаючи розсіяний склероз, псоріаз та запалення легенів, астму та хронічне обструктивне захворювання легень (ХОЗЛ).

Визначення

Визначення терміну "об'єкт", що вживається у цілому тексті цього документу, стосується тварин. Термін "тварина" включає, але не обмежується, ссавців, таких, як лабораторні тварини (гризуни, напр., щури, морські свинки, хом'яки та миші, приматів, наприклад, яванських макак або макак), домашніх тварин або тих які живіть з людьми (напр., собаки або кішки), сільськогосподарських тварин (напр., биків, овець, кіз та свиней) та/або людей. Бажано, щоб тварина була людиною або приматом.

Термін "GM-CSF", який вживається у тексті цього документу, означає GM-CSF як людини (*Homo sapiens*), так і приматів, згідно з існуючими у літературі визначеннями, і включає його варіанти (гомологи). Термін також включає рецептори GM-CSF людини та приматів, а також їхні варіанти (гомологи). Особливо бажані варіанти (гомологи) GM-CSF приматів або рецепторів GM-CSF включають мавп-гібонів (*nomascus concolor*, також відомих під назвою західного чорного хохлатого гібона) та мавп родини макак, наприклад, резус-макаки (*Macaca mulatto*) та яванського макака (*Macaca fascicularis*).

Термін "антитіло, що зв'язується з GM-CSF або рецептором GM-CSF", або функціональний фрагмент останнього, який вживається у тексті цього документу, включає антитіло або фрагмент антитіла, яке має здатність зв'язуватися з GM-CSF або рецептором GM-CSF тварини. А саме, він включає будь-яке антитіло або фрагмент останнього, яке демонструє перехресну реактивність (стосовно зв'язування з рецептором GM-CSF або GM-CSF) між людиною та щонайменше одним біологічним видом мавп, зазначених раніше. Наприклад, антитіло або

фрагмент останнього здатне зв'язуватися (та нейтралізувати) з людським GM-CSF та GM-CSF яванського макака (*Macaca fascicularis*). Це дає особливі переваги для молекули антитіла, призначеної для терапевтичного введення людям, оскільки таке антитіло повинно, як це прийнято, пройти через цілий ряд тестів до того, як воно одержить нормативне затвердження, при цьому певні види тестування на ранніх етапах будуть виконуватися на тваринах, що не є людьми. При виконанні таких тестів, як правило, важливо використовувати тварин, що не є людьми, але які при цьому мають значну генетичну подібність до людей (наприклад, примати, такі, як людиноподібні мавпи), тому що отримані таким чином результати матимуть зазвичай високу прогностичну силу відповідних результатів, які можна чекати при введенні такої ж молекули людям. Водночас така прогностична здатність, заснована на експериментах із тваринами, залежить, хоча б частково, від того, чи можна співставити молекули, і якщо це значення дуже високе внаслідок міжвидової реактивності, та ж сама терапевтична молекула може вводитися людям і тваринам, що не є людьми. Відповідно якщо молекула антитіла є перехресно-реактивною для одного й того ж самого антигену у людей та інших біологічних видів, можна проводити експерименти, вживаючи однакову молекулу антитіла для людей та інших біологічних видів, наприклад, для одного з видів мавп, зазначених вище. Це підвищує ефективність самих експериментів, а також прогностичну силу таких тестів у тому, що стосується поведінки таких антитіл у людському організмі, що є кінцевим фокусом інтересу з точки зору проведення терапії.

Термін "антитіло, що зв'язується з GM-CSF або рецептором GM-CSF", який вживається у цілому тексті цього документу, також включає моноклональні антитіла до GM-CSF або рецептору GM-CSF, або функціональний фрагмент останнього, що має таку зв'язувальну здатність.

Перший аспект цього винаходу стосується способу лікування запального процесу у об'єктів, що страждають від запального захворювання, і цей спосіб включає введення сполуки, яка нейтралізує GM-CSF (скорочено: GM-CSF-інгібуюча сполука) та сполуку, яка нейтралізує IL-17 (скорочено: IL-17-інгібуюча сполука). Сполуки можуть бути частинами одного препарату або окремими фармацевтичними препаратами, залежно від параметрів, відомих спеціалістам.

Бажані конструкції способу є наступними:

(а) Спосіб, у якому GM-CSF-нейтралізуюча сполука вводиться об'єкту перед або після сполуки, що нейтралізує IL-17, або спосіб, при якому обидві сполуки вводяться одночасно;

(b) Спосіб, згідно з першим аспектом винаходу або за пунктом (а), в якому об'єктом лікування є тварина згідно з вище зазначеним;

(c) Спосіб, згідно з першим аспектом винаходу якого або за п. (а) або (b), в якому GM-CSF-нейтралізуюча сполука є поліпептидом, пептидоміметиком, нуклеїновою кислотою, або малою молекулою;

(d) Спосіб за п. (c), в якому поліпептид є антитілом або функціональним фрагментом антитіла, що зв'язується з GM-CSF або рецептором GM-CSF; бажано, щоб антитіло було моноклональним антитілом або функціональним фрагментом останнього.

(e) Спосіб за п. (d), в якому антитіло є людським моноклональним антитілом або його функціональним фрагментом;

(f) Спосіб за п. (d) або п. (e), в якому антитіло або функціональний фрагмент останнього що зв'язується з епітопом GM-CSF людини або примату, бажано з переривчастим епітопом GM-CSF людини або примату, при цьому краще, якщо епітоп включає амінокислоти 23-27 (RRLLN) та/або амінокислоти 65-77 (GLR/QGSLTKLKGPL). Варіативність у позиції 67 у межах послідовності амінокислот фрагменту 65-77 відображує гетерогенність у цій позиції GM-CSF між, з одного боку, GM-CSF людини та гібона (іу позиції 67 є R) та, з іншого боку, мавп родини макак, наприклад, яванського макака та резус-мавп (в яких у позиції 67 є Q);

(g) Спосіб за п.(f), в якому зазначений переривчастий епітоп, включає в себе амінокислоти 28-31 (LSRD), амінокислоти 32-33 (TA), та/або амінокислоти 21-22 (EA);

(h) Спосіб за будь-якими з пп.(e), (f), та (g), в якому моноклональне антитіло людини або функціональний фрагмент останнього включає варіативний регіон важкого ланцюга CDR3, який включає будь-яку амінокислотну послідовність, яка належить до зазначених під такими послідовними номерами(SEQ ID NOs): 1-13 або 56;

(i) Спосіб за п.(h), в якому будь-яка з означених послідовностей CDR3 варіативного регіону важкого ланцюга існує разом у варіативному регіоні важкого ланцюга із CDR1 варіативного регіону важкого ланцюга, який включає амінокислотну послідовність наведену під послідовним номером 14 та CDR2 варіативного регіону важкого ланцюга, наведену під послідовним номером 15;

(j) Спосіб за п.(h) або (i), в якому моноклональне антитіло людини або функціональний

фрагмент останнього включає варіативний регіон легкого ланцюга CDR1, який включає послідовність амінокислот, зазначених під послідовним номером 16, CDR2, який включає послідовність амінокислот, зазначених під послідовним номером 17, та CDR3, який включає послідовність амінокислот, зазначених під послідовним номером 18,

5 (к) Спосіб, згідно з (j), де моноклональне антитіло людини або функціональний фрагмент останнього включає варіативний регіон легкого ланцюга з послідовністю амінокислот, зазначених під будь-якими з послідовних номерів 19, 54 та 55;

(l) Спосіб за п.(h) або п. (i), в якому моноклональне антитіло людини або функціональний фрагмент останнього включає варіативний регіон важкого ланцюга з послідовністю амінокислот, зазначених під будь-якими з послідовних номерів 20-33, 52 або 53;

10 (m) Спосіб за будь-якими з пп.(h) - (l), в якому моноклональне антитіло людини або функціональний фрагмент останнього включає CDR1 варіативного регіону легкого ланцюга, який включає послідовність амінокислот, зазначених під послідовним номером 16, CDR2 який включає послідовність амінокислот, зазначених під послідовним номером 17, CDR3, який
15 включає послідовність амінокислот, зазначених під послідовним номером 18, та CDR1 варіативного регіону важкого ланцюга, що включає послідовність амінокислот, зазначених під послідовним номером 14, область CDR2, яка має послідовність амінокислот, наведену під послідовним номером 15, та CDR3, яка має послідовність амінокислот, наведену під будь-якими з послідовних номерів 1-13 або 56;

20 (n) Спосіб за будь-якими з пп. (h) - о (m), в якому моноклональне антитіло людського організму або функціональний фрагмент останнього включає амінокислотну послідовність легкого ланцюга, наведену під послідовним номером 34, та амінокислотну послідовність важкого ланцюга, наведену під будь-якими з послідовних номерів 35-48,

(о) Спосіб згідно з будь-якими з пп. з (h) по (n), в якому моноклональне антитіло людського організму або функціональний фрагмент останнього включає амінокислотну послідовність, що
25 має гомологію не менше 70 % до відповідної послідовності амінокислот, наведеної під будь-якими з послідовних номерів 1-48 та/або 52-56. Подібність визначається за стандартними програмами вирівнювання послідовностей, такими, як Vector NTI (InforMax™, Меріленд, США). Такі програми порівнюють вирівняні послідовності на основі амінокислот і мають регулювання
30 щодо ступеню вимог до порівняння (наприклад, ідентичні амінокислоти, консервативні заміни амінокислот і т.п.). У значенні цього терміну, що використовується і цьому описі, дві амінокислоти, які розглядаються, вважаються "консервативними замінами" одна одної, якщо кожна з них належить до одного й того ж хімічного класу, наприклад, кислотних, неполярних, полярних незаряджених та основних. Розглядаючи як приклад, що не вичерпує всі можливі
35 варіанти, дві різні амінокислоти, що належать до класу неполярних амінокислот, розглядатимуться як "консервативні заміни" одна одної, навіть якщо ці дві амінокислоти не є ідентичними, в той час як неполярна амінокислота, з одного боку, та основна амінокислота, з іншого боку, не будуть розглядатися як "консервативні заміни" одна одної. У таблиці 3.1 книги "Molecular Biology of the Cell" Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts and Walter (Молекулярна
40 біологія клітини), 4^е видання (2002), автори: Альбертс, Джонсон, Льюїс, Рафф та Уолтер, амінокислоти поділені на чотири групи: кислотні, неполярні, незаряджені та основні. Така класифікація може бути використана для цілей цього винаходу при визначенні того, чи є певна амінокислота а консервативною заміною іншої амінокислоти, що розглядається;

(р) Спосіб, згідно з першим аспектом винаходу якого або за будь-якими з пп. (а) -(о), в якому
45 IL-17- нейтралізуюча сполука є поліпептидом, пептидоміметиком або нуклеїновою кислотою, або малою молекулою;

(q) Спосіб за п.(р), в якому поліпептид є антитілом або функціональним фрагментом останнього, що зв'язується з рецепторами IL-17 або IL-17; бажано, щоб антитіло було моноклональним антитілом або функціональним фрагментом останнього.

50 (r) Спосіб за п. (q), в якому антитіло є моноклональним антитілом людини або функціональним фрагментом антитіла людини, та

(s) Спосіб, згідно з першим аспектом винаходу якого або за будь-якими з пп. (а) - (r), в якому запальне захворювання являє собою ревматоїдний артрит (РА) (включаючи РА, стійкий до лікування за допомогою нейтралізаторів TNF-альфа), астму, розсіяний склероз (РС), хронічне
55 обструктивне захворювання легенів (ХОЗЛ), гострий респіраторний дистрес синдром (ГРДС), ідіопатичний фіброз легенів (ІФЛ), запальовальну хворобу кишковика (ЗХК), захворювання Крона, увеїт, дегенерація жовтої плями, коліт, псоріаз, уоллеровське переродження, антифосфоліпідний синдром (АФС), гострий коронарний синдром, рестеноз, атеросклероз, рецидивуюча поліхондрія (РП), гострий або хронічний гепатит, ортопедичні імплантати, які не
60 приживаються, гломерулонефрит, вовчанку або інші розлади аутоімунні розлади.

Другий аспект цього винаходу стосується способу лікування пухлинних захворювань у об'єктів, що страждають на пухлинні хвороби, спосіб, який передбачає введення сполуки, що нейтралізує GM-CSF, та сполуки, що нейтралізує IL-17. Сполуки можуть становити частину одного й того ж самого препарату або вони можуть бути окремими фармацевтичними сполуками, залежно від характеристик, відомих спеціалістам.

Бажана модифікація за способом згідно з другим аспектом цього винаходу є наступною:

(а) Спосіб, в якому сполука, що нейтралізує GM-CSF, вводиться об'єкту перед або після введення сполуки, що нейтралізує IL-17, або спосіб, в якому обидві сполуки вводяться одночасно;

(b) Спосіб, в якому згідно з другим аспектом цього винаходу або за п.(а), в якому об'єктом лікування є тварина згідно з визначенням, наведеного вище. Бажано, щоб об'єкт був людиною або приматом;

(c) Спосіб, за другим аспектом винаходу якого або за пп. (а) або (b), в якому сполука, що нейтралізує GM-CSF, є поліпептидом, пептидоміметиком, нуклеїновою кислотою, або малою молекулою;

(d) Спосіб за пунктом (c), в якому поліпептид є антитілом або функціональним фрагментом антитіла, що зв'язується з GM-CSF або рецептором GM-CSF; бажано, щоб антитіло було моноклональним антитілом або функціональним фрагментом останнього.

(e) Спосіб аз пунктом (d), в якому антитіло є людським моноклональним антитілом або функціональним фрагментом останнього;

(f) Спосіб за п. (d) або (e), в якому антитіло або функціональний фрагмент останнього зв'язується з епітопом GM-CSF людини або примату. Бажано, щоб епітоп був переривчастим епітопом GM-CSF людини або примату, при цьому краще, якщо епітоп включає амінокислоти 23-27 (RRLLN) та/або амінокислоти 65-77 (GLR/QGSLTKLKGPL).

(g) Спосіб за п.(f), в якому зазначений переривчастий епітоп включає амінокислоти 28-31 (LSRD), амінокислоти 32-33 (TA), та/або амінокислоти 21-22 (EA);

(h) Спосіб за будь-якими з пп. (e), (f) та (g), в якому моноклональне антитіло людини або функціональний фрагмент останнього, включає варіативний регіон важкого ланцюга CDR3, який включає будь-яку амінокислотну послідовність, яка належить до зазначених під такими послідовними номерами (SEQ ID NOs): 1-13 або 56;

(i) Спосіб за п.(h), в якому будь-яка з означених послідовностей CDR3 варіативного регіону важкого ланцюга існує разом у варіативному регіоні важкого ланцюга із CDRI варіативного регіону важкого ланцюга, який включає амінокислотну послідовність наведену під послідовним номером 14 та CDR2 варіативного регіону важкого ланцюга, наведену під послідовним номером 15;;

(j) Спосіб за пунктами (h) або (i), в якому моноклональне антитіло людини або функціональний фрагмент останнього включає варіативний регіон легкого ланцюга CDRI, який включає послідовність амінокислот, зазначену під послідовним номером 16, CDR2, який включає послідовність амінокислот, зазначену під послідовним номером 17, та CDR3, який включає послідовність амінокислот, зазначену під послідовним номером 18;

(k) Спосіб за п.(j), в якому моноклональне антитіло людини або функціональний фрагмент останнього включає варіативний регіон легкого ланцюга з послідовністю амінокислот, зазначених під будь-якими з послідовних номерів 19, 54 та 55; (l) Спосіб за пунктом (h) або пунктом (i), в якому моноклональне антитіло людини або функціональний фрагмент останнього включає варіативний регіон важкого ланцюга з послідовністю амінокислот, зазначених під будь-якими з послідовних номерів 20-33, 52 або 53;

(m) Спосіб за будь-якими з пп.(h) - (l), в якому моноклональне антитіло людини або функціональний фрагмент останнього включає CDRI варіативного регіону легкого ланцюга, який включає послідовність амінокислот, зазначених під послідовним номером 16, CDR2 який включає послідовність амінокислот, зазначених під послідовним номером 17, CDR3, який включає послідовність амінокислот, зазначених під послідовним номером 18, та CDRI варіативного регіону важкого ланцюга, що включає послідовність амінокислот, зазначених під послідовним номером 14, область CDR2, яка має послідовність амінокислот, наведену під послідовним номером 15, та CDR3, яка має послідовність амінокислот, наведену під будь-якими з послідовних номерів 1-13 або 56;

(n) Спосіб за будь-якими з пп. з (h) - (m), в якому моноклональне антитіло людини або функціональний фрагмент останнього включає у варіативний регіон легкого ланцюга послідовність амінокислот, зазначену під послідовним номером 34 та послідовність амінокислот важкого ланцюга, зазначену під будь-якими послідовними номерами 35-48;

(o) Спосіб згідно з будь-якими з пп. з (h) по (n), в якому моноклональне антитіло людського

організму або функціональний фрагмент останнього включає амінокислотну послідовність, що має гомологію не менше 70 % до відповідної послідовності амінокислот, наведеної під будь-якими з послідовних номерів 1-48 та/або 52-56. Гомологія тут визначається, як зазначено у передньому пункті, який стосується першого аспекту цього винаходу, як приклад реалізації (o);

5 (p) Спосіб згідно з другим аспектом винаходу або з будь-якими з пп. (a) - (o), в якому сполука, що нейтралізує IL-17, є поліпептидом, пептидоміметиком або нуклеїною кислотою, або малою молекулою;

(q) Спосіб за пунктом (p), в якому поліпептид є антитілом або функціональним фрагментом останнього, що зв'язується з рецептором IL-17 або IL-17; бажано антитілом, яке є моноклональним антитілом або функціональним фрагментом останнього;

10 (r) Спосіб за п.(q), в якому антитіло є моноклональним антитілом людини або функціональним фрагментом останнього;

(s) Спосіб згідно з другим аспектом винаходу або за будь-якими пп. з (a) - (r), в якому зазначені пухлинні захворювання являють собою рак; та

15 (t) Спосіб з п. (s), в якому зазначені ракові захворювання являють лейкемію, мієломну хворобу, шлункову карциному або карциному шкіри.

Третім аспектом винаходу є фармацевтична сполука, призначена для використання у клінічній практиці для людей та/або у ветеринарії, а саме для лікування запального захворювання або пухлинного захворювання у людей та/або тварин згідно з вище зазначеним. Склад препарату включає сполуку, що нейтралізує GM-CSF(скорочено - GM-CSF-інгібуюча сполука) та сполуку, що нейтралізує IL-17 (скорочено - IL-17-інгібуюча сполука). Бажані приклади реалізації сполуки згідно з третім аспектом винаходу є наступними:

(a) Сполука, в якій GM-CSF-інгібуюча сполука є поліпептидом, пептидоміметиком або нуклеїною кислотою, або малою молекулою;

25 (b) Сполука за п. (a), в якій поліпептид є антитілом або функціональним фрагментом останнього, що зв'язується з рецептором GM-CSF або GM-CSF; бажано, щоб антитіло було моноклональним антитілом або функціональним фрагментом останнього;

(c) Сполука за п. (b), в якій антитіло або функціональний фрагмент останнього є моноклональним антитілом людини або функціональним фрагментом останнього;

30 (d) Сполука за п. (b) або п. (c), в якій антитіло або функціональний фрагмент останнього зв'язується з епітопом GM-CSF людини або примату. Бажано, щоб епітоп був переривчастим епітопом GM-CSF людини або примату та бажано, щоб епітоп включав амінокислоти 23-27 (RRLLN) та/або амінокислоти 65-77 (GLR/QGSLTKLKGPL).

35 (e) Сполука за п. (d), в якій зазначений переривчастий епітоп крім того включає амінокислоти 28-31 (LSRD), амінокислоти 32-33 (TA), та/або амінокислоти 21-22 (EA);

(f) Сполука за пп. (c), (d) та (e), в якій моноклональне антитіло людини або функціональний фрагмент останнього включає варіативний регіон важкого ланцюга CDR3, який включає будь-яку послідовність амінокислот, зазначених під послідовними номерами 1-13 або 56;

40 (g) Сполука за п. (f), в якій будь-яка з означених послідовностей CDR3 варіативного регіону важкого ланцюга існує разом у варіативному регіоні важкого ланцюга із CDR1 варіативного регіону важкого ланцюга, який включає амінокислотну послідовність, зазначеною під послідовним номером 14 та CDR2 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначеною під послідовним номером 15;

45 (h) Сполука за пп. (f) або (g), в якій моноклональне антитіло людини або функціональний фрагмент останнього включає варіативний регіон легкого ланцюга CDR1, який включає послідовності амінокислот, зазначені під послідовним номером 16; CDR2, який включає послідовність амінокислот, зазначену під послідовним номером 17, та CDR3, який включає послідовність амінокислот, зазначену під послідовним номером 18;

50 (i) Сполука за п. (h), в якій моноклональне антитіло людини або функціональний фрагмент останнього далі включає варіативний регіон легкого ланцюга з послідовністю амінокислот, зазначених під послідовними номерами 19, 54 та 55;

(j) Сполука за п. (f) або п. (g), в якій моноклональне антитіло людини або функціональний фрагмент останнього включає варіативний регіон важкого ланцюга з послідовністю амінокислот, зазначених під послідовними номерами 20-33, 52 або 53;

55 (k) Сполука за будь-якими з пп. f) - j), в якій моноклональне антитіло людини або функціональний фрагмент останнього включає CDR1 варіативного регіону легкого ланцюга, який включає послідовність амінокислот, зазначених під послідовним номером 16, CDR2 який включає послідовність амінокислот, зазначених під послідовним номером 17, CDR3, який включає послідовність амінокислот, зазначених під послідовним номером 18, та CDR1 варіативного регіону важкого ланцюга, що включає послідовність амінокислот, зазначених під

послідовним номером 14, область CDR2, яка має послідовність амінокислот, наведену під послідовним номером 15, та CDR3, яка має послідовність амінокислот, наведену під будь-якими з послідовних номерів 1-13 або 56;

(l) Сполука за будь-якими з пп. (f) - (k), в якій моноклональне антитіло людини або функціональний фрагмент останнього включає послідовність амінокислот легкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 34, та послідовність амінокислот важкого ланцюга, зазначену під послідовними номерами 35-48; (m) Сполука за будь-якими з пп. (f) - (l), в якій моноклональне антитіло людини або функціональний фрагмент останнього включає послідовність амінокислот, що має гомологію не менше 70 % до відповідної послідовності амінокислот, наведеної під будь-якими з послідовних номерів 1-48 та 52-56. Гомологія тут визначається, як зазначено у передньому пункті, який стосується першого аспекту цього винаходу, як приклад реалізації (o);

(n) Сполука за будь-якими з пп. (a) - (m), в якій IL-17-інгібуюча сполука є поліпептидом, пептидоміметиком, нуклеїновою кислотою або малою молекулою;

(o) Сполука за п. (n), в якій поліпептид є антитілом або функціональним фрагментом останнього, що зв'язується з рецептором IL-17 або IL-17; бажано щоб антитіло було моноклональним антитілом або функціональним фрагментом останнього;

(p) Сполука за п. (o), в якій антитіло людини або функціональний фрагмент останнього включає моноклональне антитіло людини або функціональний фрагмент останнього;

(q) Сполука за будь-якими з пп. 3(a) - (p), в якій зазначена сполука призначена для лікування запального захворювання та/або пухлинного захворювання, при тому, що таке запальне захворювання являє собою ревматоїдний артрит (РА) (включаючи РА, стійкий до лікування за допомогою нейтралізаторів TNF-альфа), астму, розсіяний склероз (РС), хронічне обструктивне захворювання легень (ХОЗЛ), гострий респіраторний дистрес синдром (ГРДС), ідіопатичний фіброз легень (ІФЛ), запальну хворобу кишечника (ЗХК), захворювання Крона, увеїт, дегенерація жовтої плями, коліт, псоріаз, уоллеровське переродження, антифосфоліпідний синдром (АФС), гострий коронарний синдром, рестеноз, атеросклероз, рецидивуюча поліхондрія (РП), гострий або хронічний гепатит, ортопедичні імплантати, які не приживаються, гломерулонефрит, вовчанку або інші розлади аутоімунні розлади та/або пухлинних захворювань, таких, як лейкемія, мієломна хвороба, шлункова карцинома або карцинома шкіри.

Залежно від юрисдикції, у якій подається ця заявка, четвертим аспектом винаходу може бути комбіноване вживання GM-CSF-інгібуючої сполуки, та IL-17-інгібуючої сполуки при виготовленні препарату для лікування запальних захворювань та пухлинних захворювань, як це буде зазначено далі. Відповідно, бажаним прикладом реалізації четвертого аспекту цього винаходу є фармацевтичний препарат, який включає GM-CSF- та IL-17-інгібуючу речовину, може бути складений для введення (i) спочатку GM-CSF-інгібуючої сполуки, а потім IL-17-інгібуючої сполуки, (ii) спочатку IL-17-інгібуючої сполуки, а потім GM-CSF-інгібуючої сполуки, та (iii) GM-CSF-інгібуючої сполуки і IL-17-інгібуючої сполуки одночасно. Відповідно обидві сполуки можуть бути частиною одного препарату або окремими препаратами, залежно від параметрів, відомих спеціалістам.

Також п'ятим аспектом може бути GM-CSF- та IL-17-інгібуючі сполуки для використання при лікуванні будь-яких із захворювань, перелічених вище. І знову введення сполук може проходити одне за одним у будь-якій послідовності або одночасним. Аналогічним чином сполуки можуть бути частиною одного препарату або окремими препаратами, залежно від параметрів, відомих спеціалістам.

Бажаним прикладом реалізації у разі застосування GM-CSF- та IL-17-інгібуючої речовини при виробництві фармацевтичного препарату та у разі використання GM-CSF- та IL-17-інгібуючої речовини для лікування будь-яких захворювань є такі:

(a) Об'єкт, якого необхідно лікувати, визначений вище;

b) GM-CSF-інгібуюча сполука є поліпептидом, пептидоміметиком, нуклеїновою кислотою або малою молекулою;

(c) Поліпептид згідно з (b) є антитілом або функціональним фрагментом останнього, що зв'язується з рецепторами GM-CSF або GM-CSF; бажано, щоб антитіло було моноклональним антитілом або функціональним фрагментом останнього.

(d) Антитіло або функціональний фрагмент останнього, згідно визначення у п. (c), є моноклональним антитілом людини або функціональним фрагментом останнього;

(e) Антитіло або функціональний фрагмент останнього зв'язується з епітопом GM-CSF людини або примата. Епітоп бажано, щоб епітоп був переривчастим епітопом GM-CSF людини або примата, при цьому епітоп бажано включає амінокислоти 23-27 (RRLN) та/або амінокислоти 65-77 (GLR/QGSLTKLKGPL).

(f) Переривчастий епітоп крім того включає амінокислоти 28-31 (LSRD), амінокислоти 32-33 (TA), та/або амінокислоти 21-22 (EA);

(g) Моноклональне антитіло людини або функціональний фрагмент останнього за будь-якими пп. (d), (e) та (f) включає варіативний регіон важкого ланцюга CDR3, який включає будь-яку із послідовностей амінокислот, зазначених під послідовними номерами 1-13 або 56;

(h) Приклад реалізації (g), в якому будь-яка з означених послідовностей CDR3 варіативного регіону важкого ланцюга існує разом у варіативному регіоні важкого ланцюга із CDRI варіативного регіону важкого ланцюга, який включає амінокислотну послідовність, зазначеною під послідовним номером 14 та CDR2 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначеною під послідовним номером 15;

(i) Приклад реалізації (h) або (g), в якому моноклональне антитіло людини або функціональний фрагмент останнього включає варіативний регіон легкого ланцюга CDRI, який включає послідовності амінокислот, зазначені під послідовним номером 16, CDR2, який включає послідовність амінокислот, зазначених під послідовним номером 17, та CDR3, який включає послідовність амінокислот, зазначених під послідовним номером 18;

(j) Моноклональне антитіло людини або функціональний фрагмент останнього згідно з п.(i) далі включає в варіативний регіон легкого ланцюга послідовності амінокислот, зазначені під будь-якими з послідовних номерів 19, 54 та 55;

(k) Моноклональне антитіло людини або функціональний фрагмент останнього згідно з прикладом реалізації (h) або (g) включає варіативний регіон легкого ланцюга з послідовністю амінокислот, зазначених під послідовними номерами 20-33, 52 або 53;

(l) Будь-які приклади реалізації (g) по (k), в яких моноклональне антитіло людини або функціональний фрагмент останнього включає CDRI варіативного регіону легкого ланцюга, який включає послідовність амінокислот, зазначених під послідовним номером 16, CDR2 який включає послідовність амінокислот, зазначених під послідовним номером 17, CDR3, який включає послідовність амінокислот, зазначених під послідовним номером 18, та CDRI варіативного регіону важкого ланцюга, що включає послідовність амінокислот, зазначених під послідовним номером 14, область CDR2, яка має послідовність амінокислот, наведену під послідовним номером 15, та CDR3, яка має послідовність амінокислот, наведену під будь-якими з послідовних номерів 1-13 або 56;

(m) Будь-які приклади реалізації пп. з (g) по (l), в яких моноклональне антитіло людини або функціональний фрагмент останнього включає послідовності амінокислот легкого ланцюга, зазначені під послідовним номером 34, та послідовності амінокислот важкого ланцюга, зазначені під будь-якими з послідовних номерів 35-48;

(n) Будь-які приклади реалізації (g) - (m), в яких моноклональне антитіло людського організму або функціональний фрагмент останнього включає послідовності амінокислот, що мають гомологію не менше 70 % до відповідних послідовностей амінокислот, зазначених під будь-якими з послідовних номерів 1-48 та/або 52-56. Подібність визначається за стандартними програмами вирівнювання послідовностей, такими, як Vector NTI (InforMax™, Меріленд, США). Такі програми порівнюють вирівняні послідовності на основі амінокислот і мають регулювання щодо ступеню вимог до порівняння (наприклад, ідентичні амінокислоти, консервативні заміни амінокислот і т.п.). У значенні цього терміну, що використовується і цьому описі, дві амінокислоти, які розглядаються, вважаються "консервативними замінами" одна одної, якщо кожна з них належить до одного й того ж хімічного класу, наприклад, кислотних, неполярних, полярних незаряджених та основних. Розглядаючи як приклад, що не вичерпує всі можливі варіанти, дві різні амінокислоти, що належать до класу неполярних амінокислот, розглядатимуться як "консервативні заміни" одна одної, навіть якщо ці дві амінокислоти не є ідентичними, в той час як неполярна амінокислота, з одного боку, та основна амінокислота, з іншого боку, не будуть розглядатися як "консервативні заміни" одна одної. У таблиці 3.1 книги "Molecular Biology of the Cell" Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts and Walter (Молекулярна біологія клітини), 4^е видання (2002), автори: Альбертс, Джонсон, Льюїс, Рафф та Уолтер, амінокислоти поділені на чотири групи: кислотні, неполярні, незаряджені та основні. Така класифікація може бути використана при визначенні того, для цілей цього винаходу, чи є певна амінокислота а консервативною заміною іншої амінокислоти, що розглядається;

(o) Будь-які приклади реалізації за пп. (a) - (n), в яких IL-17 - інгібуюча сполука є поліпептидом, пептидоміметиком, нуклеїновою кислотою, або малою молекулою;

(p) Поліпептид за (o) є антитілом або функціональним фрагментом останнього, що зв'язується з рецептором IL-17 або IL-17; бажано, щоб антитіло було моноклональним антитілом або функціональним фрагментом останнього;

(q) Антитіло або функціональний фрагмент останнього за (p) є моноклональним антитілом

людини або функціональним фрагментом останнього; та

(г) Запальне захворювання являє собою ревматоїдний артрит (РА) (включаючи РА, стійкий до лікування за допомогою нейтралізаторів TNF-альфа), астму, розсіяний склероз (РС), хронічне обструктивне захворювання легенів (ХОЗЛ), гострий респіраторний дистрес синдром (ГРДС), ідіопатичний фіброз легенів (ІФЛ), запальовальну хворобу кишковика (ЗХК), захворювання Крона, увеїт, дегенерація жовтої плями, коліт, псоріаз, уоллеровське переродження, антифосфоліпідний синдром (АФС), гострий коронарний синдром, рестеноз, атеросклероз, рецидивуюча поліхондрія (РП), гострий або хронічний гепатит, ортопедичні імплантати, які не приживаються, гломерулонефрит, вовчанку або інші розлади аутоімунні розлади та/або пухлинні захворювання, такі, як лейкемія, мієломна хвороба, шлункова карцинома або карцинома шкіри.

Як зазначалося вище, термін "IL-17" у значенні, в якому він вживається у цій заявці, стосується родини цитокінів набутої імунної системи, що складається з шести членів, з IL-17 A по IL-17F. Визначення терміну також включає гетеродимери, наприклад, IL-17A/IL-17F, які, за існуючою інформацією, є фізіологічно експресованими, наприклад, CD4⁺T-клітинами. Найбільш бажаною групою членів родини IL-17, яка повинна бути нейтралізованою за цим винаходом включає IL-17A, IL-17F та IL-17D. Більш бажано, якщо ефекти IL-17A та IL-17F нейтралізуються згідно з винаходом. Оскільки перевага надається групі, що складається з IL-17A, IL-17F та IL-17D, також кращою бажано нейтралізувати /інгібувати сигнали підгрупи рецепторів IL-17 (IL-17Rs), тобто сигнали IL-17RA, IL-17RB та IL-17RC, більш бажано IL-17RA та IL-17RC.

Термін "зв'язує певним чином" або схожі вирази, такі, як "зв'язуючий певним чином", "зв'язаний певним чином" "певним чином зв'язуюча речовина" і т. п., які вживаються у цьому документі, стосуються здатності GM-CSF/IL-17- інгібуючої сполуки та бажано моноклонального антитіла людини або функціонального фрагмента останнього (згідно із наведеним вище визначенням) розрізняти GM-CSF/IL-17 та будь-яку кількість інших потенційних антигенів, що відрізняються від GM-CSF/IL-17 такою мірою, що з пулу або множини різних антигенів, які є потенційними зв'язуючими партнерами, зв'язується, або суттєво зв'язується, тільки GM-CSF/IL-17. У межах значення цього винаходу GM-CSF/IL-17 є "суттєво" зв'язаним, коли з пулу або множини різних однаково доступних антигенів, які є потенційними зв'язуючими партнерами, GM-CSF/IL-17 зв'язується як мінімум у 10 разів, краще, якщо у 50 разів, та найкраще, якщо у 100 або більше разів частіше (у кінетичному значенні слова), ніж будь-який інший антиген, що відрізняється від GM-CSF/IL-17. Такі кінетичні заміри можна проводити за допомогою апарату Biacore.

У межах цієї заявки "нейтралізація", "нейтралізатор", "нейтралізуючий" та інші граматично пов'язані з ними варіанти слів стосуються часткового або повного послаблення біологічної(их) дії(й) GM-CSF/IL-17. Таке часткове або повне послаблення біологічної(их) дії(й) GM-CSF/IL-17 є результатом модифікації, переривання та/або відміни GM-CSF/IL-17-опосередкованих процесів, таких, як транздукція сигналу, що проявляється, наприклад, у міжклітинній сигналізації, проліферації клітин або виділенні розчинних речовин, регуляція в бік збільшення або зменшення внутрішньоклітинної активації генів, наприклад, такої, що спричиняє експресію поверхневих рецепторів для лігандів, відмінних від GM-CSF. Згідно з наявними ноу-хау, є велика кількість різних способів визначення чи можна об'єкт, що розглядається, наприклад, антитіло або функціональний фрагмент останнього, класифікувати як нейтралізатор. Наприклад, це можна зробити за допомогою стандартного тесту *in vitro*, що, як правило, виконується таким чином: при першому проліферативному експерименті лінія клітин, рівень проліферації яких відомий як залежний від активності GM-CSF, інкубується у ряді зразків з різними варіантами концентрації GM-CSF, після такої інкубації вимірюється рівень проліферації лінії клітин. За таким вимірюванням визначається концентрація GM-CSF, що допускає половину максимального рівня проліферацію клітин. Потім виконується другий проліферативний експеримент із використанням у кожній з серій такої ж кількості клітин як і в першому проліферативному експерименті та зазначеної вище концентрації GM-CSF, як і при першому експерименті проліферації, але, цього разу, різні концентрації антитіла або функціонального фрагмента останнього, яке розглядається як можливий нейтралізатор GM-CSF. Знову вимірюється рівень проліферації клітин для визначення концентрації антитіла або функціонального фрагмента останнього, достатньої для спричинення половини максимального інгібування росту. Якщо отриманий графік інгібування росту в залежності від концентрації антитіла (або функціонального фрагмента останнього) має сигмовидну форму, що показує зменшення проліферації клітин із зростанням концентрації антитіла (або функціонального фрагмента останнього), то це означає, що був виявлений деякий рівень інгібування залежного від антитіла росту тобто активність GM-CSF виявилася до певної міри нейтралізованою. У

цьому випадку антитіло або функціональний фрагмент останнього може розглядатися як "нейтралізатор" у значенні цього винаходу. Одним із прикладів лінії клітин, ступінь проліферації яких, залежить від активності GM-CSF, є лінія клітин TF-1, що описано Т. Кітамурою та інш. (Kitamura, T. et al. (1989). J Cell Physiol 140, 323-34).

За наявними науковими даними, ступінь проліферації клітин - не єдиний параметр, за яким можна визначити нейтралізуючу здатність для GM-CSF. Наприклад, вимірювання рівня сигнальних молекул (напр., цитокінів), рівень секреції яких залежить від GM-CSF, може бути використане для виявлення підозрюваного нейтралізатора GM-CSF (GM-CSF-інгібуючої сполуки). Відповідні умови проведення експериментів із клітинами відомі особам, які обізнані в перевірці нейтралізуючих ефектів IL-17-інгібуючих сполук.

Інші приклади клітинних ліній, які можуть бути використані для визначення антитіл або функціональних фрагментів останніх, які є нейтралізатором активності GM-CSF, включають AML-193. (Lange, B. et al. (1987). Blood 70, 192-9); GF-D8 (Rambaldi, A. et al. (1993). Blood 81, 1376-83); GM/SO (Oez, S. et al. (1990). Experimental Hematology 18, 1108-11); M07E (Avanzi, G. C. et al. (1990). Journal of Cellular Physiology 145, 458-64); TALL-103 (Valtieri, M. et al. (1987). Journal of Immunology 138, 4042-50); UT-7 (Komatsu, N. et al. (1991). Cancer Research 51, 341-8). Приклади ліній клітин/тестів, заснованих на клітинах, які можуть використовуватися для визначення того, чи є сполука, що розглядається, наприклад, антитіло або функціонального фрагмента останнього, нейтралізатором дії IL-17, включають тест in Vitro клітинної культури BEAS-2B протеїнів IL-17 (BEAS-2B, бронхіальні епітеліальні клітини людського організму (ATCC, CRL-9609) або стандартний IL-6 тест виділення від фібробластів (Yao et al., 1995, Journal of Immunology, 155, 5483-5486).

Згідно з цим винаходом інгібування/нейтралізацію GM-CSF та IL-17, відповідно, розуміють як таку, що може проводитися як із зовні клітин, що несуть рецептори для цих цитокінів або в зазначених клітинах. Таким чином, інгібування/нейтралізація GM-CSF та IL-17 сполукою може бути інгібуванням або перешкоджанням зв'язування GM-CSF або IL-17 до їхнього певного рецептора або інгібуванням внутрішньоклітинного сигналу, викликаного зв'язуванням цитокінів із їх рецепторами. Приклади інгібіторів/нейтралізаторів IL-17 з внутрішньоклітинною дією сигналу включають сполуки, які блокують внутрішньоклітинні сигнальні шляхи, що включають інгібітори JAK/STAT, MAPK p38, NF- κ B або JNK.

Як зазначено вище у цьому описі, інгібітори GM-CSF або IL-17 можуть бути обрані з групи, яка складається з поліпептиду, пептидомімету або нуклеїнової кислоти, або малої молекули. Термін "поліпептид" у тому значенні, в якому він вживається тут, описує групу молекул, яка складається із понад 30 амінокислот. За цим винаходом, група поліпептидів включає "протеїни", що складаються з одного поліпептиду або більше ніж одного поліпептиду. Термін "поліпептид" також описує фрагменти протеїнів, якщо ці фрагменти складаються з більше ніж 30 амінокислот. Спеціалістам добре відомо, що поліпептиди можуть складати мультимери, наприклад, димери, тримери та вищі олігомери, тобто такі, що складаються з більше ніж однієї поліпептидної молекули. Такі мультимери також включаються у визначення терміну "поліпептид". Поліпептидні молекули, що утворюють такі димери, тримери і т.п. можуть бути ідентичними або неідентичними. Відповідна структура вищого порядку таких мультимерів називається, таким чином, гомо- або гетеродимером, гомо- або гетеротримером і т.п. Прикладом гетеромультимеру може служити молекула антитіла, яка, у своїй природній формі складається з двох ідентичних легких поліпептидних ланцюгів та двох ідентичних важких поліпептидних ланцюгів. Терміни "поліпептид" та "протеїн" також стосуються поліпептидів/протеїнів, що модифікуються природним або неприродним шляхом, при якому модифікація здійснюється, наприклад, посттрансляційними модифікаціями, такими, як глікозилювання, ацетилювання, фосфорилування та аналогічними. Такі модифікації добре відомі спеціалістам галузі.

Термін "мала молекула" визначає групу складових препаратів, яка має молекулярну масу менше 1000 дальтонів, бажано від 300 до 700 дальтонів. Відповідні малі молекули можуть бути отримані від хоча б частково рандомізованої пептидної бібліотеки. Бібліотеки малих молекул, які є прийнятними згідно з цим винаходом, добре відомі у галузі та/або можуть бути придбані у комерційних дистриб'юторів.

Термін "нуклеїнова кислота" визначає у контексті цього винаходу макромолекули, що складаються з багатократно повторених одиниць фосфорної кислоти, цукру та пуринових і піримідинових основ. Об'єднання цих молекул включають ДНК, РНК та РНА. Найбільш бажаною модифікацією амінокислоти у контексті цього винаходу є аптамер. Аптамери являють собою молекули ДНК або РНК, які були обрані із випадкових пулів, виходячи з їхньої здатності зв'язувати інші молекули. Обиралися аптамери, які зв'язують амінокислоту, протеїни, малі

органічні сполуки та навіть цілі організми.

Термін "пептидоміметик" описує малий протеїноподібний ланцюг, створений для імітації пептиду. Цей тип молекул отримують штучним шляхом через модифікацію існуючого пептиду для того, щоб змінити властивості молекули. Наприклад, модифікують материнський існуючий пептид з тим, щоб змінити стабільність молекули або її біологічну активність. Такі модифікації включають зміну скелету та включення неприродних амінокислот.

Термін "рецептор GM-CSF" стосується фізіологічного поверхневого рецептора клітини до GM-CSF, який описується як гетеромер CD116 та розповсюдженої в інших рецепторах субодиниці бета (β c). Термін "рецептор IL-17" стосується фізіологічних поверхневих рецепторів клітин до різних ізоформ IL-17. Ця група зараз включає, у числі інших, ізоформи IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD та IL-17RE.

Кращим прикладом реалізації нейтралізуючого пептиду є антитіло (або функціонального фрагмента останнього), краще якщо антитіло людини (або функціонального фрагмента останнього). Техніки продукції антитіл широко відомі в галузі, вони описані, наприклад, у Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 and Harlow and Lane "Using Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999. Термін "антитіло" включає імуноглобуліни (Ig's) різних класів (тобто IgA, IgG, IgM, IgD та IgE) та підкласів (такі, як IgG1, IgG2 і. т. п.). Похідні антитіл, які також підпадають під визначення терміну у змісті винаходу, включають модифікації таких молекул, як, наприклад, глікозилування, ацетилювання, фосфорилювання, фарнезиляцію, гідроксилування, метилювання або етерифікацію.

Людські та нелюдські антитіла або їхні функціональні фрагменти (із специфічністю як для GM-CSF, так і для IL-17) бажано є моноклональними. Особливо важко приготувати антитіла людини, що є моноклональними. На відміну від злиття мишиних В-клітин з іморталізованими лініями клітин злиття В-клітин людського організму з іморталізованими лініями клітин не життєздатні. Таким чином, моноклональні антитіла людини є результатом подолання значних технічних перешкод, які визнаються всіма у сфері технологій антитіл. Моноклональна природа антитіл робить їх особливо цінними для використання у ролі терапевтичних об'єктів, оскільки такі антитіла існуватимуть як цілісний, гомогенний молекулярний тип, який можна добре охарактеризувати, відтворювати та очищувати. Ці фактори дозволяють створювати продукти, біологічна дія яких може бути прогнозована з високим ступенем точності, що є дуже важливим, якщо такі молекули повинні одержати нормативно-правове затвердження для їхнього введення людині.

Особливо бажаним є те, щоб моноклональні антитіла (або їхні відповідні функціональні фрагменти) були антитілами людини (або їхніми відповідними функціональними фрагментами). При розгляді антитіл як об'єктів, які плануються для введення при лікуванні людям, велику перевагу надає те, що антитіла мають походження з людського організму. З високим ступенем вірогідності можна сподіватися на те, що після введення пацієнту (людині) антитіло людського організму або його функціональний фрагмент не спричинить сильної імуногенної реакції у відповідь з боку імунної системи пацієнта, тобто не буде впізнаний як чужий організму нелюдського походження білок. Це означає, що в організмі хазяїна, тобто пацієнта, не будуть вироблятися антитіла проти лікувального антитіла, які могли б блокувати дію терапевтичних антитіл та/або прискорювати знищення терапевтичних антитіл в організмі пацієнта, не даючи змоги через це проявити бажаний лікувальний ефект.

Термін "людини" або "людського організму" щодо антитіл, який вживається у цій заявці, необхідно розуміти як антитіло з тією чи іншою специфічністю, або його функціональний фрагмент, яке включає послідовність(ості) амінокислот, що входять до складу набору антитіл зародкових ліній людського організму. Для визначення у цій заявці антитіло або його фрагмент можна, таким чином, розглядати як антитіло людини, якщо воно складається з таких послідовностей амінокислот зародкових ліній людського організму, тобто якщо послідовність(ості) амінокислот антитіла, що розглядається, або його функціонального фрагменту ідентична(і) експресованій послідовності амінокислот зародкових ліній людського організму. Антитіло або функціональний фрагмент останнього можна також розглядати як антитіло людини, якщо воно складається з послідовності(остей), які мають відхилення від її (їхніх) найближчих послідовностей зародкових ліній людського організму не більше ніж можна було б передбачати на основі імпринту соматичної гіпермутації. Крім того, антитіла багатьох ссавців, які не належать до людей, наприклад, гризунів, таких, як миші або щури, включають послідовності амінокислот VH CDR3, що, як можна чекати, також існують у експресованому спектрі антитіл людини. Будь-яка(і) з таких послідовностей людського походження або походження не від людини, які, як вважаємо, могли б існувати у експресованому спектрі

людини, також розглядатимуться в рамках цього винаходу як такі, що належать до "людини".

Згідно з бажаним прикладом реалізації цього винаходу, моноклональне антитіло людини або функціональний фрагмент останнього, який повинен бути використаний у фармацевтичних цілях, демонструє перехресну реактивність між людиною та хоча б одним видом мавп. Така ж
 5 сама перехресна реактивність є бажаною для всіх інших (не антитіл та одержаних не від антитіл) нейтралізуючих/інгібуючих сполук GM-CSF та/або IL-17. Зважаючи на те, що фармацевтичні препарати проходять, як правило, цілий ряд тестувань до того, як вони одержать нормативно-правове затвердження, і при цьому деякі з тестів пов'язані з експериментами на тваринах, така перехресна реактивність антитіл є дуже корисною. При
 10 проведенні таких тестів є бажаним, щоб використовувалися такі біологічні види тварин, які мають високу генетичну подібність до людей, оскільки результати, отримані в таких тестах, будуть мати високий ступінь прогностичності щодо відповідності результатів, які можна чекати при введенні таких самих молекул людям. Водночас така прогностична сила, що базується на експериментах з тваринами, залежать, хоча б частково, від можливості порівнювати молекули, і
 15 вона буде дуже високою, коли внаслідок перехресної реактивності, одна й та ж лікувальна молекула може вводитися моделям людини та тварин. У прикладі реалізації, коли молекула антитіла є перехресно активною для того ж самого антигену людини, як і у іншому організмі біологічно близького виду, експерименти можна проводити з використанням для людини тієї ж молекули антитіла, що й для близького до неї біологічного типу, наприклад, виду мавп, які згадувалися вище. Це покращує як ефективність самих експериментів, так і прогностичну силу, яку мають ці експерименти, щодо поведінки таких антитіл у людському організмі, який є кінцевою метою з точки зору терапії. Те ж саме є справедливим для інших прикладів реалізації з нейтралізуючими/інгібуючими сполуками, які не являють собою антитіла (або одержані не від антитіл).

Згідно з наступним прикладом реалізації цього винаходу, моноклональне антитіло людського організму може бути антитілом IgG (імуноглобуліном G). IgG включає не тільки варіативний регіон антитіла, який відповідає за впізнавання та зв'язування антигену з високим ступенем дискримінації, але й константний регіон важких та легких поліпептидних ланцюгів антитіл, що в нормі, присутні в ендогенно утворених антитілах, та у певних випадках навіть з
 30 приєднаними вуглеводними залишками в одному або більше сайтах. Таке глікозилювання є, як правило, характерною рисою формату IgG, а частини таких константних регіонів утворюють так звану область Fc повного антитіла, яке відоме тим, що виконує різні ефекторні функції in vivo. Крім того, регіон Fc медіює зв'язування IgG з Fc рецептором і у такий спосіб подовжує період напіврозпаду in vivo, а також сприяє хоумінгу IgG в місцях з підвищеною присутністю рецепторів Fc - наприклад, в місцях запалення тканин. Перевагою є випадок, коли антитіло IgG є антитілом IgG1 або антитілом IgG4, формати, які є бажаними, тому що їхній механізм дії in vivo є найкраще дослідженим та описаним. Це стосується у першу чергу антитіл IgG1.

Згідно з наступним прикладом реалізації винаходу функціональний фрагмент моноклонального антитіла людини може бути scFv - однодоменним антитілом, Fv - VHH
 40 антитілом, діатілом, тандемним діатілом, Fab, Fabⁿ або F(ab)₂. Ці формати можна загалом поділити на два підкласи, а саме, на ті, які складаються з одного поліпептидного ланцюга, та ті, що включають щонайменше два поліпептидні ланцюги. Члени першого підкласу включають scFv (до складу якого входить один регіон VH та один регіон VL, поєднаних в одному поліпептидному ланцюгу через поліпептидний зв'язуючий агент); однодоменне антитіло (включає один варіативний регіон антитіла), наприклад, антитіло VHH (включає один регіон VH). Члени другого підкласу включають Fv (включає один регіон VH та один регіон VL як окремі поліпептидні ланцюги, які нековалентно зв'язані один з одним); діатіло (включає два нековалентно зв'язані поліпептидні ланцюги, кожен з яких включає два варіативні регіони антитіла - як правило, один VH та один VL на кожний поліпептидний ланцюг - при цьому два
 50 поліпептидні ланцюги розташовані в конформації "голова-хвіст", так, щоб в результаті утворювалося бівалентне антитіло); тандемне діатіло (бівалентні одноланцюгові Fv антитіла, які включають чотири ковалентно зв'язані імуноглобулінові варіативні регіони - VH та VL - регіони двох різних специфічностей, які утворюють гомодимер, удвічі більший за описане вище діатіло); Fab (включає як один поліпептидний ланцюг весь легкий ланцюг антитіла, включаючи регіон VL та весь константний регіон легкого ланцюга, та, як інший поліпептидний ланцюг, частина важкого ланцюга антитіла включає повний регіон VH та частину константного регіону важкого ланцюга, і зазначені два поліпептидні ланцюги з'єднані міжмолекулярно за допомогою міжланцюгового дисульфідного зв'язку); Fabⁿ (як описаний вище Fab, виключаючи додаткові відновлені дисульфідні зв'язки, що входять до складу важкого ланцюга антитіла), та F(ab)₂
 55 (включає дві Fabⁿ молекули, кожна з Fabⁿ молекул поєднана з відповідною іншою Fabⁿ

молекулою через міжланцюгові дисульфідні зв'язки). Загалом функціональні фрагменти антитіла типу, описаного вище у цьому тексті, дозволяють досягати значної гнучкості у розробці, наприклад, фармакокінетичних властивостей антитіл, які необхідно одержати для лікування певних реальних типів захворювань. Може бути необхідним, наприклад, зменшити розмір антитіла, що вводиться в організм, для підвищення ступеню його проникнення в тканини, коли такі тканини мають низьку васкуляризованість, наприклад, для суглобів. За певних обставин може також бути необхідно підвищити швидкість виведення терапевтичного антитіла з організму, і тоді таке підвищення швидкості, як правило, досягається через зменшення розміру антитіла, що вводиться. Фрагмент антитіла визначається як функціональний фрагмент антитіла у контексті цього винаходу у тому разі, якщо фрагмент зберігає специфічність для материнського антитіла характеристики зв'язування для епітопу/мішені, тобто до тих пір, поки він зв'язується певним чином з GM-CSF або IL-17, відповідно.

Згідно з наступним прикладом реалізації винаходу зазначене моноклональне антитіло людини або функціональний фрагмент останнього може бути присутнім в моновалентній моноспецифічній, багатовалентній моноспецифічній, а саме у бівалентній моноспецифічній або багатовалентній багатоспецифічній, а саме у бівалентній біспецифічній формах. Найчастіше терапевтично цінним може виявитися багатовалентне моноспецифічне, а саме двовалентне моноспецифічне антитіло, наприклад, повний IgG людини, описаний вище, оскільки ефект нейтралізації, спричинений таким антитілом, підсилюється авідитетним ефектом, тобто зв'язуванням одним і тим самим антитілом багатьох молекул з одним й тим самим антигеном, у цьому випадку GM-CSF/IL-17. Кілька одновалентних моноспецифічних форм фрагментів антитіл були описані вище (наприклад, scFv, Fv, VHH або одностороннє антитіло). Багатовалентні багатоспецифічні, а саме двовалентні біспецифічні форми моноклонального анти-GM-CSF/IL-17 антитіла людини можуть включати повний IgG, в якому одна зв'язуюча рука з'єднується з GM-CSF/IL-17 приматів, а інша зв'язуюча рука з'єднується з іншим антигеном, який відрізняється від GM-CSF/IL-17. Інша багатовалентна багатоспецифічна форма, а саме двовалентна біспецифічна, може переважно бути біспецифічним антитілом людського організму з єдиним ланцюгом, тобто рекомбінантний конструкт антитіла людини, що включає два scFv елементи, описані вище, зв'язані в один суміжний поліпептидний ланцюг коротким вставним поліпептидним спейсером, який є відомим у цій галузі (див., наприклад, WO 99/54440 для анти-CD19 x анти-CD3 біспецифічного одностороннього антитіла). Тут одна частина scFv біспецифічного одностороннього антитіла включена в біспецифічне одностороннє антитіло буде певним чином з'єднуватися з GM-CSF/IL-17, як зазначено вище, а відповідно інша частина scFv цього біспецифічного одностороннього антитіла буде зв'язувати інший антиген, який визначається як такий що дає терапевтичний ефект. Бажаним альтернативним способом є такий, в якому біспецифічне одностороннє антитіло певним чином зв'язує GM-CSF, як це зазначено вище, а відповідна частина scFv цього біспецифічного одностороннього антитіла зв'язуватиме IL-17.

Згідно з наступним прикладом реалізації винаходу інгібуючі моноклональні антитіла людини або їхні функціональні фрагменти можуть піддаватися дериватизації, наприклад, органічним полімером, наприклад, однією або більше молекулами поліетиленгліколю ("PEG") та/або полівінілпіролідону ("PVP").

У цій галузі відомо, що дериватизація може давати певні переваги при модуляції фармакодинамічних властивостей моноклональних антитіл або їхніх функціональних фрагментів. Найкращими є молекули PEG, дериватизовані як PEG-малеїніміди, які дозволяють кон'югацію моноклональних антитіл або їхніх функціональних фрагментів сайтспецифічно через сульфгідрильну групу цистеїнової амінокислоти. Із зазначених, особливо бажаною є 20 kD та/або 40 kD PEG-малеїніміди, як із розгалуженим, так і з прямими ланцюгом. Особливо важливим може бути підвищення ефективної молекулярної маси менших анти- GM-CSF/IL-17 фрагментів антитіл людини, таких, як фрагменти scFv, через з'єднання останніх з однією або більше молекулами PEG, особливо PEG-малеїнімідами.

У значенні, яке надається в цьому тексті, нумерація GM-CSF людини та приматів стосується зрілих GM-CSF, тобто, GM-CSF без їхніх 17 сигнальних послідовностей амінокислот (загальна довжина зрілої GM-CSF у людини, і приматів, описаних вище, складає 127 амінокислот). Послідовність GM-CSF людини (SEQ ID NO. 57) та GM-CSF гібонів (SEQ ID NO. 58) є такою:

APARSPSPST QPWEHVNAIQ EARRLLNLS.R DTAAEMNETV EVISEMFDLQ EPTCLQTRLE
LYKQGLRGSL TKLKGPLTMM ASHYKQHCPP TPETSCATQI ITFESFKENL KDFLLVIPFD
CWEVPVQE

Послідовність GM-CSF у деяких членів родини макак, наприклад, резус-макак, (SEQ ID NO. 59) та яванських макак (SEQ ID NO. 60) є такою:

APARSPSPGT QPWEHVNAIQ EARRLLNLS.R DTAAEMNKT V EVVSEMFDLQ EPSCLQTRLE
 LYKQGLQGS L TKLKGPLTMM ASHYKQHCPP TPETSCATQI ITFQSFKENL KDFLLVIPFD
 C WEPVQE

Мінімальний епітоп, найкраще переривчастий епітоп, зв'язаний з моноклональним антитілом людини (або функціональним фрагментом останнього) згідно з описаним вище позначений у зазначеній послідовності GM-CSF жирним шрифтом. У цьому документі термін "переривчастий епітоп" необхідно розуміти як щонайменше дві несуміжні частини послідовностей амінокислот у межах зазначеного поліпептидного ланцюга, у цьому прикладі зрілого GM-CSF людини та приматів, які одночасно та певним чином зв'язуються з антитілом. Згідно з цим визначенням таке певне одночасне зв'язування може бути для поліпептиду GM-CSF у лінійній формі. Тут можна уявити зрілий поліпептид GM-CSF, який утворює протяжну петлю, в одній ділянці якої розташовуються дві послідовності, позначені вище жирним шрифтом, наприклад, більш або менш паралельно та близько одна до одної. У цьому стані вони певним чином та одночасно зв'язуються фрагментом антитіла. Згідно з цим визначенням одночасне специфічне зв'язування двох частин послідовностей зрілих GM-CSF, зазначених вище, може також приймати форму антитіла, яке зв'язується з конформаційним епітопом. Тут зрілий GM-CSF вже утворив свою третинну конформацію, в якій він, в нормі, існує *in vivo*. У цій третинній конформації поліпептидний ланцюг зрілого GM-CSF згинається так, щоб звести дві частини послідовності, зазначені вище, у просторове зближення, наприклад, на зовнішній поверхні певної частини зрілого, складеного GM-CSF, де вони потім пізнаються завдяки їхній тривимірній конформації в контексті оточуючих поліпептидних послідовностей.

Бажаним моноклональними анти-GM-CSF антитілами людини або їхніми функціональними фрагментами є такі, що включають послідовності CDR1 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначені під послідовним номером 14, послідовність CDR2 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 15, та послідовність CDR3 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 1; або таку, що включає послідовність CDR1 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 14, послідовність CDR2 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 15 та послідовність CDR3 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 2; або таку, що включає послідовність CDR1 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 14, послідовність CDR2 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 15 та послідовність CDR3 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 3; або таку, що включає послідовність CDR1 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 14; послідовність CDR2 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 15, та послідовність CDR3 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 4; або таку, що включає послідовність CDR1 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 14, послідовність CDR2 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 15 та послідовність CDR3 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 5; або таку, що включає послідовність CDR1 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 14, послідовність CDR2 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 15 та послідовність CDR3 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 6; або таку, що включає послідовність CDR1 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 14, послідовність CDR2 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 15 та послідовність CDR3 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 7; або таку, що включає послідовність CDR1 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 14, послідовність CDR2 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 15 та послідовність CDR3 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 8; або таку, що включає послідовність CDR1 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 14, послідовність CDR2 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 15 та послідовність CDR3 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 9; або таку, що включає послідовність CDR1 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 14, послідовність CDR2 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 15 та послідовність CDR3 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 10; або таку, що включає послідовність CDR1 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 14, послідовність CDR2 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 15 та послідовність CDR3 варіативного регіону

важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 11; або таку, що включає послідовність CDR1 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 14, послідовність CDR2 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 15 та послідовність CDR3 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 12; або таку, що включає послідовність CDR1 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 14, послідовність CDR2 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 15 та послідовність CDR3 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 13; або таку, що включає послідовність CDR1 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 14, послідовність CDR2 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 15 та послідовність CDR3 варіативного регіону важкого ланцюга, зазначену під послідовним номером 56.

Ще більш бажано, якщо будь-яка із зазначених вище 14 комбінацій послідовностей CDR1, CDR2 та CDR3 існує у моноклональному антитілі людини або функціональному фрагменті останнього, що включає у варіативний регіон легкого ланцюга CDR1 із послідовністю амінокислот, зазначених під послідовним номером 16, CDR2, що включає послідовність амінокислот, зазначену під послідовним 17, та CDR3 що включає послідовність амінокислот, зазначену під послідовним 18.

[illegible]

варіативним регіоном легкого ланцюга, що включає послідовності амінокислот, зазначені під послідовним номером 19, та варіативний регіон важкого ланцюга, що включає послідовність амінокислот, зазначених під послідовним номером 31; або моноклональне антитіло людини або функціональний фрагмент останнього, із варіативним регіоном легкого ланцюга, що включає послідовності амінокислот, зазначені під послідовним номером 19, та варіативний регіон важкого ланцюга, що включає послідовність амінокислот, зазначених під послідовним номером 32; або моноклональне антитіло людини або функціональний фрагмент останнього, із варіативним регіоном легкого ланцюга, що включає послідовності амінокислот, зазначені під послідовним номером 19, та варіативний регіон важкого ланцюга, що включає послідовність амінокислот, зазначених під послідовним номером 33; або моноклональне антитіло людини або функціональний фрагмент останнього, із варіативним регіоном легкого ланцюга, що включає послідовності амінокислот, зазначені під послідовним номером 19, та варіативний регіон важкого ланцюга, що включає послідовність амінокислот, зазначених під послідовним номером 52; або моноклональне антитіло людини або функціональний фрагмент останнього, із варіативним регіоном легкого ланцюга, що включає послідовності амінокислот, зазначені під послідовним номером 19, та варіативний регіон важкого ланцюга, що включає послідовність амінокислот, зазначених під послідовним номером 53.

[illegible]

зазначеною під послідовним номером 31; або моноклональне антитіло людини або його функціональний фрагмент із варіативним регіоном легкого ланцюга, що включає послідовність амінокислот, зазначену під послідовним номером 54, та варіативним регіоном важкого ланцюга із послідовністю амінокислот, зазначеною під послідовним номером 32; або моноклональне антитіло людини або його функціональний фрагмент із варіативним регіоном легкого ланцюга, що включає послідовність амінокислот, зазначену під послідовним номером 54, та варіативним регіоном важкого ланцюга із послідовністю амінокислот, зазначеною під послідовним номером 33; або моноклональне антитіло людини або його функціональний фрагмент із варіативним регіоном легкого ланцюга, що включає послідовність амінокислот, зазначену під послідовним номером 54, та варіативним регіоном важкого ланцюга із послідовністю амінокислот, зазначеною під послідовним номером 52; або моноклональне антитіло людини або його функціональний фрагмент із варіативним регіоном легкого ланцюга, що включає послідовність амінокислот, зазначену під послідовним номером 54, та варіативним регіоном важкого ланцюга із послідовністю амінокислот, зазначеною під послідовним номером 53.

[illegible]

із послідовністю амінокислот, зазначеною під послідовним номером 32; або моноклональне антитіло людини або його функціональний фрагмент із варіативним регіоном легкого ланцюга, що включає послідовність амінокислот, зазначену під послідовним номером 55, та варіативним регіоном важкого ланцюга із послідовністю амінокислот, зазначеною під послідовним номером 33; або моноклональне антитіло людини або його функціональний фрагмент із варіативним регіоном легкого ланцюга, що включає послідовність амінокислот, зазначену під послідовним номером 55, та варіативним регіоном важкого ланцюга із послідовністю амінокислот, зазначеною під послідовним номером 52; або моноклональне антитіло людини або його функціональний фрагмент із варіативним регіоном легкого ланцюга, що включає послідовність амінокислот, зазначену під послідовним номером 55, та варіативним регіоном важкого ланцюга із послідовністю амінокислот, зазначеною під послідовним номером 53.

Бажаним є інгібуєuche моноклональне анти-GM-CSF антитіло людини або його функціональний фрагмент, що включає в варіативний регіон важкого ланцюга CDR1, який включає послідовність амінокислот, зазначених під послідовним номером 14, регіон CDR2, який включає послідовність амінокислот, зазначених під послідовним номером 15, та CDR3 із послідовністю амінокислот, зазначених під будь-якими з послідовних номерів 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 або 56.

[illegible]

Наведені вище бажані приклади реалізації використовують моноклональні антитіла людини та/або його функціональні фрагменти, які надають особливі переваги при їх застосуванні як нейтралізаторів активності GM-CSF приматів та людини. Моноклональні антитіла людини або їхні функціональні фрагменти, згідно з цими бажаними приладами реалізації, мають значні переваги з кількох причин.

По-перше, вони впізнають GM-CSF приматів та людини з високим рівнем специфічності. Це

означає, що із суміші GM-CSF та інших колонієстимулюючих факторів приматів (наприклад, G-CSF та M-CSF приматів), зв'язуючі молекули, згідно з цими найкращими прикладами реалізації, мають високий ступінь розрізнення для GM-CSF приматів, а інші колонієстимулюючі фактори в тому самому середовищі не розпізнаються. Те ж саме стосується, з необхідними поправками, і GM-CSF людини. Це означає, що моноклональне антитіло або його функціональний фрагмент, згідно з цими прикладами реалізації, коли його вводять людині, буде здатне, як можна очікувати, зв'язуватися певним чином тільки із бажаною мішенню та нейтралізувати її, в той же час небажані мішені не будуть ані зв'язані, ані нейтралізовані. В результаті це дасть високий ступінь передбачуваності щодо терапевтичного способу дії *in vivo*.

По-друге, зв'язуючі сполуки, згідно з цими найкращими прикладами реалізації, зв'язуються з GM-CSF приматів та людини із дуже високою афінністю. Для цього класу молекул були зафіксовані значення K_D приблизно від 4×10^{-9} М в сторону зменшення аж до приблизно $0,04 \times 10^{-9}$ М, останнє відповідає приблизно 40 пМ. Оскільки кінетичне зв'язування таких молекул у водному середовищі значною мірою контролюється дифузією і тому не може бути поліпшено більше, ніж це дозволитиметься локальними умовами дифузії згідно з фізіологічними умовами, низькі значення K_D утворюються насамперед за рахунок кінетичного зв'язування, k_{off} , яке для антитіл із найвищим ступенем афінності складає приблизно 10^{-5} s^{-1} . Це означає, що як тільки комплекс між моноклональним антитілом людини або його функціональним фрагментом, згідно з будь-якими з цих прикладів реалізації, з одного боку, та GM-CSF, з іншого боку, є сформованими, він не буде легко або принаймні швидко роз'єднуватися. Для зв'язування молекул, які мають діяти як нейтралізатори біологічної активності, ці характеристики є дуже вигідними, тому що бажана нейтралізуюча дія, як правило, продовжується до тих пір, поки молекули, біологічна дія яких має бути нейтралізована (у цьому випадку GM-CSF приматів та людини) залишаються зв'язаними нейтралізуючою зв'язуючою молекулою. Таким чином, нейтралізуюча молекула, що залишається зв'язаною із визначеною мішенню, буде продовжувати нейтралізацію протягом відповідно довгого часу.

Висока афінність зв'язування моноклональних антитіл людини або їхніх функціональних фрагментів до GM-CSF приматів та людини надає ще одну перевагу. Антитіла або їхні функціональні фрагменти, як правило, видаляються з кровотоку пацієнта залежно від їхнього розміру, при цьому малі молекули екскретуються та видаляються раніше за великі. Оскільки комплекс двох поліпептидів - антитіло або фрагмент антитіла, зв'язаних з GM-CSF є безперечно більшими за самі тільки антитіла, нижче значення k_{off} , що зазначалося раніше, спричиняє екскретування та видалення з організму пацієнта терапевтичного нейтралізатора повільніше, ніж у разі, якщо б він не був зв'язаний з GM-CSF. Отже, підвищується не тільки потужність нейтралізуючої дії, але й її період дії *in vivo*.

Нейтралізуюча активність визначена як надзвичайно висока для зв'язуючих елементів згідно із зазначеними вище прикладами реалізації. Як буде описано більш детально у цьому документі далі, нейтралізуюча дія GM-CSF вимірювалася *in vitro* за допомогою аналізу інгібіції росту TF-1 (Kitamura, T. et al. (1989). J Cell Physiol 140, 323-34). Значення IC_{50} були виміряні як показник нейтралізуючої здатності, IC_{50} репрезентує концентрацію моноклонального антитіла людини або його функціонального фрагменту згідно з будь-якими прикладами реалізації, що необхідні для забезпечення напів-максимального інгібування проліферації клітин TF-1. Для анти-GM-CSF моноклонального антитіла людини або його функціональних фрагментів, зазначених вище, було визначено значення IC_{50} приблизно 3×10^{-10} М (або 0,3 пМ). Зв'язуючі молекули, таким чином, є дуже сильними нейтралізаторами дії GM-CSF приматів та людини.

Підводячи підсумок, можна сказати, що моноклональні анти-GM-CSF антитіла людини або їхні функціональні фрагменти виявляють високий ступінь розпізнання бажаного антигену, зв'язують цей антиген дуже сильно на довгий період часу та демонструють дуже високу нейтралізуючу активність на довгий період часу, поки вони залишаються з'єднаними. У той же час довгий період існування комплексу зв'язуючий агент-антиген уповільнює виведення цього зв'язуючого агента з організму, подовжуючи у такий спосіб строк дії бажаного терапевтичного ефекту *in vivo*.

Аналогічні оцінки також стосуються нейтралізації/інгібування моноклонального анти-IL-17 антитіла.

Згідно з цим винаходом, термін "фармацевтична сполука" стосується складу сполуки, яка вводиться пацієнту, бажано людині. Також бажано, щоб фармацевтична сполука включала відповідний пропис переносників, стабілізаторів та/або наповнювачів. У кращому прикладі реалізації фармацевтична сполука включає склад для парентерального, трансдермального, внутрішньопросвітнього, внутрішньоартеріального та/або інтратекального введення або прямою ін'єкцією у тканину. Спеціально передбачено введення пацієнту зазначеної сполуки за

допомогою внутрішньовенної інфузії або ін'єкції. Введення відповідних сполук може здійснюватися різними шляхами, наприклад, внутрішньовенно, внутрішньоперитоніально, під шкіру, у м'язи, місцево або інтрадермально. Сполука за цим винаходом може далі включати прийнятний з фармацевтичної точки зору носій. Приклади відповідних фармацевтичних носіїв

5 добре відомі у галузі і включають фізіологічні розчини з фосфатно-сольовим буфером, воду, емульсії, наприклад, емульсії ефірної олії та води, різні типи засобів змочення, стерильні розчини, ліпосоми та ін. Сполуки, до складу яких входять носії, можуть мати рецептуру, складену загальновідомими способами. Такі фармацевтичні сполуки можуть вводитися об'єкту у відповідних дозах. Спосіб дозування визначається лікарем, що спостерігає за хворим, та

10 клінічними факторами. Як добре відомо професіональним медичним працівникам, вибір дози для кожного пацієнта залежить від багатьох факторів, включаючи масу тіла пацієнта, поверхню його тіла, вік, конкретну сполуку, що вводиться, стать, час та шлях введення, загальний стан здоров'я, та інші препарати, що вводяться одночасно із досліджуванним. Препарати для парентерального введення включають стерильні водні або неводні розчини, суспензії та

15 емульсії. Прикладами неводних розчинників можуть служити пропіленгліколь, поліетиленгліколь, рослинні олії, наприклад, оливкова, а також органічні ефіри, що вводяться через ін'єкції, наприклад, етилолеат. Водні носії включають воду, розчини спиртові або водні, емульсії та суспензії, включаючи фізіологічний розчин та буферний засіб. Парентеральні засоби включають розчин хлористого натрію, розчин декстрази Рінгера, глюкозу із хлористим натрієм, лактат Рінгера або нелетучі олії. Внутрішньовенні засоби включають рідину та поживні розчини, розчини електролітів (наприклад, таких, що засновані на розчині декстрази Рінгера) та аналогічні їм. Можуть бути присутніми також консервуючі речовини та добавки, наприклад, антимікробні, антиоксиданти, хелатні добавки, інертні газі та інші. А крім того, фармацевтична

20 сполука за цим винаходом може містити носії білкового типу, наприклад, сироватковий альбумін, або імуноглобулін, бажаного походження від людини. Передбачається, що фармацевтична сполука за цим винаходом може містити, крім зазначених вище складників, також біологічно активні засоби, залежно від наміченого використання фармацевтичного препарату. Такі засоби можуть бути ліками, що діють на шлунково-кишкову систему, ліками, що діють як цитостатики, ліки, що попереджують гіперурикемію, ліки, що інгібують імунні реакції

25 (наприклад, кортикостероїди), ліки, що моделюють зворотну реакцію запалення, ліки, що діють на циркуляторну систему, та/або такі засоби, як цитокіни, відомі у цій галузі.

Біологічна активність фармацевтичної сполуки, що визначається тут, може встановлюватися, наприклад, за допомогою аналізу на цитотоксичність, що описується у наведених далі прикладах, у WO 99/54440 або Schlereth et al. (Cancer Immunol. Immunother. 20

35 (2005), 1-12). "Ефективність" або "ефективність *in vivo*" у значенні, що вживається тут, є реакцією на лікування за допомогою фармацевтичної сполуки винаходу, із застосуванням, наприклад, стандартизованих критеріїв Національного інституту раку. Успіх або ефективність лікування *in vivo* за допомогою фармацевтичної сполуки згідно з цим винаходом стосується ефективності сполуки для визначеної мети, тобто здатності сполуки викликати бажаний ефект,

40 який полягає у скороченні кількості патогенних клітин, наприклад, ракових. Ефективність *in vivo* може перевірятися за допомогою прийнятих стандартних способів для відповідних захворювань, включаючи, в тому числі, лейкоцитарну формулу, елементи диференціал, флуоресцентно активоване сортування клітин (FACS) та аспірацію кісткового мозку. Крім того, можна застосовувати різні параметри, пов'язані з специфічними клінічно-біохімічними

45 параметрами різних хвороб та іншими прийнятими стандартними способами. Також можуть бути використані способи комп'ютерної томографії, рентгенографії, магнітно-резонансна ядерна томографія (наприклад, за критеріями національного інституту раку, що ґрунтуються на оцінці відповідної реакції), сканування позитронно-емісійної томографії, лейкоцитарній формулі, диференціалах, FACS, пункції кісткового мозку, біопсії або гістологічних дослідженнях

50 лімфатичних вузлів та різних параметрів, специфічних для клінічного біохімічного стану лімфоми (наприклад, дегідрогінази) та інших прийнятих стандартних способах.

Іще однією серйозною складністю при розробці ліків, таких, як фармацевтична сполука згідно з цим винаходом, є передбачувана модуляція фармакокінетичних властивостей. З цією метою необхідно встановити фармакокінетичну характеристику можливого препарату, тобто

55 характеристику його фармакокінетичних параметрів, які впливають на здатність певного препарату лікувати визначений стан.

Фармакокінетичні параметри препарату, що впливають на здатність препарату діяти на об'єкт, який викликає певне захворювання, включають, у тому числі, період напіврозпаду, об'єм розподілу, метаболічний шлях першого проходження через печінку та ступінь зв'язування

60 сироватки крові. Ефективність певної діючої речовини препарату може знаходитися під впливом

будь-якого із зазначених вище параметрів.

"Період напіврозпаду" означає період часу, при якому 50 % введеного препарату виводиться за рахунок біологічних процесів, наприклад, метаболізму, виділення і т.п.

5 "Метаболічний шлях першого проходження через печінку" означає схильність препарату бути метаболізованим при першому контакті з печінкою, тобто при першому проходженні через печінку.

"Об'єм розподілу" означає ступінь затримання препарату у різних частинах організму, наприклад, у внутрішньоклітинних та міжклітинних проміжках, тканинах та органах і т.п. та розподіл препарату між цими частинами організму.

10 "Ступінь зв'язування сироватки крові" означає схильність препарату взаємодіяти з протеїнами сироватки крові та зв'язуватися з ними, наприклад, з такими, як альбумін, що викликає зниження або втрату біологічної активності ліків.

Фармакокінетичні параметри також включають біологічну доступність, час затримки (Tlag), Tmax, швидкість абсорбції, більшої появи та/або Cmax для зазначеної кількості введеного

15 препарату.
"Біологічна доступність" означає кількість препарату, що знаходиться у крові.
"Час затримки" означає затримку у часі між введеннями ліків та їхнім виявленням та здатністю бути вимірними у крові або плазмі.

"Tmax" означає час, після якого досягається максимальна концентрація препарату у крові, а
20 "Cmax" означає концентрацію у крові, що максимально досягається для певного препарату. На час досягнення концентрації препарату у крові або тканинах, який необхідний для його біологічної дії, впливають усі параметри. Термін "токсичність" у значенні, яке надається йому у цьому документі, стосується токсичної дії препарату, яка проявляється у формі побічних ефектів або серйозних побічних ефектів. Такі побічні ефекти можуть відноситися до
25 недостатньої здатності витримувати препарат після його введення взагалі та/або недостатньої здатності витримувати препарат локально. Токсичність може також включати тератогенний або канцерогенний вплив, спричинений препаратом.

Терміни "безпека", "безпека in vivo" або "здатність витримувати" згідно з вживанням у цьому тексті визначають введення ліків без подальших серйозних побічних явищ безпосередньо після
30 прийому (загальна здатність витримувати) та протягом більш довгого строку їхнього вживання. "Безпека", "безпека in vivo" або "здатність витримувати" можуть оцінюватися, наприклад, через регулярні проміжки часу протягом періоду лікування та подальшого спостереження. Вимірювання включають клінічні оцінки, наприклад, прояви з боку органів, та скринінг щодо наявності лабораторних порушень. Клінічне оцінювання може проводитися із реєстрацією відхилень від нормальних результатів згідно зі стандартами NCI-CTC та/або MedDRA. Прояви з
35 боку органів можуть включати такі критерії, як алергічні/імунологічні, кров'ястковий мозок, серцева аритмія, коагуляція та інші, такі, як, наприклад, зазначені у Критеріях загальної термінології (Common Terminology Criteria) для побічних явищ, ред.3.0 (CTCAE). До лабораторних параметрів, які можуть перевірятися, належать, наприклад, гематологічні,
40 результати біохімічних аналізів, характеристики коагуляції та аналіз сечі, а також аналіз інших рідин тіла, наприклад, сироватки, плазми крові, лімфи або спинномозкової рідини, ліквор та інше. Таким чином безпека може оцінюватися, наприклад, через загальний медичний огляд, засоби візуальної діагностики (наприклад, ультразвук, рентген, скануючу КТ, магнітно-резонансну томографію (MRI) та інші заміри за допомогою технічних засобів (наприклад,
45 електрокардіограма), життєво важливих симптомів, через заміри лабораторних параметрів та реєстрацію побічних явищ. Термін "ефективна та нетоксична доза" відповідно до його вживання у цьому тексті стосується дози, яку може витримати об'єкт, двоспецифічного одноланцюгового антитіла згідно із наведеним тут визначенням, яке є достатньо високим для того, щоб спричинити зниження кількості патогенних клітин, ліквідацію пухлини, зменшення пухлини у
50 розмірах або стабілізацію захворювання без або значною мірою без великих токсичних впливів. Такі ефективні та нетоксичні дози можуть визначатися, наприклад, через дослідження із підвищенням дози, описані у цій області, та повинні бути нижчими від доз, які спричинюють появу серйозних побічних явищ (доза, що обмежує токсичність).

Ця заявка включає деякі малюнки, на яких зображене наступне.

55 На фіг. 1 представлений результат лікування за допомогою GM-CSF-нейтралізуючих mAb 22E9 (A), IL-1 β -нейтралізуючих mAb 1400.24.17 (B) та TNF α -антагоністу етанерцепту (C) при набряках суглобів і хронічному запаленні, викликаному клітинними стінками стрептококів. Артрит був викликаний відповідно до описаного у способах. Лікування проводилося інтраперитоніально дозами по 300 μ g у дні 14, 17, 21 та 24. Запалення вимірювалося за
60 поглинанням ^{99m}Tc колінними суглобами та виражалось як співвідношення правого (колінного

суглоба із артритом) до лівого (контрольний колінний суглоб із фізіологічним розчином з PBS). Співвідношення >1.10 розглядалося як набряк коліна. Групи порівнювалися за допомогою критерію Манна-Уїтні ($*0,05 > p > 0,01$; $**0,01 > p > 0,001$); $n=7$ на кожну групу.

На фіг. 2 представлений ефект лікування за допомогою GM-CSF-нейтралізуючих mAb (22E9 mAb), IL-1 β -нейтралізуючих mAb (1400.24.17) та TNF α -антагоністу етанерцепту на надходження запальних клітин у синовіальну мембрану (А), та на пошкодження хряща (В). Спричинення хвороби та її лікування описані у способах. Миші були евтаназовані на 28-й день із наступним приготуванням гістологічних зрізів та візуальною оцінкою. Групи порівнювалися із контрольним лікуванням за допомогою критерію Манна-Уїтні, $n = 7$.

На фіг. 3 представлені мікрофотографії репрезентативних колінних суглобів мишей із хронічним артритом, викликаним клітинними стінками стрептококів, що лікувався за допомогою GM-CS-нейтралізуючих mAb (22E9) (А), α -IL-1 β mAb (1400.24.17) (В), TNF α -антагоністу етанерцепту (С) та контрольних mAb (D). Зрізи були зроблені на 28-й день після спричинення артриту за допомогою клітинних стінок стрептококів та забарвлені Safranin O/fast green. P = колінна чашечка; F = стегно; C = хрящ. Зверніть увагу на хрящ, що добре зберігся на (А) та (В), та на втрату протеоглікану і ерозію хряща на (С) та (D). Початкове збільшення - 200х.

На фіг. 4 представлені рівні локального IL-1 β (А) та КС (еквівалент Gro α) (В), що вимірювався кульками Lumiplex супернатантах від одностодінної культури колінних чашечок, поставлених у день 21 після першої індукції артриту, викликаного клітинними стінками стрептококів. Лікування проводилося згідно з описаним у підпису до фіг. 1.

На фіг. 5 представлений хронічний артрит, викликаний клітинними стінками стрептококів, у мишей дикого типу та IL-17R-дефіцитних, яких лікували контрольними або анти-GM-CSF антитілами. (А) Набряк суглобів у мишей дикого типу (ДТ) та IL-17R-дефіцитних. Як було показано раніше, значні відмінності були встановлені при набряку колінних суглобів між мишами диких типів, що отримували лікування у контрольній групі, та тими, що лікувалися за допомогою анти-GM-CSF у дні 22, 23 та 28. (В) Запалення колінного суглоба та протеогліканове (PG) руйнування хряща у 28 день. (С) Пошкодження хряща (ерозія та смерть хондроцитів) у шарах хряща колінної чашечки та стегна мишей ДТ, що отримували лікування контрольним антитілом. (D) Менш значне пошкодження хряща у мишей IL-17R-/-, що лікувалися анти-GM-CSF антитілами. (Е) Втрата PG хряща у шарах хряща колінної чашечки та стегна мишей ДТ, що одержували контрольне антитіло. (F) Втрата PG хряща у IL-17R-/-, що лікувалися анти-GM-CSF антитілами. Більш детально показано на Малюнку 3. Інформація виражена як середнє \pm SD для щонайменше 6 мишей у групі. Експерименти були повторені один раз і дали аналогічні результати. * $P < 0,01$ порівняно до мишей ДТ контрольної групи, що одержували контрольні антитіла, ** $P < 0,01$ порівняно до мишей IL-17R-/-, що лікувалися анти-GM-CSF антитілами, за допомогою критерію Манна-Уїтні.

На фіг. 6 представлені макроскопічні оцінювання мишей із артритом, викликаним колагеном, за якими спостерігали протягом десяти днів з початку лікування. Після появи перших симптомів артриту (які відповідають дню 1 на фіг. 6), миші одержували внутрішньовенно (також у день 1 на фіг. 6) (i) одну дозу введення тільки анти-IL17 моноклонального антитіла mAb421 1,5 мг/кг, (ii) тільки анти-GM-CSF моноклонального антитіла 22E9 3 мг/кг, або (iii) mAb421 1,5 мг/кг та 22E9 3 мг/кг в комбінації. Блокування IL-17 за допомогою mAb421 в комбінації з нейтралізацією GM-CSF за допомогою 22E9 значимо зменшило клінічні оцінки артриту, викликаного колагеном, при цьому лікування тільки mAb421 або 22E9 не викликало значних зменшень ступеню серйозності захворювання. Симптоми артриту у мишей зникали через 2-3 дні після інтраперитоніального введення дексаметазону (2 мг/кг, позитивний контроль). Антитіло IgG2A (ізотиповий контроль) використовувалося як негативний контроль. Результати були середніми \pm стандартна похибка середнього $n = 9-10$ мишей/група. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ при IgG2A негативному ізотиповому контрольному лікуванні мишей, визначених за одностороннім дисперсним аналізом ANOVA та тестом багаторазового порівняння Даннета.

На фіг. 7 представлені репрезентативні зрізи суглобів через 10 днів після одноразового введення 22E9 3 мг/кг (А), mAb421 1,5 мг/кг (В), комбінації 22E9 3 мг/кг та mAb421 1,5 мг/кг (С), або ізотипного контролю (D). Суглоби фіксувалися у 4 %-му формаліні, вони були декальциновані, розрізані та забарвлені гематоксиліном/еозином. У мишей, що одержували ізотипний контроль IgG2a щурів (фіг. 7D) видно виражене запалення суглобів із масивним клітинним інфільтратом у синовіальних мембранах (*), а також руйнування суглоба з ерозією хряща та кісток (Т). Хоча і з дещо менш важким перебігом, у мишей, які одержували дозу 22E9, 3 мг/кг (фіг. 7A) або mAb421, 1,5 мг/кг (фіг. 7B), також видно серйозне запалення та руйнування суглоба, а у мишей, що одержували одне введення комбінованого лікування 22E9 3 мг/кг разом із mAb421 1,5 мг/кг, запалення біло значно меншим (*) (фіг. 7C) та хороший стан цілісності

суглоба із близькою до нормального поверхнею хряща, показано на (Т) на фіг. 7С.

Наведені далі дані експерименту дозволять фахівцю вичерпно зрозуміти суть цього винаходу.

Тварини

5 Самці мишей C57B1/6 були отримані від Charles River (Зульцфельд, Німеччина). L-17R-дефіцитні миші були люб'язно надані Дж. Пешоном (компанія Amgen, Сіетл, штат Вашингтон, США). Мишей тримали у клітках із верхніми фільтрами, а їжа та вода надавалися за бажанням. Миші в експерименті були у віці 10-12 тижнів. Усі процедури, що проводилися із тваринами, були схвалені інституційним етичним комітетом.

10 Приготування препарату клітинних стінок стрептококів та індукція артриту, викликаного клітинними стінками стрептококів

Організми *Streptococcus pyogenes* T12 були вирощені протягом ночі у бульйоні Тодда-Х'юїтта. Стінки клітин були підготовлені так, як це описано у van den Broek et al., Am J Pathol 133(1), 139-149 (1988). Отриманий при 10,000 x g супернатант використовувався для всіх експериментів. Препарат містив 11 % мурамову кислоту. Односторонній артрит був викликаний внутрішньо-суглобовою (в.с.) ін'єкцією 25 μ g клітинних стінок стрептококів (рамінозний вміст) у 6 μ l фізіологічного розчину з фосфатним буфером (PBS) у правий колінний суглоб мишей, що раніше не використовувалися у дослідях, згідно з процедурою, описаною у Joosten et al., Ann Rheum Dis 59(3), 196-205 (2000). Для створення хронічного артриту, викликаного клітинними стінками стрептококу, в.с. ін'єкції у правий колінний суглоб виконувалися у дні 0, 7, 14 та 21. Ці повторні ін'єкції викликали хронічний артрит. Як контрольну речовину у лівий колінний суглоб вводили фізіологічний розчин з фосфатним буфером.

Реактиви та протокол лікування

GM-CSF нейтралізувався за допомогою щурячого rriAb 22E9 (MM500CS, Perbio Science, Бонн, Німеччина). Етанерцепт (Enbrel®; Wyeth Pharma, Мюнстер, Німеччина) використовувався для блокади TNF α . Матеріали кількох досліджень показали ефективність цього розчинного протеїну отриманого від злиття TNF-рецептора та Fc- ділянки іммуноглобуліна G1 людини на різних мишиних моделях, включаючи CIA. Щурячий ізотипний контроль IgG2a (BLD-400516-bulk, Biozol Diagnostica, Ехінг, Німеччина) та Humira® (Abbott, Вісбаден-Делькенхейм, Німеччина) були використані як ізотипний контроль. IL-1 β нейтралізувався за допомогою щурячого антимишиного IL-1 β mAb 1400.24.17 (MM425, Perbio Science, Бонн, Німеччина). Усі лікувальні препарати вводилися внутрішньобрюшинно у дозах 300 μ g 4 рази: i) за 2 години до 3-ї реактивації (день 14), ii) у день 17, iii) за 2 години до 4-ї реактивації (день 21) та iv) на 24 день після початкової індукції захворювання.

35 Виміри набряку суглобів

Виміри набряку суглобів при артриті, викликаному клітинними стінками стрептококів, оцінювалися за способом поглинання ^{99m}Tc, описаним у Kruijsen et al., Agents Actions 11(6-7), 640-2 (1981). Цей спосіб оцінки вимірює за допомогою підрахунку зовнішнього гамма-випромінювання акумуляцію ізотопів у місці запалення через місцеве посилення кровотоку та набряку тканин. Ступінь серйозності набряку виражається у відношенні поглинання ^{99m}Tc у правому (із запаленням) до лівого (контрольного) колінного суглоба. Усі значення, що перевищували 1.10, розглядалися як набряки суглобу.

Заміри цитокінів та хемокинів

Рівні кількох цитокінів та хемокинів, включаючи IL-1 β , IL-6, TNF α , RANTES, KC та MIP-1 α , були визначені у зонах ерозії колінної чашечки. Колінна чашечка з оточуючою її синовіальною тканинною відокремлювалася від запаленого колінного суглобу та культивувалася у середовищі RPMI 1640, яке містить 0,1 % альбуміну бичачої сироватки (BSA) (200 μ l/колінна чашечка) 1 годину при кімнатній температурі, як це описано у Joosten et al., J Immunol 165(11), 6553-8 (2000). Після цього супернатант збирався та центрифугувався протягом 5 хвилин при 1000 x g. Визначалися рівні цитокінів та хемокинів за допомогою мульти-аналітної технології Luminox. Ми використовували систему BioPlex від BioRad (Мюнхен, Німеччина) у комбінації з мультиплексними наборами цитокінів та хемокинів.

Гістологічний аналіз

55 Миші умертвлялися на 28 день шляхом цервікальної дислокації. Колінні суглоби видалялися цілими та поміщалися у 4 % розчин формальдегіду на 7 днів з послідовною декальцифікацією у 5 % мурашиній кислоті та обробкою для заливки у парафін. Зрізи тканин (7 мкм) забарвлювалися розчином гематоксиліну/еозину(H/E) або safranin O/fast green(SO). Гістопатологічні зміни у колінному суглобі оцінювалися в області колінної чашечки та стегна на 5 напівсерійних зрізах з проміжком між ними 140 мкм. Оцінки виставлялися на кодованих слайдах двома незалежними спостерігачами, за допомогою наступних параметрів. На слайдах,

забарвлених Н/Е оцінювалася у балах від 0 до 3 кількість клітин, які інфільтрувалися у синовіальну оболонку. Пошкодження хряща оцінювалося на слайдах, забарвлених SO, у балах від 0 до 3.

Статистичний аналіз

Різниця між експериментальними групами перевірялася за допомогою критерію Манна-Уїтні та програми GraphPad Prism 4. Значимі дані вибірки групувалися наступним чином: * = 0,05 > p > 0,01; ** = 0,01 > p > 0,001; та *** = p < 0,001.

Наведені далі приклади також дадуть професіоналам можливість отримати повне уявлення про суть цього винаходу.

Приклад 1:

Системна нейтралізація GM-CSF зменшує набряк суглобів в моделях хронічного артриту, викликаного клітинними стінками стрептококу

Під час хронічної фази артриту, викликаного клітинними стінками стрептококу, вплив на набряк суглобів після лікування біологічними препаратами, що нейтралізують GM-CSF (mAb 22E9), TNF α (етанерцепт) або IL-1 β (mAb 1400.24.17) досліджувався у дні 15, 16, 22, 23 та 28 за допомогою диференціального поглинання ^{99m}Tc у колінних суглобах. Результати виражалися як відношення поглинання ^{99m}Tc між колінним суглобом, ураженим артритом, викликаним ін'єкцією клітинними стінками стрептококів, контрольним колінним суглобом, в який вводили PBS.

Системне введення GM-CSF-нейтралізуючого антитіла значно та істотно знижувало набряк у дні 16, 22, 23 та 28 із р-значеннями 0,018, 0,004, 0,004 та 0,002, відповідно (фіг. 1A). Нейтралізація IL-1 β також знижувала набряк суглобів, хоча істотне зменшення величин поглинання ^{99m}Tc у колінному суглобі відповідно до контрольного колінного суглоба спостерігалось тільки у дні 22 (p = 0,011) та 23 (p = 0,001) (фіг. 1B). Як і припускалося, блокада TNF α за допомогою етанерцепту, який може нейтралізувати TNF α як мишей, так і людини, не мала впливу на набряк суглобів на моделі артриту, викликаного ін'єкцією клітинними стінками стрептококів (фіг. 1C). На відміну від цього етанерцепт, як показали попередні дослідження, мав активність у гострій фазі захворювання артритом, викликаним ін'єкцією клітинними стінками стрептококів, для цієї моделі. Нейтралізація GM-CSF під час хронічного SCW артриту таким чином виявилася більш сильнодіючою, ніж нейтралізація IL-1 β , а її дія зберігалася до дня 28, тобто за 4 дні після останнього введення антитіла. Друге незалежне дослідження підтвердило ефективність нейтралізації GM-CSF для зменшення набряку суглобів у моделі хронічного артриту, викликаному ін'єкцією клітинними стінками стрептококів.

Приклад 2:

Нейтралізація GM-CSF зменшує надходження запальних клітин у синовіальну оболонку та пошкодження хряща

Гістопатологічні зрізи суглобів різних груп мишей були підготовлені після закінчення експерименту у день 28. Ступінь надходження клітин запалення у синовіальну оболонку та пошкодження хряща оцінювалися незалежно двома дослідниками сліпим способом на, Н/Е- та SO-забарвлених зрізах тканин.

Усі три види лікування - нейтралізація GM-CSF за допомогою mAb 22E9, нейтралізація IL-1 β за допомогою mAb 1400.24.17 та блокада TNF α етанерцептом виявилися ефективними щодо істотного зменшення надходження запальних клітин у синовіальну оболонку (фіг. 2A). Блокада TNF α , хоча й достатньо ефективна, виявилася менш дієвою, ніж нейтралізація GM-CSF або IL-1 β із р-значеннями відносно контролю 0,042, 0,004 та 0,001 відповідно. Крім того, незважаючи на зменшення надходження запальних клітин до колінних суглобів у мишей, які одержували етанерцепт, цілісність хряща у них не зберігалася (фіг. 2B). На відміну від зазначеного, нейтралізація GM-CSF істотно захищала від пошкодження хряща (p = 0,02; mAb 22E9 відносно ізотипових контрольних mAb) (фіг. 2B). Як зазначалося вище, нейтралізація IL-1 β виявилася дуже ефективною для захисту хряща від пошкодження (p = 0,004, анти-IL-1 β відносно контрольних; (фіг. 2B).

Дія різних типів лікування на цілісність хряща показана на фіг. 3, де даються мікрофотографії колінних суглобів, забарвлених safranin O/fast green, однієї з репрезентативних мишей, взятої з кожної групи лікування. Сильне забарвлення хряща та хороший стан тканин можна бачити на миші, яка одержувала mAb 22E9 (фіг. 3A), що свідчить про дію нейтралізації GM-CSF на захист цілісності хряща. На відміну від цього, хрящ миші, яка одержувала антитіло ізотипового контролю, (фіг. 3D), демонструє деструктивну ерозію та зниження інтенсивності забарвлення, що свідчить про втрату протеоглікану, одного з головних компонентів суглобового хряща.

Аналогічним чином втрата протеогліканів та посилене ушкодження хряща спостерігається у мишей, які одержували етанерцепт (фіг. 3C). Це співпадає з результатами попередніх

досліджень моделі хронічного артриту, викликаного клітинними стінками стрептококів, яка демонструвала незалежність від TNF α . Відомо, що IL-1 β має значний деструктивний вплив на хрящі в експериментальних моделях артриту. Відповідно, нейтралізація IL-1 β антитілом має виражену захисну дію на хрящ цього нашого дослідження (фіг. 3B).

5 Приклад 3:

Нейтралізація GM-CSF зменшує утворення IL-1 β та KC у колінних суглобах

Маючи на меті краще зрозуміти захисну дію GM-CSF та її взаємозв'язок із IL-1 β , ми дослідили концентрації різних цитокінів та хемокінів у змив від колінних чашечок. Аналізувалися тільки праві коліна (уражені артритом), оскільки рівні у контрольних неушкоджених колінах (лівих) неодноразово виявлялися у попередніх експериментах нижчими від границі визначення.

10 Нейтралізація GM-CSF за допомогою mAb 22E9 спричиняє значне зменшення локального IL-1 β порівняно з рівнями, виявленими у суглобах мишей, які одержували антитіло ізотопного контролю ($p = 0,042$; у тих, що одержували 22E9, проти контрольних) (фіг. 4). Блокада TNF α за допомогою етанерцепту не впливала на рівні IL-1 β у суглобах (фіг. 4), а у мишей, які
15 одержували IL-1 β - нейтралізуюче mAb, як і очікувалося, рівні IL-1 β наближались до рівня на початку експерименту. Рівні хемокіну KC (миші GRO- α) були значно зниженими у вражених артритом колінних суглобах усіма трьома видами лікування ($p = 0,0047$ для 22E9 проти контрольних; $p = 0,0007$ для етанерцепту проти контрольних; $p = 0,007$ для анти-IL-1 β проти контрольних). Локальні рівні IL-6 та RANTES не зазнали впливу жодного з досліджуваних видів
20 лікування (інформація не наводиться). Рівні IL-2, TNF α та GM-CSF виявилися нижчими від границі визначення аналізів, наприклад., < 10 пг/мл.

Приклад 4:

Нейтралізація GM-CSF за відсутності сигналізу IL-17 підсилює захисну дію проти руйнування хряща

25 Нейтралізація GM-CSF знижувала набряк суглоба та захищала хрящ від руйнування із ефективністю, близькою до тієї, яка спостерігалася при нейтралізації IL-1 β . Пізніше були проведені аналогічні дослідження з моноклональними антитілами проти GM-CSF при хронічному артриті, викликаному клітинними стінками стрептококів, на мишах із дефіцитом IL-17R. Дефіцит IL-17R приводить до послаблення набряків суглобу та руйнування хряща при
30 хронічному артриті, викликаного клітинними стінками стрептококів (фіг. 5A). Комбінована дія на GM-CSF та сигналінг IL-17 на цій моделі артриту приводили до сильного, покращеного пригнічення набряку суглобів (фіг. 5A). Хоча як лікування анти-GM-CSF, так і IL-17R-дефіцитність призвели до зменшення надходження клітин, комбінована дія не спричиняє суттєве зниження запалення суглобів (фіг. 5B). Цікаво відзначити, що виснаження протеоглікану та пошкодження хряща (смерть хондроцитів та ерозія) були значно знижені у мишей, які одержували анти-GM-CSF та мали дефіцит IL-17R (фіг. 5B-E). Ці результати показують, що захисна дія на хрящ анти-GM-CSF може бути іще підсилена використанням цитокіну T-клітинного IL-17 також у якості мішені.

Приклад 5:

40 Мишина модель хронічного рецидивуючого артриту, викликаного клітинними стінками стрептококів, характеризується серйозним ушкодженням суглобів, яке є типовим на пізніх стадіях хронічного РА у людей. На відміну від того, що спостерігається у модельних мишей із колаген-індукованим артритом та гострим SCW артритом, викликаним клітинними стінками стрептококів, нейтралізація TNF α вже не є ефективною для контролю хронічного артриту,
45 викликаного клітинними стінками стрептококів, при якому IL-1 β , як виявляється, відіграє головну патогенну роль (72). Незалежність від TNF α та ключова роль IL-1 β у руйнуванні хряща при хронічному артриті, викликаному клітинними стінками стрептококів, підтвердилася результатами нашого дослідження.

Блокада GM-CSF, вперше досліджена саме на цій моделі, була показана, як та, що має
50 глибокий інгібіторний ефект на набряк суглобів та руйнування хряща у колінних суглобах при хронічному артриті, викликаному введенням клітинних стінок стрептококів, при дозах антитіла 300 μ г, які вводилися інтраперитоніально на хронічній стадії захворювання. Це показує, що анти-GM-CSF антитіло у мишей при дозі, еквівалентній дозі антитіла приблизно 1 мг/кг у людини (після аллометричної корекції), є достатньою для корекції рівнів GM-CSF в колінних суглобах,
55 уражених артритом. Терапевтична ефективність нейтралізації GM-CSF в моделі хронічного артриту була надзвичайно високою. Набряк суглобів краще контролювався лікуванням анти-GM-CSF, ніж анти-IL-1 β , в той час як блокада TNF α виявилася неефективною. Аберанте утворення TNF α може все-таки відігравати певну роль при хронічному артриті, викликаному клітинними стінками стрептококів, тому що їхня нейтралізація мала вплив на надходження
60 запальних клітин та рівні хемокіну KC. Водночас роль TNF α у хронічному артриті менша

порівняно до гострої фази захворювання та відмінна від інших моделей артриту на мишах. Відносно захисту хряща лікування як за допомогою анти-GM-CSF, так і анти-IL-1 β , виявилися високоефективними. Незалежність дії GM-CSF та IL-1 раніше ніколи не відзначалася на інших моделях артриту. У цій моделі IL-1-індукованого артриту після ін'єкції mBSA GM-CSF відіграє

5 переважну патогенну роль. Відсутність GM-CSF, як у GM-CSF нокаутних мишей, або нейтралізованого GM-CSF у мишей ДТ, значно знижує дію артриту. Водночас під час хронічної фази артриту, викликаного клітинними стінками стрептококів, GM-CSF, здається, діє вище в сигналіngu від IL-1 β , оскільки його нейтралізація знижувала рівні IL-1 β у суглобах, вражених артритом. Таке зниження утворення IL-1 активованими макрофагами та іншими GM-CSF-

10 стимульованими імунними клітинами може також пояснювати, чому анти-GM-CSF лікування мало захисну дію щодо хряща у нашій моделі. У моделі гострого артриту, викликаного клітинними стінками стрептококів, ми також встановили, що анти-GM-CSF антитіло було здатне знижувати рівні IL-1 β , а етанерцепт, блокатор TNF α , не міг. У моделі мишей з колаген-індукованим РА блокада GM-CSF знижувала дуже значною мірою як рівень IL-1 β , так і TNF α .

15 При тому, що експресія GM-CSF гостро індукується у різних імунних клітинах такими підтримуючими запалення цитокінами, як TNF α та IL-1 β через активацію транскрипційного фактору NF- κ B та інших, ієрархія цитокінів виявляється порушеною на пізніших стадіях запалення, коли GM-CSF бере під контроль утворення TNF α та IL-1 β , а також, можливо інших цитокінів та хемокінів. Одночасно з інгібуванням TNF α та IL-1 β в уражених артритом тканинах,

20 блокада GM-CSF також має здатність знижувати активність та виживання GM-CSF-залежних імунних клітин, таких, наприклад, як гранулоцити, нейтрофіли та макрофаги. Можна уявити, що GM-CSF не тільки безпосередньо індукує експресію IL-1 β та TNF α , але й також викликає координовану анти-апоптичну дію та постійну активацію різних типів клітин природженої імунної системи, у такий спосіб опосередковано підсилюючи утворення IL-1 β та TNF α . Такий вплив на клітинний цикл та їхнє виживання був показаний на mBSA моделі артриту, у якій нейтралізація GM-CSF *in vivo* спричиняла виражене зменшення загальної насиченості клітинами, а також

25 числа клітин що діляться, в уражених артритом суглобах.

Приклад 6:

Крім блокади GM-CSF при хронічному артриті, викликаному клітинними стінками стрептококів у тварин ДТ, проводилися експерименти на IL-17R-дефіцитних мишах. IL-17 виробляється клітинами Th17, які можуть одночасно також виробляти TNF α та GM-CSF. У присутності TNF α IL-17 запускає утворення синовіоцитами GM-CSF, що є припустимою роллю IL-17 вище GM-CSF за сигнальним ланцюгом. З іншого боку, клітини кісткового мозку, оброблені GM-CSF та стимульовані LPS, виробляють IL-23, який є важливим фактором виживання для IL-17-утворюючих клітин Th17. До цього винаходу комбінована блокада IL-17 та GM-CSF не

35 вивчалася ані *in vitro*, ані *in vivo*. Це дослідження винахідників є першим, яке показало, що одночасна блокада сигнальних шляхів як GM-CSF, так і IL-17 спричинює більш значне пригнічення набряку суглобів та кращий захист від руйнування хряща порівняно із блокуванням лише одного із метаболічних шляхів. Така сильна дія на хрящ може бути пояснена одночасною дією IL-17 та (GM-CSF-індукованого) IL-1 β , оскільки ці два цитокіни, як було показано раніше,

40 мають одночасну дію на утворення цитокінів у пацієнтів з РА та утворення PGE₂ та NO в остеоартрозному хрящі. Це дослідження разом із попередніми виділяє як важливий момент те, що нейтралізація GM-CSF може мати терапевтичний потенціал для людей з РА, включаючи пацієнтів, які більше не мають або із самого початку не мали реакції на блокаду TNF α . Це дослідження також демонструє, що лікування за допомогою анти-GM-CSF у комбінації з анти-IL-17 має дуже значну терапевтичну дію при РА, так само, як і при інших аутоімунних та запалювальних процесах.

Приклад 7:

Колаген-індукований артрит (CIA) є широко застосовуваною моделлю артриту на мишах, яка

50 заснована на Т-клітинно- та антитіло-опосередкованої аутоімунній реактивності проти хрящового колагену типу II (CII). Ця модель має кілька спільних клінічних, гістопатологічних та імунологічних характеристик із РА у людини і відзначається в основному синовіальним запаленням, після якого розвивається сильна ерозія хряща та кісток. Метою дослідження, описаного тут, була оцінка терапевтичної ефективності комбінованого введення сполуки, що

55 нейтралізує GM-CSF, та сполуки, що нейтралізує IL-17, на модельній системі мишей із CIA. Зокрема, досліджувався вплив лікування мишей за допомогою (i) тільки моноклонального антитіла анти-IL-17 (mAb 421), (ii) тільки моноклонального антитіла анти-GM-CSF (mAb 22E9) та (iii) комбінації обох антитіл після розвитку CIA, порівняно до негативного (IgG2A) та позитивного (дексаметазон) контролю. Аанти-IL-17 антитіло mAb421 було одержано від R&D Systems, mAb 22E9 було одержане від Perbio Science. Контрольні ізотипові антитіла щурів Rat IgG2a були

60

отримані від Biolegend. Усі антитіла зберігалися при температурі -80°C . Дексаметазон був одержаний від Centrafarm і зберігався при кімнатній температурі. Усі складники розводилися для введення стерильним фізіологічним розчином з фосфатним буфером.

Лікування зазначеними вище сполуками мишей із CIA вивчалось за програмою 7-тижневого дослідження. У день 0 миші DBA/1J чоловічої статі одержували імунізацію в область основи хвоста $100\text{ }\mu\text{g}$ бичачого CII під дією анестезії ізофлураном. У день 21, миші одержували інтраперитоніально бустер-ін'єкцію $100\text{ }\mu\text{g}$ CII, розчиненого у фізіологічному розчині із фосфатним буфером (PBS), і за кілька днів після такої бустер-ін'єкції починався розвиток артриту. Бичачий колаген II типу (CII) у концентрації 2 мг/кг у розчині оцтової кислоти $0,05\text{M}$ емульгувався в рівних об'ємах з повним ад'ювантом Фрейнда (2 мг/кг туберкульозної бацили штаму H37Ra). При перших симптомах артриту (від $0,25$ бала), миші послідовним способом розподілялися на різні експериментальні групи, наведені далі, і знаходилися під спостереженням протягом наступних 10 днів дослідження. Вважалося, що миші мають артрит, коли на пальцях або в інших областях лап спостерігалися значні зміни у почервонінні та/або набряки. Запалення суглобу у кожній лапі оцінювалося у балах візуально за допомогою шкали 0-2 для кожної лапи з максимальним значенням 8 на одну тварину (чотири лапи з симптомами артриту при максимальному значенні шкали 2 на кожну), як це описано у R. Smeets et al, Arthritis Rheum 2003: 0 = відсутність запалення, 1 = незначне запалення, 1,5 = виражене запалення та 2 = сильне запалення. Оцінювання проводилося тричі на тиждень, починаючи з дня 21 до дня 45 незалежними спостерігачами, які не знали характеру розподілу тварин на експериментальні групи. Антитіла вводилися у вигляді однієї дози при виявленні симптомів артриту. Дексаметазон вводився у дозі 2 мг/кг , інтраперитоніально три рази на тиждень (у понеділок, середу та п'ятницю). Миші, у яких не були ніяких симптомів артриту до 35 дня дослідження вважалися такими, у яких немає зворотної реакції, і вони не розглядалися при аналізі у рамках дослідження. На основі результатів попередніх досліджень доза у цьому дослідженні була встановлена в об'ємі $1,5\text{ мг/кг}$ mAb421. Для анти-GM-CSF антитіла 22E9 обрана доза складала 3 мг/кг . При такому дозуванні дослідження виконувалося з метою оцінки дії комбінованого блокування IL-17 та GM-CSF при колаген-індукованому артриті. Дексаметазон використовувався для позитивного контролю, а антитіло щурів IgG2a для негативного контролю. Дослідження також включало експериментальні групи лікування анти-IL-17 (mAb421), анти-GM-CSF (22E9) та їхньою комбінацією, при використанні зазначених доз.

Експериментальні групи: mAb421 $1,5\text{ мг/кг}$ + Rat IgG2a 3 мг/кг (усього $4,5\text{ мг/кг}$)

22E9 3 мг/кг + IgG2a щурів $1,5\text{ мг/кг}$

mAb421 $1,5\text{ мг/кг}$ + 22E9 3 мг/кг

IgG2a щурів 15 мг/кг

Дексаметазон 2 мг/кг

Як показано на фіг. 6, нейтралізація IL-17 за допомогою mAb421 разом із нейтралізацією GM-CSF за допомогою 22E9 значно зменшувала рівень клінічної оцінки колаген-індукованого артриту. На відміну від цього, лікування за допомогою тільки mAb421 або 22E9 не викликало значного полегшення перебігу захворювання.

Симптоми артриту зникали за 2 або 3 дні після інтраперитоніального введення дексаметазону (2 мг/кг , позитивний контроль). У мишей, які отримували антитіло IgG2a (негативний контроль) спостерігався чіткий розвиток артриту у більш важких формах.

Для гістопатологічного аналізу брали передні та задні лапи (ліві та праві, по 4 зразка від кожної миші). Лапи зберігалися у 4% -му розчині формальдегіду. Після декальцифікації у EDTA або стандартному розчині для декальцифікації протягом 3-х днів лапи заливалися у парафін (пара пласт®), забарвлювали Н/Е, та оцінювалися під оптичним мікроскопом. Гістологічний огляд обмежувався суглобами пальців (плюсна/зап'ясток та пальці) лапи.

Гістологічний огляд виявив артрит нижніх суглобів кінцівок (зап'ясток/плюсна, пальці) у формі від підгострого до хронічного. Артрит характеризувався потовщенням синовіальної оболонки (синовіальна гіперплазія), внутрішньосуглобовим ексудатом та вираженою інфільтрацією змішаних типів клітин, переважно у суглобовій капсулі. У найбільш яскраво виражених випадках реакція клітин запалення також виявлялася у з'єднувальній тканині та сухожиллях. Також при більш хронічних випадках спостерігалось типове гранулювання тканин, що складалось з фіброзної тканини та переважно моноклеарних клітин. Крім того, були помічені ерозивні зміни хряща периферійних суглобів. На фіг. 7 показано репрезентативні зрізи суглобі через 10 днів після одноразового введення 22E9 3 мг/кг (A), mAb421 $1,5\text{ мг/кг}$ (B), комбіновано 22E9 3 мг/кг та mAb 421 $1,5\text{ мг/кг}$ (C) або ізотипового контролю 15 мг/кг (D). Суглоби зберігалися у 4% -му розчині формаліну, були декальциновані, розділені та забарвлені гематоксиліном/еозином. У мишей, які одержували ізотипний контроль (фіг. 7D), спостерігалось

виявлене запалення суглобів з масивною інфільтрацією клітин у синовіальну оболонку, а також руйнування суглобів з ерозією хряща та кісток. Хоча дещо слабшою мірою у мишей, які одержували 22E9, 3 мг/кг (фіг.7A) або mAb 421, 1,5 мг/кг (фіг.7B), також було виявлено сильне запалення та руйнування суглобів, в той час як у мишей, що одержували одноразове введення комбінованого 22E9 3 мг/кг разом із mAb421 1,5 мг/кг, спостерігалось значне зниження рівня запалення та хороший стан цілісності суглобів при майже нормальній поверхні хряща (фіг.7C). В результаті цього більшість випадків артриту спостерігалася у групі негативного контролю (IgG2A шурів). Не було виявлено артриту після 2-х або 3-х днів введення дексаметазону (позитивний контроль). Порівняно до мишей із CIA, які одержували тільки mAb421 або mAb 22E9, або комбіновано, до негативного контролю, найкращі результати щодо наявності або ступеню тяжкості артриту відзначалися у групі, що одержувала mAb421 в комбінації з mAb22E9.

Висновок:

У цьому винаході досліджувалася терапевтична ефективність нейтралізації GM-CSF на двох різних моделях артриту, а саме (i) модель TNF α -незалежного хронічного артриту, викликаного клітинними стінками стрептококів, та (ii) модель TNF α -залежного CIA. Крім того, була досліджена дія блокування як природного, так і набутого імунітету через інгібування сигнальних шляхів GM-CSF та IL-17. Це досягалось нейтралізацією GM-CSF на мишах із генетичним дефіцитом рецептора IL-17 (миші IL-17R-KO) або комбінованим лікуванням моноклональними антитілами, які нейтралізують GM-CSF та IL-17. Несподівано винахідники виявили, що обидва типи запалювальних захворювань можуть лікуватися з високим ступенем ефективності за допомогою комбінованої блокади сигнальних шляхів GM-CSF та IL-17. На моделі CIA комбіноване введення сполуки, що інгібує GM-CSF, та IL-17-інгібуючої сполуки значно знижувало клінічні оцінки рівня колаген-індукованого артриту, при тому, що лікування за допомогою тільки сполуки, що інгібує GM-CSF, або IL-17-інгібуючої сполуки не викликало значного поліпшення тяжкості стану артриту. Детальний гістологічний аналіз також показав перевагу комбінованої терапії при запаленні суглобів та руйнуванні хряща та кісток. Отже, комбінована блокада обох сигнальних шляхів забезпечувала високоефективний захист від запалення та руйнування суглобів. Ці результати були особливо неочікуваними через те, що до останнього часу вважалося, що дія GM-CSF відбувається нижче за сигнальним шляхом за IL-17 (див., наприклад, Kawaguchi M. et al., J. Allergy Clin. Immunol. 114 (2004), 444-450; Starnes T. et al., The Journal of Immunology 169 (2002), 642-646; Laan M. et al., Eur. Respir. J. 21 (2003), 387-393). Тому не очікувалося на додатковий поєднаний ефект від лікування комбінованою блокадою цих обох сигнальних шляхів. Ця заявка є першою, яка демонструє переваги дії комбінованої блокади IL-17 та GM-CSF *in vivo*. Одночасна блокада метаболічних шляхів як IL-17, так і GM-CSF, забезпечує високоефективне пригнічення набряку суглобів та кращий захист для хряща від його руйнування порівняно з блокадою одного окремого метаболічного шляху. Наведена тут інформація є переконливим доказом того, що лікування за допомогою анти-GM-CSF у комбінації з анти-IL-17 має високоефективну терапевтичну дію не тільки при РА, але також і для інших аутоімунних та запалювальних захворювань, які були визначені вище у цьому документі.

Список последовательностей

<110> Мікромет АГ
 <120> Інгібітори GM-CSF та IL-17 для терапії
 <130> MIC-033 PCT
 <160> 60
 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR-H3 7A-701

<400> 1

| | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Gly | Leu | Ile | Ala | Asn | His | Met | Thr | Pro |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 |

<210> 2
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR-H3 7B1-502

<400> 2

| | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Thr | Leu | Ile | Ser | Val | Tyr | Phe | Asp | Tyr |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 |

<210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR-H3 L38-A1

<400> 3

| | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Gly | Leu | Ile | Phe | Asp | Tyr | Trp | Leu | Asp |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 |

<210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

```

<220>
<223> CDR-H3 L38-A12

<400> 4

Ser Gly Leu Ile Ile Asp Ala Leu Ser Pro
1          5          10

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR-H3 L38-G7

<400> 5

Thr Ser Leu Met Ser Ile Tyr Phe Asp Tyr
1          5          10

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR-H3 L39-D11

<400> 6

Ser Gly Leu Leu Phe Leu Tyr Phe Asp Tyr
1          5          10

<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR-H3 E1-37-E7

<400> 7

Ser Gly Leu Ile Asn Leu Gly Met His Pro
1          5          10

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR-H3 M1_3-82

<400> 8

```

Ser Gly Leu Ile Phe Asp Ala Leu Arg Asp
1 5 10

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR-H3 Ln4p-23

<400> 9

Ser Gly Leu Ile Phe Asp Lys Leu Thr Ser
1 5 10

<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR-H3 Ln4p-28

<400> 10

Ser Gly Leu Ile Asn Leu His Phe Asp Thr
1 5 10

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR-H3 Ln4p-50

<400> 11

Ser Thr His Phe Ser Ala Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213>

<220>
<223> CDR-H3 Ln4p-65

<400> 12

Ser Gly Leu Ile Met Asp Lys Leu Asp Asn
1 5 10

<210> 13

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR-H3 Ln4p-90

<400> 13

Ser Gly Leu Ile Ile Asp Asn Leu Asn Pro
 1 5 10

<210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR-H1 7B1-502

<400> 14

Asp Tyr Leu Leu His
 1 5

<210> 15
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR-H2 7B1-502

<400> 15

Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CDR-L1 5-306

<400> 16

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Arg Asn Ile Leu Asn
 1 5 10

<210> 17
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR-L2 5-306

<400> 17

Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CDR-L3 5-306

<400> 18

Gln Gln Ser Tyr Ser Met Pro Arg Thr

1 5

<210> 19

<211> 107

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> VL 5-306* L-version

<400> 19

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ala Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Arg Asn Ile

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Gln Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Asn 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 Asn Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Met Pro Arg

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

```

<210> 20
<211> 119
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> VH з CDR-H3 = 7A - 701

<400> 20

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

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

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

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50          55          60

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

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

Thr Arg Ser Gly Leu Ile Ala Asn His Met Thr Pro Trp Gly Gln Gly
          100          105          110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
          115

```

```

<210> 21
<211> 119
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> VH з CDR-H3 = 7B1 - 502*

<400> 21

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 Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
          20          25          30

```


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

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 22
<211> 119
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> VH з CDR-H3 = 3077*

<400> 22

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 Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 23
<211> 119
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> VH з CDR-H3 = L38-A1

<400> 23

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

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

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

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 24
<211> 119
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> VH з CDR-H3 = L38-A12

<400> 24

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

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

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

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Gly Leu Ile Ile Asp Ala Leu Ser Pro Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 25
<211> 119
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> VH з CDR-H3 = L38-G7

<400> 25

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

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

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

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Thr Arg Thr Ser Leu Met Ser Ile Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 26
<211> 119
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> VH з CDR-H3 = L39-D11

<400> 26

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

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

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

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 27
<211> 119
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> VH з CDR-H3 = E1-37-E7

<400> 27

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

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

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

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Gly Leu Ile Asn Leu Gly Met His Pro Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 28
<211> 119
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> VH з CDR-H3 = M1_3-82

<400> 28

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

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

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

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Gly Leu Ile Phe Asp Ala Leu Arg Asp Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 29
<211> 119
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> VH з CDR-H3 = Ln4p-23
<400> 29

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

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

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

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Gly Leu Ile Phe Asp Lys Leu Thr Ser Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 30
<211> 119
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> VH з CDR-H3 = Ln4p-28

<400> 30

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

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

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

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Gly Leu Ile Asn Leu His Phe Asp Thr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 31

<211> 119

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> VH з CDR-H3 = Ln4p-50

<400> 31

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

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

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

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 32

<211> 119

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> VH з CDR-H3 = Ln4p-65

<400> 32

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

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

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

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Gly Leu Ile Met Asp Lys Leu Asp Asn Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 33

<211> 119
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> VH з CDR-H3 = Ln4p-90

<400> 33

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

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

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

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Gly Leu Ile Ile Asp Asn Leu Asn Pro Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 34
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Легкий ланцюг 5-306* L-версія

<400> 34

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Asn 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 Asn Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Met Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 35
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Важкий ланцюг з CDR-H3 = 7B1-502*
 <400> 35

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 Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr

| 20 | | | | | | | | | | 25 | | | | | 30 | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
| Leu | Leu | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Val | | | | |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | | | | |
| Gly | Trp | Leu | Asn | Pro | Tyr | Ser | Gly | Asp | Thr | Asn | Tyr | Ala | Gln | Lys | Phe | | | | |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | | | | |
| Gln | Gly | Arg | Val | Thr | Met | Thr | Arg | Asp | Thr | Ser | Ile | Ser | Thr | Ala | Tyr | | | | |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | | | | |
| Met | Glu | Leu | Ser | Arg | Leu | Arg | Ser | Asp | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | | | | |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | | | | |
| Thr | Arg | Thr | Thr | Leu | Ile | Ser | Val | Tyr | Phe | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | | | | |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | | | | |
| Thr | Met | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | | | | |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | | | | |
| Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | | | | |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | | | | |
| Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | | | | |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | | | | |
| Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | | | | |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | | | | |
| Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | | | | |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | | | | |
| Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | | | | |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | | | | |
| Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | | | | |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | | | | |
| Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | | | | |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 | | | | |
| Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | | | | |
| | | | 245 | | | | | | 250 | | | | | 255 | | | | | |
| Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | | | | |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | | 270 | | | | | |

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

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

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 36

<211> 449

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Важкий ланцюг з CDR-H3 =7A-701*

<400> 36

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 | Phe | Gly | Tyr | Pro | Phe | Thr | Asp | Tyr | | | | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | | 30 | | | | | |
| Leu | Leu | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Val | | | | |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | | | | |
| Gly | Trp | Leu | Asn | Pro | Tyr | Ser | Gly | Asp | Thr | Asn | Tyr | Ala | Gln | Lys | Phe | | | | |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | | | | |
| Gln | Gly | Arg | Val | Thr | Met | Thr | Arg | Asp | Thr | Ser | Ile | Ser | Thr | Ala | Tyr | | | | |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | | | | |
| Met | Glu | Leu | Ser | Arg | Leu | Arg | Ser | Asp | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | | | | |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | | | | |
| Thr | Arg | Ser | Gly | Leu | Ile | Ala | Asn | His | Met | Thr | Pro | Trp | Gly | Gln | Gly | | | | |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | | | | |
| Thr | Met | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | | | | |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | | | | |
| Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | | | | |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | | | | |
| Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | | | | |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | | | | |
| Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | | | | |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | | | | |
| Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | | | | |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | | | | |
| Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | | | | |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | | | | |
| Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | | | | |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | | | | |
| Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | | | | |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 | | | | |
| Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | | | | |
| | | | 245 | | | | | | 250 | | | | | 255 | | | | | |

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

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

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 37
<211> 449
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Важкий ланцюг з CDR-H3 = L38-A1*

<400> 37

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| 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 | Phe | Gly | Tyr | Pro | Phe | Thr | Asp | Tyr | |
| | | 20 | | | | | 25 | | | | | | 30 | | | |
| Leu | Leu | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Val | |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |
| Gly | Trp | Leu | Asn | Pro | Tyr | Ser | Gly | Asp | Thr | Asn | Tyr | Ala | Gln | Lys | Phe | |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | |
| Gln | Gly | Arg | Val | Thr | Met | Thr | Arg | Asp | Thr | Ser | Ile | Ser | Thr | Ala | Tyr | |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | |
| Met | Glu | Leu | Ser | Arg | Leu | Arg | Ser | Asp | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | |
| | | | | 85 | | | | 90 | | | | | | 95 | | |
| Ala | Arg | Ser | Gly | Leu | Ile | Phe | Asp | Tyr | Trp | Leu | Asp | Trp | Gly | Gln | Gly | |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | |
| Thr | Met | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | |
| Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | |
| Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | |
| Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | |
| | | | | 165 | | | | 170 | | | | | | 175 | | |
| Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | |
| Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | |
| Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | |
| Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 | |

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

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

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 38
<211> 449
<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Важкий ланцюг з CDR-H3 = L38-A12*

<400> 38

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 Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Gly Leu Ile Ile Asp Ala Leu Ser Pro Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

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

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

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

```

<210> 39
<211> 449
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Важкий ланцюг з CDR-H3 = L38-G7*

<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 Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
20          25          30

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

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50          55          60

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

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

Thr Arg Thr Ser Leu Met Ser Ile Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100         105         110

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130         135         140

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

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165         170         175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180         185         190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195         200         205

```

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

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

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 40

<211> 449

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Важкий ланцюг з CDR-H3 = L39-D11*

<400> 40

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 Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

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

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

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

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 41
<211> 449
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Важкий ланцюг з CDR-H3 = E1-37-E7*

<400> 41

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 Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Gly Leu Ile Asn Leu Gly Met His Pro Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

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

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

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

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 42
<211> 449
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Важкий ланцюг з CDR-H3 = M1_3-82*

<400> 42

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 Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Gly Leu Ile Phe Asp Ala Leu Arg Asp Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

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

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 43
<211> 449
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> ВАЖКИЙ ЛАНЦУГ З CDR-H3 = Ln4p-23*

<400> 43

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 Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Gly Leu Ile Phe Asp Lys Leu Thr Ser Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | 165 | 170 | 175 | |
| Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | 180 | 185 | 190 | |
| Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | 195 | 200 | 205 | |
| Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | 210 | 215 | 220 | |
| Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | 245 | 250 | 255 | |
| Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | 260 | 265 | 270 | |
| Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | 275 | 280 | 285 | |
| Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | 290 | 295 | 300 | |
| Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | 305 | 310 | 315 | 320 |
| Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | 325 | 330 | 335 | |
| Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | 340 | 345 | 350 | |
| Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Asp | Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | 355 | 360 | 365 | |
| Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | 370 | 375 | 380 | |

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 44

<211> 449

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Важкий ланцюг з CDR-H3 = Ln4p-28*

<400> 44

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 Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Gly Leu Ile Asn Leu His Phe Asp Thr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | 130 | 135 | 140 |
| Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | 145 | 150 | 155 |
| Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | 165 | 170 | 175 |
| Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | 180 | 185 | 190 |
| Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | 195 | 200 | 205 |
| Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | 210 | 215 | 220 |
| Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | 225 | 230 | 235 |
| Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | 245 | 250 | 255 |
| Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | 260 | 265 | 270 |
| Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | 275 | 280 | 285 |
| Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | 290 | 295 | 300 |
| Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | 305 | 310 | 315 |
| Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | 325 | 330 | 335 |
| Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | 340 | 345 | 350 |
| Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Asp | Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | 355 | 360 | 365 |

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

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 45
<211> 449
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Важкий ланцюг з CDR-H3 = Ln4p-50*

<400> 45

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 Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

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

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

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

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 46
<211> 449
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Важкий ланцюг з CDR-H3 = Ln4p-65*

<400> 46

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 Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Gly Leu Ile Met Asp Lys Leu Asp Asn Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

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

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

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

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 47

<211> 449

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Важкий ланцюг з CDR-H3 = Ln4p-90*

<400> 47

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 Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Gly Leu Ile Ile Asp Asn Leu Asn Pro Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

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

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

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

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 48
<211> 449
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Важкий ланцюг з CDR-H3 = 3077*

<400> 48

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 Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Gly | Arg | Val | Thr | Met | Thr | Arg | Asp | Thr | Ser | Ile | Ser | Thr | Ala | Tyr | 65 | 70 | 75 | 80 |
| Met | Glu | Leu | Ser | Arg | Leu | Arg | Ser | Asp | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | 85 | 90 | 95 | |
| Thr | Arg | Ser | Gly | Leu | Ile | Ala | Val | Tyr | Phe | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | 100 | 105 | 110 | |
| Thr | Met | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | 115 | 120 | 125 | |
| Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | 130 | 135 | 140 | |
| Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | 165 | 170 | 175 | |
| Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | 180 | 185 | 190 | |
| Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | 195 | 200 | 205 | |
| Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | 210 | 215 | 220 | |
| Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | 245 | 250 | 255 | |
| Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | 260 | 265 | 270 | |
| Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | 275 | 280 | 285 | |
| Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | 290 | 295 | 300 | |

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

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

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 49
<211> 127
<212> PRT
<213> ЛЮДИНИ GM-CSF

<400> 49

Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His Val
1 5 10 15

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

Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe Asp
35 40 45

Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys Gln

```

50              55              60

Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met
65              70              75              80

Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser Cys
85              90              95

Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp
100             105             110

Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
115             120             125

<210> 50
<211> 127
<212> PRT
<213> MAKAMU GM-CSF

<400> 50

Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Gly Thr Gln Pro Trp Glu His Val
1              5              10              15

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

Ala Ala Glu Met Asn Lys Thr Val Glu Val Val Ser Glu Met Phe Asp
35             40             45

Leu Gln Glu Pro Ser Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys Gln
50             55             60

Gly Leu Gln Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met
65              70              75              80

Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser Cys
85              90              95

Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Gln Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp
100             105             110

Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
115             120             125

<210> 51
<211> 127
<212> PRT

```


<213> пiдoну GM-CSF

<400> 51

Ala Pro Ser Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His Val
1 5 10 15

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

Ala Ala Glu Ile Asn Glu Thr Val Glu Val Val Ser Glu Met Phe Asp
35 40 45

Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys Gln
50 55 60

Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met
65 70 75 80

Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser Cys
85 90 95

Ala Thr Gln Ile Ile Ile Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp
100 105 110

Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Gly
115 120 125

<210> 52

<211> 119

<212> PRT

<213> Штучна послiдовнiсть

<220>

<223> VH з CDR-H3 7B1-502

<400> 52

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

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

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

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 53
<211> 119
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> VH з CDR-H3 3077

<400> 53

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

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

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

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 54
<211> 107

<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> VL 5-306

<400> 54

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Asn 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 Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 55
<211> 107
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> VL 5-306* V-версія

<400> 55

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Asn 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 Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 56
<211> 10
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CDR-H3 3077

<400> 56

Ser Gly Leu Ile Ala Val Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 57
<211> 127
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57

Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His Val
1 5 10 15

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

Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe Asp
35 40 45

Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys Gln
50 55 60

Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met
65 70 75 80

Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser Cys
85 90 95

Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp
100 105 110

Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
115 120 125

<210> 58
<211> 127
<212> PRT
<213> Hylobates sp.

<400> 58

Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His Val
1 5 10 15

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

Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe Asp
35 40 45

Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys Gln
50 55 60

Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met
65 70 75 80

Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser Cys
85 90 95

Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp
100 105 110

Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
115 120 125

<210> 59
<211> 127
<212> PRT
<213> Macaca mulatta

<400> 59

Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Gly Thr Gln Pro Trp Glu His Val
1 5 10 15

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

Ala Ala Glu Met Asn Lys Thr Val Glu Val Val Ser Glu Met Phe Asp
35 40 45

Leu Gln Glu Pro Ser Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys Gln
50 55 60

Gly Leu Gln Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met
65 70 75 80

Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser Cys
85 90 95

Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Gln Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp
100 105 110

Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
115 120 125

<210> 60
<211> 127
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<400> 60

Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Gly Thr Gln Pro Trp Glu His Val
1 5 10 15

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

Ala Ala Glu Met Asn Lys Thr Val Glu Val Val Ser Glu Met Phe Asp
35 40 45

Leu Gln Glu Pro Ser Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys Gln
50 55 60

Gly Leu Gln Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met
65 70 75 80

Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser Cys
85 90 95

Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Gln Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp
100 105 110

Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
115 120 125

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Спосіб лікування запального захворювання у пацієнта, який страждає на запальне захворювання, у якому зазначеному пацієнту вводять:
(а) сполуку, яка нейтралізує гранулоцитарномакрофагальний колонієстимулюючий фактор (далі GM-CSF), а також
(б) сполуку, яка нейтралізує інтерлейкін IL-17,

причому сполуку, яка нейтралізує GM-CSF вибирають з групи, що включає поліпептид і малу молекулу, і сполуку, яка нейтралізує IL-17, вибирають з групи, що включає поліпептид і малу молекулу.

2. Спосіб за п. 1, який характеризується тим, що

- 5 (a) сполуку, яка нейтралізує GM-CSF, вводять перед сполукою, яка нейтралізує IL-17;
- (b) сполуку, яка нейтралізує GM-CSF, вводять після сполуки, яка нейтралізує IL-17; або
- (c) сполуку, яка нейтралізує GM-CSF, та сполуку, яка нейтралізує IL-17, вводять одночасно.

3. Спосіб за п. 1, який характеризується тим, що пацієнт є людиною або приматом.

- 10 4. Спосіб за п. 1, який характеризується тим, що сполука, яка нейтралізує GM-CSF, є поліпептид і цей поліпептид є антитілом або функціональним фрагментом антитіла, що зв'язується з GM-CSF або рецептором GM-CSF.

5. Спосіб за п. 4, який характеризується тим, що антитіло є моноклональним антитілом людського організму або функціональним фрагментом останнього.

- 15 6. Спосіб за п. 4, який характеризується тим, що антитіло або функціональний фрагмент останнього зв'язується з епітопом GM-CSF, бажано з епітопом, до складу якого входять амінокислоти 23-27 (RRLN) та/або амінокислоти 65-77 (GLR/QGSLTKLKGPL).

7. Спосіб за п. 6, який характеризується тим, що зазначений епітоп у свою чергу включає:

- (a) амінокислоти 28-31 (LSRD);
- (б) амінокислоти 32-33 (TA) та/або
- 20 (c) амінокислоти 21-22 (EA).

8. Спосіб за п. 5, який характеризується тим, що зазначене моноклональне антитіло людського організму або функціональний фрагмент останнього включає варіативний регіон важкого ланцюга CDR3, який включає амінокислотну послідовність, що обирається з групи, яка належить до зазначених під такими послідовними номерами: 1-13 та 56.

- 25 9. Спосіб за п. 8, який характеризується тим, що будь-яка із зазначених послідовностей варіативного регіону важкого ланцюга CDR3 існує разом у варіативному регіоні важкого ланцюга із CDR1 варіативного регіону важкого ланцюга, який включає амінокислотну послідовність, наведену під послідовним номером 14, та CDR2 варіативного регіону важкого ланцюга, наведену під послідовним номером 15.

- 30 10. Спосіб за п. 8, який характеризується тим, що зазначене моноклональне антитіло людського організму або функціональний фрагмент останнього включає варіативний регіон легкого ланцюга CDR1, який включає амінокислотну послідовність, наведену під послідовним номером 16; CDR2, який включає амінокислотну послідовність, наведену під послідовним номером 17, а також CDR3, який включає амінокислотну послідовність, наведену під послідовним номером 18.

- 35 11. Спосіб за п. 10, який характеризується тим, що зазначене моноклональне антитіло людського організму або функціональний фрагмент останнього включає варіативний регіон легкого ланцюга з послідовністю амінокислот, зазначених під будь-якими з послідовних номерів 19, 54 та 55.

- 40 12. Спосіб за п. 8, який характеризується тим, що зазначене моноклональне антитіло людського організму або функціональний фрагмент останнього включає варіативний регіон важкого ланцюга з послідовністю амінокислот, зазначених під будь-якими з послідовних номерів 20-33, 52 або 53.

- 45 13. Спосіб за п. 8, який характеризується тим, що зазначене моноклональне антитіло людського організму або функціональний фрагмент останнього включає CDR1 варіативного регіону легкого ланцюга, який включає послідовність амінокислот, зазначених під послідовним номером 16, CDR2, який включає послідовність амінокислот, зазначених під послідовним номером 17, CDR3, який включає послідовність амінокислот, зазначених під послідовним номером 18, та CDR1 варіативного регіону важкого ланцюга, що включає послідовність амінокислот, зазначених під послідовним номером 14, область CDR2, яка має послідовність амінокислот, наведену під послідовним номером 15, та CDR3, яка має послідовність амінокислот, наведену під будь-якими з послідовних номерів 1-13 або 56.

- 50 14. Спосіб за п. 8, який характеризується тим, що зазначене моноклональне антитіло людського організму або функціональний фрагмент останнього включає амінокислотну послідовність легкого ланцюга, наведену під послідовним номером 34, та амінокислотну послідовність важкого ланцюга, наведену під будь-якими з послідовних номерів 35-48.

- 55 15. Спосіб за п. 8, який характеризується тим, що зазначене моноклональне антитіло людського організму або функціональний фрагмент останнього включає амінокислотну послідовність, що має гомологію на рівні не менше 70 % до відповідної послідовності амінокислот, наведеної під будь-якими з послідовних номерів 1-48 та 52-56.

16. Спосіб за п. 1, який характеризується тим, що сполука, яка нейтралізує IL-17, є поліпептид і цей поліпептид є антитілом або функціональним фрагментом останнього, що зв'язується з IL-17 або рецептором IL-17.

5 17. Спосіб за п. 16, який характеризується тим, що антитіло або функціональний фрагмент останнього є моноклональним антитілом людського організму та функціональним фрагментом останнього відповідно.

10 18. Спосіб за п. 1, який характеризується тим, що зазначене запальне захворювання вибирають з групи, до складу якої входять ревматоїдний артрит (РА) (включаючи РА, стійкий до лікування за допомогою нейтралізатора фактору некрозу пухлини альфа), астма, розсіяний склероз (РС), хронічне обструктивне захворювання легенів (ХОЗЛ), гострий респіраторний дистрес-синдром (ГРДС), ідіопатичний фіброз легенів (ІФЛ), запалювальна хвороба кишечника (ЗХК), захворювання Крона, увеїт, дегенерація жовтої плями, коліт, псоріаз, уоллерівське переродження, антифосфоліпідний синдром (АФС), гострий коронарний синдром, рестеноз, атеросклероз, рецидивуюча поліхондрія (РП), гострий або хронічний гепатит, ортопедичні імпланти, які не приживаються, гломерулонефрит, вовчак та інші аутоімунні розлади.

15 19. Фармацевтична композиція, яка характеризується тим, що включає:

(a) сполуку, що нейтралізує GM-CSF; а також

(b) сполуку, що нейтралізує IL-17,

20 причому сполука, яка нейтралізує GM-CSF вибирається з групи, що включає поліпептид і малу молекулу, і сполука, яка нейтралізує IL-17, вибирається з групи, що включає поліпептид і малу молекулу.

20. Фармацевтична композиція за п. 19, яка характеризується тим, що сполука, яка нейтралізує GM-CSF є поліпептид і цей є поліпептид є антитілом або функціональним фрагментом антитіла, який зв'язується з GM-CSF або GM-CSF-рецептором.

25 21. Фармацевтична композиція за п. 20, яка характеризується тим, що антитіло є моноклональним антитілом людського організму або функціональним фрагментом антитіла.

22. Фармацевтична композиція за п. 20 або 21, яка характеризується тим, що моноклональне антитіло або функціональний фрагмент останнього зв'язується з епітопом GM-CSF, при цьому краще, якщо епітоп включає амінокислоти 23-27 (RRLN) та/або амінокислоти 65-77

30 (GLR/QGSLTKLKGPL).

23. Фармацевтична композиція за п. 22, яка характеризується тим, що зазначений епітоп, у свою чергу, містить:

(a) амінокислоти 28-31 (LSRD);

(b) амінокислоти 32-33 (TA) та/або

35 (c) амінокислоти 21-22 (EA).

24. Фармацевтична композиція за п. 20, яка характеризується тим, що зазначене моноклональне антитіло або функціональний фрагмент останнього включає варіативний регіон важкого ланцюга CDR3, який включає амінокислотну послідовність, що обирається з групи, яка належить до зазначених під такими послідовними номерами: 1-13 та 56.

40 25. Фармацевтична композиція за п. 24, яка характеризується тим, що будь-яка із зазначених послідовностей варіативного регіону важкого ланцюга CDR3 існує разом у варіативному регіоні важкого ланцюга із CDR1 варіативного регіону важкого ланцюга, який включає амінокислотну послідовність, наведену під послідовним номером 14, та CDR2 варіативного регіону важкого ланцюга, наведену під послідовним номером 15.

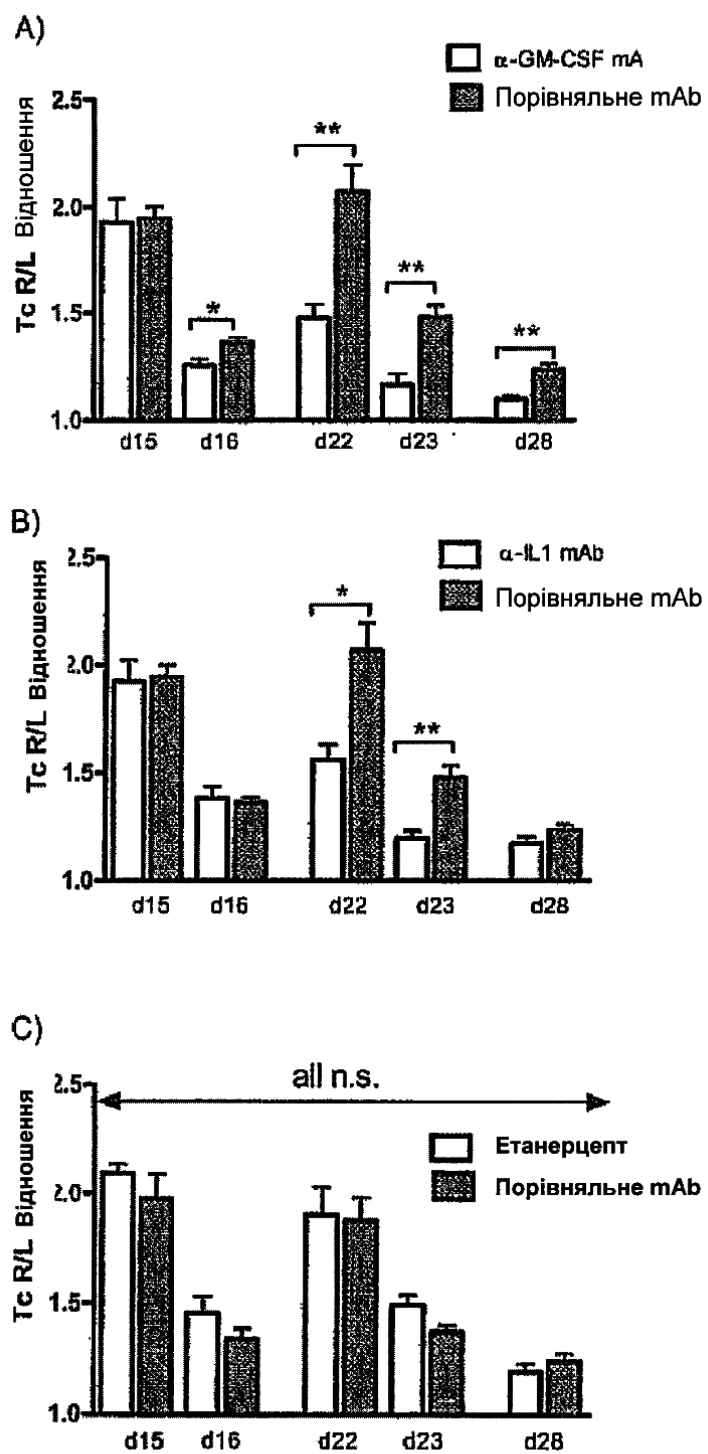
45 26. Фармацевтична композиція за п. 24, яка характеризується тим, що зазначене моноклональне антитіло людського організму або функціональний фрагмент останнього включає варіативний регіон легкого ланцюга CDR1, який включає амінокислотну послідовність, наведену під послідовним номером 16; CDR2, який включає амінокислотну послідовність, наведену під послідовним номером 17, а також CDR3, який включає амінокислотну послідовність, наведену під послідовним номером 18.

27. Фармацевтична композиція за п. 26, яка характеризується тим, що зазначене моноклональне антитіло людського організму або функціональний фрагмент останнього включає варіативний регіон легкого ланцюга з послідовністю амінокислот, зазначених під будь-якими з послідовних номерів 19, 54 та 55.

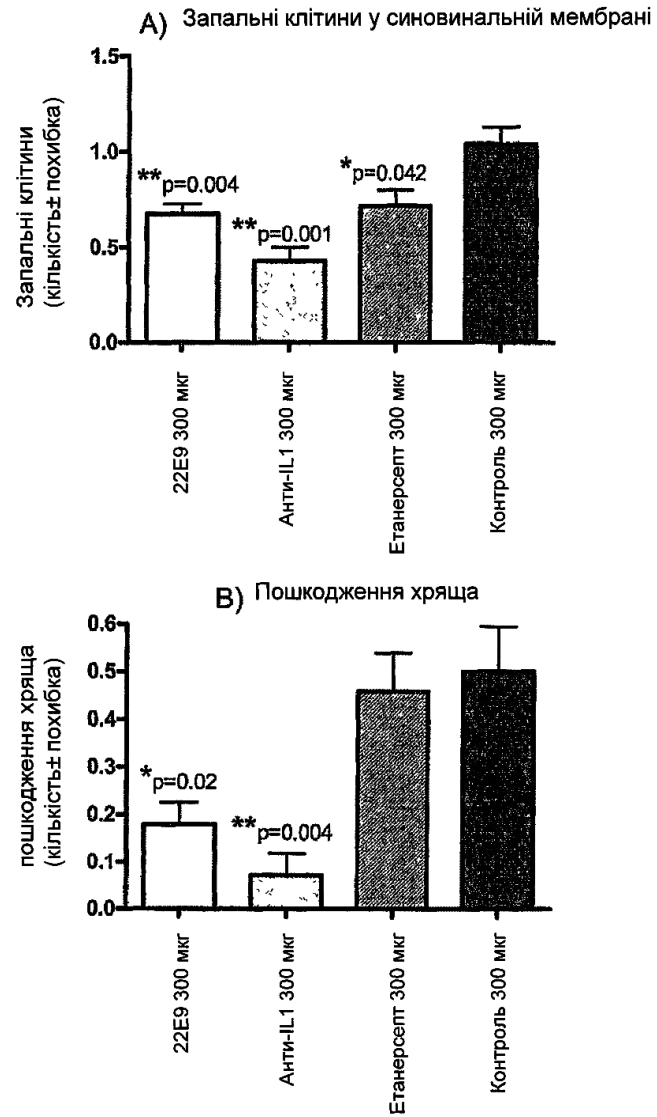
55 28. Фармацевтична композиція за п. 24, яка характеризується тим, що зазначене моноклональне антитіло людського організму або функціональний фрагмент останнього включає варіативний регіон важкого ланцюга з послідовністю амінокислот, зазначених під будь-якими з послідовних номерів 20-33, 52 або 53.

60 29. Фармацевтична композиція за п. 24, яка характеризується тим, що зазначене моноклональне антитіло людського організму або функціональний фрагмент останнього

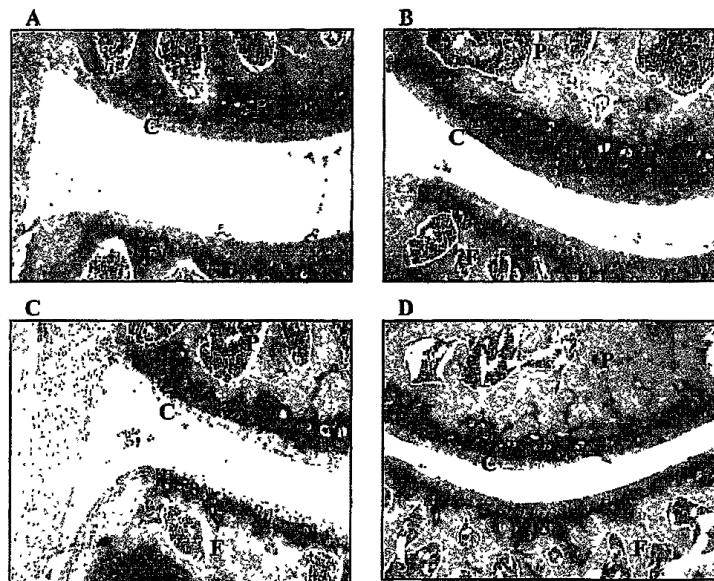
- включає CDR1 варіативного регіону легкого ланцюга, який включає послідовність амінокислот, зазначених під послідовним номером 16, CDR2 який включає послідовність амінокислот, зазначених під послідовним номером 17, CDR3, який включає послідовність амінокислот, зазначених під послідовним номером 18, та CDR1 варіативного регіону важкого ланцюга, що
- 5 включає послідовність амінокислот, зазначених під послідовним номером 14, область CDR2, яка має послідовність амінокислот, наведену під послідовним номером 15, та CDR3, яка має послідовність амінокислот, наведену під будь-якими з послідовних номерів 1-13 або 56.
30. Фармацевтична композиція за п. 24, яка характеризується тим, що зазначене моноклональне антитіло людського організму або функціональний фрагмент останнього
- 10 включає амінокислотну послідовність легкого ланцюга, наведену під послідовним номером 34, та амінокислотну послідовність важкого ланцюга, наведену під будь-якими з послідовних номерів 35-48.
31. Фармацевтична композиція за п. 24, яка характеризується тим, що зазначене моноклональне антитіло людського організму або функціональний фрагмент останнього
- 15 включає амінокислотну послідовність, що має гомологію на рівні не менше 70 % до відповідної послідовності амінокислот, наведеної під будь-якими з послідовних номерів 1-48 та 52-56.
32. Фармацевтична композиція за п. 19, яка характеризується тим, що сполука, яка нейтралізує IL-17, є поліпептид і цей поліпептид є антитілом або функціональним фрагментом антитіла, що зв'язується з IL-17 або IL-17-рецептором.
- 20 33. Фармацевтична композиція за п. 32, яка характеризується тим, що антитіло є антитілом або функціональним фрагментом антитіла.
34. Фармацевтична композиція за п. 19, яка характеризується тим, що сполука являє собою сполуку для лікування запальних захворювань.
35. Фармацевтична композиція за п. 34, яка характеризується тим, що зазначене запальне
- 25 захворювання, вибирається з групи, до складу якої входять ревматоїдний артрит (РА) (включаючи РА, стійкий до лікування за допомогою нейтралізатора фактору некрозу пухлини альфа), астма, розсіяний склероз (РС), хронічне обструктивне захворювання легень (ХДЗЛ), гострий респіраторний дистрес синдром (ГРДС), ідіопатичний фіброз легень (ІФЛ), запальна хвороба кишечника (ЗХК), захворювання Крона, увеїт, дегенерація жовтої плями,
- 30 коліт, псоріаз, уоллерівське переродження, антифосфоліпідний синдром (АФС), гострий коронарний синдром, рестеноз, атеросклероз, рецидивуюча поліхондрія (РП), гострий або хронічний гепатит, ортопедичні імплантати, які не приживаються, гломерулонефрит, вовчак та інші аутоімунні розлади.



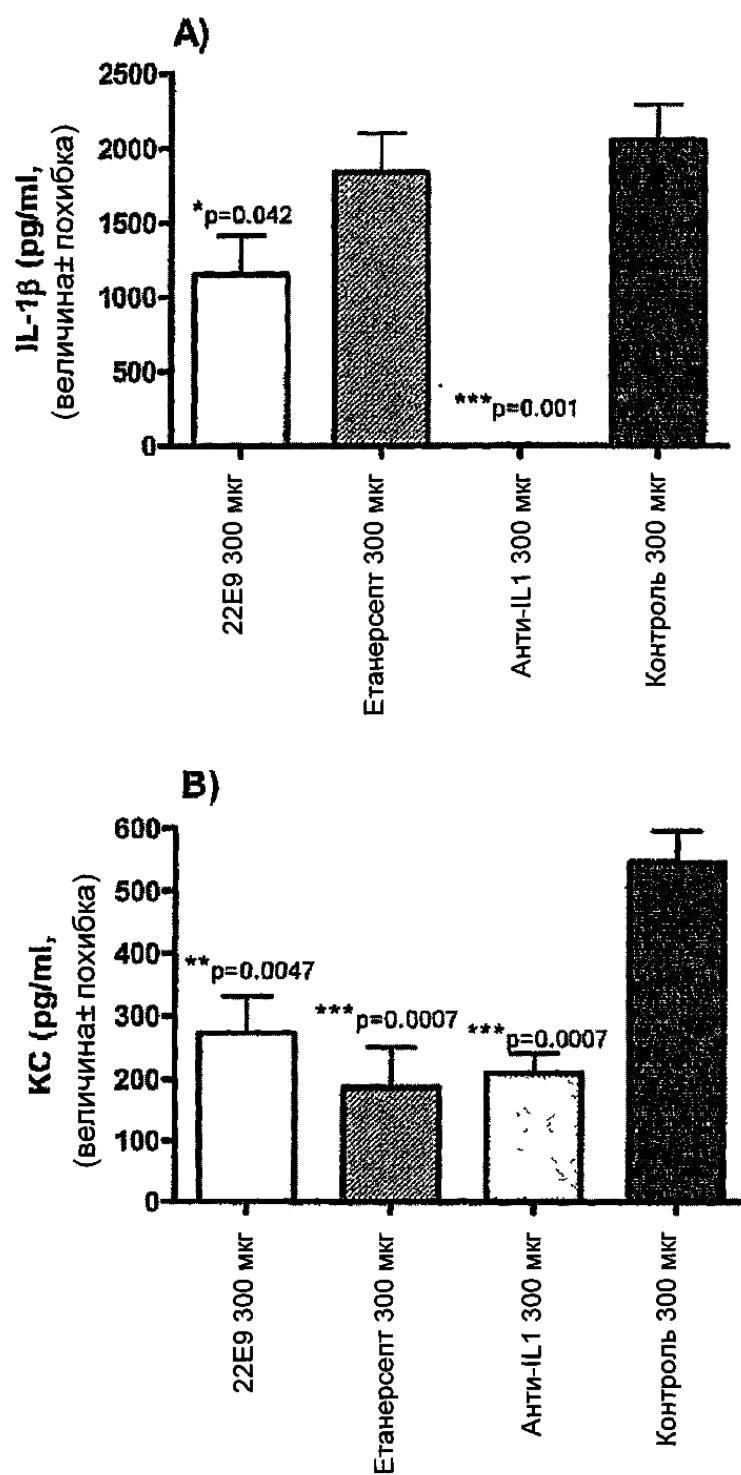
Фиг. 1



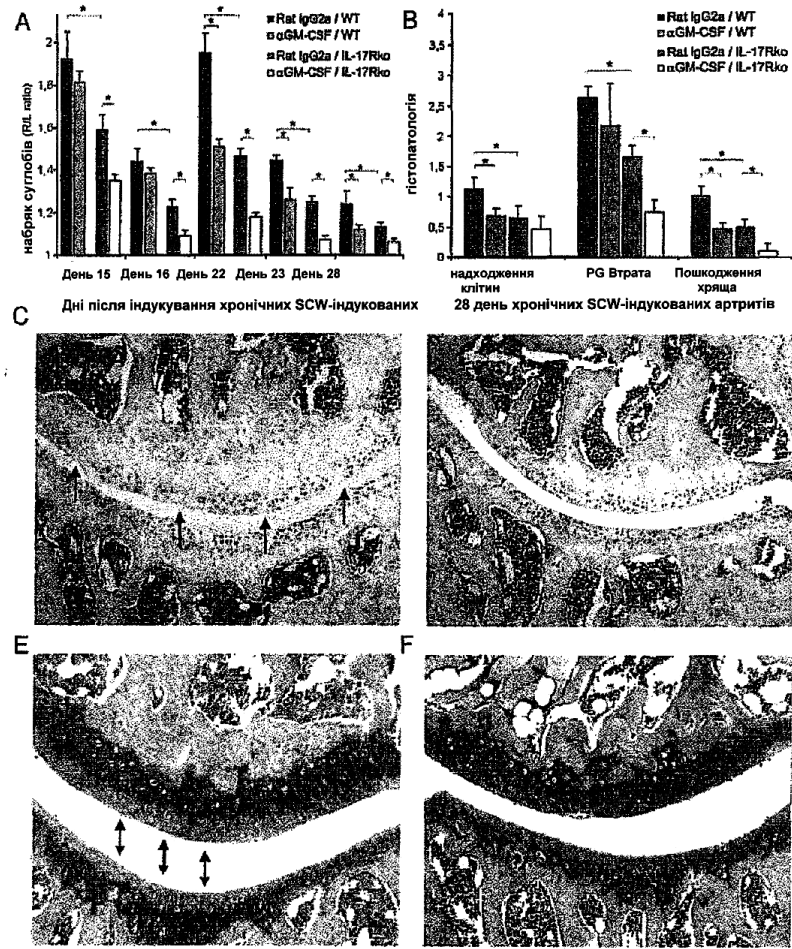
Фіг. 2



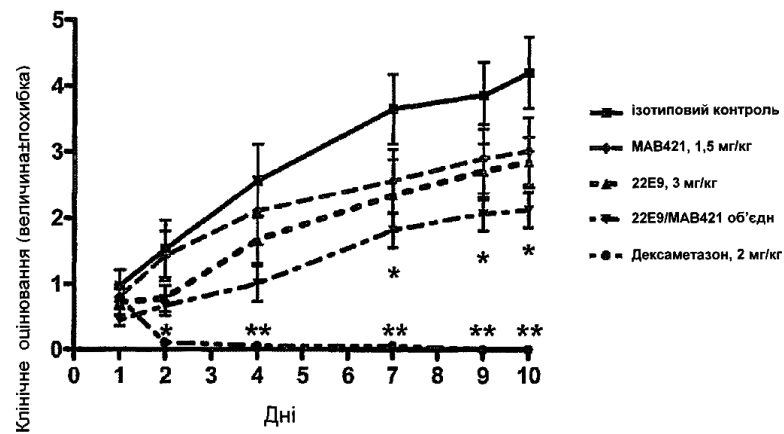
Фіг. 3



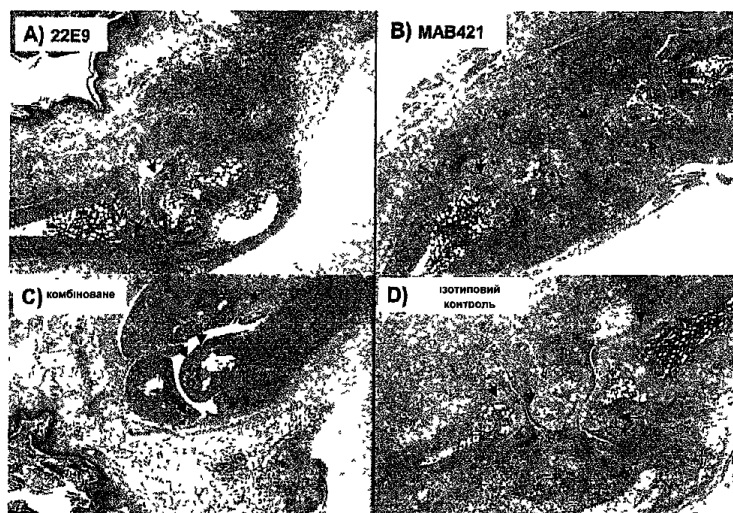
Фиг. 4



Фіг. 5



Фіг. 6



Фіг. 7

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

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

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