



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118646** (13) **C2**
(51) МПК (2019.01)

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61P 37/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2013 05880	(72) Винахідник(и): Альмагро Хуан Карлос (US), Дабелл Уілльям (US), Франссон Йохан (US), Пардінас Хосе (US)
(22) Дата подання заявки: 10.10.2011	(73) Власник(и): ЯНССЕН БАЙОТЕК, ІНК., 800/850 Ridgeview Drive, Horsham, PA 19044, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.02.2019	(74) Представник: Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/392,683	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: US 20070286861 A1, 13.12.2007 US 20030044772 A1, 06.03.2003 US 20080292620 A1, 17.11.2008 US 20040208887 A1, 21.10.2004 Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation / Peter C. Heinrich, Iris Behrmann, Serge Haan, Helke M. Hermanns et al. // Biochemical joirnal. - 2003. - Vol. 374. - No. 1. - P. 1-20 US 20030079253 A, 24.04.2003 US 20020086978 A1, 04.07.2002 US 2002018750 A1, 14.02. 2002 US 20050208558 A1, 22.09.2005 US 20080090999 A1, 17.04.2008 US 20090232795 A1, 17.09.2009 US 20070124833 A1, 31.05.2007 US 20090155164 A1, 18.06.2009 WO 9948523 A2, 30.09.1999 WO 2006084092 A2, 10.08.2006
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 13.10.2010	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US	
(41) Публікація відомостей про заявку: 10.09.2013, Бюл.№ 17	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.02.2019, Бюл.№ 4	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: РСТ/US2011/055606, 10.10.2011	

(54) ВИДІЛЕНЕ АНТИТІЛО, ЯКЕ СПЕЦИФІЧНО ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ З ОНКОСТАТИНОМ М (ОМ) ЛЮДИНИ

(57) Реферат:

Винахід стосується виділеного антитіла, яке специфічно зв'язується з онкостатином М (ОМ) людини, його антигензв'язувального фрагмента, виділеного поліпептиду, що кодує важкий та легкий ланцюг антитіла, стабільно трансформованої або трансфікованої рекомбінантної клітини-хазяїна, способу одержання антитіла, набору, що містить стерильний препарат виділеного антитіла та фармацевтичної композиції. Винахід також стосується способу лікування хворої людини, що страждає на захворювання або розлад, пов'язаний з моделюючою активністю або взаємодією людського ОМ з людським білком gr130.

UA 118646 C2

ГАЛУЗЬ ЗАСТОСУВАННЯ ВІНАХОДУ

Даний винахід стосується людського антитіла, здатного нейтралізувати біологічну активність, викликану онкостатином М, шляхом зв'язування з мембранними рецепторами, і способів його використання.

5 ПЕРЕДУМОВИ СТВОРЕННЯ ВІНАХОДУ

Онкостатин М (ОМ) є мультифункціональним членом сімейства цитокінів ІЛ-6 з масою 28 кДа, які секретуються моноцитами, макрофагами, нейтрофілами і активованими Т-лімфоцитами (Tanaka & Miyajima, Rev Physiol Biochem Pharmacol 149:39-53, 2003). Протеолітичне розщеплення в області карбоксильного кінця секретованого ОМ приводить до формування повністю активної форми ОМ, яка складає 209 амінокислотних залишків в довжину і містить дві N-зв'язаних ділянки глікозилювання. ОМ належить до сімейства цитокінів ІЛ-6, яке включає ІЛ-6, ІЛ-11, фактор, інгібуючий лейкемію (LIF), кардіотрофін-1, циліарний нейтротрофічний фактор (CNTF) і кардіотрофіноподібний цитокін (CLC), які містять загальну рецепторну субодиницю - білок gp130. У людей ОМ виявляє сигнальну активність за допомогою 15 рецепторних гетеродимерів, що містять gp130 і субодиницю LIFR α або gp130 і субодиницю OSMR β . На відміну від інших цитокінів сімейства ІЛ-6, ОМ безпосередньо зв'язується з gp130 за відсутності якого-небудь додаткового мембранозв'язаного корецептора (Gearing et al. Science 255:1434-1437, 1992). Після того, як ОМ зв'язався з gp130, в утворенні високоафінного сигнального комплексу беруть участь OSMR β або LIFR α (Mosley et al. J. Biol. Chem. 271:32635-32643, 1996). Активація іншого рецептора приводить до передачі сигналу по шляху JAK/STAT (Auguste et al. J. Biol. Chem. 272:15760-15764, 1997).

ОМ головним чином виробляється клітинами, що виробляються імунною системою, і, в зв'язку з широкою розповсюдженістю сигнальних рецепторів, він пов'язаний з різноманітними виявами біологічної активності, що включає регуляцію клітинного росту, розвиток нервової системи і регуляцію складу позаклітинного матриксу.

Як впливає з назви, онкостатин М пов'язаний з процесами онкогенезу. Крім того, ОМ також бере участь в ранніх стадіях каскадів реакцій, які відбуваються при запальних і гіпертрофічних процесах, що приводять до таких шкідливих станів, як легеневого фіброз. Таким чином, існує необхідність в одержанні людських антитіл, специфічних до людського ОМ, які були б здатні до блокування сигнальних рецепторів (сигнальних рецепторів gp130), і антитіла, які блокують ці сигнали, можуть здійснювати використовуваний в клініці цитотоксичний або імунomodulatory вплив на клітини, які експресують gp130.

ВИКЛАД СУТІ ВІНАХОДУ

Даний винахід забезпечує ОМ-зв'язувальні моноклональні антитіла, здатні блокувати активність, пов'язану з одним або більше видами біологічної активності, пов'язаної з дією ОМ і ОМ-зв'язувального рецептора на клітини, тканини або органи в організмі пацієнта. Представлені амінокислотні послідовності зразкових ОМ-зв'язувальних моноклональних антитіл, які закодовані за допомогою нуклеїнових кислот для їх експресії в клітинах організму. Одне або більше моноклональних ОМ-антитіл даного винаходу розпізнають епітоп на поверхні 40 ОМ, з'єднання якого з антитілом винаходу запобігає його взаємодії з рецепторними компонентами сигнального комплексу gp130 і LIFR α або gp130 і OSMR β , тим самим запобігаючи лігуванню ліганду, викликаному сигнальною і регулюючою подальші ланки сигнальних каскадів біологічною активністю.

Одним з аспектів винаходу є виділене антитіло, яке взаємодіє з людським ОМ-білком і має антигензв'язувальну активність моноклонального антитіла, що містить антигензв'язувальний домен, який містить амінокислотні послідовності, вказані в SEQ ID NO: 13-18 окремо або в певних положеннях FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3, як вказано в SEQ ID NO: 1-3, CDR3, як представлено в SEQ ID NO: 27-29 і 47; або антигензв'язувальний домен, що містить амінокислотну послідовність, вказану в SEQ ID NO: 23-26 окремо або в певних положеннях, як вказано в SEQ ID NO: 5-8, або їх варіанти, і CDR3, як представлено в SEQ ID NO: 19-22. В конкретному варіанті здійснення людське ОМ-зв'язувальне антитіло містить варіабельний домен, вибраний з SEQ ID NO: 49-55.

У іншому варіанті здійснення винаходу зв'язувальні домени моноклонального антитіла використовуються як непроцесовані структури IgG, що мають константні домени, одержані з константних доменів людського IgG, або їх специфічні варіанти, і використовуються як терапевтичні молекули в фармацевтичних препаратах для запобігання зв'язуванню ОМ з клітинами, експресуючими рецепторні компоненти для ОМ. У іншому варіанті здійснення зв'язувальні домени сконфігуровані як фрагменти антитіла, які використовуються як терапевтичні молекули, здатні запобігати зв'язуванню ОМ з клітинами, експресуючими рецепторні компоненти для ОМ. У одному аспекті винаходу забезпечується фармацевтично

прийнятний склад, система або набір для доставки, а також спосіб лікування станів, пов'язаних з онкостатином М, що містять один або більше доменів для зв'язування ОМ даного винаходу, що не обмежується 13-28, 30-46 і варіантами, які представлені в SEQ ID NO: 29 і 47.

КОРОТКИЙ ОПИС ДЕЯКИХ ВИГЛЯДІВ НА КРЕСЛЕННЯХ

ФІГ. 1 зображує зародкові послідовності генів, використовувані для побудови бібліотек Fab-фрагментів, що виявляються на білку оболонки рІХ, причому кожна з гіперваріабельних ділянок доменів містить мозаїчний FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3 згідно з SEQ ID NO: 1-3 (1 = IGHV1-69, 2 = IGHV3-23 і 3 = IGHV5-51), що супроводжується варіабельною довжиною, мозаїчною ділянкою Н-CDR3 і J-ділянкою (FR4, SEQ ID NO: 4); і кожна з низьковаріабельних ділянок доменів містить мозаїчний FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3 згідно з SEQ ID NO: 5-8 (5 = IGKV1-39 (O12), 6 = IGKV3-11 (L6), 7 - IGKV3-20 (A27) і 8 = IGKV4-1 (B3)), а також CDR3 згідно з SEQ ID NO: 9, що супроводжується J-ділянкою (FR4, SEQ ID NO: 10).

ФІГ. 2А є графіком залежності дози від ефекту рекомбінантного онкостатину людини і яванської макаки, який був одержаний з клітинної лінії CHO, для пригнічення проліферації клітин A375-S2, яке вимірювалося за допомогою включення 5-бромдезоксїуридину і нормалізації до контролю тільки в присутності несучого середовища.

ФІГ. 2В є графіком, що зображує здатність антитіла M71, яке містить варіабельні домени L180 (SEQ ID NO: 53) і H17 (SEQ ID NO: 54), до зменшення супресії проліферації ОМ A375-S2, коли ОМ присутній в концентрації 2 нг/мл.

ФІГ. 3 є стовбчастою діаграмою, що зображує ефект M64, M71, M55 і M69 в концентрації 20 мкг/мл для збільшення поглинання $^{35}\text{SO}_4$, яке є мірою збільшення синтезу протеогліканів, що перевищує свій нормальний рівень за відсутності антитіл і коли антитіла неспецифічного ізоотипу використовувалися як контроль в кокультивуванні людських хондроцитів в гранулах альгінату і людських макрофагах, які здатні секретувати ОМ.

ФІГ. 4А є графіком залежності дози від ефекту людського ОМ, стимулюючого рSTAT3 в клітинах неходжкінської лімфоми, коли знайдена EC50 складає близько 1 нг/мл.

ФІГ. 4В є графіком, що зображує здатність антитіла M71 нейтралізувати сигнал рSTAT3 в присутності 2 нг/мл ОМ.

ФІГ. 5А і В є діаграмами розсіювання, які зображають кількість IP-10 (А) і MCP-1 (В), що виявляються в сироватці окремих мишей після введення ОМ за наявності або відсутності попереднього введення вказаних концентрацій антитіла M71.

ФІГ. 6А і В є графіками, що зображують сироваткові концентрації у яванських макак через деякий час після внутрішньовенного (А) або підшкірного (В) введення 3 мг/кг M71 або Fc-варіанта M71.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Всі публікації, згадувані в даному описі, включаючи патенти і патентні заявки, але не обмежуючись ними, включені шляхом посилань, є частиною цього документа, як якщо вони були викладені безпосередньо в цьому документі.

Скорочення

BSA = бичачий сироватковий альбумін; CDR = гіперваріабельна ділянка; Суно = яванська макака (*Macaca fascicularis*); ДН= діабетична нефропатія; ECD = позаклітинний домен; FR = каркасна ділянка; Н = важкий ланцюг; PA-I3Л = інтерстиціальне захворювання легень при ревматоїдному артриті; L = легкий ланцюг; Ig = імуноглобулін; Mab = моноклональні антитіла; ОМ= онкостатин М; ОА = остеоартрит; PBS = фізіологічний розчин з фосфатним буфером; РА = ревматоїдний артрит; VL = варіабельна ділянка легкого ланцюга; VH = варіабельна ділянка важкого ланцюга.

Визначення

Використовуваний в цьому документі термін "антитіло" включає цілі антитіла, будь-які антигензв'язувальні фрагменти або один з їх ланцюгів. Таким чином, антитіло включає будь-яку білкову або пептидовмісну молекулу, яка містить щонайменше частину молекули імуноглобуліну, що, без обмежень, включає в себе щонайменше одну гіперваріабельну ділянку (CDR) важкого або легкого ланцюга або їх лігандзв'язувальну частину, варіабельну ділянку важкого або легкого ланцюга, константну ділянку важкого або легкого ланцюга, каркасну ділянку (FR) або будь-яку їх частину, або щонайменше одну частину зв'язувального білка, який може бути включений в антитіло даного винаходу. Термін "антитіло" додатково охоплює антитіла, їх розщеплені фрагменти, специфічні частини і варіанти, що включають міметики антитіл або містять частини антитіл, які схожі по структурі і/або функції з антитілом або його специфічним фрагментом або частиною, включаючи одноланцюжкові або однодоменні антитіла і їх фрагменти. Функціональні фрагменти включають антигензв'язувальні фрагменти до визначеної мішені. Приклади зв'язувальних фрагментів охоплені терміном

"антигензв'язувальна частина" антитіла, що включає (i) Fab-фрагмент, моновалентний фрагмент, що містить домени VL, VH, CL і CH; (ii) F(ab')₂-фрагмент, який є двовалентним фрагментом, що містить два Fab-фрагменти, які зв'язані дисульфідним містком в області шарніра; (iii) Fd-фрагмент, що складається з доменів VH і CH; (iv) Fv-фрагмент, що складається з доменів VL і VH одного плеча антитіла, (v) dAb-фрагмент (Ward et al. (1989), *Nature*, 341:544-546), який складається з домену VH; і (vi) виділену гіперваріабельну ділянку (CDR). Більше того, хоч два домени VL і VH Fv-фрагмента кодуються різними генами, вони можуть бути об'єднані способами рекомбінації за допомогою синтетичного лінкера, який дозволяє зробити з них один білковий ланцюг, в якому ділянки VL і VH сполучаються для утворення моновалентних молекул (відомих як одноланцюжкові Fv (scFv); див., наприклад, Bird et al. (1988), *Science*, 242:423-426, і Huston et al. (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5879-5883). Такі одноланцюжкові антитіла також охоплюються терміном "антигензв'язувальна частина" антитіла. Ці фрагменти антитіла одержуються за допомогою стандартних способів, відомих фахівцям в даній галузі техніки, і придатність фрагментів перевіряється таким же чином, як і придатність інтактних антитіл. Навпаки, для аналізу антигензв'язувальної здатності можуть використовуватися бібліотеки конструкцій scFv, після чого за допомогою стандартних способів вони можуть сплайсуватися з іншою ДНК, яка кодує зародкові послідовності генів людини. Одним з прикладів такої бібліотеки є "HuCAL: Комбінаторна бібліотека антитіл людини" (Knappik A. et al. *J. Mol. Biol.* (2000), 296(1):57-86).

Термін "CDR" стосується ділянки, яка визначає комплементарність, або гіперваріабельної ділянки амінокислотних залишків антитіла, що бере участь або відповідає за зв'язування з антигеном. Гіперваріабельні ділянки, або CDR, антитіла людини підтипу IgG містять амінокислотні залишки із залишків 24-34 (L-CDR1), 50-56 (L-CDR2) і 89-97 (L-CDR3) в легкому ланцюзі варіабельного домену і 31-35 (H-CDR1), 50-65 (H-CDR2) і 95-102 (H-CDR3) у важкому ланцюзі варіабельного домену, як описано у Kabat et al. (1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, п'ята редакція Служби суспільної охорони здоров'я, Національні інститути охорони здоров'я, Бетесда, Меріленд), і/або ці залишки з гіперваріабельної петлі (тобто залишки 26-32 (L1), 50-52 (L2) і 91-96 (L3) в легкому ланцюзі варіабельного домену і 26-32 (H1), 53-55 (H2) або поточному позначенні H2 по Чотія 52-57, і 96-101 (H3) у важкому ланцюзі варіабельного домену, як описано у Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987). Чотія і Леск відносять HV з консервативною структурою до "канонічних структур". Каркасна ділянка або залишки FR1-4a є залишками цього варіабельного домену, які відрізняються від гіперваріабельних ділянок, тим самим обмежуючи їх. Система нумерації по Чотія і Леску враховує відмінності в нумерації залишків в петлі, вказуючи протяжність конкретних залишків, позначених умовними знаками у вигляді маленьких букв, наприклад 30a, 30b, 30c і т. д. Останнім часом була розроблена і широко розповсюджена міжнародна система нумерації - міжнародна інформаційна система ImMunoGeneTics information system® (IMGT) (LaFranc et al. 2005. *Nucl. Acids. Res.* 33:D593-D597).

Тут CDR згадуються як з урахуванням їх амінокислотної послідовності, так і розташування в легкому і важкому ланцюгах за допомогою послідовної нумерації. Оскільки "розташування" CDR в структурі варіабельного домену імуноглобуліну консервативне у різних видів і присутнє там у вигляді структур, званих петлями, використання систем нумерації, які упорядковують варіабельні домени відповідно до особливостей структури, CDR і залишки каркасної ділянки швидко визначаються. Ця інформація використовується для заміни і трансплантації залишків CDR з імуноглобулінів одного виду в акцепторну каркасну ділянку, яка звичайно знаходиться в людському антитілі.

Термін "дозрівання" застосовується до направлених змін у варіабельній ділянці антитіла з метою зміни властивостей поліпептиду. Як відомо в даній галузі техніки і описується в цьому документі, велика кількість послідовностей, розташованих в V-ділянці, може впливати на розпізнавання антигену. У природі антитіла досягають високої афінності і специфічності за допомогою прогресивного процесу соматичних мутацій. Цей процес може імітуватися *in vitro* для забезпечення паралельного відбору і селективної мінливості, при яких підтримується цілісність послідовностей кожного ланцюга антитіла таким чином, що вони відповідають антитілам певних видів, в цьому випадку - людини, а також посилення афінності або біофізичних параметрів, таких як розчинність або стійкість до окислення. Процес створення направлених змін, або "дозрівання", звичайно проводиться на рівні кодуючої послідовності і забезпечується за допомогою створення підбібліотек для вибору посиленої властивості.

У цьому документі термін "ОМ" стосується поліпептиду онкостатину М або полінуклеотиду, що містить послідовність, яка кодує поліпептид онкостатин М. Людський ОМ є продуктом людського гена *osm* (Ген 5008).

Термін "епітоп" означає область зв'язування білка, яка здатна до специфічного зв'язування з антитілом. Епітопи звичайно складаються з хімічно активних груп на поверхні молекул, таких як амінокислоти або бічні ланцюги цукрів, і звичайно мають специфічні тривимірні структурні характеристики, як і певні характеристики заряду. Конформаційні і неконформаційні епітопи розрізняються тим, що в присутності денатуруючих розчинників втрачається зв'язування з першими, але не втрачається зв'язування з другими.

У цьому документі K_D означає константу дисоціації, більш конкретно - K_D антитіла до попередньо визначеного антигену, і є мірою афінності антитіла до конкретної мішені. Високоафінні антитіла до попередньо визначеного антигену мають K_D 10^{-8} М або менше, більш переважно 10^{-9} М або менше і найбільш переважно 10^{-10} М або менше. Зворотною для K_D є константа асоціації K_a . Використовувані в цьому документі терміни " k_{dis} ", " k_2 " або " k_d " призначені для позначення швидкості дисоціації під час певної взаємодії антитіла з антигеном. " K_D " є відношенням швидкості дисоціації (k_2), також званої (k_{off}), до швидкості асоціації (k_1), або (k_{on}). Таким чином, K_D дорівнює k_2/k_1 або k_{off}/k_{on} і виражається у вигляді молярної концентрації (М). З цього випливає, що чим менше K_D , тим сильніше зв'язування. Таким чином, K_D 10^{-6} М (або 1 мкмоль/л) вказує на слабке зв'язування в порівнянні з 10^{-9} М (або 1 нмоль/л).

Терміни "моноклональне антитіло" або "композиція моноклональних антитіл" в даному документі стосуються одержання молекул антитіл з однією молекулярною композицією. Композиція моноклональних антитіл має однакову специфічність зв'язування і афінність до певного епітопа. Цей термін також включає "рекомбінантне антитіло" і "рекомбінантне моноклональне антитіло" як антитіла, які були одержані, експресовані, створені або виділені рекомбінантними способами, в яких (а) антитіла, виділені з клітин тварин або гібридом, одержуються за допомогою злиття клітин тварин, секретуючих антитіла, і клітин, що зливаються, (b) антитіла, виділені з клітин організму, трансформуються для експресування антитіл, утворюючи, наприклад, трансфектому, (c) антитіла, виділені з комбінаторної бібліотеки рекомбінантних антитіл людини або інших видів, і (d) антитіла, одержані, експресовані, створені або виділені іншими способами, які включають сплайсинг послідовностей гена імуноглобуліну з іншими послідовностями ДНК. У цьому документі термін "виділене антитіло" призначений для позначення антитіла, яке по суті не містить інших антитіл, що мають іншу антигенну специфічність. Виділене антитіло, яке специфічно зв'язується з епітопом, ізоформою або варіантом людського ОМ, проте, може бути здатне до перехресної реактивності з іншими спорідненими антигенами, наприклад, інших видів (наприклад, ОМ гомологічних видів). Крім того, виділене антитіло може бути практично вільним від стороннього клітинного матеріалу і (або) хімічних речовин. У одному варіанті здійснення комбінація "виділених" моноклональних антитіл, що мають різну специфічність, має чітко визначений склад.

У цьому документі словосполучення "специфічне зв'язування", "імуноспецифічне зв'язування" і "зв'язується імуноспецифічно" стосуються зв'язування антитіла з попередньо визначеним антигеном. Як правило, зв'язування антитіла характеризується константою дисоціації (K_D) 10^{-7} М або менше. Зв'язування з визначеним антигеном відбувається при K_D , яка в два рази менша, ніж K_D зв'язування з неспецифічним антигеном (наприклад, BSA, казеїн або будь-який інший поліпептид), відмінним від визначеного антигену. Фрази "антитіло розпізнало антиген" і "антитіло специфічне до антигену" в цьому документі взаємозамінні з терміном "антитіло, яке специфічно зв'язується з антигеном". У цьому документі "високоспецифічне" зв'язування означає, що відносна K_D антитіла при зв'язуванні з епітопом, який є його специфічною мішенню, щонайменше в 10 разів менше, ніж K_D при зв'язуванні цього антитіла з іншими лігандами.

У цьому документі "тип" стосується класу антитіла (наприклад, IgA, IgE, IgM або IgG), який кодується генами константної ділянки важкого ланцюга. Деякі класи антитіл додатково охоплюють підкласи, або "ізотипи", які також кодуються константними ділянками важкого ланцюга (наприклад, IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4). Антитіла можуть бути додатково сполучені з олігосахаридами, зв'язаними з білком за допомогою специфічних залишків в доменах константної ділянки, що додатково посилює біологічні функції антитіла. Наприклад, у людини ізотипи антитіл IgG1, IgG3 і меншою мірою IgG2 виявляють такі ж ефекторні функції, як і мишачі антитіла IgG2a.

Під "ефекторними" функціями або "позитивним ефектором" мається на увазі, що антитіло містить домени, які відрізняються від доменів для специфічного зв'язування антигену і здатні взаємодіяти з рецепторами або іншими компонентами крові, такими як комплемент, що приводить, наприклад, до рекрутингу макрофагів і подій, що приводять до руйнування клітин, зв'язаних з антигензв'язувальними доменами антитіла. Антитіла мають деякі ефекторні функції, зумовлені зв'язуванням з ефекторними молекулами. Наприклад, зв'язування C1-компонента

комплемента з антитілом активує систему комплемента. Активація комплемента важлива для опсонізації і лізису клітинних патогенів. Активація комплемента стимулює запальну відповідь і може також брати участь в аутоімунній гіперчутливості. Крім того, антитіла зв'язуються з клітинами за допомогою Fc-ділянки, яка містить Fc рецепторну ділянку на Fc-ділянці антитіла, що зв'язується з Fc-рецептором (FcR) на клітині. Існує множина Fc-рецепторів, які специфічні для різних класів антитіл, включаючи IgG (гамма-рецептори), IgE (епсилон-рецептори), IgA (альфа-рецептори) і IgM (мю-рецептори). Зв'язування антитіла з Fc-рецепторами на поверхнях клітин запускає множину важливих і різноманітних біологічних відповідей, що включають захоплення і руйнування покритих антитілами частинок, виведення імунних комплексів, лізис покритих антитілами клітин-мішеней за допомогою клітин-кілерів (званий опосередкованою антитілами клітинною цитотоксичністю, або ADCC), вивільнення медіаторів запалення, плацентарне перенесення і контроль за продукцією імуноглобулінів.

Термін "поліпептид" означає молекулу, яка містить амінокислотні залишки, зв'язані пептидним зв'язком з утворенням поліпептиду. Невеликі поліпептиди, що складаються з менше ніж 50 амінокислот, можуть бути віднесені до "пептидів". Поліпептиди можуть бути також названі "білками".

Загальний опис

Даний винахід передбачає виділені Mab, здатні до зв'язування і нейтралізації біологічної активності OM-білків і продуктів розщеплення. Зокрема, OM-зв'язувальні mAb даного винаходу здатні блокувати зв'язування OM з gp130 або запобігати рекрутингу LIFR α або OSMR β , викликаному зв'язуванням OM з gp130. У іншому випадку, OM-зв'язувальне mAb даного винаходу здатне блокувати викликану OM сигнальну дію рецептора gp130.

Повідомлялося, що фосфорилування STAT3 приводить до гіперпродукції колагену фібробластами в різних патологічних умовах (Lim et al. Oncogene, 23(39):5416-25, 2006; Huang et al. J. Cell Biochem. 81(1):102-13, 2001). Ці властивості показують можливе терапевтичне значення цих антитіл при РА, ОА і при фіброзах, таких як ідіопатичний легеневий фіброз (ІЛФ) і діабетична нефропатія (ДН).

Продукт людського гена OM, OM (зразок NCBI № NP_065391) є препрополіпептидом з довжиною 252 амінокислот (SEQ ID NO: 11), має сигнальний пептид довжиною 25 амінокислот і ділянку протеолітичного розщеплення між залишками 234 і 235. Він є секретованим білком, що має п'ять залишків цистеїну, які утворюють два внутрішніх дисульфідних зв'язки між залишками амінокислот 31-152 і 74-192 (Kallestad J.C. et al. J. Biol. Chem. 1991, May 15; 266(14):8940-5). Є дві можливі N-зв'язані ділянки глікозилювання біля залишків 100 і 217, і при продукції в еукаріотичних клітинах даний білок глікозилюється. Людський OM містить вільну сульфгідрильну групу біля залишку 105.

Послідовність білка OM макак відсутня у відкритому доступі, хоч існує автоматично обчислений запис 1867 пар нуклеотидних основ мРНК (NCBI № XM_001110148), одержаний з анотованої геномної послідовності (NW_001095169). Для одержання послідовності OM макак РНК була виділена з мононуклеарних клітин периферичної крові макак, і потім ген був ампліфікований з кДНК за допомогою ПЛР в реальному часі і секвенований. Передбачена трансляція клонованої послідовності (SEQ ID NO: 12) була на 99,6% ідентичною передбаченій послідовності *Macaca mullata* (резус), на 92% ідентичною послідовності білка OM людини і на 41% ідентичною послідовності білка OM миші, як було описано заявником в одній із заявок, що знаходяться одночасно на розгляді патентного відомства США (Сер. № 12/648430).

Більше того, даний винахід направлений на ідентифікацію одержаних у людини OM-зв'язувальних Mab, здатних інгібувати подальші ланки сигнальних каскадів біологічної активності, що приводить до появи сигналів при зв'язуванні OM з gp130, і де Mab виявляють здатність до:

відновлення проліферації клітин в присутності OM, інгібування викликаної OM деградації хондроцитів у внутрішньосуглобовому матриксі тканинного експлантата, ефективної нейтралізації OM-залежного фосфорилування STAT3 в фібробластах легень людини і запобігання OM-індукованому вивільненню цитокінів.

1. Склад антитіла даного винаходу

OM-нейтралізуюче антитіло даного винаходу є антитілом, яке пригнічує, блокує або протидіє щонайменше одному виду активності OM або зв'язуванню OM з рецептором *in vitro*, *in situ* і/або *in vivo* і не сприяє, не стимулює, не індукує або не збільшує активність OM або його зв'язування з лігандом, а також не є антитілом, яке при своєму зв'язуванні імітує ефекти подальших ланок сигнальних каскадів, викликаних OM-зумовленим лігуванням OM-рецепторів, зокрема взаємодію gp130 з OM, що полягає в передачі сигналу в клітині організму. Придатне OM-нейтралізуюче антитіло, певна частина або варіант можуть також в необов'язковому

порядку впливати щонайменше на один вид активності або функцію OM, які необмежено включають: синтез РНК, ДНК або білка; вивільнення білка; активацію, проліферацію або диференціювання клітини; секрецію антитіла; передачу сигналів рецептором OM; розщеплення OM; зв'язування OM, індукцію, синтез або секрецію OM або gr130.

Даний винахід ґрунтується на відкритті антилюдських моноклональних антитіл до OM, здатних пригнічувати сигнальну дію gr130 після зв'язування з OM або OM-індукованого рекрутингу LIFR. Для зв'язування OM були вибрані зв'язувальні домени антитіла у вигляді Fab-бібліотеки, які відображаються у вигляді частинок ниткоподібного фага, зв'язаних з оболонковим білком рІХ (див. WO 29085462A1 і подальший опис нижче). Для розпізнавання цих Fab-фрагментів був використаний порівняльний аналіз за допомогою gr130 таким чином, щоб при їх зв'язуванні з OM відбувалося запобігання зв'язуванню OM з gr130. У іншому випадку, Fab-фрагменти повинні були запобігати рекрутингу LIFR, викликаному зв'язуванням gr130 з OM. Клітинний аналіз (A375, клітини меланоми людини) був використаний для ідентифікації деяких придатних антитіл, здатних до інгібування gr130-зумовленої активації pSTAT3 в OM-експресуючих клітинах організму.

OM-зв'язувальні антитіла, описані в цьому документі, розпізнають щонайменше дві різних області в активній формі людського білка OM, що вказує на додаткове відкриття множинних ділянок OM, які придатні для направленої впливу антитіл або інших сполук зі схожими блокувальними функціями. Таким чином, експресія і очищення зв'язувальних доменів антитіл в цьому документі зводиться до амінокислотної послідовності, яка є інструментом, який може забезпечити можливість вибору нових молекул, що виявляють OM-нейтралізуючу активність.

У одному варіанті здійснення антилюдське OM-антитіло містить зв'язувальну ділянку, яка має варіабельну ділянку легкого ланцюга (VL) або варіабельну ділянку важкого ланцюга (VH), що містить амінокислотну послідовність, показану в SEQ ID NO: 49-55, і це антитіло або його зв'язувальна частина імуноспецифічно зв'язує OM. У іншому варіанті здійснення даного винаходу, який містить важкий ланцюг, що містить в своїй антигензв'язувальній частині SEQ ID NO: 54 або 55, антитіло зв'язується з білком OM і, крім цього, має специфічні функціональні властивості антитіла винаходу, такі як:

- 1) зв'язування людського OM з K_D менше 100 пмоль/л;
- 2) зв'язування OM макака з K_D менше 500 пмоль/л;
- 3) здатність відновлювати проліферацію клітин A375-S2 в присутності 2 нг/мл людського OM на 90% від рівня, який спостерігається за відсутності OM;
- 4) здатність відновлювати проліферацію клітин A375-S2 в присутності 2 нг/мл OM макака на 90% від рівня, який спостерігається за відсутності OM;
- 5) інгібування OM-індукованої деградації хондроцитів у внутрішньосуглобовому матриксі тканинних експлантатів,
- 6) ефективна нейтралізація OM-залежного фосфорилування STAT3 в фібробластах легень нормальної людини (NHLF); або
- 7) блокування вивільнення цитокінів після системної перевірки імунності до OM у мишей.

У іншому аспекті даного винаходу структурні особливості антитіл, що виявляють деякі або всі види вищепереліченої біологічної активності, зокрема Mab, позначених як зв'язувальні домени M55 і M71, використовуються для створення споріднених по структурі людських анти-OM антитіл, які зберігають щонайменше одну функціональну властивість антитіл даного винаходу, таку як зв'язування з OM. Більш конкретно, одна або більше ділянок CDR в M55 і M71 (такі як специфічні залишки в SEQ ID NO: 1 і 8) можуть бути рекомбіновані з відомими каркасними ділянками людини і такими CDR, як SEQ ID NO: 13-28, 30-46, для створення додаткових рекомбінантних генно-інженерних людських анти-OM антитіл даного винаходу.

У одному варіанті здійснення антитіла даного винаходу мають послідовності, що включають FR1, 2 і/або 3; IGVH1-69 (SEQ ID NO: 1) або IGVH5-51 (SEQ ID NO: 3), причому один або більше залишків CDR вибираються з групи, що включає SEQ ID NO: 13-22, які знаходяться в CDR, розташованій в SEQ ID NO: 1 або 3, причому здатність антитіла до зв'язування OM зберігається (наприклад, за рахунок консервативних замінів). Таким чином, в іншому варіанті здійснення, генно-інженерне антитіло може містити одну або більше CDR, які, наприклад, можуть бути на 90%, 95%, 98% або 99,5% ідентичними CDR, перерахованим в SEQ ID NO: 13-22, або варіантам L-CDR3, наведеним в SEQ ID NO: 29 або 47.

На доповнення до простого зв'язування з OM, генно-інженерні антитіла, такі як описані вище антитіла, можуть бути вибрані з точки зору збереження функціональних властивостей антитіл даного винаходу, таких як здатність пригнічувати зв'язування білка OM або його продуктів розщеплення з gr130-позитивними клітинами, і це зв'язування може привести до пригнічення проліферації gr130-позитивних клітин *in vivo*.

Людські моноклональні антитіла даного винаходу можуть бути досліджені на зв'язування з ОМ, наприклад, за допомогою стандартного твердофазного імуноферментного аналізу.

2. Синтез ОМ-нейтралізуючих антитіл

ОМ-нейтралізуючі антитіла, що демонструють бажаний спектр біологічної активності, прикладами чого є антитіла М5, М6, М9, М10, М42, М45, М53, М54, М55, М62, М63, М65, М66, М67, М68, М69, М71 і М83, які містять послідовності важкого ланцюга і легкого ланцюга, які вказані в бібліотеці каркасних ділянок SEQ ID NO: 1, 3, 8, а також мають CDR з SEQ ID NO: 13-28, 30-46, можуть бути синтезовані різними способами.

У іншому варіанті здійснення епітоп, що зв'язується антитілами даного винаходу і містить усього лише п'ять зі всіх залишків 51-227 з SEQ ID NO: 11, або нуклеїнова кислота, що кодує дану послідовність, можуть використовуватися для імунізації випробуваного для продукування антитіл даного винаходу безпосередньо в організмі з метою лікування, профілактики або полегшення перебігу захворювання або симптомів захворювання, які пов'язані з продукцією ОМ.

У одному варіанті здійснення і як приклад в цьому документі людське антитіло вибирається з бібліотеки фагів, де ці фаги містять гени людського імуноглобуліну, і бібліотека експресує зв'язувальні домени антитіла, наприклад, у вигляді одноланцюжкових антитіл (scFv), Fab-фрагментів або деяких інших конструкцій, що містять парні і непарні варіабельні ділянки антитіл (Vaughan et al. Nature Biotechnology, 14:309-314 (1996); Sheets et al. PITAS (USA), 95:6157-6162 (1998); Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al. J. Mol. Biol., 222:581 (1991)). Людські моноклональні антитіла даного винаходу можуть також одержуватися за допомогою способів фагового дисплея для скринінгу бібліотек генів людських імуноглобулінів. У даній галузі техніки визнані дані способи фагового дисплея для ізоляції людських антитіл. Див., наприклад, Патенти США №№ 5223409; 5403484 і 5571698, Ладнер і співавт.; Патенти США №№ 5427908 і 5580717, Довер і співавт.; Патенти США №№ 5969108 і 6172197, МкКафферті і співавт.; і Патенти США №№ 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915 і 6593081, Гріффітс і співавт.

Клони фагів вибираються і ідентифікуються за допомогою багатоетапної процедури, яка відома як біопенінг. Біопенінг здійснюють за допомогою інкубування фага, мішенню якого є варіанти білкових лігандів (бібліотеки генів фагового дисплея), видалення незв'язаного фага за допомогою промивання, і специфічного елюювання зв'язаного фага. Елююваний фаг необов'язково може ампліфікуватися перед проходженнями додаткових циклів зв'язування і необов'язкової ампліфікації, які поповнюють пул специфічних послідовностей на користь клонів цих фагів, які несуть фрагменти антитіл, що демонструють найкраще зв'язування з мішенню. Після декількох циклів характеризуються окремі клони фагів, і пептидні послідовності, відображені за допомогою клонів, визначаються за допомогою секвенування відповідної ДНК віріона фага.

Бібліотека Fab-фрагментів фага pIX

У конкретному варіанті здійснення способу фагового дисплея синтетичні Fab-бібліотеки відображаються на фаговому оболонковому білку pIX, описаному Shi et al. J. Mol. Biol. 397:385-396, 2010; а також в міжнародній заявці WO 29085462A1 і патенті США Сер. № 12/546850, що буде детально розглядатися далі, і використовуються для вибору зв'язувальної речовини з імунного репертуару послідовностей людського IgG, які одержані із зародкових генів людини. Бібліотеки сконструйовані з чотирьох доменів VL і трьох доменів VH, що кодуються відомими зародковими послідовностями IGV і IGJ, вибраними на основі частоти, з якою ці послідовності виявляються в людських антитілах, виділених з природних джерел. По номенклатурі IMGT VH є IGHV1-69 (SEQ ID NO: 1), IGHV3-23 (SEQ ID NO: 2) або IGHV5-51 (SEQ ID NO: 3). Різноманітність конструкцій VH приводить до утворення важких ланцюгів з послідовністю варіабельної довжини в ділянці CDR3, різноманіття положень яких обмежується H-CDR1 і H-CDR2, довжина яких залишається постійною. Каркасна ділянка чотири (H-FR4) залишається постійною у всіх представників бібліотеки (SEQ ID NO: 4).

VH169, IGHV1-69*01, довжина = 98, CDR1 = 31-35, CDR2 = 50-66,
QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGGTFS SYX₁ISWVRQA PGQGLEWMGX₂
IX₃X₄X₅X₆GTANY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAR (SEQ ID NO: 1),
причому в 169 бібліотеці X₁ є А або G, X₂ є G або W, X₃ може бути I або S, X₄ може бути Р або А, X₅ може бути I або Y, і X₆ може бути F або N.

VH323, IGHV3-23*01, довжина = 98, CDR1 = 31-35, CDR2 = 50-66,
EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS X₁YX₂MX₃WVRQA PGKGLEWVSX₄
IX₅X₆X₇GX₈STYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAK (SEQ ID NO: 2),

причому в 323 бібліотеці X_1 може бути S, D, N або T; X_2 може бути A, G або W; X_3 може бути S або H; X_4 може бути V, A, N або G; X_5 може бути S, N, K або W; X_6 може бути Y, S, G або Q; X_7 може бути S або D; і X_8 може бути S або G.

VH551, IGHV5-51*03, довжина = 98, CDR1 = 31-35, CDR2 = 50-66,
 5 EVQLVQSGAE VKKPGESLKI SCKGSGYSFT X_1 YWIX X_2 WVRQM PGKGLEWMGX X_3
IX X_4 PX X_5 DSX X_6 TRY SPSFQGQVTI SADKSISTAY LQWSSLKASD TAMYCAR (SEQ ID NO: 3),

причому в 551 бібліотеці X_1 може бути S, N або T; X_2 може бути S або G; X_3 може бути I або R; X_4 може бути D або Y; X_5 може бути G або S; X_6 може бути D або Y.

10 Ділянки FR4 або JH, що містять 11 залишків, WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 4), були приєднані до вищезазначених послідовностей для утворення цілої варіабельної ділянки важкого ланцюга.

Положення H-CDR1 і H-CDR2, які були використані як мішень для різноманітності, були визначені 1) різноманітністю в зародкових генах; і 2) частотою, з якою вони виявляються з антигеном в комплексах антитіло-антиген з відомою структурою (Almagro, J. Mol. Recognit. 15 17:132-143, 2004). Різноманітність амінокислот у вибраних положеннях зумовлюється 1) використанням зародкової лінії; 2) амінокислотами, які найчастіше виявляються в реаранжованих V-генах людини; 3) амінокислотами, які передбачувано є результатами соматичних мутацій в одній основі; і 4) біохімічними і біофізичними властивостями амінокислот, які беруть участь в розпізнаванні антигену.

20 Бібліотека включає різноманітність CDR3 в VH (H3), що імітує імунний репертуар людських антитіл (Shi et al. 2010 supra) показаним нижче способом (Формула I), де підсумкова довжина складає від 7 до 14 залишків. Серед CDR3 з 5000 людських варіабельних ділянок у всіх положеннях часто використовуються амінокислоти гліцин (G) і аланін (A). Крім того, аспарагінова кислота (D) часто використовується в положенні 95, і тирозин (Y) часто закований в положеннях, що передують каноничній ділянці J-сегмента. Амінокислоти 25 фенілаланін (F), аспарагінова кислота (D) і тирозин (Y) визначені в положеннях 99-101 і в цих же положеннях використовуються в IgG. Оскільки ці положення часто служать для структурного підтримання H-CDR3 і менш відкриті для антигену і/або на поверхні IgG, амінокислоти фенілаланін з лейцином (у співвідношенні 50/50) фіксуються в положенні 99, аспарагінова 30 кислота - в положенні 100, а тирозин - в положенні 101. Таким чином, послідовність Формули I вставлена між SEQ ID NO: 1, 2 або 3 і SEQ ID NO: 4 для утворення цілого домену VH.

-(D)-(N) n (N+O) m (F)DY-, (I)

де:

(D) = положення, багаті аспарагіновою кислотою (D) і гліцином (G);
 35 (N) n = положення, багаті аланіном (A) і гліцином (G), n = 3-7;
 (O) m = положення, багаті аланіном (A), гліцином (G) і Y (тирозином), m = 1-4;
 (F) = основне положення фенілаланіну (F).

Різні версії бібліотек, що охоплюють об'єднання з фіксованими або різноманітними легкими ланцюгами, також були одержані з імунного репертуару людської зародкової лінії. У даному 40 винаході чотири бібліотеки генів легких ланцюгів VL_{каппа} (Kawasaki et al. 2001. Eur. J. Immunol. 31:1017-1028; і Schaeble & Zachau, 1993, Biol. Chem. Hoppe Seyler, 374:1001-1022) є A27 (IGKV3-20*01), B3 (IGKV4-1*01), L6 (IGKV3-11*01) і O12 (IGKV1-39*01), де назва гена в круглих дужках була передбачена за допомогою відповідного гена IMGT. Fab-фрагменти відображені на рІХ за рахунок експресії двоцистронного вектора, в якому домен VH-CH1 конденсований з 45 послідовністю оболонкового білка, і VL-CL каппа або VL-CL лямбда експресуються у вигляді вільного поліпептиду, який самостійно сполучається з VH-CH1. Ділянки CDR підкреслені.

Бібліотека варіабельних ділянок легких ланцюгів ґрунтується на зародкових генах V-каппа (Vk)

012; IGKV1-39*01, IGKV1D-39*01, довжина = 88; CDR1 = 24-34, CDR2 = 50-56,
 50 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSSIS X_1 X_2 X_3 NWYQQKP GKAPKLLIY X_4 ASSLQSGVPS
 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYC (SEQ ID NO: 5),

L6, IGKV3-11*01, довжина = 88, CDR1 = 24-34, CDR2 = 50-56,

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSV X_1 X_2 X_3 LAWYQQKP GQAPRLIY X_4 ASNRATGIPA
 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYC (SEQ ID NO: 6),

55 A27, IGKV3-20*01, довжина = 89, CDR1 = 24-35, CDR2 = 51-57,

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSV X_1 X_2 X_3 X_4 LAWYQQK PGQAPRLIY X_5 ASSRATGIP
 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYC (SEQ ID NO: 7),

B3, DPK24, VKIVKlobeck; IGKV4-1*01, довжина = 94, CDR1 = 24-40, CDR2 = 56-62,

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSVL X_1 SSNNX X_2 NX X_3 LA WYQQKPGQPP KLLIY X_4 ASTR
 60 ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYC (SEQ ID NO: 8).

Різноманітність певних положень кожної підтримуючої варіабельної ділянки підсумована нижче в Таблиці 1, де застосовується однобуквений амінокислотний код, який використовується і присутній як альтернатива для певних положень, які показані на фіг. 1.

Таблиця 1

CDR	Положення по Кебату	O12 (SEQ ID NO: 5)		L6 (SEQ ID NO: 6)		A27 (SEQ ID NO: 7)		B3 (SEQ ID NO: 8)	
1	30	X ₁	SRNAD	X ₁	SRNAD	X ₁	SRNTD		L
	30a		-		-	X ₂	SNR	X ₁	YSHFA
	30e		-		-		-		
	30f							X ₂	KTNE
	31	X ₂	SNKDG	X ₂	NSKD	X ₃	SNRADH		Кількість
	32	X ₃	YHNDWFSAV	X ₃	YWDFHSAN	X ₄	YFHQSEK	X ₃	YFHNWDAS
2	50	X ₄	FYTNKADG	X ₄	ADKGYFTN	X ₅	ADGS	X ₄	WSRDYA

Домен VL CDR3 у всіх бібліотеках містить сім залишків, причому перші два залишки є глутаміном (Gln, Q), і залишок, відповідний 95 залишку по Кебату, є проліном (Pro, P). У L-CDR3 послідовність відповідає QQX₁X₂X₃X₄PX₅T (SEQ ID NO:9), причому її мінливість наведена нижче в таблиці, а положення залишків відповідають нумерації по Кебату.

Таблиця 2

Залишок	Положення CDR3 по Кебату	<u>O12</u>	<u>L6</u>	<u>A27</u>	<u>B3</u>
X ₁	91	SAYHPD	RYSGF	YSHA	YSHA
X ₂	92	FIYHNDKGRE	RHNSL	YNDSHIFKG	YNDSHIFKG
X ₃	93	STHNDRG	NDKR	SNTDGHR	SNTDGHR
X ₄	94	TYLVFSRGPI	WA	TYLVFAS	TYLVFAS
X ₅	96	LWRFYIN	WYFLIR	WYFLIR	WYFLIR

Оскільки довжина варіабельної послідовності змінюється від гена до гена, різноманітність положень певного залишку в гіперваріабельній петлі або CDR може бути описана таким чином за допомогою нумерації залишків, наведеної в Al-Lazikani B., Lesk A.M., Chothia C. 1997 (Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. J. Mol. Biol. 273:927 948). У цій системі зміни довжини гіперваріабельних петель визначаються за допомогою позначення субположень a, b, c і т. д. для даного залишку.

Такий сегмент каркасної ділянки 4 (FR4), як JK4, FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 10) використовується для утворення цілісної людської варіабельної ділянки легкого ланцюга.

Під час входних відборів була продемонстрована афінність Fab-фрагментів до окремих білків-мішеней, яка склала від 0,2 до 20 нМ.

Способи інтегрованого процесу дозрівання для поліпшення параметрів зв'язування включають перестановку екзонів VL або VH з метою різноманітності, або, навпаки, направлену або обмежену модифікацію домену VL, яка проводиться за допомогою векторів і праймерів, створених і використовуваних для бібліотек, як описано у вказаній публікації і цьому документі, і комбінації зі способами, які відомі фахівцям в даній галузі техніки.

Альтернативні джерела ОМ-зв'язувальних доменів імуноглобулінів

ОМ-зв'язувальні антитіла, що мають характеристики людських Mab, які були описані в цьому документі, можуть бути виготовлені, або зв'язувальні фрагменти, одержані з доменів імуноглобулінів, можуть бути сформовані множиною способів, які включають стандартні способи гібридизації соматичних клітин (спосіб гібридоми) по Kohler і Milstein (1975), Nature, 256:495. При одержанні гібридоми мишу або іншу придатну тварину, наприклад хом'ячка або макаку, імунізують описаним в цьому документі способом, щоб виділити лімфоцити, що виробляють або здатні виробляти антитіла, які специфічно зв'язуються з білками, використовуваними для імунізації. У іншому випадку лімфоцити можуть бути імунізовані in vitro. Потім лімфоцити можуть бути злиті з клітинами мієломи за допомогою придатного фактора, що

викликає злиття клітин, такого як поліетиленгліколь, для утворення клітин гібридами (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)).

ОМ-нейтралізуючі антитіла також необов'язково можуть бути синтезовані за допомогою імунізації трансгенних тварин (наприклад, миші, щура, хом'яка, приматів (за винятком людини) і т. п.), здатних до продукування імунологічного репертуару людських антитіл, як описується в цьому документі і/або відомо фахівцям в даній галузі техніки. Клітини, продукуючі людські анти-ОМ антитіла, можуть бути виділені з цих тварин і імунізовані за допомогою придатних способів, таких як способи, описані в цьому документі. У іншому випадку, послідовності, що кодують антитіло, можна клонувати, ввести у придатний вектор і використовувати для трансфекції клітини-хазяїна, щоб експресувати і виділити антитіла описаними в цьому документі способами і іншими способами, відомими фахівцям в даній галузі.

Використання трансгенних мишей, що є носіями локусу людського імуноглобуліну (Ig) в конфігурації своєї зародкової лінії, забезпечує ізоляцію високоафінних повністю людських моноклональних антитіл, направлених проти різних мішеней, включаючи власні антигени людини, до яких нормальна імунна система людини толерантна (Lonberg N. et al. Патент США US5569825, Патент США US6300129, і 1994, *Nature*, 368:856-9; Green L. et al. 1994, *Nature Genet.* 7:13-21; Green L. & Jakobovits, 1998, *Exp. Med.* 188:483-95; Lonberg N. and Huszar D., 1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93; Kucherlapati et al. US6713610; Bruggemann M. et al. 1991, *Eur. J. Immunol.* 21:1323-1326; Fishwild D. et al. 1996, *Nat. Biotechnol.* 14:845-851; Mendez M. et al. 1997, *Nat. Genet.* 15:146-156; Green L. 1999, *J. Immunol. Methods*, 231:11-23; Yang X. et al. 1999, *Cancer Res.* 59:1236-1243; Bruggemann M. and Taussig M.J., *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:455-458, 1997; Tomizuka et al. міжнародна заявка WO 02043478). Ендогенний локус імуноглобуліну у таких мишей можна зруйнувати або піддати делеції, щоб таким чином позбавити тварину здатності утворювати антитіла, що кодуються ендогенними генами. Крім того, компанії, такі як Abgenix, Inc. (Фрімонт, Каліфорнія) і Medarex (Сан-Хосе, Каліфорнія), можуть залучатися до одержання людських антитіл, направлених проти визначеного антигену, за допомогою описаної вище технології.

Підготовка поліпептидів для використання як лігандів мішені способом пенінгу і імуногенних антигенів може проводитися за допомогою будь-якого придатного способу, такого як рекомбінантне одержання білка. Ліганд мішені або його фрагмент у вигляді очищеного білка або білкової суміші, що включає цілі клітини, клітинні або тканинні екстракти, або, у випадку імунізації, антиген може бути сформований *de novo* в тілі тварини з нуклеїнових кислот, що кодують згаданий антиген або його частину.

Як добре відомо фахівцям, виділені нуклеїнові кислоти, які складають предмет даного винаходу, можуть бути одержані з використанням (а) рекомбінантних способів, (b) синтетичних способів, (c) способів очищення або їх поєднань. ДНК, що кодує моноклональні антитіла, легко виділяється і секвенується за допомогою способів, відомих в даній галузі техніки (наприклад, з використанням олігонуклеотидних зондів, які здатні специфічно зв'язуватися з генами, що кодують важкі і легкі ланцюги ділянок людського антитіла). При створенні гібридом такі клітини можуть служити джерелом такої ДНК. У іншому випадку, коли використовується спосіб дисплея зі злиттям кодуючої послідовності і продукту трансляції (наприклад, бібліотеки фагового або рибосомального дисплея), селекція зв'язувальної ланки і нуклеїнової кислоти спрощена. Після селекції ділянки фага, що кодують антитіло, можна виділити і використовувати для синтезу цілих антитіл (в тому числі людських) або будь-яких інших необхідних антигензв'язувальних ділянок, і експресувати в будь-якому бажаному хазяїні (в тому числі в клітинах ссавців, клітинах комах, клітинах рослин, дріжджах і бактеріях).

Людські антитіла

Крім того, винахід передбачає людські імуноглобуліни (або антитіла), які зв'язують людський ОМ. Ці антитіла також можна охарактеризувати як генно-інженерні або адаптовані антитіла. Імуноглобуліни мають варіабельні ділянки, які по суті походять з людських зародкових імуноглобулінів, і включають направлену мінливість в залишках, які, як відомо, беруть участь в розпізнаванні антигену, прикладом чого можуть служити CDR по Кебату або гіперваріабельні петлі з відомою структурою. Константні ділянки, якщо вони є, також по суті знаходяться в людському імуноглобуліні. Людські антитіла мають K_D для ОМ щонайменше близько 10^{-6} М (1 мікромоль/л), близько 10^{-7} М (100 нмоль/л), 10^{-9} М (1 нмоль/л) або менше. Для зміни афінності, яка, наприклад, виражається в поліпшенні афінності або зменшенні K_D людського антитіла з ОМ, можуть бути введені замісники в будь-який із залишків CDR або інші залишки.

Джерелом продукції людських антитіл, які зв'язуються з ОМ, переважно є представлені тут послідовності, які містять варіабельні ділянки, каркасні ділянки і/або CDR, позначені як SEQ ID

NO: 13-55, які ідентифіковані як здатні до зв'язування людського ОМ і перехресного реагування з ОМ яванської макаки за рахунок імунного репертуару одержаних у людини Fab-фрагментів, введених в частинки ниткоподібного фага.

Заміщення будь-якої з CDR в будь-якій каркасній ділянці варіабельного домену людини, швидше всього, приведе до збереження її правильної орієнтації в просторі, якщо каркасна ділянка варіабельного домену людини прийме конформацію, яка аналогічна або схожа з батьківською варіабельною каркасною ділянкою, з якої була одержана CDR. Варіабельні каркасні ділянки важкого і легкого ланцюга можуть бути об'єднані в підсумкове Mab, яке може бути одержане з однакових або різних послідовностей людського антитіла. Послідовності людського антитіла можуть бути послідовностями природних людських антитіл, можуть одержуватися із зародкових послідовностей імуноглобулінів або можуть бути консенсусною послідовністю деяких людських антитіл і/або зародкових послідовностей.

Придатні послідовності людських антитіл ідентифікуються за допомогою комп'ютерного порівняння амінокислотних послідовностей варіабельних ділянок миші з послідовностями відомих людських антитіл. Порівняння проводиться окремо для важких і легких ланцюгів, однак його принцип для них однаковий.

Що стосується емпіричного способу, то було виявлено, що він особливо зручний для створення бібліотеки варіантів послідовностей, які можуть бути досліджені для виявлення бажаної активності і афінності або специфічності зв'язування. Одним з форматів створення подібної бібліотеки варіантів є вектор для фагового дисплея. У іншому випадку, варіанти можуть бути створені за допомогою альтернативних відомих способів рандомізування і мозаїцювання послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує цільові залишки у варіабельному домені.

За необхідності подальшої заміни може використовуватися інший спосіб визначення, в якому вибір амінокислотних залишків для заміщення може здійснюватися за допомогою комп'ютерного моделювання. Широко доступне апаратне і програмне забезпечення комп'ютера для одержання тривимірних зображень молекул імуноглобуліну. Загалом, молекулярні моделі створюються на основі відомих структур ланцюгів імуноглобуліну або його доменів. Амінокислотна послідовність модельованих ланцюгів порівнюється з ланцюгами або доменами відомих тривимірних структур для виявлення їх схожості, і ланцюги і домени, послідовності яких виявилися найбільш схожими, вибираються як початкова точка для конструювання молекулярної моделі. Відомі вихідні структури модифікуються з урахуванням відмінностей між амінокислотами в ланцюгах або доменах модельованого імуноглобуліну і вихідною структурою. Потім модифіковані структури об'єднуються в змішаний імуноглобулін. В результаті модель вдосконалюють шляхом мінімізації енергії і переконуються в тому, що всі атоми знаходяться на належній відстані один від одного і що довжини зв'язків і кути знаходяться в хімічно прийнятних межах.

У зв'язку з виродженістю коду кожен амінокислотну послідовність імуноглобуліну може кодувати множина послідовностей нуклеїнових кислот. Бажані послідовності нуклеїнових кислот можуть створюватися de novo за допомогою твердофазного синтезу ДНК або ПЛР-мутагенезу одержаного раніше варіанта бажаного полінуклеотиду. Всі нуклеїнові кислоти, що кодують антитіла, описані в даній заявці, спеціально включені в даний винахід.

Варіабельні сегменти людських антитіл, одержувані відповідно до цього документа, звичайно зв'язані щонайменше з частиною константної ділянки людського імуноглобуліну. У складі антитіла будуть константні ділянки і легкого, і важкого ланцюга. Константна ділянка важкого ланцюга звичайно містить домени CH1, шарнірний, CH2, CH3 і іноді CH4.

Людські антитіла можуть містити будь-який тип константних доменів будь-якого класу антитіл, включаючи IgM, IgG, IgD, IgA і IgE, і будь-якого підкласу (ізотипу), включаючи IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4. Коли бажано, щоб гуманізоване антитіло виявляло цитотоксичну активність, константний домен звичайно є константним доменом, який фіксує комплемент і звичайно належить до класу IgG1. Коли така цитотоксична активність небажана, як константний домен можна використовувати IgG2. Гуманізоване антитіло може містити послідовності з більше ніж одного класу або ізотипу антитіл.

Нуклеїнові кислоти, що кодують варіабельні ділянки легкого і важкого ланцюгів гуманізованого антитіла, які необов'язково можуть бути зв'язані з константною ділянкою, поміщені в експресійні вектори. Легкий і важкий ланцюги можна клонувати в одному або в різних векторах експресії. Сегменти ДНК, що кодують ланцюги імуноглобулінів, функціонально зв'язані з контрольними послідовностями в експресійних векторах, які забезпечують експресію поліпептидів імуноглобуліну. Такими контролюючими послідовностями є сигнальна послідовність, промотор, енхансер і термінатор транскрипції (див. Queen et al. Proc. Natl. Acad.

Sci. USA, 86, 10029 (1989); WO 90/07861, Co et al. J. Immunol. 148, 1149 (1992), які включені у всій повноті в цей документ за допомогою посилання).

3. Способи застосування анти-ОМ антитіл

Як детально описується нижче, даний винахід показує, що виділені моноклональні антитіла, які мають варіабельні домени M5, M6, M9, M10, M42, M45, M53, M54, M55, M62, M63, M65, M66, M67, M68, M69, M71 і M83, зв'язуються з антигенними детермінантами ОМ, що перекриваються, і виявляють *in vitro* і/або *in vivo* активність, пов'язану з пригніченням ОМ. Суттєво, що реактивність вибраних МАb включає здатність до дозозалежного блокування взаємодії ОМ з gp130, зменшення сигнальної активності ОМ в присутності gp130, зменшення стимульованої ОМ проліферації клітин А375, запобігання стимульованій макрофагами продукції колагену хондроцитами або зменшення вивільнення цитокінів під дією ОМ *in vivo*.

Враховуючи властивості моноклональних антитіл, описаних в даному винаході, антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти придатні для використання як лікувальних, так і профілактичних засобів для лікування або профілактики ОМ-асоційованих станів у людей і тварин.

Загалом, застосування може включати введення терапевтично або профілактично ефективної кількості одного або більше моноклональних антитіл або їх антигензв'язувальних фрагментів відповідно до даного винаходу, або антитіл або молекул, які були вибрані через схожий спектр зв'язувальної і біологічної активності, сприйнятливому суб'єкту або суб'єкту, що знаходиться в стані, в якому ОМ викликає відомі патологічні наслідки, такі як імунологічні розлади або ріст пухлини і метастазів. Вводити можна будь-яку активну форму антитіла, в тому числі фрагменти Fab і F(ab')₂.

Переважно використовувати антитіла, сумісні з видом реципієнта, щоб дія МАb не була дуже короткою або не індукувала у суб'єкта імунну відповідь на МАb. При прийомі МАb можуть виявляти деякі другорядні функції, такі як зв'язування з Fc-рецепторами суб'єкта і активація механізмів опосередкованої антитілами клітинної цитотоксичності для виснаження популяції клітин-мішеней за допомогою цитолітичних або цитотоксичних механізмів, або вони можуть бути генетично сконструйовані з урахуванням обмеження або виключення цих вторинних ефекторних функцій з метою збереження популяції клітин-мішеней.

Лікування індивідумів може полягати у введенні терапевтично ефективної кількості антитіл даного винаходу. Антитіла можуть бути в складі набору, описаного нижче. Антитіла можуть застосовуватися або вводитися у вигляді суміші, наприклад в рівних кількостях, або окремо у вигляді певної послідовності, або вони можуть вводитися всі відразу. При забезпеченні пацієнта антитілами або їх фрагментами, здатними зв'язувати ОМ, або антитілами, здатними захищати реципієнта від ОМ, дозування агента, що вводиться, може варіюватися залежно від таких факторів, як вік пацієнта, вага, зріст, стать, загальний медичний стан, медичний анамнез і т. д.

При подібному підході іншим терапевтичним застосуванням моноклональних антитіл даного винаходу є активна імунізація пацієнта за допомогою антиідіотипічного антитіла, індукованого проти одного з цих моноклональних антитіл. Імунізація антиідіотипічними антитілами, які імітують структуру епітопа, дозволяє викликати реакцію у відповідь проти ОМ (Linthicum D. S. and Farid N. R. Anti-idiotypes, Receptors, and Molecular Mimicry (1988), pp. 1-5, 285-300).

Більше того, активну імунізацію можна індукувати, включивши до складу вакцини один і більше антигенних і (або) імуногенних епітопів. Вакцинацію з метою профілактики або терапії можна проводити орально або парентерально, в кількості, достатній для генерації реципієнтом захисних антитіл до цих біологічно активних ділянок. Хазяїна можна активно імунізувати антигенним/імуногенним пептидом в чистому вигляді, фрагментом цього пептиду або модифікованою формою пептиду. До N- або C-кінця оригінального пептиду або його частини можна додати одну і більше амінокислот, відсутніх в оригінальній послідовності білка. Такі додаткові амінокислоти звичайно включають для забезпечення взаємодії пептиду з іншим пептидом, з білком-носієм або з підкладкою. Амінокислоти, які можуть використовуватися в цих цілях, включають: тирозин, лізин, глутамінову кислоту, аспарагінову кислоту, цистеїн і їх похідні. У альтернативних способах модифікації білків можуть використовуватися, наприклад, NH₂-ацетилювання або COOH-кінцеве амінування для забезпечення додаткових засобів для об'єднання або конденсації пептиду з іншим білком, пептидною молекулою або підкладкою.

Антитіла, здатні захищати від небажаної біологічної активності ОМ, призначені для їх надання реципієнтам в кількостях, достатніх для ефективного пригнічення, усунення або пом'якшення симптомів або патологій, пов'язаних з ОМ. Кількість називається достатньою або "терапевтично ефективною кількістю" для "ефективного" зменшення симптомів, якщо дозування, шляхи введення і т. д. агента достатні для його впливу у вигляді такої відповіді.

Реакції у відповідь на введення антитіла можна виміряти, аналізуючи тканини, органи або клітини суб'єкта способами візуалізації або одержуючи зразки тканин і вивчаючи їх *ex vivo*. Речовина вважається фізіологічно значущою, якщо її присутність викликає зміни фізіології реципієнта, що піддаються виявленню.

5 Терапевтичні застосування

ОМ-нейтралізуючі антитіла даного винаходу, антигензв'язувальні фрагменти або їх специфічні варіанти можуть використовуватися для викликання ефектів в клітині, тканині, органі або тварині (включаючи ссавців і людей) для діагностики, спостереження, модулювання, лікування, полегшення або запобігання захворюванню, зменшення симптомів, станів, опосередкованих, викликаних або модульованих ОМ або клітинами, експресуючими ОМ. Таким чином, даний винахід забезпечує спосіб модулювання або лікування щонайменше одного захворювання, пов'язаного з ОМ, клітини, тканини, органа, тварини або пацієнта відомими в даній галузі техніки способами або способами, які описані в цьому документі, за допомогою щонайменше одного антитіла до ОМ даного винаходу.

15 Відомо, що ген ОМ активується при різних патологічних станах, які включають запалення, і грає різні біологічні ролі в процесах, що включають формування кістки, деградацію хряща, поглинання холестерину, біль і запалення. Конкретне показання обговорюється нижче.

Показання

20 Автори даного винаходу продемонстрували, що ОМ обумовлює деструкцію хряща, і було показано, що ОМ викликає деградацію хондроцитів у внутрішньосуглобовому матриксі тканинних експлантатів. ОМ також сприяє вивільненню цитокінів, таких як ФНО- α , які здатні стимулювати вироблення колагену в хрящі, як показано Cawston T. et al. (1998, Arthritis and Rheumatism, 41(10) 1760-1771), і на даний час таке антитіло, як, наприклад, зв'язувальні домени M71, здатне блокувати систему вивільнення цитокінів. Антитіла даного винаходу M55, M64, 25 M69 і M71 в системі, в якій проводиться кокультивування мікрофагів і хондроцитів, демонструють здатність до підвищення синтезу протеогліканів, який перевищує рівень, спостережуваний за відсутності ОМ-специфічного антитіла.

Автори даного винаходу далі показали, що введення нейтралізуючого анти-ОМ антитіла даного винаходу може пригнічувати викликане ОМ вивільнення таких цитокінів і хемокинів *in vivo*, як ІЛ-6, ІР-10 і КС. ІР-10, індукований інтерфероном-гамма протеїн масою 10 кДа, або малий індукований цитокін В10, є білком, який у людини кодується геном CXCL10 (С-Х-С мотив хемокіну 10). CXCL10 був пов'язаний з деякими біологічними ролями, такими як хемоатракція моноцитів/макрофагів, Т-клітин, НК-клітин і дендритних клітин і стимуляція адгезії Т-клітин до ендотелію. КС, тепер відомий як ліганд 1 (CXCL1) хемокіну з мотивом С-Х-С, є малим цитокіном, що належать до сімейства хемокіну CXС, який раніше називався GRO1-онкогеном, 35 GRO α , нейтрофілактуючим протеїном 3 (NAP-3) і стимулюючим активатором росту меланоми альфа (MSGA- α). У людей цей білок кодується геном CXCL1. CXCL1 експресується макрофагами, нейтрофілами і епітеліальними клітинами, і він має хемоатрактантну активність для нейтрофілів.

40 Тому, відповідно до даного винаходу, в цьому документі пропонується використання антитіла або фрагмента антитіла, вибраного з групи M5, M6, M9, M10, M42, M45, M53, M54, M55, M62, M63, M65, M66, M67, M68, M69, M71 і M83, для виробництва лікарського препарату для лікування або профілактики захворювань суглобів, пов'язаних з деградацією протеогліканів, таких як остеоартрит, запальна артропатія або запальні розлади. Конкретним використанням антагоніста ОМ є виробництво лікарського препарату, який запобігає або зменшує синтез колагену в хрящі. Винахід далі передбачає спосіб лікування або профілактики запальної артропатії або запального розладу, який полягає у введенні ефективної кількості антитіл, які блокують зв'язування ОМ з gr130 у пацієнтів, що страждають даними розладами.

Антитіло даного винаходу може використовуватися при підготовці до лікування запальних процесів, при яких ОМ прямо або непрямо, наприклад за допомогою вивільнення прозапальних цитокінів, приводить до патологічних змін в тканинах або органах, особливо в шкірі, легенях і суглобах. Такі патології включають остеоартрит, ревматоїдний артрит, псоріатичний артрит, анкілозуючий спондиліт, нейропатичну артропатію, реактивний артрит, артропатію при ураженні обертачів плеча, гостру ревматичну пропасницю, синдром Рейтера, прогресуючий системний склероз, первинний біліарний цироз печінки, пемфігоїд, некротичний васкуліт, важку псевдопаралітичну міастенію, розсіяний склероз, червоний вовчак, поліміозит, саркоїдоз, гранулематоз, васкуліт, перніціозну анемію, запальне порушення ЦНС, захворювання, зумовлене дією комплексу антиген-антитіло, аутоімунну гемолітичну анемію, тиреоїдит Хашимото, хворобу Грейвса, хворобу Рейно, гломерулонефрит, дерматоміозит, хронічний 60 активний гепатит, целіакію, аутоімунні ускладнення СНІДу, атрофічний гастрит, хворобу

Аддісона, ендотоксикоз або септичний шок (сепсис) або один або більше симптомів сепсису і інших видів гострого або хронічного запалення. Пацієнти, які, зокрема, здатні одержати для себе користь з даного способу лікування, страждають від інфекцій, викликаних *E. coli*, *Haemophilus influenza B*, *Neisseria meningitides*, стафілококів або пневмококів. Пацієнти з ризиком сепсису включають пацієнтів, що страждають від опіків, ран, ниркової або печінкової недостатності, травм, імунодефіциту (ВІЛ), гемопоетичних неоплазій, множинної мієломи, хвороби Кастлемана або міксому серця.

Інші стани, які пов'язані з ОМ і піддаються лікуванню або превентивній терапії антитілами даного винаходу, включають склерозуючі захворювання, такі як легеневий фіброз, діабетична нефропатія, ідіопатичний легеневий фіброз, системна склеродермія і цироз. Іншим показанням до використання антитіл даного винаходу є лікування або профілактика ноцицептивного болю, що зачіпає нейрони дорсальних корінцевих гангліїв.

Введення і дозування

Винахід передбачає наявність стабільних складів антитіл, які нейтралізують ОМ і переважно є водними розчинами фосфатного буфера або розчинами суміші солей, а також консервованими розчинами і складами, як і консервованими складами для багаторазового використання, які придатні для фармацевтичного і ветеринарного застосування і містять щонайменше одне ОМ-нейтралізуюче антитіло в фармацевтично прийнятному складі. Допустимі для цілей даного винаходу несучі середовища і їх композиція з можливістю введення інших білків людини, наприклад сироватковий альбумін людини, описані, наприклад, в публікації Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Troy D.B. ред., Lipincott Williams and Wilkins, Філадельфія, Пенсільванія, 2006, Частина 5, Pharmaceutical Manufacturing на стор. 691-1092, особливо див. стор. 958-989.

Описане в цьому документі ОМ-нейтралізуюче антитіло в стабільному або консервованому складі або розчині може бути введене пацієнту відповідно до даного винаходу за допомогою множини шляхів введення, включаючи внутрішньовенний (в/в); внутрішньом'язовий (в/м); підшкірний (п/ш); трансдермальний; легеневий; черезслизовий; використання складу в імплантаті, осмотичному насосі, картриджі, мікронасосі або інших засобах, які добре відомі фахівцям в даній галузі техніки.

Наприклад, можливе направлене введення в ту або іншу частину тіла або порожнину, таке як внутрішньосуглобове введення, всередину бронха, внутрішньоочеревинне, всередину капсули, хряща, порожнини, інтрацеліальне, всередину мозочка, шлуночка мозку, всередину товстої кишки, шийки, шлунка, печінки, міокарда, всередину кістки, таза, перикардія, порожнини живота, плеври, простати, легені, всередину прямої кишки, всередину нирки, сітківки, хребта, суглобової сумки, грудної клітки, всередину матки, сечового міхура, всередину пошкодженої тканини, вагінально, ректально, за щок, під язик, інтраназально або трансдермально.

Загалом, при системному введенні антитіл бажано давати реципієнту дозу антитіл в діапазоні 1 нг/кг - 100 нг/кг, 100 нг/кг - 500 нг/кг, 500 нг/кг - 1 мкг/кг, 1 мкг/кг - 100 мкг/кг, 100 мкг/кг - 500 мкг/кг, 500 мкг/кг - 1 мг/кг, 1 мг/кг - 50 мг/кг, 50 мг/кг - 100 мг/кг, 100 мг/кг - 500 мг/кг (ваги тіла реципієнта), хоч можливе застосування більш низьких або більш високих доз. Звичайно, придатні дозування антагоніста даного винаходу можуть варіюватися залежно від таких факторів, як захворювання або розлад, який піддається лікуванню, шлях введення, вік і вага індивідуума, який піддається лікуванню, і природа антагоніста. Без прив'язки до якої-небудь конкретної дози вважається, що при парентеральному введенні денне дозування складає від 0,01 до 20 мг/кг антитіла (або іншої великої молекули) даного винаходу (звичайно присутнє як частина вказаної вище фармацевтичної композиції), яке придатне для лікування звичайної дорослої людини.

Лікувати пацієнта можна однократною дозою або - що переважніше - по схемі з багаторазовим введенням препарату, при цьому первинний курс лікування може складатися з 1-10 доз, і далі через певні проміжки часу, так, щоб імунна відповідь зберігалася або посилювалася (наприклад, через 1-4 місяці друга серія доз і, за необхідності, ще через декілька місяців наступна серія). Приклади допустимих схем лікування включають: (i) 0, 1 місяць і 6 місяців, (ii) 0, 7 днів і 1 місяць, (iii) 0 і 1 місяць, (iv) 0 і 6 місяців або інші схеми, достатні для викликання бажаних відповідей, при яких очікується зменшення симптомів захворювання або зменшення тяжкості захворювання.

Антитіла даного винаходу можуть використовуватися окремо або в комбінації з імуносупресивними агентами, такими як стероїди (преднізолон і т. д.), циклофосфамід, циклоспорин А або аналоги пуринів (наприклад, метотрексат, 6-меркаптопурин і т. п.), або антитілами, такими як антитіла до антилімфоцитарного антигену, антитіла до антилейкоцитарного антигену, антагоністи ФНО, наприклад анти-ФНО антитіла або інгібітори

ФНО, наприклад розчинний рецептор ФНО, або такі агенти, як НПЗЗ або інші інгібітори цитокінів.

Таблиця послідовностей

№ ПОСЛ.:	Опис	Послідовність і властивості
1	IGHV1-69*01 людини	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGGTFS SYX ₁ ISWVRQA PGQGLEWMGX ₂ IX ₃ X ₄ X ₅ X ₆ GTANY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAR, де X ₁ є A або G; X ₂ є G або W; X ₃ може бути I або S; X ₄ може бути P або A; X ₅ може бути I або Y; i X ₆ може бути F або N
2	IGHV3-23*01 людини	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS X ₁ YX ₂ MX ₃ WVRQA PGKGLEWVSX ₄ IX ₅ X ₆ X ₇ GX ₈ STYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAK, де X ₁ може бути S, D, N або T; X ₂ може бути A, G або W; X ₃ може бути S або H; X ₄ може бути V, A, N або G; X ₅ може бути S, N, K або W; X ₆ може бути Y, S, G або Q; X ₇ може бути S або D; i X ₈ може бути S або G
3	IGHV5-51*01 людини	EVQLVQSGAE VKKPGESLKI SCKGSGYSFT X ₁ YWIX ₂ WVRQM PGKGLEWMGX ₃ IX ₄ PX ₅ DSX ₆ TRY SPSFQGQVTI SADKSISTAY LQWSSLKASD TAVYYCAR, де X ₁ може бути S, N або T; X ₂ може бути S або G; X ₃ може бути I або R; X ₄ може бути D або Y; X ₅ може бути G або S; X ₆ може бути D або Y
4	JH людини	WGQGTTLTVSS
5	IGKV1-39*01 людини (O12)	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSI X ₁ X ₂ X ₃ LNWYQQKP GKAPKLLIYX ₄ ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYC, де X ₁ може бути A, D, N, S або R; X ₂ може бути D, G, K, N або S; X ₃ може бути A, D, F, H, N, S, W, V або Y; X ₄ може бути A, D, F, G, K, N, T або Y
6	IGKV3-11 (L6)	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSV X ₁ X ₂ X ₃ LAWYQQKP GQAPRLLIYX ₄ ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLPEP EDFAVYYC, де X ₁ може бути A, D, N, R або S; X ₂ може бути D, K, N або S; X ₃ може бути A, D, F, H, N, S, W або Y; X ₄ може бути A, D, K, G, F, T або N
7	IGKV3-20 людини (A27)	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCX ₁ X ₂ X ₃ X ₄ SVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY X ₅ ASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYC, де X ₁ може бути D, N, S, R або T; X ₂ може бути N, S або R; X ₃ може бути A, D, H, N, S або R; X ₄ може бути E, F, H, K, Q, S або Y; X ₅ може бути A, D, G або S
8	IGKV4-1*01 людини (B3)	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSVL X ₁ SSNNX ₂ NX ₃ LA WYQQKPGQPP KLLIYX ₄ ASTR ESGVPDRFSG SSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYC, де X ₁ може бути A, F, H, S або Y; X ₂ може бути E, K, N або T; X ₃ може бути A, D, F, H, N, S, W або Y; X ₄ може бути A, D, S, W або Y
9	JK4	FGQGTKVEIK
10	Формула L-CDR3	QQX ₁ X ₂ X ₃ X ₄ PX ₅ T, де X ₁ може бути A, D, F, H, P, S або Y; X ₂ може бути D, E, G, H, I, K, N, R, T або Y; X ₃ може бути D, G, H, K, N, S, T або R; X ₄ може бути F, I, L, N, R, W або Y, як визначено в Таблиці 2

№ ПОСЛ.:	Опис	Послідовність і властивості
11	Послідовність білка ОМ людини	AAIGSCSKEYRVLLGQLQKQTDLMQDTSRLDPYIRIQGLDVPKLR EHCR ERPGAFPSEETLRGLGRRGFLQTLNATLGCVLHRLADLEQRLPKA QDLER SGLNIEDLEKLQMARPNILGLRNNIYCMAQLLDNSDTAEPTKAGRG ASQP PTPTPASDAFQRKLEGCRFLHGYHRFMHSVGRVFSKWGESPNR SRRHSPH QALRKGVRRTRPSRKGKRLMTRGQLPR
12	Білок ОМ яванської макаки (<i>Macaca fascicularis</i>)	AAMGSCSKEYRMLLGQLQKQTDLMQDTSRLDPYIRIQGLDIPKL REHCR ESPGAFPSEETLRGLGRRGFLQTLNATLGRVLHRLADLEQHLPKA QDLER SGLNIEDLEKLQMARPNVLGLRNNIYCMAQLLDNSDMTEPTKAGR GTPQP PTPTPTSDVFQRKLEGCSFLRGYHRFMHSVGRVFSKWGESPNRS RRHSPH QALRKGVRRTRPSRKGKRLMTRGQLPR
13	H2 H-CDR1	SYAIS
14	H14 & H17 H-CDR1	SYWIS
15	H135 H-CDR1	SYWIG
16	H2 H-CDR2	GIPIFGNANYAQKFQG
17	H14 & H17 H-CDR2	IIYPGDSYTRYSPSFQG
18	H135 H-CDR2	IIYPGDSYTRYSPSFQG
19	H2 H-CDR3	YGAKGLLDY
20	H14 H-CDR3	GSVFEAYFDY
21	H17 H-CDR3	VPVSPAYLDY
22	H135 H-CDR3	GFGASYLDY
23	B3 & L2 L-CDR1	KSSQSVLYSSNNKNYLA
24	L12 L-CDR1	KSSQSVLSSNNENWLA
25	L111 L-CDR1	KSSQSVLASSNNNNFLA
26	B3 L-CDR2	WASTRES
27	B3 L-CDR3	QQYYSTPL
28	L2 L-CDR3	QQSFSFPI
29	Консенсус L-CDR3	QQ-(SY)-(FY)-S-(FT)-PLT
30	L171-CDR1	KSSQSVLSSGNNNGNYLA
31	L172-CDR1	KSSQSVLSSGNNHNYLA
32	L173-CDR1	KSSQSVLSSRGNNNYLA
33	L174-CDR1	KSSQSVLGSWGNDNYLA
34	L175-CDR1	KSSQSVLYSGGNGNYLA
35	L176-CDR1	KSSQSVLGSWGNGHYLA
36	L177-CDR1	KSSQSVLSSNGNHNYLA
37	L178-CDR1	KSSQSVLSSDGNHNYLA
38	L180-CDR1	KSSQSVLGSSSNINFLA
39	L182-CDR1	KSSQSVLGSGDNRNYLA
40	L184 & L186 L- CDR1	KSSQSVLGSGYNRNYLA
41	L192 L-CDR1	KSSQSVLGSWHNDNYLA
42	L-CDR2	KASTRES
43	L180-CDR2	SASTRES
44	L182-CDR2	NASTRES
45	L175-CDR3	QQYSTTPLT
46	L180-CDR3	QQYFSTPIT
47	Повторно вибраний консенсус L-CDR3	QQY-(F,Y)-STP-(L,I)-T

№ ПОСЛ.:	Опис	Послідовність і властивості
48	H-FR1-CDR1-FR2- CDR2-FR3	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWISWVRQMPGKG LEWMG IIYPGDSYTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYY C
49	L173	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLSSRGNNNYLAWYQQK PGQPPKLLIY KASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYST PL
50	L178	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLSSDGNHNYLAWYQQK PGQPPKLLIY KASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYST PL
51	L180	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLGSSSNINFLAWYQQK PGQPPKLLIY SASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYFST PI
52	L185	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLSSGGNWNLYLAWYQQ KPGQPPKLLIY WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYTT PL
53	L186	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLSSGSNRNYLAWYQQK PGQPPKLLIY WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYST TPL
54	H14	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWISWVRQMPGKG LEWMG IIYPGDSYTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYY CARGSVFEAYFDY
55	H17	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWISWVRQMPGKG LEWMG IIYPGDSYTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYY CARVPVSPAYLDY
56	AviTag	GLNDIFEAQKIEWHE

Даний винахід далі буде розглянутий з посиланням на конкретні, але не обмежувальні приклади.

ПРИКЛАД 1. РЕАГЕНТИ І АНАЛІЗИ

- 5 Для вибору і характеристики ОМ-зв'язувальних антитіл були створені конструкти з ОМ людини і макак, які дозволяють оцінити експресію в клітині ссавця. Людський ОМ (NP_065391, що кодується NM_020530) є попередником з 252 амінокислот, який процесується в непроцесований секретований білок з 227 амінокислот (SEQ ID NO: 11), який є пропротеїном, який далі процесується в більш активну зрілу форму з амінокислот 1-184. кДНК людського ОМ
- 10 була замовлена в OriGene (Кат. № SC121421), і відкрита рамка зчитування людського ОМ з клону OriGene була ампліфікована за допомогою ПЛР, сигнальний пептид (мишачий IgG1) був введений окремо з гексагістидиновою міткою для очищення білка, а AviTag (SEQ ID NO: 56) - для направленої обробки білка біотином. Останній реагент був вибраний для запобігання випадковому хімічному біотинілюванню залишків лізину, присутніх в області, в якій ОМ
- 15 взаємодіє з рецепторами.

- ОМ яванських макак був клонований з РНК мононуклеарних клітин периферичної крові макак за допомогою першої системи синтезу ниток Superscript III (InVitrogen) для одержання кДНК, після чого вона була ампліфікована за допомогою ПЛР і нетрансльованих областей праймерів, створених з послідовності людського ОМ, як описано в заявці на патент США Сер. № 12/648430. Експресований непроцесований білок наведений в SEQ ID NO: 12 з розщепленою активною формою, представленою 184 залишками 51-227.
- 20

- Попередники зрілі форми ОМ людини і макак були експресовані клітинами HEK 293 і очищені за допомогою стандартних способів. Функціональна активність білків була вивчена під час аналізів проліферації клітин A375-S2 і сигнальної активності pSTAT3, причому як контроль
- 25 використовувався одержаний з *E. coli* наявний в продажу людський ОМ (R&D Systems, Кат. № 295-OM).

Mab

У випадку, якщо використовувалися контрольні антитіла, були використані людські антитіла ізотипу IgG1, позначені як CNT06234.

Хімічне біотинілювання

5 Рекомбінантний людський ОМ був біотинілюваний за допомогою ефіру N-гідроксисукциніміду (набір для біотинілювання EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit, Pierce, № 21435), що направлено впливає на амініні залишки цитокінів. Реакція приєднання біотину була оптимізована для ефективного мічення мішеней одним молем біотину на моль антигену. Останнє мінімізує втрату зв'язувальної і функціональної активності, тим самим забезпечуючи
10 майже повне мічення сукупності білків. Після завершення реакції білок очищається від незв'язаного біотинового реагенту і відхідних груп, що залишилися, за допомогою центрифужних колонок Zeba Desalt Spin Column, які включені в набір для біотинілювання EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit (Pierce). Було відновлено приблизно 80% вихідного матеріалу. Аналіз з 2-п-гідроксифенілазобензойною кислотою (набір Pierce Biotin Quantitation
15 Kit, № 28005) був використаний для оцінки рівня вбудовування біотину, який орієнтовно вказує на один моль біотину на моль людського ОМ. Прилад Octet (FortéBIO) був використаний для перевірки зв'язування стрептавідину і gp130-Fc (R&D Systems, Кат. № 671-GP) з біотинілюваним білком. Вимірювання за допомогою приладу Octet показали, що профіль зв'язування біотинілюваного ОМ з gp130 по суті аналогічний такому для неміченого вихідного
20 матеріалу.

Направлене біотинілювання In Vitro

AviTag із 15 залишків (GLNDIFEAQKIEWHE) (SEQ ID NO: 56) має схожу кінетику з'єднання з біотином з ендogenous BirA і субстратом BCCP (Beckett et al. 1999, Protein Science). Після зв'язування білка, що представляє інтерес, з AviTag, що має один акцепторний залишок лізину,
25 він може бути біотинілюваний тільки в одному положенні. Рекомбінантний ОМ макак був направлено біотинілюваний *in vitro* за допомогою біотин-протеїн лігази і наявних в продажу реагентів для визначення авідності. Біотинілюваний ОМ макак був очищений за допомогою моновалентної смоли, афінної до стрептавідину. Якість одержаного білка була оцінена за допомогою ДСН-ПААГ-електрофорезу ексклюзивної ВЕРХ. Аналіз з 2-п-гідроксифенілазобензойною кислотою (набір Pierce Biotin Quantitation Kit, № 28005) був
30 використаний для оцінки рівня вбудовування біотину, який орієнтовно вказує на один моль біотину на моль ОМ макак. Прилад Octet (FortéBIO) був використаний для перевірки зв'язування стрептавідину і химери gp130-Fc з біотинілюваним білком. Вимірювання за допомогою приладу Octet показали, що профіль зв'язування біотинілюваного ОМ макак з gp130 по суті аналогічний такому для неміченого вихідного матеріалу.
35

Твердофазні імуноаналізи

Початковий пенінг фагових Fab-фрагментів був здійснений за допомогою планшетів для твердофазного ІФА NEUTRAVIDIN™ (Pierce), покритих 2 мкг/мл біотинілюваного ОМ людини або ОМ макак в TBS. Після інкубації протягом ночі при 4°C, блокування і промивання,
40 розведення 1:100 на кожному етапі пенінгу були додані поліклональні фагові пули. Зв'язані фаги були виявлені за допомогою моноклонального антитіла, кон'югованого з пероксидазою хрому і специфічного до pVIII, який є головним оболонковим білком фага M13 (GE Healthcare, Кат. № 27-9421-01), після чого була додана хемілюмінесцентна підкладка з пероксидази (Roche, Кат. № 11582950001), і фаги були зчитані за допомогою приладу PerkinElmer.

45 Первинний пошук окремих клонів був проведений за допомогою секретованого розчинного Fab-His-білка з супернатантів *E. coli*. Бактеріальні супернатанти, що містять Fab-His-білок, були використані для зв'язування в умовах твердофазного ІФА. Планшети Black MaxiSorp (Nunc, Кат. № 437111) були покриті 1 мкг/мл овечих антилюдських Fd (CH1) антитіл (The Binding Site, Кат. № PC075) і інкубовані при 4°C протягом ночі. Після блокування і промивання планшетів було
50 додано 50 мкл нерозведеного бактеріального супернатанту (що містить Fab-His-білок), після чого було продовжене інкубування протягом 1 години при кімнатній температурі і акуратному струшуванні. Планшети були промиті, після чого до зв'язаних Fab-фрагментів було додано 20 нМ біотинілюваного ОМ людини або макак. Після 1 години при кімнатній температурі був доданий кон'югат стрептавідин-пероксидази хрому (Invitrogen, Кат. № 43-4323), після чого було
55 проведено хемілюмінесцентне виявлення описаним вище способом. Було розраховано, що перевірка первинного зв'язування за допомогою твердофазного ІФА з людським ОМ в концентрації 20 нМ дозволяє виявити клони з афінністю в наномолярному діапазоні афінності.

Сортування епітопів

60 Сортування епітопів є конкурентним аналізом, що проводиться для угруповання МАВ на основі зв'язувальних характеристик за допомогою моноклональних конвертованих людських

IgG1 і наявних в продажу антитіл MAB29, які відомі як блокатори рекрутингу OSMR β /LIFR α (R-блокатори).

У кожному ямку 384-ямкового планшета Multi-Array (Meso Scale Discovery (MSD), L25XA-4) було додано 2,5 мкг/мл антилюдського Fc (Jackson Immuno, 709-005-149) в фосфатно-сольовому буфері (PBS) з pH 7,4 (Sigma, P3813). Планшет був інкубований при 4°C протягом ночі, а потім блокований 50 мкл блокатора A MSD при кімнатній температурі протягом 1 години. 384-ямковий планшет Multi-Array був промитий три рази (PBS, pH 7,4, 0,05% полісорбат 20 (Scyteck, PBT010)), і в кожному ямку було додано 1,0 мкг/мл розчину досліджуваних mAb з подальшим струшуванням на 6 рівні струшувача титрувального планшета при кімнатній температурі протягом 1 години. Як і раніше, планшет був промитий три рази.

Паралельно цьому 5 мкг/мл розчин конкуруючих mAb і 1 мкг/мл біотинільованого OM (R&D Systems, 295-OM-010/CF) були змішані на окремому 96-ямковому планшеті (COSTAR, 3357) в буфері для аналізу MSD (1:3 блокувального буфера з PBS, pH 7,4, і 0,05% полісорбатом 20) і струшувалися на 3 рівні струшувача титрувального планшета при кімнатній температурі протягом 1 години. Прекомплекс конкуруючого антитіла і біотинільованого OM був доданий в кожному ямку 384-ямкового планшета Multi-Array і перемішаний (на рівні 6 струшувача титрувального планшета) при кімнатній температурі протягом 1 години. Планшет був промитий три рази, і в кожному ямку був доданий стрептавідин sulfo TAG (MSD, R32Ad-S) і перемішаний (на рівні 6 струшувача титрувального планшета) при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Планшет був промитий три рази, і в кожному ямку був доданий буфер T для зчитування, розведений у відношенні 1:4 дистильованою водою (MSD, R92TC-1). Планшет був зчитаний за допомогою приладу MSD S6000.

Дані були інтерпретовані на основі сигналів, одержаних для досліджуваних mAb в присутності біотинільованого OM і без якого-небудь конкуруючого mAb (максимальний сигнал), разом з сигналами при самоконкуренції (зменшення максимального сигналу в 2-4 рази). Конкуруючий аналіз епітопів був завершений, коли значення, одержане в присутності конкуруючого mAb, було в межах трьох стандартних відхилень від значення, одержаного при самоконкуруючому аналізі.

Клітини A375

Клітини A375 (ATCC; CRL-1619) є клітинами людського епітелію, одержаними із злоякісної меланоми. Клітини A375-S2 (ATCC; CRL-1872, сублінія CRL-1619, чутлива до ІЛ-1) культивуються в готовому поживному середовищі (DMEM/GlutaMax-I, Gibco) з додаванням 10% фетальної бичачої сироватки (FBS, Gibco) в колби з культурою T-175 (Corning; Кат. № 431080), і пасивуються, коли протягом кожних трьох-чотирьох днів відбувається приблизно 80% злиття зі співвідношенням субкультур 1:20.

Аналіз проліферації клітин A375-S2 (включення 5-бромдезоксіуридину)

Зменшення проліферації клітин A375-S2 під дією OM людини або яванських макак було виміряне по включенню 5-бромдезоксіуридину за допомогою хемілюмінесцентного твердофазного ІФА. Онкостатин М знижує проліферацію в лінії клітин меланоми людини A375-S2 (Zarling et al. PNAS, 83:9739-9743). Ця клітинна лінія була використана для оцінки активності антитіл до онкостатину М на всіх стадіях виявлення антитіл. Клітини A375-S2 були поміщені в колби з культурою тканини T-150 (BD Falcon 35-5001) в DMEM (модифіковане за способом Дульбекко середовище Ігла, Gibco 11995) + 10% FBS (Gibco 16140) + 1% Pen-Strep (пеніцилін/стрептоміцин, Gibco 15140) при 37°C в 95% O₂ - 5% CO₂, і розводилися при пересіванні у співвідношенні 1:10 два рази на тиждень.

Для проведення аналізу проліферації клітини були трипсинізовані (0,25%, Gibco 25200) для їх видалення з колб T-150, а потім поміщені на планшети з густиною 2000 клітин на ямку у внутрішні 48 ямок чорних планшетів, оброблених тканинною культурою (BD Falcon 353948), з 200 мкл DMEM/FBS/Pen-Strep. Після інкубації протягом ночі при 37°C/95% O₂ - 5% CO₂ середовище було видалене і замінено 180 мкл свіжого середовища. Був підготовлений окремий планшет, що містить всі досліджувані розчини з десятикратною кінцевою концентрацією. З цього планшета 20 мкл було перенесено у відповідну ямку з клітинною пластинкою для створення належних умов для експерименту. Кожні експериментальні умови перевірялися на трьох екземплярах. У будь-якому експерименті, в якому оцінюється нейтралізація, в клітини додаються антитіло і онкостатин М, після чого вони інкубуються разом щонайменше протягом 1 години. Потім планшети інкубуються при 37°C/95% O₂ - 5% CO₂ протягом додаткових 72 годин. У цей час проводиться хемілюмінесцентний аналіз проліферації клітин способом твердофазного ІФА з 5-бромдезоксіуридином (Roche 11669915001). Реагент для мічення 5-бромдезоксіуридину додається в культуру на 4 години. Потім середовище видаляється, і в кожному ямку додається 100 мкл фіксуючого розчину. Після 30 хвилин при

кімнатній температурі розчин видаляється, і в кожную ямку додається по 100 мкл розчину анти-5-бромдезоксіуридин-пероксидази. Після 2 годин при кімнатній температурі планшет був промитий PBS-полісорбатом, і в кожную ямку було додано по 100 мкл Super Signal Pico (Thermo Scientific 37069). Потім люмінесценція була зчитана за допомогою приладу Perkin Elmer Victor3.

Вихідні експерименти були проведені для визначення дозозалежної відповіді на рекомбінантний онкостатин М людини і яванських макак, який був виділений з клітин CHO, одержаних внутрішньолабораторно, при пригніченні проліферації. OM був досліджений з початковою концентрацією 100 нг/мл з 1-5 розведеннями до кінцевої концентрації 0,0244 нг/мл. Процентне пригнічення проліферації було розраховане в порівнянні з клітинами, обробленими розчинником. Результати цього експерименту показані на фіг. 2А. Підвищення концентрації онкостатину М людини і макак відповідає зменшенню вбудовування 5-бромдезоксіуридину. Антипроліферативна активність онкостатину М людини і яванських макак невідмітна одна від одної і ґрунтується на мірі антипроліферативної активності і ефекті EC50.

На основі даних експериментів можна сказати, що концентрація 2 нг/мл онкостатину М була використана для оцінки і порівняння антитіл проти онкостатину М, оскільки ця концентрація інгібує проліферацію приблизно на 80%, утворюючи велике вікно, в якому можна визначати дозозалежну відповідь на антитіла. Повний діапазон доз антитіл був оцінений в присутності 2 нг/мл онкостатину М людини або макак. Крім того, в експеримент був включений контроль ізотипів при використанні більш високих концентрацій антитіл до онкостатину М. Вікно аналізу було визначене по різниці між необробленими контрольними ямками (з максимальною проліферацією) і ямками, інкубованими з 2 нг/мл одного онкостатину М (з мінімальною проліферацією), і в цьому вікні визначається процент нейтралізації при будь-якій концентрації.

Аналіз сигнальної активності pSTAT3 за допомогою A375-S2 Phospho-STAT3 Assay

OM інгібує ріст клітин A375-S2 шляхом зв'язування з рецептором gp130 на поверхні клітин і індукуювання гетеродимеризації рецептора, що дозволяє OSMR β запустити каскад внутрішньоклітинних сигнальних реакцій, які включають активацію (фосфорилювання) сигнальної молекули STAT3 (Kortylewski et al. *Oncogene*, 18:3742-3753, 1999). Порухення сигнальної активності STAT3 припиняє викликане OM пригнічення росту клітин A375-S2, тим самим демонструючи, що активація STAT3 є ключовим кроком в сигнальній активності OM (Heinrich et al. *Biochem. J.* 374:1-20, 2003). Було показано, що фосфорилювання STAT3 в клітинах A375-S2 залежить від концентрації OM, і за допомогою наявних в продажу наборів можливо його виміряти в стимульованих клітинах. Нейтралізація OM-індукованого фосфорилювання STAT3 в клітинах A375-S2 була вибрана як головний аналіз при відборі кандидатів для Mab.

Для нейтралізації антитіл при OM-індукованому фосфорилюванні STAT3 клітини A375-S2 були висіяні в 96-ямкові планшети з тканинною культурою (Corning; Кат. № 3596) в кількості 25000 клітин на ямку в 200 мкл готового поживного середовища і інкубовані протягом 24 годин. Клітини були оброблені розчином, що містить 5 нг/мл людського OM (рекомбінантного OSMN1-1, одержаного з клітин ссавців), який був попередньо інкубований протягом 3 годин при кімнатній температурі з серійно розведеними експериментальними mAb у співвідношенні 1:5 з початковою концентрацією 10 мкг/мл. Контролі включали необроблені клітини, стимульовані клітини (5 нг/мл тільки OM) і контрольні mAb ізотипу hlgG1. Всі обробки проводилися в трьох екземплярах, якщо не було вказане інше.

Аналіз вмісту pSTAT3 проводився за допомогою набору Phospho-STAT3 Whole-Cell Lysate Kit (MSD; Кат. № K150DID-1, Серія № K0010570) відповідно до протоколу виробника. Коротко, клітини оброблялися в ямці об'ємом 200 мкл протягом 10 хвилин; розчини для обробки видалялися, і за допомогою багатоканальної піпетки було додано 50 мкл буфера для лізису клітин MSD. Планшет поміщався в орбітальний струшувач (при 300 обертах на хвилину) на 5 хвилин. Після цього 30 мкл кожного лізату переносилося на 96-ямковий планшет MSD phospho-STAT3. Планшет герметизували і поміщали в орбітальний струшувач (при 300 обертах на хвилину) на 1 годину при кімнатній температурі, промивали три рази 150 мкл промивального буфера MSD, і в кожную ямку додавали по 25 мкл кон'югата вторинних детекторних антитіл (анти-pSTAT3-Ru(bpy)32+), після чого планшет знов герметизувався і інкубувався на орбітальному струшувачі (при 300 обертах на хвилину) протягом 1 години при кімнатній температурі. Планшет попередньо промивався, і в кожную ямку було додано по 150 мкл буфера для зчитування MSD (розчину трипропіламіну). Планшет був зчитаний за допомогою приладу MSD SECTOR Imager 6000.

Повні криві дози-відповіді EC50 для вбудованих зрілих, споріднених і контрольних mAb були одержані і зображені як нормалізований процент сигналу pSTAT3.

Вимірювання афінності за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (Biacore)

Зв'язувальна здатність була виміряна за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (SPR) на оптичному біосенсорі Biacore 3000 (Biacore) з використанням конструктивів OM людини або макак описаним тут способом. Поверхня біосенсора була підготовлена шляхом з'єднання суміші антитіл анти-IgG Fc (антимішачих (Jackson, Кат. № 315-005-046) і антилюдських (Jackson, Кат. № 109-005-098)) з поверхнею карбоксиметильованого декстрану чипа CM-5 (Biacore, Кат. № BR-1000-14) з використанням інструкцій виробника для проведення реакції амінування. Приблизно 19000 ОВ (одиниць відповіді) анти-OM антитіл було іммобілізовано на кожній з чотирьох проточних комірок. Кінетичні експерименти були проведені при 25°C в рухомому буфері (DPBS (фосфатно-сольовий буфер Дульбекко) + 0,005% P20 + 3 мМ ЕДТО). У рухомому буфері були приготовані серійні розведення ECD OM людини і макак від 100 нМ до 0,412 нМ. Близько 200 ОВ mAb було захоплено проточними комірками 2-4 сенсорного чипа. Проточна комірка 1 була використана як поверхня порівняння. Захоплення mAb супроводжувалося трихвилинним введенням (фаза асоціації) антигену зі швидкістю 50 мкл/хв., після чого протягом 10 хвилин подавався буфер (фаза дисоціації). Поверхня чипа була регенерована двома викидами у вигляді 18-секундних введень 100 мМ H₃PO₄ (Sigma, Кат. № 7961) зі швидкістю 50 мкл/хв.

Зібрані дані були оброблені за допомогою програмного забезпечення BIAevaluation (Biacore, версія 3.2). По-перше, проводили подвійне еталонне віднімання даних, віднімаючи графіки, одержані при ін'єкції буфера, з еталонних графіків, одержаних при ін'єкціях аналізованих речовин. Кінетичний аналіз даних був проведений за допомогою описаної загальної моделі зв'язування в пропорції 1:1. Результат для кожного mAb реєстрували в форматі k_a (швидкість асоціації), k_d (швидкість дисоціації) і K_D (константа спорідненості).

ПРИКЛАД 2. ВИБІР OM-ЗВ'ЯЗУВАЛЬНИХ Fab-ФРАГМЕНТІВ

Бібліотеки Fab-pIX *de novo* були описані Shi et al. J. Mol. Biol. 397:385-396, 2010; в міжнародній заявці WO 09085462A1; патенті США Сер. № 12/546850; і вище в цьому документі позначені як 169, 323 і 551, що відповідає використаним людським зародковим каркасним ділянкам важких ланцюгів: IGHV1-69 (SEQ ID NO: 1), IGHV3-23 (SEQ ID NO: 2) або IGHV5-51 (SEQ ID NO: 3) по номенклатурі IMGT. Бібліотека каркасних ділянок трьох важких ланцюгів комбінуються з бібліотекою каркасних ділянок VL_{каппа} чотирьох легких ланцюгів: A27 (IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 5)), B3 (IGKV4-1*01 (SEQ ID NO: 6)), L6 (IGKV3-11*01 (SEQ ID NO: 7)) і O12 (IGKV1-39*01 (SEQ ID NO: 8)). У бібліотеках Fab-фрагментів V-ділянки завершуються додаванням J-ділянки (FR4), що містить SEQ ID NO: 4 у важких ланцюгах і SEQ ID NO: 10 в легких ланцюгах. Важкий ланцюг CDR3 має варіабельну довжину в 7-14 залишків. Приклади цілих V-ділянок з кожної бібліотеки показані на фіг. 1, і пронумеровані ділянки CDR показані відповідно до нумерації по Кебату.

Вихідний набір анти-OM попадань в фаговому дисплеї був ідентифікований за допомогою доступного в продажу аглікозилованого людського OM. Бібліотеки фагових дисплеїв Fab-pIX були розділені способом пенінгу з використанням захоплення біотинільованого людського OM (R&D Systems, Кат. № 295-OM) на парамагнітних гранулах стрептавідину (SA) (Invitrogen, Кат. № 112.05D) відповідно до опублікованого протоколу для відбору фарів (Marks and Bradbury, Antibody Engineering, Vol. 248:161-176, Humana Press, 2004). Коротко, біотинільований людський OM був доданий до фагової бібліотеки, яка була попередньо абсорбована на некон'югованих гранулах, до одержання кінцевої концентрації 100 нМ і інкубований протягом 1 години при легкому обертанні. Блоковані гранули SA були додані і інкубовані протягом 15 хвилин для захоплення біотинільованого OM зі зв'язаним фагом. Захоплений магнітом комплекс фага/антигену/гранули був промитий 5 разів 1 мл TBST (буферного розчину Tris і полісорбату 20) і однократно 1 мл TBS. Після видалення залишків від промивання TBS був доданий 1 мл експоненціально зростаючих клітин TG1 (Stratagene, Кат. № 200123) і інкубований при 37°C протягом 30 хвилин без струшування. Інфіковані бактерії були нанесені на планшети з агаром Лурія-Бертані (1% глюкози/100 мкг/мл карбеніциліну) (Teknova, Кат. № L5804) і інкубовані протягом ночі при 37°C. Бактеріальні газони були зшкрябані, після чого в гліцерині була приготована чиста культура [15% гліцерин/карбеніцилін (100 мкг/мл)/2xYT], яка зберігалася при -80°C. Для приготування фарів для другого етапу пенінгу було інокульовано 25 мл 2xYT/карбеніциліну (100 мкг/мл) з 25 мкл чистої культури бактерій в гліцерині з подальшим вирощуванням при 37°C до OD₆₀₀ близько 0,5. Хелперний фаг VCSM13 (Stratagene, Кат. № 200251) був доданий в культуру з множинним зараженням у співвідношенні близько 10:1, і інкубування проводилося протягом 30 хвилин при 37°C без струшування. Бактерії були відцентрифуговані, і осад був ресуспендований в індукційне середовище (2xYT/Carb/Kan/ізопропілтіоґалактозид) і культивований при 30°C протягом ночі. Фаги були осажені з 2% поліетиленгліколем/0,25M NaCl (кінцева концентрація) і ресуспендовані в 2 мл PBS. Після

першого етапу пенінгу фаги зберігалися при 4°C і використовувалися для проведення другого етапу пенінгу. Параметри пенінгу: Етап 1, 100 нМ антигену, 1 год. інкубування при кімнатній температурі, п'ятикратне промивання TBST з подальшим однократним промиванням TBS; Етап 2, 10 нМ антигену, 1 год. інкубування при кімнатній температурі, десятикратне промивання TBST/однократне промивання TBS; і Етап 3, 1 нМ антигену, 16 год. (протягом ночі) інкубування при 4°C, десятикратне промивання TBST/однократне промивання TBS.

Результати спостерігалися за допомогою твердофазного ІФА, де Fab-фрагменти захоплювалися антилюдськими антитілами Fd (CH1), біотинільований людський ОМ був доданий в концентрації 20 нМ, і зв'язування ОМ було виявлене за допомогою кон'югата стрептавідин-пероксидази хрому.

Як було відображено на Fab-фрагментах, було ідентифіковано тридцять (30) унікальних пар важких ланцюгів-легких ланцюгів, і за допомогою твердофазного ІФА було показано, що вони перехресно реагують з ОМ макак. Важкі ланцюги відобразили послідовності з 169 (одержана з IGHV1-69) і 551 (одержана з IGHV5-51) бібліотеки, і вони були скомбіновані з варіабельними ділянками легких ланцюгів, які відобразили всі чотири бібліотеки зародкового походження (A27, B3, L6 і O12).

ПРИКЛАД 3. ХАРАКТЕРИСТИКА ОМ-ЗВ'ЯЗУВАЛЬНИХ МАВ

Будова ОМ у вигляді вузла з чотирьох спіралей характеризується чотирма α -спіральними сегментами, позначеними як А, В, С і D, які зв'язані відносно неструктурованими петлями. ОМ взаємодіє з gr130-поверхнею, що знаходиться на спіралях А і С (ділянка II), які визначені для контакту з амінокислотними залишками Q16, Q20, G120, N123, N124 з SEQ ID NO: 1 (Deller et al. Структура 8(8):863-874, 2000; Liu et al. Int. J. Mol. Med. 23:161-172, 2009). Вважається, що поверхня, що відповідає за взаємодію ОМ з OSMR β і LIFR α (ділянка III), переважно визначається залишками, розташованими в спіралі D (Deller et al. *ibid*).

Мета полягала у виборі високоафінних зв'язувальних речовин для ОМ, які були б здатні запобігати викликаній ОМ сигнальній активності gr130 або за рахунок запобігання зв'язуванню ОМ з gr130 (ділянка II або В-блокатор), або за рахунок запобігання рекрутингу LIFR α або OSMR β , викликаному зв'язуванням ОМ з gr130 (ділянка III або R-блокатор).

З 30 початково відібраних ОМ-зв'язувальних Fab-фрагментів 29 були клоновані у вектори для конверсії в непроцесовані людські Mab IgG1. Характеризуючі аналізи включали (1) конкурентне зв'язування для ідентифікації груп епітопів, або "сортів", (2) вимірювання афінності за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (Biacore), і (3) здатність блокувати сигнальну активність pSTAT3. Всі відбори і аналізи проводилися з використанням клітин ссавців, що виробляють (глікозиловані) білки людини і макак, як описано в Прикладі 1.

Результати

Дані вимірювань афінності для субпопуляції mAb, вибраних на основі їх положення відносно контролю MAB295 (R&D Systems) при аналізах зв'язування pSTAT3 і твердофазному ІФА, показані в Таблиці 3.

Таблиця 3

Афінність вибраної субпопуляції анти-ОМ mAb після першого етапу пенінгу

mAb	Зв'язування з ОМ людини			Зв'язування з ОМ макак			Відношення K _D Макака/Людина
	K _a (1/Mc) 10 ⁴	K _d (1/c) 10 ⁻⁴	K _D (нМ)	K _a (1/Mc) 10 ⁴	K _d (1/c) 10 ⁻⁴	K _D (нМ)	
MAB295	118,00	21,70	1,85	70,95	141,00	19,75	10,70
M2	54,57	9,03	1,66	50,23	67,40	13,50	8,10
M6	19,15	1,97	1,03	20,30	2,99	1,48	1,40
M22	10,20	3,57	3,52	9,43	101,00	107,00	30,40
M9	6,63	0,81	1,22	7,31	0,54	0,73	0,60
M21	30,00	12,55	4,17	31,80	14,30	4,50	1,10
M10	6,02	0,63	1,05	5,33	10,05	18,90	18,10
M7	8,24	1,08	1,31	8,49	0,37	0,43	0,30
M3	39,85	1,75	0,44	41,95	1,20	0,29	0,70
M19	7,89	0,26	0,34	7,70	2,43	3,15	9,40
M25	8,19	5,09	6,21	9,45	71,70	75,80	12,20

mAb	Зв'язування з ОМ людини			Зв'язування з ОМ макак			Відношення K_D
	$K_a (1/Mc) \cdot 10^4$	$K_d (1/c) \cdot 10^4$	$K_D (нМ)$	$K_a (1/Mc) \cdot 10^4$	$K_d (1/c) \cdot 10^4$	$K_D (нМ)$	Макака/Людина
M24			Слабе			Немає зв'язування	Н/Д
M8	4,71	0,33	0,70	4,98	0,31	0,62	0,90
M4			Слабе			Слабе	Н/Д
M20	16,60	7,43	4,48	15,30	16,20	10,60	2,40
M5	6,59	7,79	11,85	9,22	11,10	12,05	1,00
M17	2,78	0,45	1,61	2,90	0,77	2,64	1,60
M11	8,64	8,32	9,63	19,65	10,70	5,46	0,60
M27	6,39	34,95	55,50			Слабе	Н/Д
M18			Слабе			Немає зв'язування	Н/Д

Результати сортування показали, що M5, M6 і M9 конкурують одне з одним, але не з MAB295. M10 може конкурувати з MAB295. У аналізі pSTAT3 було показано, що ці чотири mAb можуть грати роль функціональних нейтралізаторів сигнальної активності gp130. Таким чином, з цього випливає, що M10 є R-блокатором, а M5, M6 і M9 блокують зв'язування ОМ з gp130 (В-блокатори).

Афінність до мішені з точки зору терапевтичного застосування була продиктована необхідністю переконливого конкурування при взаємодії ОМ з gp130, виміряна афінність якого (K_D) складає близько 1 нМ. Тому бажано, щоб афінність до мішені для ОМ становила 100 пМ або мала меншу K_D .

Виявлено, що нейтралізуючі MAb M5, M6 і M9 є блокаторами взаємодії ОМ з gp130, а M10 було вибрано в зв'язку з відповідним дозріванням, в ході якого утворюються похідні, які відповідають вимогам афінності 100 пМ для кандидата, який може використовуватися в лікувальних цілях. Додатковою бажаною властивістю є зв'язування mAb з ОМ яванської макаки з п'ятикратною афінністю в порівнянні з ОМ людини (K_D 500 пМ або менше).

Було виявлено, що композиції зв'язувальних доменів цих чотирьох MAb відповідають чотирьом унікальним парам важких і легких ланцюгів, позначених, як показано в Таблиці 4.

Таблиця 4

mAb	Бібліотека HC	Ідентифікатор важкого ланцюга	Ідентифікатор легкого ланцюга
M10	169	H2	L2
M6	551	H14	L12
M9	551	H17	IGKV4-1 (B3)
M5	551	H135	L111

Повні послідовності варіабельних ділянок містять зародкові послідовності, використовувани для створення фагових бібліотек, які були описані вище, отже, фіксовані залишки відповідають немутованим батьківським зародковим залишкам. Таким чином, кожна V-ділянка складається з позначених CDR1 і CDR2 в підтримуючій ділянці, позначеній як SEQ ID NO: 1-3 або 5-8; з подальшим CDR3 (Таблиця 3 і 4) для варіабельної ділянки легкого ланцюга, відповідно (Таблиця 5 для LC і Таблиця 6 для HC), і з подальшою J-ділянкою з SEQ ID NO: 4 для важкого ланцюга і SEQ ID NO: 10 для легкого ланцюга.

Таблиця 5

Ідентифікатор VH	Каркасна ділянка (SEQ ID NO:)	H-CDR1	№ ПОСЛ.:	H-CDR2	№ ПОСЛ.:	H-CDR3	№ ПОСЛ.:
H2	1-69 (1)	SYAIS	13	GIIPIFGNANYAQKFQ	16	YGAKGLLDY	19
H14	5-51 (3)	SYWIS	14	IIYPGDSYTRYSPSFQG	17	GSVFEAYFDY	20
H17	5-51 (3)	SYWIS	14	IIYPGDSYTRYSPSFQG	17	VPVSPAYLDY	21
H135	5-51 (3)	SYWIG	15	IIYPGDSYTRYSPSFQG	18	GFGASYLDY	22

- 5 Варіабельна ділянка HC H2 містить FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3, одержану з SEQ ID NO: 1, де $X_1 = A$, $X_2 = G$, $X_3 = I$, $X_4 = P$, $X_5 = I$ і $X_6 = F$, з додатковою мутацією в H-CDR2. HC з бібліотеки 551 (H14, H17 і H135) містить FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3, одержану з SEQ ID NO: 3, де $X_1 = S$, $X_2 = S$ або G , $X_3 = I$, $X_4 = Y$, $X_5 = G$ і $X_6 = Y$ або D . Кожна з чотирьох HC містила унікальну CDR3 (SEQ ID NO: 19-22).

Таблиця 6

Ідентифікатор VL	Каркасна ділянка (SEQ ID NO:)	CDR1	№ ПОСЛ.:	CDR2	№ ПОСЛ.:	CDR3	№ ПОСЛ.:
IGKV4-1 (B3)	B3 (8)	KSSQSVLYSSNNKNYLA	23	WASTRES	26	QQYYSTPL	27
L2	B3 (8)	KSSQSVLYSSNNKNYLA	23	WASTRES	26	QQSFSFPI	28
L12	B3 (8)	KSSQSVLSSNNENWLA	24	WASTRES	26	QQYYSTPL	27
L111	B3 (8)	KSSQSVLASSNNNNFLA	25	WASTRES	26	QQYYSTPL	27

- 10 Всі варіабельні ділянки LC вибраних Fab були одержані з бібліотеки B3 і включають перевірену зародкову послідовність, позначену в базі даних IMGT як IGKV4-1 (B3), яка використовується як початкова послідовність для забезпечення різноманітності описаним тут способом і відповідно до публікацій. Три з чотирьох легких ланцюгів мають відмінності в CDR1 і містять ідентичний H-CDR2. Консенсусна послідовність для чотирьох вибраних варіабельних
- 15 ділянок легких ланцюгів FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3 була одержана з SEQ ID NO: 8, де $X_1 \in Y, S$ або A ; $X_2 \in K, E$ або N ; $X_3 \in Y, W$ або F ; і X_4 завжди $\in W$.

Були ідентифіковані дві унікальні послідовності CDR3. L-CDR3 може бути представлений консенсусною послідовністю (SEQ ID NO: 29), позначеною формулою Q-Q-(S,Y)-(F,Y)-S-(F,T)-PLT.

20 ПРИКЛАД 4. ПОВТОРНИЙ ВИБІР АФІННОСТІ

- Чотири пари V-ділянок, OSMM5, OSMM6, OSMM9 і OSMM10, описаних в Прикладі 3, були повторно вибрані для легкого ланцюга для поліпшення афінності. Для швидкого і ефективного встановлення афінності великої кількості антитіл при первинному відборі був використаний процес "внутрішньолінійного" дозрівання, описаний Shi et al. в J. Mol. Biol. 397:385-396, 2010, міжнародній заявці WO 09085462A1 і заявці на патент США Сер. № 12/546850. Коротко, ділянки
- 25 VH антигенспецифічних клонів, одержаних на початкових етапах селекції, були комбіновані з бібліотеками відповідних підтримуючих ділянок VL, в цьому випадку B3 ґрунтується на ділянці V (SEQ ID NO: 8).

- Були створені три нові бібліотеки, в одній з яких використовується бібліотека VL, що використовується при первинних відборах як джерело окремих VL-ланцюгів, і дві додаткові бібліотеки, розроблені на основі попередніх аналізів комплексів антиген-антитіло відомої структури (Raghuanathan et al. J. Mol. Recognit, 2010). Залишки були вибрані з різноманітності, ґрунтованої на залишках, які найбільш ймовірно будуть брати участь в зв'язуванні білка-мішені, що також називається використанням специфічно визначених залишків (SDRU). У легких ланцюгах V-каппа були визначені три контактуючі ділянки, сконцентровані навколо гіперваріабельних петель, як було встановлено Чотія і Ліском, які дещо відрізняються залежно від того, чи є мішень білком, пептидом або невеликим гаптенем. Таблиця 5 показує бібліотеки
- 30 VL, використані для встановлення афінності, де B3 є тією ж бібліотекою, яка використовується під час фази пошуку, бібліотека 2, "Сфокусована на SDRM", ґрунтується на залишках SDRU і

фокусується на їх різноманітності, і NNK є розупорядкованою бібліотекою. У таблиці "х" означає будь-яку амінокислоту з одним стоп-кодоном, створеним з суміші NNK.

Таблиця 7 підсумовує різноманітність в бібліотеках 1, 2 і 3. Під час аналізу підсумкової бібліотеки деякі амінокислоти були ідентифіковані не як частини вихідної структури, і тому представляються як наслідки застосування способу синтезу. У бібліотеці 2, синтезованій з використанням динуклеотидів, ці амінокислоти були: S (положення 30с), T (положення 30d), EK (положення 30f), IW (положення 32), TV (положення 50), I (положення 92), D (положення 93) і F (положення 96).

Таблиця 7

CDR	Положення		Бібліотека		
			1	2	3
	Послідов-ність	Кебат	pIX B3 de novo	З фокусом на SDRM	SDRM NNK
L1	30	30	L	L	L
	31	30a	YSHFA	RNDGHSY	x
	32	30b	S	S	S
	33	30c	S	RNDGHWSY	x
	34	30d	Кількість	RNDGHSTY	x
	35	30e	Кількість	Кількість	Кількість
	36	30f	KTNE	EKRNDGHWY	x
	37	31	Кількість	Кількість	Кількість
	38	32	YFHNWDAS	IRNDWY	x
L2	56	50	WSRDYA	YWNKTV	x
L3	97	91	YSHA	SYGH	x
	98	92	YNDSHIFKG	ISYGN	x
	99	93	SNTDGHR	DSTER	x
	100	94	TYLVFAS	YSHT	x
	102	96	WYFLIR	FYRWL	x

Fab-His-протеїн був одержаний з результатів третього етапу пенінгу, і твердофазний ІФА моноклональних Fab-His-протеїнів використовується для ідентифікації окремих піків з більшим зв'язувальним сигналом, ніж у відповідного батьківського Fab-фрагмента. У цьому сортуванні за допомогою твердофазного ІФА були використані дві концентрації біотинільованого людського антигену: 2 нМ і 0,2 нМ. Сигнал при зв'язуванні для кожного батьківського клону був прийнятий за 100%. Були одержані 22 піки від збільшення афінності M6 і M9, які показали дев'ятикратне (900%) поліпшення зв'язування при порівнянні з батьківськими Fab, що містять вихідні V-ділянки важких і легких ланцюгів. Деякі з цих нових пар важких і легких ланцюгів були вибрані для подальшої оцінки.

Афінності (K_D) внутрішньолінійного зрілого mAb до OM людини і яванської макаки в порівнянні з контрольним антитілом MAB295 і батьківськими антитілами mAb M6 і M9 були підсумовані в Таблиці 8, і склад CDR цих mAb показаний в Таблиці 9. У деяких випадках LCV утворював пару і з H14, і з H17. Деякі mAb, які були визнані можливими кандидатами для використання в терапевтичних цілях на основі їх біофізичних властивостей і функціональних можливостей, були виділені сірим.

Таблиця 8

Внутрішньоланцюгові зріли анти-ОМ mAb			Афінність з ОМ людини			Афінність з ОМ макак			
mAb	Важкий ланцюг Ідентифікатор	Легкий ланцюг Ідентифікатор	Конс-танта асоціації k_a (1/Мс) 10^4	Конс-танта дисоціації k_d (1/с) 10^{-4}	Афінність K_D (нМ)	Конс-танта асоціації k_a (1/Мс) 10^4	Конс-танта дисоціації k_d (1/с) 10^{-4}	Афінність K_D (нМ)	Спів-відношення Макака/Людина
MAB295			11,80	2,17	1,85	7,10	14,10	19,75	10,70
M6	H14	L12	1,68	21,20	1,260	1,85	30,70	1,660	1,3
M42	H14	L173	2,88	13,90	0,484	2,65	13,70	0,516	1,1
M45	H14	L176	4,68	6,73	0,144	3,80	6,03	0,159	1,1
M53	H14	L184	1,83	3,92	0,214	1,84	2,71	0,147	0,7
M54	H14	L185	3,20	1,70	0,053	3,51	2,01	0,057	1,1
M55	H14	L186	3,51	1,90	0,054	3,86	2,22	0,058	1,1
M9	H17	B3	0,60	8,54	1,420	0,65	5,83	0,898	0,6
M62	H17	L171	2,62	4,82	0,184	2,85	6,19	0,217	1,2
M63	H17	L172	4,22	4,89	0,116	4,50	4,36	0,097	0,8
M64	H17	L173	3,15	2,98	0,095	3,29	0,75	0,023	0,2
M65	H17	L174	8,59	5,45	0,064	6,42	3,40	0,053	0,8
M66	H17	L175	3,20	2,29	0,071	3,73	4,59	0,124	1,7
M67	H17	L176	6,40	3,39	0,053	5,24	1,80	0,034	0,6
M68	H17	L177	3,43	2,55	0,064	4,35	2,12	0,049	0,8
M69	H17	L178	3,75	1,83	0,045	4,84	2,99	0,062	1,4
M71	H17	L180	3,44	3,61	0,105	4,09	4,42	0,108	1,0
M83	H17	L192	4,66	1,94	0,042	4,67	1,39	0,030	0,7

Таблиця 9

LC-CDR Таблиця високоафінних MAb

Пар-них VH ID	Ідентифікатор VL	L-CDR1	№ ПОСЛ.:	L-CDR2	№ ПОСЛ.:	L-CDR3	№ ПОСЛ.:
H17	IGKV4-1 (B3)	KSSQSVLYSSNNKNYLA	23	WASTRES	26	QQYYSTPLT	27
H14	L12	KSSQSVLSSNNENWLA	24	WASTRES	26	QQYYSTPLT	27
H17	L171	KSSQSVLSSGNGNGNYLA	30	KASTRES	42	QQYYSTPLT	27
H17	L172	KSSQSVLSSGNSHNYLA	31	KASTRES	42	QQYYSTPLT	27
H14/7	L173	KSSQSVLSSRGNNNYLA	32	KASTRES	42	QQYYSTPLT	27
H17	L174	KSSQSVLGSGWGNNDNYLA	33	KASTRES	42	QQYYSTPLT	27
H17	L175	KSSQSVLYSGGNGNYLA	34	KASTRES	42	QQYSTPLT	45
H14/7	L176	KSSQSVLGSGWGNHNYLA	35	KASTRES	42	QQYYSTPLT	27
H17	L177	KSSQSVLSSNGNHNYLA	36	KASTRES	42	QQYYSTPLT	27
H17	L178	KSSQSVLSSDGNHNYLA	37	KASTRES	42	QQYYSTPLT	27
H17	L180	KSSQSVLGSSSNINFLA	38	SASTRES	43	QQYFSTPIT	46
H14	L182	KSSQSVLGSGDNRNYLA	39	NASTRES	44	QQYYSTPLT	27
H14	L186	KSSQSVLGSGYNRNYLA	40	KASTRES	42	QQYYSTPLT	27
H14	L184	KSSQSVLGSGYNRNYLA	40	WASTRES	26	QQYYSTPLT	27
H17	L192	KSSQSVLGSWHNDNYLA	41	KASTRES	42	QQYYSTPLT	27

Різноманітність LC-CDR3 Q-Q-(S,Y)-(F,Y)-S-(F,T)-PLT (SEQ ID NO: 29) у вибраних кандидатах була зменшена, і консенсусні послідовності повторно вибраних високоафінних LC-CDR3 представлені як QQY-(F,Y)-STP-(L,I)-T (SEQ ID NO: 47).

У повторно вибраних mAb VH з H14 і H17 містять спільну ділянку FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3, яка представлена в SEQ ID NO: 46 і містить SEQ ID NO: 14 (CDR1) і SEQ ID NO: 17 (CDR2).

Здатність зменшувати проліферацію клітин A375-S2 у людини і макак

- 5 Оцінка залежності відповіді від дози внутрішньолінійних зрілих антитіл проводилася, починаючи від дози 5 мкг/мл або 1 мкг/мл з 1-5 розведеннями до 0,0016 або 0,00032 мкг/мл, відповідно. Нейтралізація M71 показана на фіг. 2В. При підвищенні концентрації антитіл антипроліферативний ефект онкостатину М людини і макак буде нейтралізований. Криві залежності відповіді від дози були розраховані з використанням даних з трьох окремих експериментів з онкостатином М людини (незафарбовані позначення) і яванських макак (зафарбовані позначення). У Таблиці 10 підсумовані IC₅₀ (з 95% довірчими інтервалами) M55, M64, M69 і M71 проти онкостатину М людини і яванських макак.

Таблиця 10

Антитіло	ОМ людини		ОМ макак	
	IC ₅₀ (нг/мл)	95% довірчий інтервал	IC ₅₀ (нг/мл)	95% довірчий інтервал
M55	54,5	42,5-70,0	88,4	67,8-115,2
M64	162,4	125,7-210	321,1	272,6-378,1
M69	44,6	32,7-60,9	50,81	37,4-69,1
M71	21,9	16,9-28,4	39,67	31,2-50,4

- 15 Конкуренція з gr130 людини
- Конкурентні експерименти були проведені між анти-ОМ mAb, вибраними для внутрішньолінійного дозрівання, і новими зв'язувальними речовинами з наведеної вище таблиці і gr130 людини за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (SPR) на оптичному біосенсорі Biacore 3000 (Biacore), як описувалося в Прикладі 1.
- 20 Поверхня біосенсора була підготовлена за допомогою з'єднання кожного досліджуваного mAb з поверхнею карбоксиметильованого декстрану чипа CM-5 (Biacore, Кат. № BR-1000-14) відповідно до інструкцій виробника. Приблизно 4000-15000 ОВ (одиниць відповіді) кожного досліджуваного mAb було іммобілізовано в чотирьох проточних комірках приладу. Конкурентні експерименти проводилися при 25°C в рухомому буфері (DPBS + 0,005% P20 + 3 mM ЕДТО).
- 25 ОМ людини (внутрішньолабораторний OSMN1-1) був розведений до 30 нМ в рухомому буфері і введений зі швидкістю 3 мкл/хв. протягом 3 хвилин в кожен проточну комірку з іммобілізованими mAb. Подальше захоплення ОМ людини відбувалося під час трихвилинного введення (фаза асоціації) кожного конкурентного mAb або gr130-Fc людини в концентрації 300 нМ з подальшим промиванням буфером (фаза дисоціації) протягом 3 хвилин. Поверхня чипа була регенована двома 12-секундними викидами 100 mM H₃PO₄ (Sigma, Кат. № 7961) зі швидкістю 50 мкл/хв. Одержані дані були оброблені за допомогою програмного забезпечення BIAevaluation версії 3.2 (Biacore). По-перше, сенсорограми були націлені на введення ОМ людини. Потім були записані рівні зв'язування (ОВ) для ОМ людини, конкуруючого mAb або gr130-Fc. Збільшення зв'язування (ОВ) при введенні конкурентного mAb або gr130-Fc на поверхню ОМ вказує на те, що вони не конкурують з іммобілізованими досліджуваними mAb і навпаки. Проточна комірка (Fc1 і т. д.) з іммобілізованими mAb знаходиться вздовж горизонтальних рядів зразків з Таблиці 10.
- 30 Раніше було показано, що M2 конкурує з наявним в продажу антитілом MAB295, яке, як відомо, не конкурує з gr130 при зв'язуванні з ОМ. Результати аналізів конкурентного зв'язування показують, що M54, M55, M64, M69 і M71 конкурують з gr130-Fc людини при зв'язуванні з антигеном ОМ (Таблиця 11).
- 40

Таблиця 11

Конкурентне дослідження зрілих антитіл до gp130, що є кандидатами для створення лікарських mAb

Зразок	Рівень зв'язування (ОВ)				Конкуренція			
	M2 (Fc1)	M54 (Fc2)	M69 (Fc3)	M71 (Fc4)	M2 (Fc1)	M54 (Fc2)	M69 (Fc3)	M71 (Fc4)
Буфер	-57	31	35	51				
gp130-Fc людини	319	17	20	29	HI	TAK	TAK	TAK
MAV295	-83	2903	2390	1989	TAK	HI	HI	HI
M6	985	11	16	19	HI	TAK	TAK	TAK
M54	1765	14	21	33	HI	TAK	TAK	TAK
M55	1417	14	21	35	HI	TAK	TAK	TAK
M64	1758	12	20	36	HI	TAK	TAK	TAK
M69	1243	13	17	21	HI	TAK	TAK	TAK
M71	1194	-1	23	32	HI	TAK	TAK	TAK
M2	-73	3246	2483	2055	TAK	HI	HI	HI
gp130-Fc людини	310	19	25	34	HI	TAK	TAK	TAK
Буфер	-52	35	37	55				

Зразок	Рівень зв'язування (ОВ)			Конкуренція		
	M2 (Fc1)	M55 (Fc2)	M64 (Fc3)	M2 (Fc1)	M55 (Fc2)	M64 (Fc3)
Буфер	-54	50	30			
gp130-Fc людини	251	25	18	HI	TAK	TAK
MAV295	-80	2950	1948	TAK	HI	HI
M6	926	36	33	HI	TAK	TAK
M54	1634	19	16	HI	TAK	TAK
M55	1316	21	19	HI	TAK	TAK
M64	1665	20	22	HI	TAK	TAK
M69	1148	17	11	HI	TAK	TAK
M71	1127	22	17	HI	TAK	TAK
M2	-74	3474	2203	TAK	HI	HI
gp130-Fc людини	248	26	20	HI	TAK	TAK
Буфер	-47	60	38			

- Здатність блокувати pSTAT3 в клітинах A375
- 5 Розраховані значення EC50 для інгібування pSTAT3, що відбувається в клітинах A375 в присутності або за відсутності 5 нг/мл людського ОМ для M6, M9 і внутрішньолінійних зрілих варіантів цих Mab, показані в Таблиці 12.

Таблиця 12

Інгібування pSTAT3

Ідентифікатор mAb	EC50 (нг/мл)	Критерій згоди	Крива R ² піка
M65	29,5	24,35-35,82	0,9921
M67	37,7	30,93-45,92	0,9905
M45	50,0	42,45-58,91	0,9931
M83	71,2	59,59-85,05	0,9908
MAV295	72,1	46,91-110,7	0,9848
M54	78,5	66,11-93,23	0,9930
M63	88,2	58,55-132,9	0,9819
M64	97,1	77,01-122,4	0,9902
M68	126,9	107,2-150,1	0,9924
M69	141,7	115,1-174,5	0,9914
M66	152,7	111,1-209,8	0,9833

Ідентифікатор mAb	EC50 (нг/мл)	Критерій згоди	Крива R ² піка
M71	159,6	128,3-198,5	0,9885
M55	181,6	153,0-215,6	0,9869
M42	191,3	93,67-390,7	0,9607
M62	233,5	206,4-264,1	0,9947
M53	236,6	196,3-285,2	0,9859
M6	650,3	241,7-1750	0,9540
M9	1218,0	352,8-4208	0,9614
M85	-		0,4454
IL13	-		0,3438

ПРИКЛАД 5. БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ

Аналіз кокультури макрофагів і хондроцитів

5 М71 був досліджений в системі кокультури макрофагів і хондроцитів. Відомо, що диференційовані макрофаги продукують онкостатин М (Hasegawa et al. Rheumatology, 38:612-617, 1999). OM може знижувати синтез високосульфатованих протеогліканових агреганів (глікозоаміногліканів), які утворюють значну частину матриксу хряща.

10 Антилюдські антитіла до онкостатину М були виявлені за допомогою рекомбінантного міченого His-Avi-білком онкостатину М людини і яванських макак з клітин HEK, і активність цих антитіл була оцінена за допомогою цих молекул і одержаного з бактерій рекомбінантного людського онкостатину М компанії R&D Systems (295-OM). Жоден з них не є ідентичним до природного ендогенного онкостатину М людини або через мічення His-Avi-білком (OM з клітин HEK), або через відсутність глікозилювання (бактеріальний рекомбінантний OM). Відомо, що

15 макрофаги секретують онкостатин М (Grove et al. J. Lipid Res. 32:1889-97, 1991), і онкостатин М знижує синтез протеогліканів в хондроцитах людини (Sanchez et al. OA and Cart. 12:810-10, 2004). Таким чином, кокультуральна система використовується для визначення здатності антилюдських антитіл до онкостатину М нейтралізовувати ендогенний, або природний, людський онкостатин М. Коротко, одиночні альгінатні гранули, що містять 40000 нормальних

20 людських суглобових хондроцитів, були культивовані протягом 72 годин в присутності диференційованих макрофагів людини. Ці експерименти проводилися в присутності діапазону доз антитіл до онкостатину М. Наприкінці експерименту синтез протеогліканів вимірювався по включенню радіоактивного ³⁵SO₄.

CD14+ моноцити периферичної крові були одержані з компанії AllCells. Моноцити культивувалися на 48-ямкових планшетах з 2,5×10⁵ клітинами в ямці в 0,5 мл макрофагального середовища (RPMI + глутамін з 10% термоінактивованою FBS, 1% NEAA (замінні амінокислоти) і 1% Pen-Strep). Клітини оброблялися 100 нг/мл макрофагального колонієстимулюючого фактора (M-CSF). Через 48 годин середовище було замінено для видалення клітин, що не прикріпилися. На 6 день макрофагальне середовище, що містить M-CSF, було замінено

30 макрофагальним середовищем без M-CSF. На 8 день макрофагальне середовище було замінено хондроцитарним середовищем (50% F-12 Хема/50% DMEM з 10% фетальної телячої сироватки), і в кожен ямку були додані окремі альгінатні гранули з культурою хондроцитів (Articular Engineering № CDD-H-2200). Аліквоти кондиціонованого макрофагального середовища були дубльовані і збережені при -80°C для аналізів рівнів онкостатину М за допомогою набору R&D Systems Human Oncostatin M DuoSet (DY295).

35

Кокультури макрофагів з альгінатними гранулами утримувалися або в присутності 20 мкг/мл антилюдських антитіл проти онкостатину М (M64, M71, M55, M69), або в присутності діапазону доз (від 5 мкг/мл до 0,00076 мкг/мл; 1-3 розведення) антитіла (M71 і M55). Крім того, контроль у вигляді людського ізо типу IgG1 (CNT06234) внесений на планшет до найбільшої

40 концентрації досліджуваного антитіла проти онкостатину М. Інші контролю включали тільки хондроцити (в кокультури) і хондроцити в присутності 2 нг/мл людського онкостатину М. Крім того, ямки, що містять тільки макрофаги, утримувалися для вимірювання продукції онкостатину М. Після 72 годин кокультування в кожен ямку було додано 10 мкКи/мл радіоактивного ³⁵SO₄ (Perkin-Elmer NEX041H002MC) на додаткові 20 годин.

45 Включення ³⁵SO₄ було виміряне за допомогою способу преципітації CPC (MP Biomedicals (№ 190177)). Через 20 годин інкубування з ³⁵SO₄ мічене середовище було видалене, і кожна гранула була двічі промита DPBS з Ca і Mg. Після другого промивання до кожної гранули було додано 200 мкл цитратного буфера (150 mM NaCl, 55 mM цитрату Na, pH 6,8). Планшети інкубувалися протягом від 10 до 15 хв. при 37°C доти, поки гранули не розчинилися. 100 мкл

50 аліквоти з кожної ямки було перенесено на 96-ямковий фільтрувальний планшет Millipore

Multiscreen, попередньо змочений 1% CPC, після чого в кожну ямку було додано по 10 мкл 10% CPC на 5 хвилин. Потім планшет був поміщений у вакуум доти, поки фільтри не стали сухими. Потім кожна ямка була промита 2 рази 200 мкл 1% CPC, після чого ямки були поміщені у вакуум доти, поки фільтри не стали сухими. Потім з планшета було видалене пластикове дно, і воно
 5 було замінено на пристосування для заклеювання планшетів (Perkin Elmer № 6005185). В кожну ямку була додана сцинтиляційна рідина (50 мкл, Perkin Elmer № 6013621), і пристосування для заклеювання планшетів було поміщене на верхню частину планшета. Потім планшет був зчитаний за допомогою зчитувача Top Count.

У концентрації 20 мкг/мл M64, M71, M55 і M69 підвищують синтез протеогліканів вище рівня, спостережуваного за відсутності антитіл, коли контрольний ізотип неефективний (фіг. 3). У
 10 окремому експерименті M71 дозозалежно підвищує синтез протеогліканів до рівня, спостережуваного у одних хондроцитів (визначений як 100% нейтралізація), причому EC50 становила 30 нг/мл, і контрольний ізотип був неефективний. Ці дані показують, що одержаний з макрофагів OM знижує синтез протеогліканів в кокультивованих хондроцитах, і що антилюдські
 15 антитіла до онкостатину M нейтралізують природний онкостатин M.

Аналіз фосфорилювання STAT3 в фібробластах людської легені

OM індукуює проліферацію і продукцію колагену в нормальних фібробластах людської легені (Scaffidi et al. Br. J. Pharmacol. 136:793-801, 2002). Надмірна продукція колагену фібробластами є
 20 ключовою особливістю багатьох патологічних станів (Lim et al. Oncogene, 23(39):5416-25, 2006; Huang et al. J. Cell Biochem. 81(1):102-13, 2001). Сигнальна активність рецептора онкостатину M запускає каскад реакцій JAK-STAT, і фосфорилювання STAT3 є початковим етапом цього сигнального шляху (Auguste et al. (1997), Signaling of Type II Oncostatin M Receptor. J Biol. Chem. 272:15760-15764). Здатність онкостатину M до утворення фосфорилюваного
 25 STAT3 була визначена в нормальних фібробластах людської легені (NHLF) за допомогою набору R&D Systems human/mouse pSTAT3 DuoSet (DYC4607-5). Цей аналіз потім був використаний для визначення здатності M55 і M71 до нейтралізації сигнальної активності онкостатину M.

Ці експерименти були проведені за допомогою NHLF з Lonza (CC-2512), які культивувалися на відповідному середовищі Lonza FGM-2 (CC-3132). Коротко, клітини були поміщені на
 30 планшет в кількості 25000 клітин на ямку в FGM-2 і культивувалися протягом 24 годин. Потім клітини були оброблені онкостатином M або антитілами і онкостатином M протягом 10 хвилин. Для запобігання впливу температури під час 10-хвилинної інкубації всі розчини, використовувані для підготовки до обробки, були попередньо нагріті і утримувалися при 37°C. Після 10-хвилинної обробки середовище було аспіровано і замінено повним лізуючим буфером.
 35 Лізуючий буфер (pH=7,2), що містить 1% NP-40, 1% дезоксихолату натрію, 0,1% SDS, 0,15M NaCl і 0,01M фосфат натрію, зберігався при 4°C. Під час використання повний лізуючий буфер був приготований за допомогою додавання 1 таблетки суміші інгібіторів протеаз (Roche, 11836153001) і 110 мкл інгібітору фосфатази HALT (Thermo Scientific 78420) в 11 мл лізуючого буфера. Через 10 хвилин лізису одержаний лізат був готовий для визначення
 40 фосфорилюваного STAT3.

Для визначення дозозалежної відповіді на онкостатин M клітини NHLF були оброблені діапазоном доз OM (від 100 нг/мл до 0,024 нг/мл з 1-4 розведеннями для трьох ямок). Планшет для розведення був підготовлений за допомогою попередньо нагрітого PBS + 1% BSA, в кожній
 45 ямці якого концентрація OM була в 10 разів вище, ніж кінцева концентрація, яка необхідна для обробки, а ямки, що містять тільки середовище, були включені як необроблені контролю. Середовище було повністю видалене з культурального планшета і замінено 180 мкл попередньо підігрітого середовища FGM-2. Таймер був ввімкнений на 10 хвилин, і потім з кожної ямки планшета для розведення 20 мкл були перенесені у відповідну ямку культурального планшета. Через 10 хвилин розчини для обробки були повністю видалені з
 50 клітинної пластинки шляхом аспірації і замінені 100 мкл повного лізуючого буфера. Для мінімізації відмінностей під час інкубування лізуючий буфер був доданий в ямки в тому ж порядку, що і розчини для обробки. Потім аналізований планшет був поміщений у струшувач на 10 хвилин. Після струшування лізати були або заморожені при -80°C для подальшого аналізу, або напряму нанесені на планшети для твердофазного ІФА, які були покриті антитілами до
 55 фосфорилюваного STAT3. Твердофазний ІФА (набір R&D Systems human/mouse pSTAT3 DuoSet) був проведений відповідно до інструкцій виробника за винятком того, що 1) в кожну ямку було додано тільки 90 мкл лізату або стандарту, і 2) як підкладка для SuperSignal Pico (ThermoScientific 37069) була використана пероксидаза хрому. Люмінесценція планшета для твердофазного ІФА була зчитана за допомогою спектрофотометра для зчитування планшетів
 60 Victor3.

Для оцінки здатності M55 і M71 до нейтралізації сигнальної активності OM в клітинах NHLF ці клітини були оброблені діапазоном доз антитіл до OM (по три ямки для кожного випробування, від 500 нг/мл до 0,005 нг/мл з 1-10 розведеннями або від 50 нг/мл до 1,563 нг/мл з 1-2 розведеннями) в присутності 2 нг/мл людського OM. Планшет для розведення був підготовлений за допомогою PBS для дозозалежної обробки антитілами в концентрації, яка в 20 разів перевищує кінцеву, причому планшет містив ямки для контролю ізотипів (з більшою концентрацією антитіл до OM) і ямки без антитіл для необроблених контролів і клітин, оброблених тільки OM. Людський онкостатин M був приготований окремо в концентрації 40 нг/мл (двадцятикратна кінцева концентрація) в середовищі FGM-2. Антитіла в двадцятикратній концентрації з розчинами OM були перемішані в рівних об'ємах на планшеті для розведення для одержання розчинів для обробки з десятикратною концентрацією, і планшет був інкубований протягом 1 години при 37°C для забезпечення зв'язування OM з антитілами. Через 1 годину середовище було видалене з культурального планшета і заміщене 180 мкл попередньо нагрітого FGM-2. Таймер був ввімкнений на 10 хвилин, і потім з кожної ямки планшета для розведення 20 мкл були перенесені у відповідну ямку культурального планшета. Через 10 хвилин розчини були повністю видалені з клітинної пластинки шляхом аспірації і заміщені 100 мкл повного лізуючого буфера. Для мінімізації відмінностей під час інкубування лізуючий буфер був доданий в ямки в тому ж порядку, що і розчини для обробки. Потім аналізований планшет був поміщений у струшувач на 10 хвилин. Після струшування лізати були або заморожені при -80°C для подальшого аналізу, або напряду нанесені на планшети для твердофазного ІФА, які були покриті антитілами до фосфорилюваного STAT3. Твердофазний ІФА (набір R&D Systems human/mouse pSTAT3 DuoSet) був проведений відповідно до інструкцій виробника за винятком того, що 1) в кожен ямку було додано тільки 90 мкл лізату або стандарту, і 2) як підкладка для SuperSignal Pico (ThermoScientific 37069) була використана пероксидаза хрому. Люмінесценція планшета для твердофазного ІФА була зчитана за допомогою спектрофотометра для зчитування планшетів Victor3.

Людський онкостатин M підвищує фосфорилювання STAT3 в клітинах NHLF з EC50 близько 1 нг/мл. Приклади відповідей на введення доз онкостатину M наведені на фіг. 4A. У цьому прикладі EC50 становила 0,90 нг/мл з 95% довірчим інтервалом від 0,70 до 1,17 нг/мл. Нейтралізуюча здатність антитіл до онкостатину M була визначена в присутності 2 нг/мл онкостатину M, і всі дані були нормалізовані відповідно до люмінесценції в присутності 2 нг/мл OM за відсутності антитіл. Фіг. 4B зображує дозозалежну нейтралізацію OM-індукованого фосфорилювання STAT3 антитілами M71. При підвищенні концентрації M71 міра фосфорилювання STAT3 знижується. Крива залежності відповіді від дози була розрахована на основі даних шести окремих експериментів, і розрахована IC₅₀ для M71 становила 8,9 нг/мл з 95% довірчим інтервалом від 6,9 до 11,6 нг/мл.

ПРИКЛАД 6. АКТИВНІСТЬ IN VIVO

Здатність M71 до блокування продукції цитокінів in vivo була оцінена після системного введення людського онкостатину M. Внутрішньоочеревинне введення людського онкостатину M підвищило рівень деяких сироваткових цитокінів, ймовірно, за рахунок взаємодії з рецептором мишачого фактора інгібування лейкемії.

Системне (і/п) введення людського онкостатину M мишам було розроблене як модель оцінки нейтралізуючої здатності моноклональних антитіл до онкостатину M в умовах in vivo. Мишам і/п вводилося по 10 мкг людського онкостатину M в 200 мкл PBS або контрольного несучого середовища PBS. Через 1 годину миші були наркотизовані CO₂, і кров була взята за допомогою термінальної пункції серця. Окремим зразкам крові дали згорнутися на льоду протягом 20 хв., а потім вони були центрифуговані на 3500 обертах на хвилину протягом 10-15 хвилин. Відповідно до інструкцій виробника зразки сироватки залишалися замороженими до проведення аналізу за допомогою панелі Milliplex Murine MAP Cytokine/Chemokine Multiplex (32). Аналізи зразків показали, що в порівнянні з контрольним несучим середовищем людський онкостатин M суттєво підвищив рівень мишачих KC, IP-10, MCP-1, IP-6 і еотаксину і не вплинув на інші цитокіни даної панелі. Ці дані показали, що введення людського онкостатину M індукує вивільнення цитокінів, передбачувано, за рахунок взаємодії з рецептором мишачого фактора інгібування лейкемії (Richards et al. J. Immunol. 159:2431-37, 1997; Lindberg et al. Mol. Cell Biol. 18:3357-3367, 1998), який може використовуватися для дослідження нейтралізуючої здатності антитіл до онкостатину M in vivo.

M71 і M55 були оцінені в мишачій моделі системного введення онкостатину M. Коротко, мишам підшкірно були введені дози M71 або M55 (людських IgG1 до OM в дозі 20, 2,0 або 0,2 мг/кг), CNTO6234 (контрольного ізотипу hulgG1, 20 мг/кг) або PBS в об'ємі 10 мкл/г. Через 24 години кожній миші підшкірно було введено або по 10 мкг внутрішньолабораторного

рекомбінантного онкостатину М, одержаного з клітин CHO, в PBS (Sigma D8357) з 0,1% мишачим сироватковим альбуміном (Sigma A3559), або тільки контрольного несучого середовища PBS-MSA (загальним об'ємом 200 мкл). Через 1 годину миші були наркотизовані CO₂, і кров була взята за допомогою термінальної пункції серця. Окремим зразкам крові дали згорнутися на льоду протягом 20 хв., а потім вони були центрифуговані на 3500 обертах на хвилину протягом 10-15 хвилин. Зразки сироватки залишалися замороженими до проведення аналізу за допомогою панелі Milliplex Murine MAP Cytokine/Chemokine Multiplex (32). Зразки сироватки були проаналізовані відповідно до інструкцій виробника.

Людський онкостатин М достовірно (відповідно до критерію Ст'юдента для однієї вибірки) індукує підвищення рівнів п'яти цитокінів в сироватці крові, що було визначено за допомогою набору: еотаксину, ІЛ-6, ІР-10, КС і MCP-1. Попереднє введення дозування контрольного ізо типу CNTO6234 в дозі 20 мг/кг не вплинуло на викликане онкостатином М вивільнення цитокінів. Проте, попереднє введення дозування М71 достовірно знизило рівні ІР-10, MCP-1, ІЛ-6 і еотаксину в сироватці при 2,0 і 20 мг/кг і КС при 20 мг/кг. Введення 0,2 мг/кг М71 не надало ефекту на цитокіни. Ефект М71 і контрольного ізо типу на ІР-10 і MCP-1 показаний на фіг. 5А і В, відповідно. Менш сильна нейтралізація спостерігалася при введенні М55 в дозі 20 і 2,0 мг/кг спостерігалася тільки з ІР-10. Сироваткові рівні ІЛ-6, еотаксину і MCP-1 були знижені при введенні 20 мг/кг М55, але зниження рівня КС було відмічене тільки при введенні будь-якої дози М55. Ці дані демонструють здатність антитіл до онкостатину М до нейтралізації біологічних ефектів екзогенного людського онкостатину М в мишачій моделі його системного введення.

ІР-10, індукований інтерфероном-гамма протеїн масою 10 кДа, або малий індукований цитокін В10, є білком, який у людини кодується геном CXCL10 (С-Х-С мотив хемокіну 10). CXCL10 був пов'язаний з деякими біологічними ролями, такими як хемоатракція моноцитів/макрофагів, Т-клітин, НК-клітин і дендритних клітин і стимуляція адгезії Т-клітин до ендотелію. КС, тепер відомий як ліганд 1 (CXCL1) хемокіну з мотивом С-Х-С, є малим цитокіном, що належать до сімейства хемокіну CXС, який раніше називалися GRO1-онкогеном, GRO α , нейтрофілактівуючим протеїном 3 (NAP-3) і стимулюючим активатором росту меланоми альфа (MSGA- α). У людей цей білок кодується геном CXCL1. CXCL1 експресується макрофагами, нейтрофілами і епітеліальними клітинами, і він має хемоатрактантну активність для нейтрофілів.

ПРИКЛАД 7. КОКРИСТАЛОГРАФІЯ

Fab-фрагмент, що містить V-ділянки H17 (SEQ ID NO: 51) і L180 (SEQ ID NO: 55), був кристалізований із залишками людського ОМ (SEQ ID NO: 10) 26-212.

ОМ має загальну тривимірну структуру у вигляді вузла з чотирьох спіралей з іншими членами сімейства цитокінів gr130. Будова у вигляді вузла з чотирьох спіралей характеризується чотирма α -спіральними сегментами, позначеними як А (основи 10-37), В (основи 67-90), С (основи 105-131) і D (основи 159-185) і зв'язаними відносно неструктурованими петлями. ОМ взаємодіє з gr130 за допомогою кінцевої ділянки епітопа II, яка включає амінокислотні залишки (Q16, Q20, G120, N123, N124), розташовані в спіралях А і С (Deller et al. Структура 8(8):863-874, 2000; Liu et al. Int. J. Mol. Med. 23:161-172, 2009). Ділянка III, епітоп, відповідальний за взаємодію ОМ з OSMR β і LIFR α , ймовірно, переважно визначається залишками, розташованими в спіралі D (Deller et al. Структура 8(8):863-874, 2000).

Кристалізація

Кристалізація комплексу проведена за допомогою способу дифузії парів в сидячій краплі при 20°C з використанням робота для кристалізації протеїну Oryx4 (Douglas Instruments), що розподіляє рівні об'єми 0,2 мкл білкового комплексу (10,95 мг/мл) і 0,2 мкл резервуарного розчину. Було проведено декілька спроб кристалізації. Множина крапель, які залишилися прозорими, відображає високу розчинність комплексу. Кристали були одержані з 0,1M MES, pH 6,5, 2,4M сульфату амонію і 0,1M Тріс, pH 8,5, 3,5M форміату натрію.

Одержана кристалічна структура розчину

Залишки ОМ в поєднанні з H14/L180 Fab-фрагментами утворюють зв'язуваний епітоп. Залишки антитіла в поєднанні з ОМ утворюють зв'язуваний паратоп. Всі шість CDR двох варіабельних доменів беруть участь в зв'язуванні ОМ. Контактуючі залишки наведені в Таблиці 13 і показані на фіг. 5. Довга CDR-L1 разом з CDR з варіабельної ділянки H1 важкого ланцюга утворюють ділянку зв'язування антигену у вигляді западини з невеликим ребром знизу (фіг. 4С, ліва панель). Після зв'язування дві сторони западини охоплюють вузол з чотирьох спіралей ОМ вздовж спіралей А і С, причому нижнє ребро зв'язується між двома спіралями (фіг. 4С, права панель). Поверхня для зв'язування антитіла і антигену закриває 2,514 А2 поверхні, доступної для впливу розчинника (1225 А2 для антитіла і 1298 А2 для антигену). Хоч на поверхні присутня

множина заряджених залишків, там відсутні іонні зв'язки, тим самим підтверджуючи, що вандерваальсові і водневі зв'язки грають найбільш важливі ролі у взаємодіях антитіла і антигену.

Таблиця 13

OM	VH (H17)	VL (L180)
Q16	Y32, R98	
K19	Y105	Y55, E61
Q20	S31, P100, V101	
D22		I36
L23	P100, Y105, A104, V101	Y97
Q25		S34
D26		G31, S32, S33
T27		S32, S33
S28		S32, F38, F98
R29		F38, Y97, F98
D32		S32
I105	R59	
E106		T100
E109	Y57, R59	
K110		F98, S99
Q112	Y57	
M113	Y57, R59, S102	T100
P116	W33, Y52	
N117	W33, V101, S102	
L119	Y52, D55	
G120	T30, Y52	

* Довжина становить 3,3 Å для водневих зв'язків (виділені жирним) і 3,9 Å для вандерваальсових сил.

5

Тому H17/L180 Fab контактує з OM-залишками, які, як було показано раніше, взаємодіють з gp130; Q20 і G120, і вздовж спіралей A і C.

ПРИКЛАД 8. ФАРМАКОКІНЕТИКА

10 OM є розчинною мішенню, пов'язаною з запальними процесами, на відміну від клітинної поверхні, презентуючої мішень на клітині. Цілий IgG містить зв'язувальні ділянки, які були описані в цьому документі, і додатково має Fc-домен, який, з урахуванням мети і терапевтичних характеристик, що стосуються застосування використаних способів генної інженерії Fc з мутаціями, забезпечує зміни в зв'язуванні FcR.

15 У даному складі тривала активність і персистенція в крові є позитивною характеристикою для терапевтичного моноклонального IgG. Тому Fc-домен має сильну афінність до неонатального рецептора (FcRn).

20 Використання описаних раніше мутацій M428L (MedImmune патент США № 7670600) в поєднанні з N434S (Заявка на патент США 7371826, міжнародна заявка WO 2006/053301) дозволяє використовувати стандартні способи рекомбінації для створення мутантних антитіл і антитіл дикого типу. Два Mab, M71 і M71 L/S, були порівняні в аналізах стандартної активності і з точки зору персистенції в крові приматів (крім людини).

Аналізи

25 M71 і M71 L/S були порівняні один з одним в аналізі проліферації A375-S2. Залежність відповідей від дози була оцінена з початкової концентрації 1 мкг/мл і 1-5 розведеннями до 0,00032 мкг/мл. При концентрації 1 мкг/мл контрольний ізотип цих антитіл, CNTO3930 і CNTO8852, відповідно, не впливає на здатність 2 нг/мл людського онкостатину M інгібувати проліферацію. M71 і M71 L/S повністю нейтралізували вплив онкостатину M в концентрації 1 мкг/мл з виміряною різницею в IC₅₀.

30 M71 і M71 L/S були порівняні в мишачій моделі системного введення OM. Коротко, мишам підшкірно вводили дози M71 і M71 L/S (20, 10 або 5,0 мг/кг), CNTO3930 (контрольний ізотип

hulgG1, 20 мг/кг), CNTO8852 (контрольний ізотип для мутантної версії Fc, 20 мг/кг) або PBS в об'ємі 10 мкл/м. Через 24 години кожній миші було введено і/п 10 мкг або лабораторного рекомбінантного людського онкостатину М, одержаного з клітин CHO, в PBS (Sigma D8357) з 0,1% мишачого альбуміну сироватки (Sigma A3559), або одного контрольного несучого середовища PBS-MSA (загальний об'єм 200 мкл). Через 1 годину миші були наркотизовані CO₂, і кров була взята за допомогою термінальної пункції серця. Окремим зразкам крові дали згорнутися на льоду протягом 20 хв., а потім вони були центрифуговані на 3500 обертах на хвилину протягом 10-15 хвилин. Зразки сироватки залишалися замороженими до проведення аналізу за допомогою виготовленого на замовлення мишачого мультикомплексу Millipore, що містить гранули, специфічні до ІЛ-6, MCP-1, еотаксину, KC і IP-10. Контрольний ізотип не надав якого-небудь впливу на вивільнення цитокінів, викликане людським онкостатином М. Тим не менше, M71 і M71 L/S нейтралізують викликане онкостатином М вивільнення цитокінів без очевидних відмінностей в силі і ефективності.

Фармакокінетичний аналіз

Періоди напівжиття M71 і M71 L/S в сироватці були порівняні в некінцевому дослідженні фармакокінетики на яванських макаках. Дослідження включало всього 12 яванських макак, у яких оцінювалося підшкірне (п/ш, n=3) і внутрішньовенне (в/в, n=3) введення кожного антитіла. Антитіла вводилися в дозі 3 мг/кг, і дослідження продовжувалося протягом 60 днів. Зразки крові були взяті через 1 (тільки IV групи) і 6 годин і на 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 30, 37, 45 і 60 дні. Сироватка зразків була заморожена при -80°C до початку дослідження. Рівні антитіл в сироватці були визначені за допомогою твердофазного ІФА, оптимізованого для сироватки яванських макак на платформі MesoScale Discovery. Біотинільовані захоплені антитіла були антиідіотипічними антитілами проти M71 (мишачі анти-M71). Детекторне антитіло було мічене рутенієм антилюдським IgG, і зчитувальний пристрій був представлений хемілюмінесцентним приладом MesoScale Discovery.

Результати дослідження показані на фіг. 6A і B. Фіг. 6A зображує графіки при в/в введенні, при якому період напівжиття в сироватці M71 становить 15,21 +/- 3,0 дні, і період напівжиття M71 L/S становить 29,4 +/- 2,3 дні. Схожі результати були одержані при підшкірному введенні (фіг. 6B) з періодом напівжиття в сироватці 15,4 +/- 4 дні для M71 і 32,0 +/- 5,9 дні для M71 L/S.

Результати показали, що M71 L/S t_{1/2} підвищилася в два рази в порівнянні з M71.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Janssen Biotech, Inc.

<120> Людські імуноглобуліни класу М до онкостатину і методи їх застосування

<130> CEN5306WOPCT

<160> 56

<170> PatentIn версія 3.5

<210> 1

<211> 98

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<220>

<221> Варіант

<222> (33)..(33)

<223> X можливо Ала або Глі

<220>

<221> Варіант

<222> (50)..(50)

<223> X можливо Глі або Три

<220>

<221> Варіант

<222> (52)..(52)

<223> X можливо Іле або Сер

<220>

<221> Варіант

<222> (53)..(53)

<223> X можливо Ала або Про

<220>

<221> Варіант

<222> (54)..(54)

<223> X можливо Іле або Тір

<220>

<221> Варіант

<222> (55)..(55)

<223> X можливо Асн або Фен

<400> 1

Глн Вал Глн Лей Вал Глн Сер Глі Ала Глу Вал Ліз Ліз Про Глі Сер
1 5 10 15

Сер Вал Ліз Вал Сер Цис Ліз Ала Сер Глі Глі Тре Фен Сер Сер Тір
20 25 30

Хаа Іле Сер Три Вал Арг Глн Ала Про Глі Глн Глі Лей Глу Три Мет
35 40 45

Глі Хаа Іле Хаа Хаа Хаа Хаа Глі Тре Ала Асн Тір Ала Глн Ліз Фен
50 55 60

Глн Глі Арг Вал Тре Іле Тре Ала Асп Глу Сер Тре Сер Тре Ала Тір
65 70 75 80

Мет	Глу	Лей	Сер	Сер	Лей	Арг	Сер	Глу	Асп	Тре	Ала	Вал	Тір	Тір	Цис
			85		90			95							

Ала Арг

<210> 2
 <211> 98
 <212> Програмна довідкова таблиця
 <213> Геном людини

<220>
 <221> Варіант
 <222> (31)..(31)
 <223> X можливо Асп, Асн або Сер

<220>
 <221> Варіант
 <222> (33)..(33)
 <223> X можливо Асп, Глі або Три

<220>
 <221> Варіант
 <222> (35)..(35)
 <223> X можливо Гіс або Сер

<220>
 <221> Варіант
 <222> (50)..(50)
 <223> X можливо Ала, Асн, Глі або Вал

<220>

<221> Варіант
 <222> (52)..(52)
 <223> X можливо Асн, Ліз, Сер або Три

<220>
 <221> Варіант
 <222> (53)..(53)
 <223> X можливо Глн, Глі, Сер або Тір

<220>
 <221> Варіант
 <222> (54)..(54)
 <223> X можливо Асп або Сер

<220>
 <221> Варіант
 <222> (56)..(56)
 <223> X можливо Глі або Сер

<400> 2

Глу Вал Глн Лей Лей Глу Сер Глі Глі Глі Лей Вал Глн Про Глі Глі
 1 5 10 15

Сер Лей Арг Лей Сер Цис Ала Ала Сер Глі Фен Тре Фен Сер Хаа Тір
 20 25 30

Хаа Мет Хаа Три Вал Арг Глн Ала Про Глі Ліз Глі Лей Глу Три Вал
 35 40 45

Сер Хаа Іле Хаа Хаа Хаа Глі Хаа Сер Тре Тір Тір Ала Асп Сер Вал
 50 55 60

Ліз Глі Арг Фен Тре ІлеСер Арг Асп Асн Сер Ліз Асн Тре Лей Тір
65 70 75 80

Лей Глн Мет Асн Сер Лей Арг Ала Глу Асп Тре Ала Вал Тір Тір Цис
85 90 95

Ала Ліз

<210> 3
<211> 98
<212> Програмна довідкова таблиця
<213> Геном людини

<220>
<221> Варіант
<222> (31)..(31)
<223> X можливо Асн або Сер

<220>
<221> Варіант
<222> (35)..(35)
<223> X можливо Глі або Сер

<220>
<221> Варіант
<222> (50)..(50)
<223> X можливо Арг або Іле

<220>

<221> Варіант

<222> (52)..(52)

<223> X можливо Асп або Тір

<220>

<221> Варіант

<222> (54)..(54)

<223> X можливо Глі або Сер

<220>

<221> Варіант

<222> (57)..(57)

<223> X можливо Асп або Тір

<400> 3

Глу Вал Глн Лей Вал Глн Сер Глі Ала Глу Вал Ліз Ліз Про Глі Глу
1 5 10 15

Сер Лей Ліз Ле Сер Цис Ліз Глі Сер Глі Тір Сер Фен Тре Хаа Тір
20 25 30

Три Ле Хаа Три Вал Арг Глн Мет Про Глі Ліз Глі Лей Глу Три Мет
35 40 45

Глі Хаа Ле Хаа Про Хаа Асп Сер Хаа Тре Арг Тір Сер Про Сер Фен
50 55 60

Глн Глі Глн Вал Тре Ле Сер Ала Асп Ліз Сер Ле Сер Тре Ала Тір
65 70 75 80

Лей Глн Три Сер Сер Лей Ліз Ала Сер Асп Тре Ала Мет Тір Тір Цис
85 90 95

Ала Арг

<210> 4
<211> 11
<212> Програмна довідкова таблиця
<213> Геном людини

<400> 4

Три Глі Глн Глі Тре Лей Вал Тре Вал Сер Сер
1 5 10

<210> 5
<211> 88
<212> Програмна довідкова таблиця
<213> Геном людини

<220>
<221> Варіант
<222> (30)..(30)
<223> X можливо Ала, Асп, Асн, Сер або Арг

<220>
<221> Варіант
<222> (31)..(31)

<223> X можливо Асп, Глі, Ліз, Асн або Сер

<220>

<221> Варіант

<222> (32)..(32)

<223> X можливо Ала, Асп, Фен, Гіс, Асн, Сер Три, Вал або Тір

<220>

<221> Варіант

<222> (50)..(50)

<223> X можливо Ала, Асп, Фен, Глі, Асн, Ліз, Тре або Тір

<400> 5

Асп Іле Глн Мет Тре Глн Сер Про Сер Сер Лей Сер Ала Сер Вал Глі
1 5 10 15

Асп Арг Вал Тре Іле Тре Цис Арг Ала Сер Глн Сер Іле Хаа Хаа Хаа
20 25 30

Лей Асн Три Тір Глн Глн Ліз Про Глі Ліз Ала Про Ліз Лей Лей Іле
35 40 45

Тір Хаа Ала Сер Сер Лей Глн Сер Глі Вал Про Сер Арг Фен Сер Глі
50 55 60

Сер Глі Сер Глі Тре Асп Фен Тре Лей Тре Іле Сер Сер Лей Глн Про
65 70 75 80

Глу Асп Фен Ала Тре Тір Тір Цис

85

<210> 6

<211> 88

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<220>

<221> Варіант

<222> (30)..(30)

<223> X можливо Ала, Асн, Асп, Арг або Сер

<220>

<221> Варіант

<222> (31)..(31)

<223> X можливо Асн, Асп, Ліз або Сер

<220>

<221> Варіант

<222> (32)..(32)

<223> X можливо Ала, Асн, Асп, Гіс, Фен, Сер, Три або Тір

<220>

<221> Варіант

<222> (50)..(50)

<223> X можливо Ала, Асн, Асп, Глі, Ліз, Фен, Тре або Тір

<400> 6

Глу Іле Вал Лей Тре Глн Сер Про Ала Тре Лей Сер Лей Сер Про Глі

1

5

10

15

Глу Арг Ала Тре Лей Сер Цис Арг Ала Сер Глн Сер Вал Хаа Хаа Хаа
20 25 30

Лей Ала Три Тір Глн Глн Ліз Про Глі Глн Ала Про Арг Лей Лей Ле
35 40 45

Тір Хаа Ала Сер Асн Арг Ала Тре Глі Ле Про Ала Арг Фен Сер Глі
50 55 60

Сер Глі Сер Глі Тре Асп Фен Тре Лей Тре Ле Сер Сер Лей Глу Про
65 70 75 80

Глу Асп Фен Ала Вал Тір Тір Цис
85

<210> 7

<211> 89

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<220>

<221> Варіант

<222> (30)..(30)

<223> X можливо Асн, Асп, Арг, Сер або Тре

<220>

<221> Варіант

<222> (31)..(31)

<223> X можливо Асн, Арг або Сер

<220>

<221> Варіант

<222> (32)..(32)

<223> X можливо Ала, Асп, Асн, Арг, Гіс або Сер

<220>

<221> Варіант

<222> (33)..(33)

<223> X можливо Глу, Глн, Гіс, Ліз, Фен, Сер або Тір

<220>

<221> Варіант

<222> (51)..(51)

<223> X можливо Ала, Асп, Глі або Сер

<400> 7

Глу Лє Вал Лей Тре Глн Сер Про Ала Тре Лей Сер Лей Сер Про Глі
1 5 10 15

Глу Арг Ала Тре Лей Сер Цис Арг Ала Сер Глн Сер Вал Хаа Хаа Хаа
20 25 30

Хаа Лей Ала Три Тір Глн Глн Ліз Про Глі Глн Ала Про Арг Лей Лей
35 40 45

Лє Тір Хаа Ала Сер Сер Арг Ала Тре Глі Лє Про Асп Арг Фен Сер
50 55 60

Глі Сер Глі Сер Глі Тре Асп Фен Тре Лей Тре Лє Сер Сер Лей Глу

65 70 75 80

Про Глу Асп Фен Ала Вал Тір Тір Цис

85

<210> 8

<211> 94

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<220>

<221> Варіант

<222> (31)..(31)

<223> X можливо Ала, Гіс, Фен, Сер або Тір

<220>

<221> Варіант

<222> (36)..(36)

<223> X можливо Асп, Глу, Ліз або Тре

<220>

<221> Варіант

<222> (38)..(38)

<223> X можливо Ала, Асп, Асп, Гіс, Фен, Сер, Три або Тір

<220>

<221> Варіант

<222> (56)..(56)

<223> X можливо Ала, Асп, Арг, Сер, Три або Тір

<400> 8

Асп Іле Вал Мет Тре Глн Сер Про Асп Сер Лей Ала Вал Сер Лей Глі
1 5 10 15

Глу Арг Ала Тре Іле Асн Цис Ліз Сер Сер Глн Сер Вал Лей Хаа Сер
20 25 30

Сер Асн Асн Хаа Асн Хаа Лей Ала Три Тір Глн Глн Ліз Про Глі Глн
35 40 45

Про Про Ліз Лей Лей Іле Тір Хаа Ала Сер Тре Арг Глу Сер Глі Вал
50 55 60

Про Асп Арг Фен Сер Глі Сер Глі Сер Глі Тре Асп Фен Тре Лей Тре
65 70 75 80

Іле Сер Сер Лей Глн Ала Глу Асп Вал Ала Вал Тір Тір Цис
85 90

<210> 9

<211> 9

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<220>

<221> Варіант

<222> (3)..(3)

<223> X можливо Ала, Асп, Арг, Глі, Гіс, Фен, Про, Сер або Тір

<220>

<221> Варіант

<222> (4)..(4)

<223> X можливо Асп, Асн, Арг, Глу, Глі, Гіс, Ле, Лей, Ліз, Фен, Сер
або Тір

<220>

<221> Варіант

<222> (5)..(5)

<223> X можливо Асп, Асн, Арг, Глі, Гіс, Ліз, Тре або Сер

<220>

<221> Варіант

<222> (6)..(6)

<223> X можливо Ала, Арг, Глі, Лей, Фен, Про, Сер, Тре, Три або Вал

<220>

<221> Варіант

<222> (8)..(8)

<223> X можливо Асн, Арг, Ле, Лей, Фен, Три або Тір

<400> 9

Глн Глн Хаа Хаа Хаа Хаа Про Хаа Тре

1 5

<210> 10

<211> 10

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 10

Фен Глі Глн Глі Тре Ліз Вал Глу Ле Ліз

1 5 10

<210> 11

<211> 227

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 11

Ала Ала Іле Глі Сер Цис Сер Ліз Глу Тір Арг Вал Лей Лей Глі Глн

1 5 10 15

Лей Глн Ліз Глн Тре Асп Лей Мет Глн Асп Тре Сер Арг Лей Лей Асп

20 25 30

Про Тір Іле Арг Іле Глн Глі Лей Асп Вал Про Ліз Лей Арг Глу Гіс

35 40 45

Цис Арг Глу Арг Про Глі Ала Фен Про Сер Глу Глу Тре Лей Арг Глі

50 55 60

Лей Глі Арг Арг Глі Фен Лей Глн Тре Лей Асп Ала Тре Лей Глі Цис

65 70 75 80

Вал Лей Гіс Арг Лей Ала Асп Лей Глу Глн Арг Лей Про Ліз Ала Глн

85 90 95

Асп Лей Глу Арг Сер Глі Лей Асп Іле Глу Асп Лей Глу Ліз Лей Глн

100 105 110

Мет Ала Арг Про Асн Іле Лей Глі Лей Арг Асн Асн Іле Тір Цис Мет
115 120 125

Ала Глн Лей Лей Асп Асн Сер Асп Тре Ала Глу Про Тре Ліз Ала Глі
130 135 140

Арг Глі Ала Сер Глн Про Про Тре Про Тре Про Ала Сер Асп Ала Фен
145 150 155 160

Глн Арг Ліз Лей Глу Глі Цис Арг Фен Лей Гіс Глі Тір Гіс Арг Фен
165 170 175

Мет Гіс Сер Вал Глі Арг Вал Фен Сер Ліз Три Глі Глу Сер Про Асн
180 185 190

Арг Сер Арг Арг Гіс Сер Про Гіс Глн Ала Лей Арг Ліз Глі Вал Арг
195 200 205

Арг Тре Арг Про Сер Арг Ліз Глі Ліз Арг Лей Мет Тре Арг Глі Глн
210 215 220

Лей Про Арг
225

<210> 12

<211> 227

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 12

Ала Ала Мет Глі Сер Цис Сер Ліз Глу Тір Арг Мет Лей Лей Глі Глн
1 5 10 15

Лей Глн Ліз Глн Тре Асп Лей Мет Глн Асп Тре Сер Арг Лей Лей Асп
20 25 30

Про Тір Іле Арг Іле Глн Глі Лей Асп Іле Про Ліз Лей Арг Глу Гіс
35 40 45

Цис Арг Глу Сер Про Глі Ала Фен Про Сер Глу Глу Тре Лей Арг Глі
50 55 60

Лей Глі Арг Арг Глі Фен Лей Глн Тре Лей Асп Ала Тре Лей Глі Арг
65 70 75 80

Вал Лей Гіс Арг Лей Ала Асп Лей Глу Глн Гіс Лей Про Ліз Ала Глн
85 90 95

Асп Лей Глу Арг Сер Глі Лей Асп Іле Глу Асп Лей Глу Ліз Лей Глн
100 105 110

Мет Ала Арг Про Асн Вал Лей Глі Лей Арг Асн Асн Ле Тір Цис Мет
115 120 125

Ала Глн Лей Лей Асп Асн Сер Асп Мет Тре Глу Про Тре Ліз Ала Глі
130 135 140

Арг Глі Тре Про Глн Про Про Тре Про Тре Про Тре Сер Асп Вал Фен
145 150 155 160

Глн Арг Ліз Лей Глу Глі Цис Сер Фен Лей Арг Глі Тір Гіс Арг Фен
165 170 175

Мет Гіс Сер Вал Глі Арг Вал Фен Сер Ліз Три Глі Глу Сер Про Асн
180 185 190

Арг Сер Арг Арг Гіс Сер Про Гіс Глн Ала Лей Арг Ліз Глі Вал Арг
195 200 205

Арг Тре Арг Про Сер Арг Ліз Глі Асн Арг Лей Мет Про Арг Глі Глн
210 215 220

Лей Про Арг
225

<210> 13

<211> 5

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 13

Сер Тір Ала Іле Сер

1 5

<210> 14

<211> 5

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 14

Сер Тір Три Іле Сер

1 5

<210> 15

<211> 5

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 15

Сер Тір Три Іле Глі

1 5

<210> 16

<211> 17

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 16

Глі Іле Іле Про Іле Фен Глі Асн Ала Асн Тір Ала Глн Ліз Фен Глн
1 5 10 15

Глі

<210> 17

<211> 17

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 17

Іле Іле Тір Про Глі Асп Сер Тір Тре Арг Тір Сер Про Сер Фен Глн
1 5 10 15

Глі

<210> 18

<211> 17

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 18

Іле Іле Тір Про Глі Асп Сер Асп Тре Арг Тір Сер Про Сер Фен Глн
1 5 10 15

Глі

<210> 19

<211> 9

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 19

Тір Глі Ала Ліз Глі Лей Лей Асп Тір

1 5

<210> 20

<211> 10

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 20

Глі Сер Вал Фен Глу Ала Тір Фен Асп Тір

1 5 10

<210> 21

<211> 10

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 21

Вал Про Вал Сер Про Ала Тір Лей Асп Тір

1 5 10

<210> 22

<211> 9

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 22

Глі Фен Глі Ала Сер Тір Лей Асп Тір

1 5

<210> 23

<211> 17

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 23

Ліз Сер Сер Глн Сер Вал Лей Тір Сер Сер Асн Асн Ліз Асн Тір Лей

1 5 10 15

Ала

<210> 24

<211> 17

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 24

Ліз Сер Сер Глн Сер Вал Лей Сер Сер Сер Асн Асн Глу Асн Три Лей
1 5 10 15

Ала

<210> 25

<211> 17

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 25

Ліз Сер Сер Глн Сер Вал Лей Ала Сер Сер Асн Асн Асн Асн Фен Лей
1 5 10 15

Ала

<210> 26

<211> 7

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 26

Три Ала Сер Тре Арг Глу Сер
1 5

<210> 27

<211> 8

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 27

Глн Глн Тір Тір Сер Тре Про Лей

1 5

<210> 28

<211> 8

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 28

Глн Глн Сер Фен Сер Фен Про Ле

1 5

<210> 29

<211> 9

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<220>

<221> Варіант

<222> (3)..(3)

<223> X можливо Сер або Тір

<220>

<221> Варіант

<222> (4)..(4)

<223> X можливо Фен або Тір

<220>

<221> Варіант

<222> (6)..(6)

<223> X можливо Фен або Тре

<400> 29

Глн Глн Хаа Хаа Сер Хаа Про Лей Тре

1 5

<210> 30

<211> 17

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 30

Ліз Сер Сер Глн Сер Вал Лей Сер Сер Глі Асн Асн Глі Асн Тір Лей

1 5 10 15

Ала

<210> 31

<211> 17

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 31

Ліз Сер Сер Глн Сер Вал Лей Сер Сер Глі Сер Асн Гіс Асн Тір Лей
1 5 10 15

Ала

<210> 32

<211> 17

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 32

Ліз Сер Сер Глн Сер Вал Лей Сер Сер Арг Глі Асн Асн Асн Тір Лей
1 5 10 15

Ала

<210> 33

<211> 17

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 33

Ліз Сер Сер Глн Сер Вал Лей Глі Сер Три Глі Асн Асп Асн Тір Лей
1 5 10 15

Ала

<210> 34

<211> 17

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 34

Ліз Сер Сер Глн Сер Вал Лей Тір Сер Глі Глі Асн Глі Асн Тір Лей
1 5 10 15

Ала

<210> 35

<211> 17

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 35

Ліз Сер Сер Глн Сер Вал Лей Глі Сер Три Глі Асн Глі Гіс Тір Лей
1 5 10 15

Ала

<210> 36

<211> 17

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 36

Ліз	Сер	Сер	Глн	Сер	Вал	Лей	Сер	Сер	Асн	Глі	Асн	Гіс	Асн	Тір	Лей
1		5			10			15							

Ала

<210> 37

<211> 17

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 37

Ліз	Сер	Сер	Глн	Сер	Вал	Лей	Сер	Сер	Асп	Глі	Асн	Гіс	Асн	Тір	Лей
1		5			10			15							

Ала

<210> 38

<211> 17

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 38

Ліз Сер Сер Глн Сер Вал Лей Глі Сер Сер Сер Асн Іле Асн Фен Лей
1 5 10 15

Ала

<210> 39

<211> 17

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 39

Ліз Сер Сер Глн Сер Вал Лей Глі Сер Глі Асп Асн Арг Асн Тір Лей
1 5 10 15

Ала

<210> 40

<211> 17

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 40

Ліз Сер Сер Глн Сер Вал Лей Глі Сер Глі Тір Асн Арг Асн Тір Лей
1 5 10 15

Ала

<210> 41

<211> 17

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 41

Ліз Сер Сер Глн Сер Вал Лей Глі Сер Три Гіс Асн Асп Асн Тір Лей

1 5 10 15

Ала

<210> 42

<211> 7

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 42

Ліз Ала Сер Тре Арг Глу Сер

1 5

<210> 43

<211> 7

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 43

Сер Ала Сер Тре Арг Глу Сер

1 5

<210> 44

<211> 7

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 44

Асн Ала Сер Тре Арг Глу Сер

1 5

<210> 45

<211> 9

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 45

Глн Глн Тір Сер Тре Тре Про Лей Тре

1 5

<210> 46

<211> 9

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 46

Глн Глн Тір Фен Сер Тре Про Іле Тре

1 5

<210> 47

<211> 9

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<220>

<221> Варіант

<222> (4)..(4)

<223> X можливо Фен або Тір

<220>

<221> Варіант

<222> (8)..(8)

<223> X можливо Іле або Лей

<400> 47

Глн Глн Тір Хаа Сер Тре Про Хаа Тре

1 5

<210> 48

<211> 96

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 48

Глу Вал Глн Лей Вал Глн Сер Глі Ала Глу Вал Ліз Ліз Про Глі Глу

1 5 10 15

Сер Лей Ліз Іле Сер Цис Ліз Глі Сер Глі Тір Сер Фен Тре Сер Тір
20 25 30

Три Іле Сер Три Вал Арг Глн Мет Про Глі Ліз Глі Лей Глу Три Мет
35 40 45

Глі Іле Іле Тір Про Глі Асп Сер Тір Тре Арг Тір Сер Про Сер Фен
50 55 60

Глн Глі Глн Вал Тре Іле Сер Ала Асп Ліз Сер Іле Сер Тре Ала Тір
65 70 75 80

Лей Глн Три Сер Сер Лей Ліз Ала Сер Асп Тре Ала Мет Тір Тір Цис
85 90 95

<210> 49

<211> 102

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 49

Асп Іле Вал Мет Тре Глн Сер Про Асп Сер Лей Ала Вал Сер Лей Глі
1 5 10 15

Глу Арг Ала Тре Іле Асп Цис Ліз Сер Сер Глн Сер Вал Лей Сер Сер
20 25 30

Арг Глі Асн Асн Асн Тір Лей Ала Три Тір Глн Глн Ліз Про Глі Глн
35 40 45

Про Про Ліз Лей Лей Іле Тір Ліз Ала Сер Тре Арг Глу Сер Глі Вал
50 55 60

Про Асп Арг Фен Сер Глі Сер Глі Сер Глі Тре Асп Фен Тре Лей Тре
65 70 75 80

Іле Сер Сер Лей Глн Ала Глу Асп Вал Ала Вал Тір Тір Цис Глн Глн
85 90 95

Тір Тір Сер Тре Про Лей
100

<210> 50

<211> 102

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 50

Асп Іле Вал Мет Тре Глн Сер Про Асп Сер Лей Ала Вал Сер Лей Глі
1 5 10 15

Глу Арг Ала Тре Іле Асн Цис Ліз Сер Сер Глн Сер Вал Лей Сер Сер
20 25 30

Асп Глі Асн Гіс Асн Тір Лей Ала Три Тір Глн Глн Ліз Про Глі Глн
35 40 45

Про Про Ліз Лей Лей Іле Тір Ліз Ала Сер Тре Арг Глн Сер Глі Вал
50 55 60

Про Асп Арг Фен Сер Глі Сер Глі Сер Глі Тре Асп Фен Тре Лей Тре
65 70 75 80

Іле Сер Сер Лей Глн Ала Глн Асп Вал Ала Вал Тір Тір Цис Глн Глн
85 90 95

Тір Тір Сер Тре Про Лей
100

<210> 51

<211> 102

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 51

Асп Іле Вал Мет Тре Глн Сер Про Асп Сер Лей Ала Вал Сер Лей Глі
1 5 10 15

Глн Арг Ала Тре Іле Асн Цис Ліз Сер Сер Глн Сер Вал Лей Глі Сер
20 25 30

Сер Сер Асн Іле Асн Фен Лей Ала Три Тір Глн Глн Ліз Про Глі Глн
35 40 45

Про Про Ліз Лей Лей Іле Тір Сер Ала Сер Тре Арг Глу Сер Глі Вал
50 55 60

Про Асп Арг Фен Сер Глі Сер Глі Сер Глі Тре Асп Фен Тре Лей Тре
65 70 75 80

Іле Сер Сер Лей Глн Ала Глу Асп Вал Ала Вал Тір Тір Цис Глн Глн
85 90 95

Тір Фен Сер Тре Про Іле
100

<210> 52

<211> 102

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 52

Асп Іле Вал Мет Тре Глн Сер Про Асп Сер Лей Ала Вал Сер Лей Глі
1 5 10 15

Глу Арг Ала Тре Іле Асн Цис Ліз Сер Сер Глн Сер Вал Лей Сер Сер
20 25 30

Глі Глі Асн Три Асн Тір Лей Ала Три Тір Глн Глн Ліз Про Глі Глн
35 40 45

Про Про Ліз Лей Лей Іле Тір Три Ала Сер Тре Арг Глу Сер Глі Вал
50 55 60

Про Асп Арг Фен Сер Глі Сер Глі Сер Глі Тре Асп Фен Тре Лей Тре
65 70 75 80

Іле Сер Сер Лей Глн Ала Глу Асп Вал Ала Вал Тір Тір Цис Глн Глн
85 90 95

Тір Тір Тре Тре Про Лей
100

<210> 53

<211> 102

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 53

Асп Іле Вал Мет Тре Глн Сер Про Асп Сер Лей Ала Вал Сер Лей Глі
1 5 10 15

Глу Арг Ала Тре Іле Асн Цис Ліз Сер Сер Глн Сер Вал Лей Сер Сер
20 25 30

Глі Сер Асн Арг Асн Тір Лей Ала Три Тір Глн Глн Ліз Про Глі Глн
35 40 45

Про Про Ліз Лей Лей Ле Тір Три Ала Сер Тре Арг Глу Сер Глі Вал
50 55 60

Про Асп Арг Фен Сер Глі Сер Глі Сер Глі Тре Асп Фен Тре Лей Тре
65 70 75 80

Ле Сер Сер Лей Глн Ала Глу Асп Вал Ала Вал Тір Тір Цис Глн Глн
85 90 95

Тір Тір Сер Тре Про Лей
100

<210> 54

<211> 108

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 54

Глу Вал Глн Лей Вал Глн Сер Глі Ала Глу Вал Ліз Ліз Про Глі Глу
1 5 10 15

Сер Лей Ліз Ле Сер Цис Ліз Глі Сер Глі Тір Сер Фен Тре Сер Тір
20 25 30

Три Іле Сер Три Вал Арг Глн Мет Про Глі Ліз Глі Лей Глу Три Мет
35 40 45

Глі Іле Іле Тір Про Глі Асп Сер Тір Тре Арг Тір Сер Про Сер Фен
50 55 60

Глн Глі Глн Вал Тре Іле Сер Ала Асп Ліз Сер Іле Сер Тре Ала Тір
65 70 75 80

Лей Глн Три Сер Сер Лей Ліз Ала Сер Асп Тре Ала Мет Тір Тір Цис
85 90 95

Ала Арг Глі Сер Вал Фен Глу Ала Тір Фен Асп Тір
100 105

<210> 55

<211> 108

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Геном людини

<400> 55

Глу Вал Глн Лей Вал Глн Сер Глі Ала Глу Вал Ліз Ліз Про Глі Глу
1 5 10 15

Сер Лей Ліз Іле Сер Цис Ліз Глі Сер Глі Тір Сер Фен Тре Сер Тір
20 25 30

Три Іле Сер Три Вал Арг Глн Мет Про Глі Ліз Глі Лей Глу Три Мет
35 40 45

Глі Іле Іле Тір Про Глі Асп Сер Тір Тре Арг Тір Сер Про Сер Фен
50 55 60

Глн Глі Глн Вал Тре Іле Сер Ала Асп Ліз Сер Іле Сер Тре Ала Тір
65 70 75 80

Лей Глн Три Сер Сер Лей Ліз Ала Сер Асп Тре Ала Мет Тір Тір Цис
85 90 95

Ала Арг Вал Про Вал Сер Про Ала Тір Лей Асп Тір
100 105

<210> 56

<211> 15

<212> Програмна довідкова таблиця

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Узагальнююча типова послідовність для ензимного біотинілювання

<400> 56

Глі Лей Асп Асп Іле Фен Глу Ала Глн Ліз Іле Глу Три Гіс Глу
1 5 10 15

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

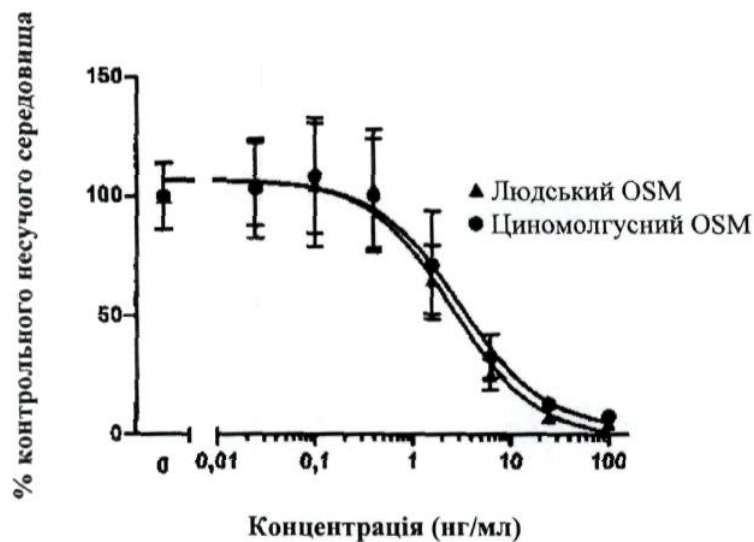
- 5 1. Виділене антитіло, яке специфічно зв'язується з онкостатином М (ОМ) людини, що містить варіабельну ділянку легкого ланцюга з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 51 і варіабельну ділянку важкого ланцюга з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 55.
2. Виділене антитіло відповідно за п. 1, яке додатково містить константну ділянку важкого ланцюга людини, вибрану з групи, що містить IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 і IgM.
- 10 3. Виділене антитіло за п. 2, в якому константна ділянка містить людський ізотип IgG.
4. Виділене антитіло за п. 3, в якому ізотип є IgG1.

5. Виділене антитіло за п. 4, в якому константна ділянка змінена, щоб забезпечити нелізованість антитіла.
6. Виділене антитіло за п. 5, в якому константна ділянка змінена для посилення афінності антитіла до неонатального рецептора (FcRn) в порівнянні з антитілом з послідовністю константного домену IgG1.
7. Виділене антитіло за п. 6, в якому константна ділянка змінена в положеннях 428 і 434, причому нумерація відповідає європейській нумерації по Кебату.
8. Виділене антитіло за п. 7, в якому мутаціями є M428L і N434S, причому нумерація відповідає європейській нумерації по Кебату.
9. Виділене антитіло, яке специфічно зв'язується з ОМ, що містить:
H-CDR1, що має амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 14;
H-CDR2, що має амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 17;
H-CDR3, що має амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 21;
L-CDR1, що має амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 38;
L-CDR2, що має амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 43; і
L-CDR3, що має амінокислотну послідовність з SEQ ID NO: 46.
10. Антигензв'язувальний фрагмент будь-якого з антитіл за пп. 1-9.
11. Антигензв'язувальний фрагмент за п. 10, в якому згаданий фрагмент вибраний з групи, що містить Fab, Fab', Fd, F(ab)₂ і ScFv.
12. Фармацевтична композиція, яка містить ефективну кількість виділеного антитіла за будь-яким з пп. 1-9 або антигензв'язувального фрагмента за п. 10 або 11, і фармацевтично прийнятну допоміжну речовину або носій.
13. Спосіб лікування хворої людини, що страждає на захворювання або розлад, пов'язаний з модулюючою активністю або взаємодією людського ОМ з людським білком gp130, де згаданий спосіб включає етап введення згаданому пацієнту терапевтично ефективної кількості композиції за п. 12.
14. Спосіб за п. 13, в якому захворювання або розлад є артропатією, вибраною з групи, що включає остеоартрит, ревматоїдний артрит, псоріатичний артрит, анкілозуючий спондиліт, нейропатичну артропатію, реактивний артрит і артропатію при ураженні обертачів плеча.
15. Спосіб лікування хворої людини, яка страждає на захворювання або розлад, що характеризується вивільненням прозапальних цитокінів і хемокінів з макрофагів і моноцитів, який включає етап введення згаданому пацієнту терапевтично ефективної кількості композиції за п. 12.
16. Спосіб за п. 13, в якому захворювання або розлад вибираються з групи, що включає ревматоїдний артрит, ювенільний артрит, псоріатичний артрит, анкілозуючий спондиліт, псоріаз, хронічний бляшкоподібний псоріаз, червоний вовчак, запальні захворювання легень, ідіопатичний легеневий фіброз, сепсис, прееклампсію, ХНЗЛ, астму і розсіяний склероз.
17. Спосіб лікування хворої людини за п. 13, в якому пацієнт страждає на склерозуюче захворювання, вибране з групи, що включає атеросклероз, діабетичну нефропатію, легеневий фіброз, ідіопатичний легеневий фіброз, системну склеродермію і цироз.
18. Виділений полінуклеотид, що кодує важкий ланцюг і легкий ланцюг антитіла за будь-яким з пп. 1-9 або його антигензв'язувального фрагмента за п. 10 або 11.
19. Стабільно трансформована або трансфікована рекомбінантна клітина-хазяїн, що містить виділений полінуклеотид за п. 18.
20. Стабільно трансформована або трансфікована рекомбінантна клітина-хазяїн за п. 19, що містить вектор, який містить полінуклеотид, що кодує варіабельну амінокислотну послідовність легкого ланцюга SEQ ID NO: 51, і другий полінуклеотид, що кодує варіабельну амінокислотну послідовність важкого ланцюга SEQ ID NO: 55.
21. Клітина-хазяїн за п. 20, яка **відрізняється** тим, що згадана клітина належить ссавцю.
22. Клітина-хазяїн за п. 21, яка **відрізняється** тим, що згадана клітина є клітиною CHO.
23. Спосіб одержання антитіла, який включає етапи культивування клітини-хазяїна за п. 21 і виділення антитіла з цієї клітини.
24. Набір, який містить стерильний препарат виділеного антитіла або його антигензв'язувального фрагмента за будь-яким з пп. 1-9 і інструкції по введенню антитіла потребуючому його суб'єкту.

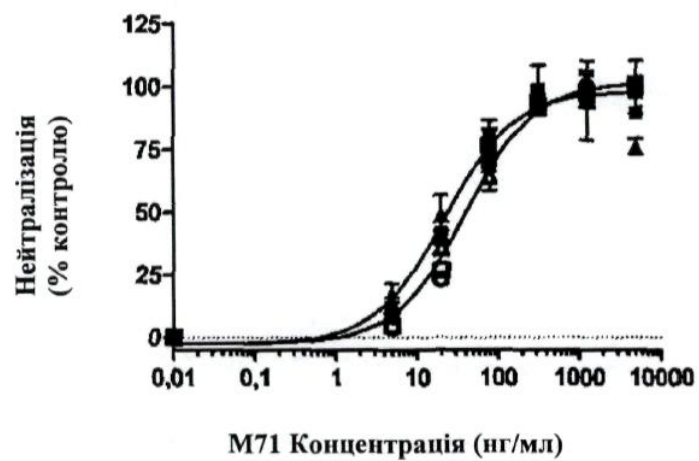
Амінокислотні послідовності і нумерація каркасних ділянок людських зародкових антитіл, які були використані в бібліотеці

1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
IGHV1-69	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFSSYAI	SWVRQAPGQGLEWMGIIPIFGTANTAKPKQGV	ITADESTSTATMELSLSED	TAFTTCAR	---	---	---	---	---	---	---
IGHV3-23	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS	SVRQAPGKGLKLVSAISGGSGSYIYADSVKGRFTI	SRDNSKNTLYLQMNSLRADTAFTTCAR	---	---	---	---	---	---	---	---
IGHV5-51	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFSSYAI	SWVRQAPGQGLEWMGIIPIFGTANTAKPKQGV	ITADESTSTATMELSLSED	TAFTTCAR	---	---	---	---	---	---	---
IGHV3-20 A27	RIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCASQVSSSYLANTQ	QKPKQAPRLIYCASSRASTGT	FORPSGSGSGTDFTLT	ISRLPEDFAVITCCQTSAPLT	FOGQTKVEIK	---	---	---	---	---	---
IGHV4-1 B3	DIIVMTQSPDLSAVSLGERATLSCASQVSSSYLANTQ	QKPKQAPRLIYCASSRASTGT	FORPSGSGSGTDFTLT	ISRLPEDFAVITCCQTSAPLT	FOGQTKVEIK	---	---	---	---	---	---
IGHV3-11 L6	RIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCASQVSSSYLANTQ	QKPKQAPRLIYCASSRASTGT	FORPSGSGSGTDFTLT	ISRLPEDFAVITCCQTSAPLT	FOGQTKVEIK	---	---	---	---	---	---
IGHV1-39 O12	DIIVMTQSPDLSAVSLGERATLSCASQVSSSYLANTQ	QKPKQAPRLIYCASSRASTGT	FORPSGSGSGTDFTLT	ISRLPEDFAVITCCQTSAPLT	FOGQTKVEIK	---	---	---	---	---	---

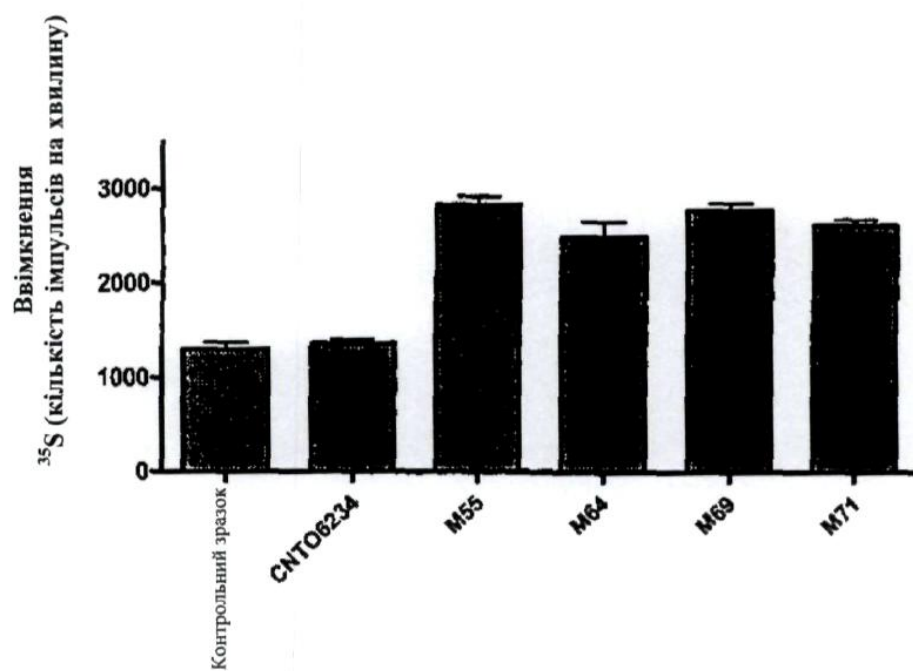
Фіг. 1



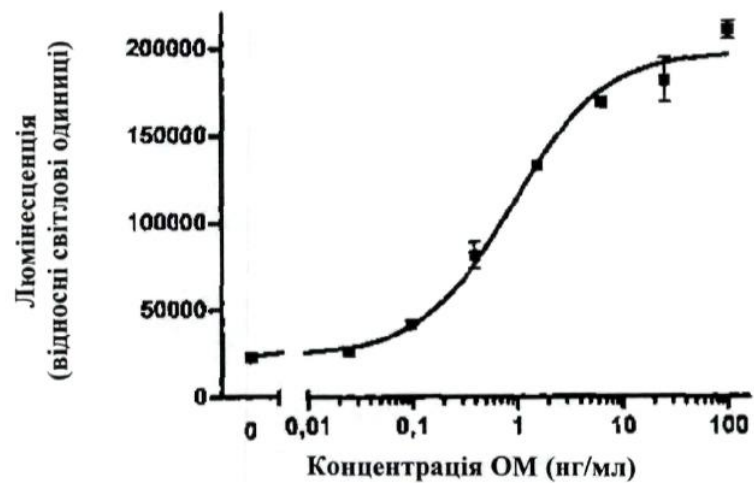
Фіг. 2А



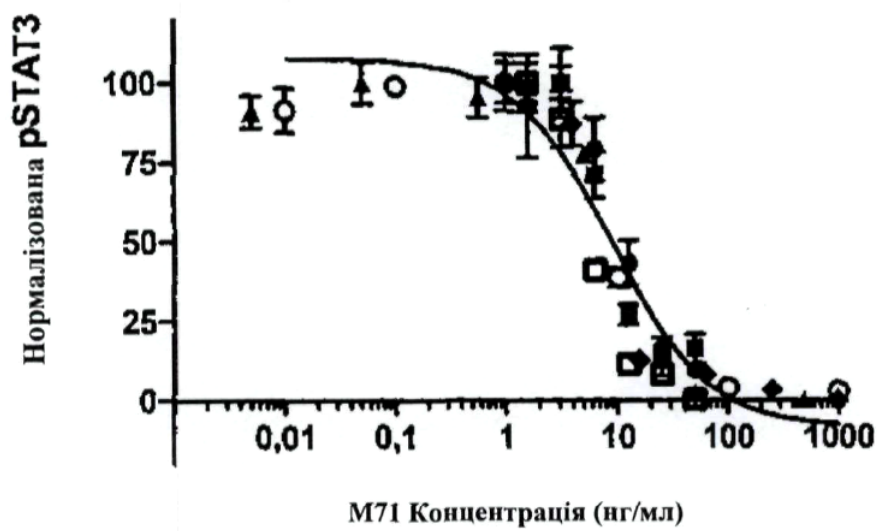
Фіг. 2В



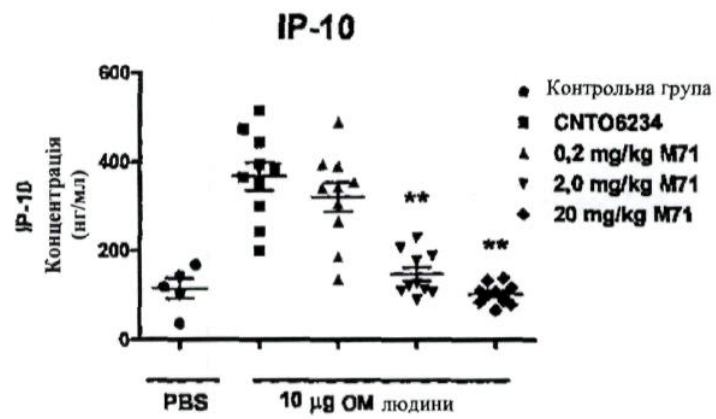
Фіг. 3



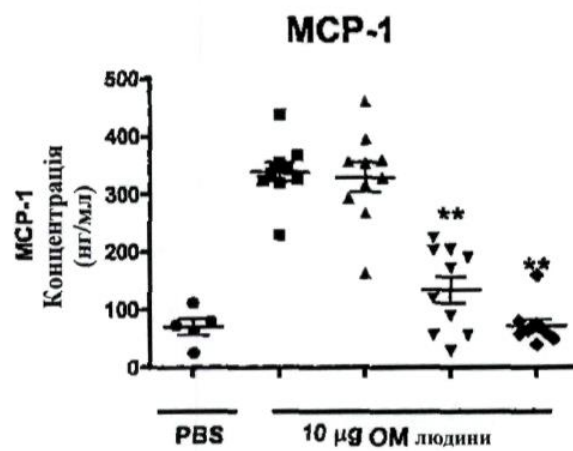
Фіг. 4А



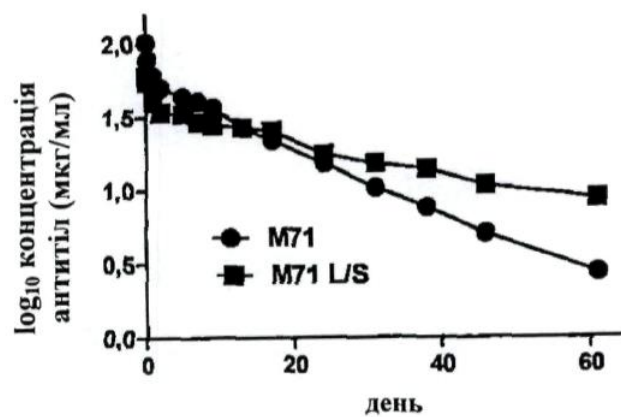
Фіг. 4В



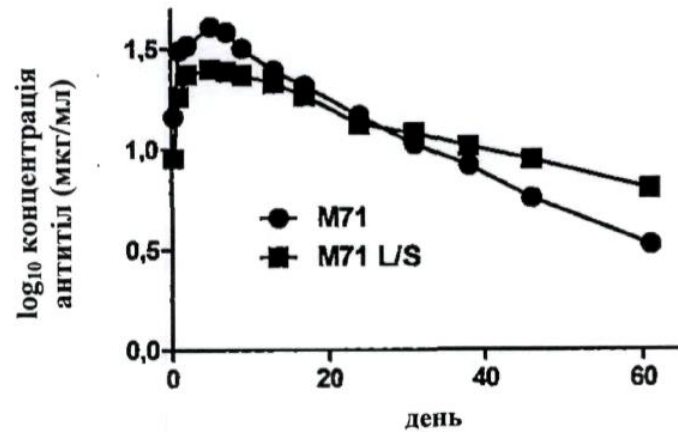
Фіг. 5А



Фіг. 5В



Фіг. 6А



Фіг. 6В

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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