



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 121453

(13) C2

(51) МПК

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

- (21) Номер заявки: **а 2014 11972**
- (22) Дата подання заявки: **10.04.2009**
- (24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **10.06.2020**
- (31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **2008-104147, 2008-247713, 2009-068744**
- (32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **11.04.2008, 26.09.2008, 19.03.2009**
- (33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **JP, JP, JP**
- (41) Публікація відомостей про заявку: **25.03.2015, Бюл.№ 6**
- (46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.06.2020, Бюл.№ 11**
- (62) Номер та дата подання попередньої заявки, з якої виділено заявку, позначену кодом (21): **, а201012805, 10.04.2009**
- (72) Винахідник(и):
**Іґава Томоюкі (JP),
Ісії Сінїа (JP),
Маєда Ацухіко (JP),
Накай Такасі (JP)**
- (73) Власник(и):
**ЧУГЕЙ СЕЙЯКУ КАБУСІКІ КАЙСЯ,
5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku, Tokyo 115-8543,
Japan (JP)**
- (74) Представник:
**Войтенко Олександр Петрович, реєстр.
№23**

- (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
Wataru Iro et al. The His-probe method: effects of histidine residues introduced into the complementarity-determining regions of antibodies on antigen-antibody interactions at different pH values. Federation or European Biochemical Societies, 1992, Vol. 309 (1), P. 85-88
WO 03105757 A2, 24.12.2003
WO 2009139822 A1, 19.11.2009
WO 2009139822 A1, 19.11.2009
Lance Martin W. et al. Crystal Structure at 2.8 Å of an FcRn/Heterodimeric Fc Complex: Mechanism of pH-Dependent Binding. Molecular Cell, 2001, Vol. 7, P. 867-877
Maeda K. et al. pH-dependent receptor/ligand dissociation as a determining factor for intracellular sorting of ligands for epidermal growth factor receptors in rat hepatocytes. Journal of Controlled Release, 2002, Vol. 82, P. 71-82
Megan L. Murtaugh et al. A Combinatorial Histidine Scanning Library Approach to Engineer Highly pH-Dependent Protein Switches. Protein science, 2011, Vol. 20, P. 1619-1631
Tomoyuki I. et al. Antibody recycling by engineered pH-dependent antigen binding improves the duration of antigen neutralization. Nature biotechnology, 2010, Vol. 28 (11), P. 1203-1207
Tomoyuki I. et al. Reduced elimination of IgG antibodies by engineering the variable region. Protein Engineering Design & Selection, 2010, Vol. 23 (5), P. 385-392
Tomoyuki I. et al. Engineering the variable region of therapeutic IgG antibodies. mAbs, 2011, Vol. 3 (3), P. 243-252
WO 2011111007 A2, 15.09.2011
Drake A. W. et al. Biophysical Considerations for Development of Antibody-Based Therapeutics. Development of Antibody-Based Therapeutics, 2012, P. 95-97
Chingwei V. Lee et al. High-affinity Human Antibodies from Phage-displayed Synthetic Fab Libraries with a Single Framework Scaffold. Journal of molecular biology, 2004, Vol. 340, P. 1073-1093
US 2003059937 A1, 27.03.2003
Casim A. Sarkar et al. Rational cytokine design for increased lifetime and enhanced potency using pH-activated "histidine switching". Nature biotechnology, 2002, Vol. 20 (9), P. 908-913
Maxfield F. R. et al. Endocytic recycling. Molecular cell biology, 2004, Vol. 5 (2), P.121-132

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ КОМПОЗИЦІЇ, ЯКА МІСТИТЬ АНТИТІЛО

UA 121453 C2

(57) Реферат:

Винахід стосується способу виготовлення фармацевтичної композиції, яка містить антитіло, за рахунок виготовлення антитіл класу IgG, які здатні зв'язуватися з характерним антигеном, визначення антигензв'язувальної активності згаданих антитіл при різних значеннях кислотних та нейтральних рН, вибору антитіла, антигензв'язувальна активність якого є рН-залежною, одержання гену, що кодує антитіло, виготовлення антитіла із використанням гена, та змішування виготовленого на етапі антитіла з прийнятим носієм з одержанням фармацевтичної композиції, при цьому вибирають антитіло, антигензв'язувальна активність якого при рН від 6,7 до 10,0 є більшою, ніж його антигензв'язувальна активність при рН від 4,0 до 6,5.

Галузь техніки

Цей винахід стосується способів покращення фармакокінетики антиген-зв'язувальних молекул, переважно антитіл, та способів збільшення кількості разів зв'язування з антигеном антиген-зв'язувальних молекул, а також антиген-зв'язувальних молекул, що мають покращену фармакокінетику, антиген-зв'язувальних молекул, що мають збільшену кількість разів зв'язування з антигеном, та способів скринінгу та одержання таких молекул.

Попередній рівень техніки

Антитіла привертають до себе увагу як фармацевтичні препарати, оскільки вони є надзвичайно стійкими у плазмі та мають небагато шкідливих ефектів. На цей час на ринку доступними є ряд фармацевтичних препаратів антитіл типу IgG, та набагато більше фармацевтичних препаратів на основі антитіл зараз розробляється (непатентні документи 1 та 2). Крім того, розроблено різні методи, які можна застосовувати до фармацевтичних препаратів другого покоління на основі антитіл, включаючи такі, як методи, що підсилюють ефекторну функцію, антиген-зв'язувальну здатність, фармакокінетику та стійкість, та такі, що знижують ризик імуногенності (непатентний документ 3). Взагалі, необхідна доза фармацевтичного препарату на основі антитіл є дуже високою. Це, у свою чергу, спричиняє проблеми, такі як висока вартість виробництва, а також складність при виробництві фармацевтичних складів для підшкірного введення. Теоретично дозу фармацевтичного препарату на основі антитіл можна знизити шляхом покращення фармакокінетики антитіл або шляхом покращення афінності між антитілами та антигенами.

У літературі повідомляється про способи покращення фармакокінетики антитіл шляхом штучного заміщення амінокислот у константних ділянках (непатентні документи 4 та 5). Подібно до цього, про формування афінності повідомлялося як про спосіб підвищення антиген-зв'язувальної здатності або антиген-нейтралізуючої активності (непатентний документ 6). Цей метод дозволяє підсилити антиген-зв'язувальну активність шляхом введення амінокислотних мутацій у гіперваріабельну ділянку (CDR) варіабельної ділянки або їй подібної. Підсилення антиген-зв'язувальної здатності дозволяє покращити біологічну активність *in vitro* або знизити дозу та, крім того, дозволяє покращити ефективність *in vivo* (непатентний документ 7).

Антиген-нейтралізуюча здатність єдиної молекули антитіла залежить від її афінності. За допомогою збільшення афінності антиген можна нейтралізувати меншою кількістю антитіл. Різні способи можна використовувати для підвищення афінності антитіла. Крім того, якщо афінність можна зробити безмежною шляхом ковалентного зв'язування антитіла з антигеном, єдина молекула антитіла може нейтралізувати одну молекулу антигену (двовалентне антитіло може нейтралізувати дві молекули антигену). Проте, стехіометрична нейтралізація одним антитілом одного антигену (одним двовалентним антитілом двох антигенів) є межею попередньо існуючих способів, та, отже, неможливо повністю нейтралізувати антиген меншою кількістю антитіл, ніж кількість антигенів. Інакше кажучи, ефект підвищення афінності має обмеження (непатентний документ 9). Для того, щоб пролонгувати ефект нейтралізації нейтралізуючого антитіла на певний період часу, це антитіло слід вводити у дозі, яка перевищує кількість антигену, що виробляється в організмі під час такого ж самого періоду. При покращенні фармакокінетики антитіла або тільки способу формування афінності, який описано вище, існує, отже, обмеження стосовно зниження необхідної дози антитіла.

Відповідно, для того, щоб підтримувати антиген-нейтралізуючий ефект антитіла протягом наміченого періоду часу за допомогою меншої ніж кількість антигену кількості антитіла, єдине антитіло мусить нейтралізувати численні антигени. Способи нейтралізації численних антигенів єдиним антитілом включають інактивацію антигену із використанням каталітичних антитіл, що є антитілами, яким надана каталітична функція. Коли антиген є білком, його можна інактивувати шляхом гідролізу його пептидних зв'язків. Антитіло може неодноразово нейтралізувати антигени шляхом каталізу такого гідролізу (непатентний документ 8). Існує багато попередніх повідомлень, опублікованих стосовно каталітичних антитіл та способів їх отримання. Проте, нема повідомлень стосовно каталітичних антитіл, які мають достатню каталітичну активність як фармацевтичні агенти. Детальніше, при дослідженні антитіла *in vivo* для певного антигену не виявлено жодної публікації стосовно каталітичних антитіл, які можуть виробляти порівняльний або сильніший ефект навіть при низьких дозах або виробляти більш тривалий ефект навіть при такій самій дозі порівняно зі звичайним некаталітичним нейтралізуючим антитілом.

Як сказано вище, не було жодних повідомлень про антитіла, які порівняно зі звичайними нейтралізуючими антитілами можуть виробляти більш суттєвий ефект *in vivo* за допомогою єдиного антитіла, що нейтралізує численні антигенні молекули. Отже, з точки зору зменшення дози та подовження тривалості, зараз є потреба у нових способах, які б дозволили отримати

нові молекули антитіл, які порівняно зі звичайними нейтралізуючими антитілами мають сильніший ефект *in vivo* стосовно індивідуальної нейтралізації численних антигенних молекул.

Документи попереднього рівня техніки, які стосуються цього винаходу, наведено нижче:

Документи попереднього рівня техніки

5 Непатентні документи

Непатентний документ 1: Monoclonal antibody successes in the clinic. Janice M Reichert, Clark J Rosensweig, Laura B Faden & Matthew C Dewitz, *Nature Biotechnology* 23, 1073-1078 (2005).

Непатентний документ 2: Pavlou AK, Belsey MJ. The therapeutic antibodies market to 2008. *Eur J Pharm Biopharm.* 2005 Apr; 59(3):389-96.

10 Непатентний документ 3: Kim SJ, Park Y, Hong HJ. Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. *Mo' Cells.* 2005 Aug 31; 20(1): 17-29. Review.

Непатентний документ 4: Hinton PR, Xiong JM, Johlfs MG, Tang MT, Keller S, Tsurushita N. An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life. *J Immunol.* 2006 Jan 1; 176(1):346-56.

15 Непатентний документ 5: Ghetie V, Popov S, Borvak J, Radu C, Matesoi D, Medesan C, Ober RJ, Ward ES. Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis. *NatBiotechnol.* 1997 Jul; 15(7):637-40.

Непатентний документ 6: Rajpal A, Beyaz N, Haber L, Cappuccilli G, Yee H, Bhatt RR, Takeuchi T, Lerner RA, Crea R. A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005 Jun 14; 102(24):8466-71. Epub 2005 Jun 6.

20 Непатентний документ 7: Wu H, Pfarr DS, Johnson S, Brewah YA, Woods RM, Patel NK, White WI, Young JF, Kiener PA. Development of Motavizumab, an Ultra-potent Antibody for the Prevention of Respiratory Syncytial Virus Infection in the Upper and Lower Respiratory Tract. *J Mol Biol.* 2007, 368, 652-665.

25 Непатентний документ 8: Hanson CV, Nishiyama Y, Paul S. Catalytic antibodies and their applications. *Curr Opin Biotechnol.* 2005 Dec; 16(6):631-6.

Непатентний документ 9: Rathanaswami P, Roalstad S, Roskos L, Su QJ, Lackie S, Babcook J. Demonstration of an *in vivo* generated sub-picomolar affinity fully human monoclonal antibody to interleukin-8. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Sep 9; 334(4):1004-13.

Суть винаходу

30 Задачі, які розв'язує винахід

Вищевказані обставини зумовили відкриття цього винаходу. Отже, завдання цього винаходу - це розробка способів багаторазового зв'язування антиген-зв'язувальних молекул, переважно антитіл, з антигенами та способів покращення фармакокінетики антиген-зв'язувальних молекул, переважно антитіл, а також розробка антиген-зв'язувальних молекул, переважно антитіл, які є здатними зв'язуватися з антигенами багато разів, антиген-зв'язувальних молекул, переважно антитіл, які мають покращену фармакокінетику, фармацевтичних композицій, що містять такі антиген-зв'язувальні молекули, переважно антитіла, та розробка способів скринінгу та отримання таких антиген-зв'язувальних молекул, переважно антитіл, та композицій.

Засоби розв'язання задач

40 У цьому описі винаходу описані дослідження стосовно способів багаторазового зв'язування поліпептидів, які мають антиген-зв'язувальну здатність, таких як антиген-зв'язувальні молекули, переважно антитіл, з антигенами та способів подовження періоду піврозпаду таких молекул у плазмі (крові) (покращення їх фармакокінетики). Внаслідок вказаного визначили, що коли антиген-зв'язувальна активність антиген-зв'язувальної молекули, переважно антитіла, при ранньому ендосомному рН є нижчою, ніж її антиген-зв'язувальна активність при рН плазми (крові), то буде можливим зв'язати антигени неодноразово та мати триваліший період піврозпаду у плазмі.

Отже, цей винахід стосується способів багаторазового зв'язування антиген-зв'язувальних молекул, переважно антитіл, з антигенами, способів покращення фармакокінетики антиген-зв'язувальних молекул, переважно антитіл, та способів скринінгу та отримання антиген-зв'язувальних молекул, переважно антитіл, з покращеною фармакокінетикою; цей винахід також стосується антиген-зв'язувальних молекул, переважно антитіл, які є здатними неодноразово зв'язувати антигени, та антиген-зв'язувальних молекул, переважно антитіл з покращеною фармакокінетикою.

55 Цим винаходом пропонується спосіб скринінгу антитіла, який включає наступні етапи:

(а) визначення антиген-зв'язувальної активності антитіла при рН від 6,7 до 10,0;

(b) визначення антиген-зв'язувальної активності антитіла при рН від 4,0 до 6,5 та

(с) вибирання антитіла, антиген-зв'язувальна активність якого при рН від 6,7 до 10,0

є більшою, ніж антиген-зв'язувальна активність при рН від 4,0 до 6,5, при цьому:

60 (1) фармакокінетика антитіла є покращеною,

(2) кількість разів зв'язування антитіла з антигеном є збільшеною,
 (3) кількість антигенів, які можуть зв'язуватися антитілом, є збільшеною,
 (4) антиген відокремлюється усередині клітини від антитіла, яке зв'язалося з ним ззовні клітини,

5 (5) антитіло, яке зв'язалося з антигеном та інтерналізувалося у клітину, виділяється у вільній від антигену формі за межі клітини або

(6) здатність антитіла еліминувати антиген у плазмі є підвищеною.

В одному випадку виконання винаходу пропонується спосіб скринінгу антитіла, який включає етап вибору антитіла, антиген-зв'язувальна активність якого при рН від 6,7 до 10,0 удвічі або

10 більше перебільшує антиген-зв'язувальну активність при рН від 4,0 до 6,5.

В одному варіанті здійснення винаходу пропонується спосіб скринінгу антитіла, який включає наступні етапи:

(a) зв'язування антитіла з антигеном при умові рН від 6,7 до 10,0;

(b) поміщення антитіла, яке зв'язалося з антигеном за (a), в умови рН від 4,0 до 6,5 та

15 (c) отримання антитіла, яке відокремилось при умові рН від 4,0 до 6,5, при цьому:

(1) фармакокінетика антитіла є покращеною,

(2) кількість разів зв'язування антитіла з антигеном є збільшеною,

(3) кількість антигенів, які можуть зв'язуватися антитілом, є збільшеною,

20 (4) антиген відокремлюється усередині клітини від антитіла, яке зв'язалося з ним ззовні клітини,

(5) антитіло, яке зв'язалося з антигеном та інтерналізувалося у клітину, виділяється у вільній від антигену формі за межі клітини або

(6) здатність антитіла еліминувати антиген у плазмі є підвищеною.

25 В іншому варіанті здійснення винаходу пропонується спосіб скринінгу антитіла, зв'язувальна активність якого при рН від 6,7 до 10,0 є більшою, ніж зв'язувальна активність при рН від 4,0 до 6,5, який включає наступні етапи:

(a) зв'язування антитіла з колонкою з іммобілізованим антигеном при умові рН від 6,7 до 10,0;

30 (b) елюювання антитіла, яке зв'язалося з колонкою при рН від 6,7 до 10,0, з колонки при умові рН від 4,0 до 6,5 та

(c) збирання елюйованого антитіла, при цьому:

(1) фармакокінетика антитіла є покращеною,

(2) кількість разів зв'язування антитіла з антигеном є збільшеною,

35 (3) кількість антигенів, які можуть зв'язуватися антитілом, є збільшеною,

(4) антиген відокремлюється усередині клітини від антитіла, яке зв'язалося з ним ззовні клітини,

(5) антитіло, яке зв'язалося з антигеном та інтерналізувалося у клітину, виділяється у вільній від антигену формі за межі клітини або

40 (6) здатність антитіла еліминувати антиген у плазмі є підвищеною.

В іще іншому варіанті здійснення винаходу пропонується спосіб скринінгу антитіла, зв'язувальна активність якого при рН від 6,7 до 10,0 є більшою, ніж зв'язувальна активність при рН від 4,0 до 6,5, який включає наступні етапи:

45 (a) зв'язування бібліотеки антитіл з колонкою з іммобілізованим антигеном при умові рН від 6,7 до 10,0;

(b) елюювання антитіла з колонки при умові рН від 4,0 до 6,5;

(c) ампліфікування гена, що кодує елюйоване антитіло; та

(d) отримання елюйованого антитіла, при цьому:

(1) фармакокінетика антитіла є покращеною,

50 (2) кількість разів зв'язування антитіла з антигеном є збільшеною,

(3) кількість антигенів, які можуть зв'язуватися антитілом, є збільшеною,

(4) антиген відокремлюється усередині клітини від антитіла, яке зв'язалося з ним ззовні клітини,

(5) антитіло, яке зв'язалося з антигеном та інтерналізувалося у клітину, виділяється у вільній від антигену формі за межі клітини або

55 (6) здатність антитіла еліминувати антиген у плазмі є підвищеною.

В одному випадку виконання винаходу пропонується спосіб скринінгу антитіла, де принаймні одна амінокислота гіперваріабельної ділянки (CDR) або амінокислотний залишок 27 у важкому ланцюзі антитіла (за нумерацією за Kabat) заміщений гістидином або принаймні один гістидин вставлений в CDR антитіла.

60

В іншому випадку виконання винаходу пропонується спосіб скринінгу для отримання антитіла, яке є найкращим стосовно утримання у плазмі.

В ще іншому випадку виконання винаходу пропонується спосіб скринінгу для отримання антитіла, яке є здатним зв'язуватися з антигеном два або більше разів.

5 В ще одному випадку виконання винаходу пропонується спосіб скринінгу для отримання антитіла, яке є здатним зв'язуватися з більшою кількістю антигенів порівняно з кількістю його антиген-зв'язувальних ділянок.

В ще одному випадку виконання винаходу пропонується спосіб скринінгу для отримання антитіла, яке усередині клітини відокремлює антиген, з яким воно зв'язалося ззовні клітини.

10 В ще одному випадку виконання винаходу пропонується спосіб скринінгу для отримання антитіла, яке зв'язується з антигеном, та інтерналізується у клітину, та виділяється за межі клітини у вільній від антигену формі.

В ще одному випадку виконання винаходу пропонується спосіб скринінгу для отримання антитіла, яке має підвищену здатність еліминувати антиген у плазмі.

15 Цим винаходом також пропонується спосіб одержання антитіла, який включає наступні етапи:

(a) визначення антиген-зв'язувальної активності антитіла при рН від 6,7 до 10,0;

(b) визначення антиген-зв'язувальної активності антитіла при рН від 4,0 до 6,5;

20 (c) вибирання антитіла, антиген-зв'язувальна активність якого при рН від 6,7 до 10,0 є більшою, ніж антиген-зв'язувальна активність при рН від 4,0 до 6,5;

(d) отримання гена, що кодує антитіло, вибране у (c); та

(e) одержання антитіла із використанням гена, отриманого у (d),

при цьому:

(1) фармакокінетика антитіла є покращеною,

25 (2) кількість разів зв'язування антитіла з антигеном є збільшеною,

(3) кількість антигенів, які можуть зв'язуватися антитілом, є збільшеною,

(4) антиген відокремлюється усередині клітини від антитіла, яке зв'язалося з ним ззовні клітини,

30 (5) антитіло, яке зв'язалося з антигеном та інтерналізувалося у клітину, виділяється у вільній від антигену формі за межі клітини або

(6) здатність антитіла еліминувати антиген у плазмі є підвищеною.

В одному варіанті здійснення винаходу пропонується спосіб одержання антитіла, який включає наступні етапи:

(a) зв'язування антитіла з антигеном при умові рН від 6,7 до 10,0;

35 (b) надання можливості антитілу за (a), зв'язаному з антигеном, витримуватися при умові рН від 4,0 до 6,5;

(c) збирання антитіла, яке відокремилось при умові рН від 4,0 до 6,5;

(d) отримання гена, що кодує антитіло, отримане у (c); та

(e) одержання антитіла із використанням гена, отриманого у (d),

40 при цьому:

(1) фармакокінетика антитіла є покращеною,

(2) кількість разів зв'язування антитіла з антигеном є збільшеною,

(3) кількість антигенів, які можуть зв'язуватися антитілом, є збільшеною,

45 (4) антиген відокремлюється усередині клітини від антитіла, яке зв'язалося з ним ззовні клітини,

(5) антитіло, яке зв'язалося з антигеном та інтерналізувалося у клітину, виділяється у вільній від антигену формі за межі клітини або

(6) здатність антитіла еліминувати антиген у плазмі є підвищеною.

50 В іншому варіанті здійснення винаходу пропонується спосіб одержання антитіла, зв'язувальна активність якого при рН від 6,7 до 10,0 є більшою, ніж зв'язувальна активність при рН від 4,0 до 6,5, який включає наступні етапи:

(a) зв'язування антитіла з колонкою з іммобілізованим антигеном при умові рН від 6,7 до 10,0;

55 (b) елюювання антитіла, яке зв'язалося з колонкою при рН від 6,7 до 10,0, з колонки при умові рН від 4,0 до 6,5;

(c) збирання елюйованого антитіла;

(d) отримання гена, що кодує антитіло, отримане у (c); та

(e) одержання антитіла із використанням гена, отриманого у (d),

60 при цьому:

(1) фармакокінетика антитіла є покращеною,

(2) кількість разів зв'язування антитіла з антигеном є збільшеною,
 (3) кількість антигенів, які можуть зв'язуватися антитілом, є збільшеною,
 (4) антиген відокремлюється усередині клітини від антитіла, яке зв'язалося з ним ззовні клітини,

5 (5) антитіло, яке зв'язалося з антигеном та інтерналізувалося у клітину, виділяється у вільній від антигену формі за межі клітини або

(6) здатність антитіла еліминувати антиген у плазмі є підвищеною.

В іще іншому варіанті здійснення винаходу пропонується спосіб одержання антитіла, зв'язувальна активність якого при рН від 6,7 до 10,0 є більшою, ніж зв'язувальна активність при рН від 4,0 до 6,5, який включає наступні етапи:

10 (а) зв'язування бібліотеки антитіл з колонкою з іммобілізованим антигеном при умові рН від 6,7 до 10,0;

(b) елюювання антитіла з колонки при умові рН від 4,0 до 6,5;

(c) ампліфікування гена, що кодує елюйоване антитіло;

15 (d) збирання елюйованого антитіла;

(e) отримання гена, що кодує антитіло, зібране у (d); та

(f) одержання антитіла із використанням гена, отриманого у (e), при цьому:

(1) фармакокінетика антитіла є покращеною,

20 (2) кількість разів зв'язування антитіла з антигеном є збільшеною,

(3) кількість антигенів, які можуть зв'язуватися антитілом, є збільшеною,

(4) антиген відокремлюється усередині клітини від антитіла, яке зв'язалося з ним ззовні клітини,

(5) антитіло, яке зв'язалося з антигеном та інтерналізувалося у клітину, виділяється у вільній від антигену формі за межі клітини або

25 (6) здатність антитіла еліминувати антиген у плазмі є підвищеною.

В одному випадку виконання винаходу пропонується спосіб одержання антитіла, який далі включає етап заміщення принаймні однієї амінокислоти гіперваріабельної ділянки (CDR) або амінокислотного залишку 27 у важкому ланцюзі антитіла (за нумерацією за Kabat) гістидином або вставляння принаймні одного гістидину в CDR антитіла.

30 Цим винаходом також пропонується:

[1] антиген-зв'язувальна молекула, що має значення $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$, визначене як відношення KD для антигену при рН 5,8 та KD для антигену при рН 7,4, яке становить 2 або більше;

35 [2] антиген-зв'язувальна молекула за [1], де значення $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ становить 10 або більше;

[3] антиген-зв'язувальна молекула за [1], де значення $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ становить 40 або більше;

40 [4] антиген-зв'язувальна молекула за будь-яким від [1] до [3], де принаймні одна амінокислота антиген-зв'язувальної молекули заміщена гістидином або принаймні один гістидин вставлений в антиген-зв'язувальну молекулу;

[5] антиген-зв'язувальна молекула за будь-яким від [1] до [4], де антиген-зв'язувальна молекула має антагоністичну активність;

45 [6] антиген-зв'язувальна молекула за будь-яким від [1] до [5], де антиген-зв'язувальна молекула зв'язується з мембранним антигеном або розчинним антигеном;

[7] антиген-зв'язувальна молекула за будь-яким від [1] до [6], де антиген-зв'язувальна молекула - це антитіло;

[8] фармацевтична композиція, яка включає антиген-зв'язувальну молекулу за будь-яким від [1] до [7];

50 [9] спосіб покращення фармакокінетики антиген-зв'язувальної молекули шляхом зниження антиген-зв'язувальної активності антиген-зв'язувальної молекули при рН 5,8 порівняно з антиген-зв'язувальною активністю при рН 7,4;

[10] спосіб збільшення кількості разів зв'язування з антигеном антиген-зв'язувальної молекули шляхом зниження антиген-зв'язувальної активності антиген-зв'язувальної молекули при рН 5,8 порівняно з антиген-зв'язувальною активністю при рН 7,4;

55 [11] спосіб збільшення кількості антигенів, які можуть зв'язуватися антиген-зв'язувальною молекулою, шляхом зниження антиген-зв'язувальної активності антиген-зв'язувальної молекули при рН 5,8 порівняно з антиген-зв'язувальною активністю при рН 7,4;

[12] спосіб відокремлення усередині клітини антигену від антиген-зв'язувальної молекули, яка зв'язалася з ним ззовні клітини, шляхом зниження антиген-зв'язувальної активності антиген-зв'язувальної молекули при pH 5,8 порівняно з антиген-зв'язувальною активністю при pH 7,4;

5 [13] спосіб виділення антиген-зв'язувальної молекули, яка зв'язалася з антигеном та інтерналізувалася у клітину, у вільній від антигену формі за межі клітини шляхом зниження антиген-зв'язувальної активності антиген-зв'язувальної молекули при pH 5,8 порівняно з антиген-зв'язувальною активністю при pH 7,4;

10 [14] спосіб підвищення здатності антиген-зв'язувальної молекули елімінувати антиген у плазмі шляхом зниження антиген-зв'язувальної активності антиген-зв'язувальної молекули при pH 5,8 порівняно з антиген-зв'язувальною активністю при pH 7,4;

[15] спосіб за будь-яким від [9] до [14], де значення $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$, визначене як відношення KD для антигену при pH 5,8 та KD для антигену при pH 7,4, становить 2 або більше;

[16] спосіб за будь-яким від [9] до [14], де значення $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ становить 10 або більше;

15 [17] спосіб за будь-яким від [9] до [14], де значення $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ становить 40 або більше;

[18] спосіб покращення фармакокінетики антиген-зв'язувальної молекули шляхом заміщення принаймні однієї амінокислоти антиген-зв'язувальної молекули гістидином або вставлення принаймні одного гістидину в антиген-зв'язувальну молекулу;

20 [19] спосіб збільшення кількості разів зв'язування з антигеном антиген-зв'язувальної молекули шляхом заміщення принаймні однієї амінокислоти антиген-зв'язувальної молекули гістидином або вставлення принаймні одного гістидину в антиген-зв'язувальну молекулу;

[20] спосіб збільшення кількості антигенів, які можуть зв'язуватися антиген-зв'язувальною молекулою, шляхом заміщення принаймні однієї амінокислоти антиген-зв'язувальної молекули гістидином або вставлення принаймні одного гістидину в антиген-зв'язувальну молекулу;

25 [21] спосіб відокремлення усередині клітини антигену від антиген-зв'язувальної молекули, яка зв'язалася з ним ззовні клітини, шляхом заміщення принаймні однієї амінокислоти антиген-зв'язувальної молекули гістидином або вставлення принаймні одного гістидину в антиген-зв'язувальну молекулу;

30 [22] спосіб виділення антиген-зв'язувальної молекули, яка зв'язалася з антигеном та інтерналізувалася у клітину, у вільній від антигену формі за межі клітини шляхом заміщення принаймні однієї амінокислоти антиген-зв'язувальної молекули гістидином або вставлення принаймні одного гістидину в антиген-зв'язувальну молекулу;

35 [23] спосіб підвищення здатності антиген-зв'язувальної молекули елімінувати антиген у плазмі шляхом заміщення принаймні однієї амінокислоти антиген-зв'язувальної молекули гістидином або вставлення принаймні одного гістидину в антиген-зв'язувальну молекулу;

[24] спосіб за будь-яким від [18] до [23], де заміщення гістидином або вставка гістидину підвищує значення $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$, визначеного як відношення антиген-зв'язувальної активності при pH 5,8 та антиген-зв'язувальної активності при pH 7,4, порівняно зі значенням $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ до заміщення гістидином або вставки гістидину;

40 [25] спосіб за будь-яким від [9] до [24], де антиген-зв'язувальна молекула має антагоністичну активність;

[26] спосіб за будь-яким від [9] до [25], де антиген-зв'язувальна молекула зв'язується з мембранним антигеном або розчинним антигеном;

45 [27] спосіб за будь-яким від [9] до [26], де антиген-зв'язувальна молекула - це антитіло;

[28] спосіб скринінгу антиген-зв'язувальної молекули, який включає наступні етапи:

(a) визначення антиген-зв'язувальної активності антиген-зв'язувальної молекули при pH від 6,7 до 10,0;

50 (b) визначення антиген-зв'язувальної активності антиген-зв'язувальної молекули при pH від 4,0 до 6,5 та

(c) вибирання антиген-зв'язувальної молекули, антиген-зв'язувальна активність якої при pH від 6,7 до 10,0 є більшою, ніж антиген-зв'язувальна активність при pH від 4,0 до 6,5;

[29] спосіб скринінгу за [28], який включає етап вибору антитіла, антиген-зв'язувальна активність якого при pH від 6,7 до 10,0 удвічі або більше перебільшує антиген-зв'язувальну активність при pH від 4,0 до 6,5;

55 [30] спосіб скринінгу антиген-зв'язувальної молекули, який включає наступні етапи:

(a) зв'язування антиген-зв'язувальної молекули з антигеном при умові pH від 6,7 до 10,0;

(b) поміщення антиген-зв'язувальної молекули, яка зв'язалася з антигеном за (a), в умови pH від 4,0 до 6,5 та

(с) отримання антиген-зв'язувальної молекули, яка відокремилася при умові рН від 4,0 до 6,5;

[31] спосіб скринінгу антиген-зв'язувальної молекули, зв'язувальна активність якої при першому значенні рН є вищою, ніж зв'язувальна активність при другому значенні рН, який включає наступні етапи:

(а) зв'язування антиген-зв'язувальної молекули з колонкою з іммобілізованим антигеном при умові першого значення рН;

(б) елюювання антиген-зв'язувальної молекули, яка зв'язалася з колонкою при першому значенні рН, з колонки при умові другого значення рН та

(с) збирання елюйованої антиген-зв'язувальної молекули;

[32] спосіб скринінгу антиген-зв'язувальної молекули, зв'язувальна активність якої при першому значенні рН є більшою, ніж зв'язувальна активність при другому значенні рН, який включає наступні етапи:

(а) зв'язування бібліотеки антиген-зв'язувальних молекул з колонкою з іммобілізованим антигеном при умові першого значення рН;

(б) елюювання антиген-зв'язувальної молекули з колонки при умові другого значення рН;

(с) ампліфікування гена, що кодує елюйовану антиген-зв'язувальну молекулу; та

(д) отримання елюйованої антиген-зв'язувальної молекули;

[33] спосіб скринінгу за [31] або [32], де перше значення рН становить від 6,7 до 10,0, а друге значення рН становить від 4,0 до 6,5;

[34] спосіб скринінгу за будь-яким від [28] до [33], де принаймні одна або більше амінокислот антиген-зв'язувальної молекули заміщені гістидином або принаймні один гістидин вставлений в антиген-зв'язувальну молекулу;

[35] спосіб скринінгу за будь-яким від [28] до [33] для отримання антиген-зв'язувальної молекули, яка є найкращою стосовно утримання у плазмі;

[36] спосіб скринінгу за будь-яким від [28] до [33] для отримання антиген-зв'язувальної молекули, яка є здатною зв'язуватися з антигеном два або більше разів;

[37] спосіб скринінгу за будь-яким від [28] до [33] для отримання антиген-зв'язувальної молекули, яка є здатною зв'язуватися з більшою кількістю антигенів порівняно з кількістю її антиген-зв'язувальних ділянок;

[38] спосіб скринінгу за будь-яким від [28] до [33] для отримання антиген-зв'язувальної молекули, яка усередині клітини відокремлює антиген, з яким вона зв'язалася ззовні клітини;

[39] спосіб скринінгу за будь-яким від [28] до [33] для отримання антиген-зв'язувальної молекули, яка зв'язується з антигеном, та інтерналізується у клітину, та виділяється за межі клітини у вільній від антигену формі;

[40] спосіб скринінгу за будь-яким від [28] до [33] для отримання антиген-зв'язувальної молекули, яка має підвищену здатність елімінувати антиген у плазмі;

[41] спосіб скринінгу за будь-яким від [28] до [40], де антиген-зв'язувальна молекула використовується як фармацевтична композиція;

[42] спосіб скринінгу за будь-яким від [28] до [41], де антиген-зв'язувальна молекула - це антитіло;

[43] спосіб одержання антиген-зв'язувальної молекули, який включає наступні етапи:

(а) визначення антиген-зв'язувальної активності антиген-зв'язувальної молекули при рН від 6,7 до 10,0;

(б) визначення антиген-зв'язувальної активності антиген-зв'язувальної молекули при рН від 4,0 до 6,5;

(с) вибирання антиген-зв'язувальної молекули, антиген-зв'язувальна активність якої при рН від 6,7 до 10,0 є більшою, ніж антиген-зв'язувальна активність при рН від 4,0 до 6,5;

(д) отримання гена, що кодує антиген-зв'язувальну молекулу, вибрану у (с); та

(е) одержання антиген-зв'язувальної молекули із використанням гена, отриманого у (д);

[44] спосіб одержання антиген-зв'язувальної молекули, який включає наступні етапи:

(а) зв'язування антиген-зв'язувальної молекули з антигеном при умові рН від 6,7 до 10,0;

(б) надання можливості антиген-зв'язувальній молекулі, зв'язаній з антигеном за (а), витримуватися при умові рН від 4,0 до 6,5;

(с) збирання антиген-зв'язувальної молекули, яка відокремилася при умові рН від 4,0 до 6,5;

(д) отримання гена, що кодує антиген-зв'язувальну молекулу, зібрану у (с); та

(е) одержання антиген-зв'язувальної молекули із використанням гена, отриманого у (д);

[45] спосіб одержання антиген-зв'язувальної молекули, зв'язувальна активність якої при першому значенні рН є вищою, ніж зв'язувальна активність при другому значенні рН, який включає наступні етапи:

(а) зв'язування антиген-зв'язувальної молекули з колонкою з іммобілізованим антигеном при умові першого значення рН;

(b) елюювання антиген-зв'язувальної молекули, яка зв'язалася з колонкою при першому значенні рН, з колонки при умові другого значення рН;

5 (c) збирання елюйованої антиген-зв'язувальної молекули;

(d) отримання гена, що кодує антиген-зв'язувальну молекулу, отриману у (c); та

(e) одержання антиген-зв'язувальної молекули із використанням гена, отриманого у (d);

10 [46] спосіб одержання антиген-зв'язувальної молекули, зв'язувальна активність якої при першому значенні рН є вищою, ніж зв'язувальна активність при другому значенні рН, який включає наступні етапи:

(а) зв'язування бібліотеки антиген-зв'язувальних молекул з колонкою з іммобілізованим антигеном при умові першого значення рН;

(b) елюювання антиген-зв'язувальної молекули з колонки при умові другого значення рН;

(c) ампліфікування гена, що кодує елюйовану антиген-зв'язувальну молекулу;

15 (d) збирання елюйованої антиген-зв'язувальної молекули;

(e) отримання гена, що кодує антиген-зв'язувальну молекулу, зібрану у (d); та

(f) одержання антиген-зв'язувальної молекули із використанням гена, отриманого у (e);

[47] спосіб одержання за [45] або [46], де перше значення рН становить від 6,7 до 10,0, а друге значення рН становить від 4,0 до 6,5;

20 [48] спосіб одержання за будь-яким від [43] до [47], який далі включає етап заміщення принаймні однієї амінокислоти антиген-зв'язувальної молекули гістидином або вставки принаймні одного гістидину в антиген-зв'язувальну молекулу;

[49] спосіб одержання за будь-яким від [43] до [48], де антиген-зв'язувальна молекула - це антитіло;

25 [50] фармацевтична композиція, яка містить антиген-зв'язувальну молекулу, одержану за будь-яким способом одержання від [43] до [49].

Ефекти винаходу

30 Цим винаходом пропонуються способи одержання єдиних антиген-зв'язувальних молекул, переважно антитіл, які неодноразово зв'язуються з численними антигенними молекулами. Коли антиген-зв'язувальна молекула, переважно антитіло, зв'язується з численними антигенними молекулами, тоді фармакокінетику антиген-зв'язувальної молекули, переважно антитіла, можна покращити, та така молекула може демонструвати найкращі ефекти *in vivo* порівняно з ефектами звичайних антиген-зв'язувальних молекул.

Стислий опис ілюстративного матеріалу

35 Фіг. 1 - це схема, яка показує шлях антитіл, зв'язаних зі зв'язаним з мембраною антигеном.

Фіг. 2 - це схема, яка показує механізм, за допомогою якого молекули IgG реутилізуються за допомогою FcRn.

Фіг. 3 - це схема, яка показує повторне зв'язування молекул IgG з новим антигеном після відділення від зв'язаного з мембраною антигеном усередині ендосом.

40 Фіг. 4 - це схема, яка показує повторне зв'язування молекул IgG з новим антигеном після відділення від розчинного антигену усередині ендосом.

Фіг. 5 - це схема, яка ілюструє метод пенінгу із використанням колонки з іммобілізованим антигеном.

45 Фіг. 6 представляє графіки фагового ЕЛАЙЗА (ELISA) для клонів, набутих внаслідок пенінгу з використанням колонки. Верхній графік показує природний тип (WT), а нижній графік показує CL5.

Фіг. 7 - це графік, що показує біологічну нейтралізуючу активність антитіл проти рецептора IL6, які зв'язуються залежним від рН чином.

50 Фіг. 8 представляє графіки, які показують результати Біасоре-сенсорграми для зв'язування антитіл проти рецептора IL6, які зв'язуються залежним від рН чином, з розчинним рецептором IL6 при рН 7,4. Верхній графік показує WT; другий графік зверху показує H3pI/L73; третій графік зверху показує H170/L82 та нижній графік показує CLH5/L73.

55 Фіг. 9 представляє графіки, які показують результати Біасоре-сенсорграми для зв'язування антитіл проти рецептора IL6, які зв'язуються залежним від рН чином, з розчинним рецептором IL6 при рН 5,8. Верхній графік показує WT; другий графік зверху показує H3pI/L73; третій графік зверху показує H170/L82 та нижній графік показує CLH5/L73.

Фіг. 10 представляє графіки, які показують результати Біасоре-сенсорграми для асоціації (рН 7,4) з рецептором IL6 мембранного типу та відокремлення (рН 5,8) від нього антитіл проти рецептора IL6, які зв'язуються залежним від рН чином. Верхній графік показує WT; другий

графік зверху показує H3pl/L73; третій графік зверху показує H170/L82 та нижній графік показує CLH5/L73.

Фіг. 11 - це Біасоре-сенсорграма, яка вказує на неодноразове зв'язування антитіл проти рецептора IL6, які зв'язуються залежним від рН чином, з SR344.

5 Фіг. 12 - це графік, що показує загальну кількість зв'язаного антигену в експерименті багаторазового зв'язування антитіл проти рецептора IL6, що зв'язуються залежним від рН чином, з SR344.

10 Фіг. 13 - це графік, що показує зміну за часом концентрацій антитіла у плазмі антитіл проти рецептора IL6, які зв'язуються залежним від рН чином, у трансгенних мишей з рецептором IL6 людини.

Фіг. 14 - це графік, що показує зміну за часом концентрацій антитіла у плазмі антитіл проти рецептора IL6, які зв'язуються залежним від рН чином, у мавп *супомолгус*.

15 Фіг. 15 - це графік, що показує зміну за часом концентрацій С-реактивного білку у плазмі (CRP) у мавп *супомолгус* для антитіл проти рецептора IL6, які зв'язуються залежним від рН чином.

Фіг. 16 - це графік, що показує зміну за часом концентрацій рецептора IL6 незв'язаного типу мавп *супомолгус* у мавп *супомолгус* для антитіл проти рецептора IL6, які зв'язуються залежним від рН чином.

20 Фіг. 17 представляє графіки, які показують результати Біасоре-сенсорграми для асоціації (рН 7,4) з рецептором IL6 мембранного типу та відокремлення (рН 5,8) від нього антитіл проти рецептора IL6, які зв'язуються залежним від рН чином. Рухаючись зверху вниз, представлено результати для WT, H3pl/L73-IgG1, Fv2-IgG1 та Fv4-IgG1.

25 Фіг. 18 - це графік, що показує зміну за часом концентрацій антитіла у плазмі для антитіл проти рецептора IL6 (WT, H3pl/L73-IgG1, Fv2-IgG1 та Fv4-IgG1), які зв'язуються залежним від рН чином, у трансгенних мишей з рецептором IL-6 людини.

Фіг. 19 представляє графіки, які показують результати Біасоре-сенсорграми для асоціації (рН 7,4) з рецептором IL-6 мембранного типу та відокремлення (рН 5,8) від нього антитіл проти рецептора IL6, які зв'язуються залежним від рН чином. Рухаючись зверху вниз, представлено результати для WT, Fv4-IgG1, Fv4-IgG2 та Fv4-M58.

30 Фіг. 20 - це графік, що показує зміну за часом концентрацій антитіла у плазмі для антитіл проти рецептора IL6 (WT, Fv4-IgG1, Fv4-IgG2 та Fv4-M58), які зв'язуються залежним від рН чином, у трансгенних мишей з рецептором IL-6 людини.

35 Фіг. 21 представляє графіки, які показують результати Біасоре-сенсорграми для асоціації (рН 7,4) з рецептором IL-6 мембранного типу та відокремлення (рН 5,8) від нього антитіл проти рецептора IL6, які зв'язуються залежним від рН чином. Рухаючись зверху вниз, представлено результати для Fv1-M71, Fv1-M73, Fv3-M71 та Fv3-M73.

40 Фіг. 22 - це графік, що показує зміну за часом концентрацій антитіла у плазмі для антитіл проти рецептора IL6, які зв'язуються залежним від рН чином, у мавп *супомолгус* під час введення H3pl/L73-IgG1, Fv1-M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M73 та Fv4-M73 у дозі 0,5 мг/кг та під час введення високоафінного антитіла (Ab) у дозі 1,0 мг/кг.

Фіг. 23 - це графік, що показує зміну за часом концентрацій CRP у мавп *супомолгус* для антитіл проти рецептора IL6, які зв'язуються залежним від рН чином (групи, яким вводилися H3pl/L73-IgG1-, Fv1-M71-, Fv1-M73-, Fv2-IgG1-, Fv3-M73-, Fv4-M73- та високоафінне Ab).

45 Фіг. 24 - це графік, що показує зміну за часом концентрацій рецептора IL-6 незв'язаного типу мавп *супомолгус* у мавп *супомолгус* для антитіл проти рецептора IL6, які зв'язуються залежним від рН чином (групи, яким вводилися H3pl/L73-IgG1-, Fv1-M71-, Fv1-M73-, Fv2-IgG1-, Fv3-M73-, Fv4-M73- та високоафінне Ab).

50 Фіг. 25 - це схема, яка показує FR1, FR2, FR3 та FR4 разом з CDR1, CDR2 та CDR3 важких ланцюгів (VH1, VH2, VH3, VH4) та легких ланцюгів (VL1, VL2, VL3). Зірочки вказують на місця, де існують амінокислотні мутації у вирівняних послідовностях.

Фіг. 26 представляє Біасоре-сенсорграму, яка показує залежне від рН зв'язування антитіла проти IL-6, клону 2 проти IL-6, з IL-6 при рН 7,4 та рН 5,5. Криві на сенсорграмі при рН 7,4 відповідають 100, 50, 25, 12,5 та 6,25 нг/мл IL-6 у напрямку зверху вниз.

55 Фіг. 27 представляє Біасоре-сенсорграми, яка показує залежне від рН зв'язування антитіла проти рецептора IL-31, клону 1 проти IL31R, з рецептором IL-31 при рН 7,4 та рН 5,5. Криві на сенсорграмі при рН 5,5 відповідають 100, 50, 25, 12,5 та 6,25 нг/мл рецептора IL-31 у напрямку зверху вниз.

Фіг. 28 показує зміну концентрації антитіла у плазмі після внутрішнього введення миші розчину суміші, що містить SR344 та антитіло проти людського рецептора IL-6.

Фіг. 29 показує зміну концентрації SR344 у плазмі після внутрішньовенного введення миші розчину суміші, що містить SR344 та антитіло проти людського рецептора IL-6.

Варіанти здійснення цього винаходу

Цим винаходом пропонуються способи збільшення кількості разів зв'язування з антигеном антиген-зв'язувальних молекул. Більш специфічно, цим винаходом пропонуються способи збільшення кількості разів зв'язування з антигеном антиген-зв'язувальних молекул шляхом зниження антиген-зв'язувальної здатності антиген-зв'язувальних молекул при кислотному pH порівняно з антиген-зв'язувальною здатністю при нейтральному pH. Крім того, цим винаходом пропонуються способи збільшення кількості разів зв'язування з антигеном антиген-зв'язувальних молекул шляхом заміщення, делеції, додавання та/або вставки амінокислот у константу ділянку антитіла антиген-зв'язувальних молекул.

Цим винаходом також пропонуються способи збільшення кількості антигенів, які можуть зв'язуватися антиген-зв'язувальною молекулою. Більш специфічно, цим винаходом також пропонуються способи збільшення кількості антигенів, які можуть зв'язуватися антиген-зв'язувальною молекулою, шляхом зниження антиген-зв'язувальної здатності при кислотному pH порівняно з антиген-зв'язувальною здатністю при нейтральному pH. Крім того, цим винаходом пропонуються способи збільшення кількості антигенів, які можуть зв'язуватися антиген-зв'язувальною молекулою, шляхом заміщення гістидином принаймні однієї амінокислоти в антиген-зв'язувальних молекулах або шляхом вставки принаймні одного гістидину в антиген-зв'язувальні молекули. Крім того, цим винаходом пропонуються способи збільшення кількості антигенів, які можуть зв'язуватися антиген-зв'язувальною молекулою, шляхом заміщення, делеції, додавання та/або вставки амінокислот у константу ділянку антитіла антиген-зв'язувальних молекул.

Цим винаходом також пропонуються способи відокремлення усередині клітини антигену від антиген-зв'язувальної молекули, яка зв'язалася з ним ззовні клітини. Більш специфічно, цим винаходом також пропонуються способи відокремлення усередині клітини антигену від антиген-зв'язувальної молекули, яка зв'язалася з ним ззовні клітини, шляхом зниження антиген-зв'язувальної здатності при кислотному pH порівняно з антиген-зв'язувальною здатністю при нейтральному pH. Крім того, цим винаходом також пропонуються способи відокремлення усередині клітини антигену від антиген-зв'язувальної молекули, яка зв'язалася з ним ззовні клітини, шляхом заміщення гістидином принаймні однієї амінокислоти у антиген-зв'язувальній молекулі або шляхом вставки принаймні одного гістидину в антиген-зв'язувальну молекулу. Крім того, цим винаходом також пропонуються способи відокремлення усередині клітини антигену від антиген-зв'язувальної молекули, яка зв'язалася з ним ззовні клітини, шляхом заміщення, делеції, додавання та/або вставки амінокислот у константу ділянку антитіла антиген-зв'язувальної молекули.

Цим винаходом також пропонуються способи виділення антиген-зв'язувальної молекули, яка зв'язалася з антигеном та інтерналізувалася у клітину, у вільній від антигену формі за межі клітини. Більш специфічно, цим винаходом також пропонуються способи виділення антиген-зв'язувальної молекули, яка зв'язалася з антигеном та інтерналізувалася у клітину, у вільній від антигену формі за межі клітини шляхом зниження антиген-зв'язувальної здатності при кислотному pH порівняно з антиген-зв'язувальною здатністю при нейтральному pH. Крім того, цим винаходом також пропонуються способи виділення антиген-зв'язувальної молекули, яка зв'язалася з антигеном та інтерналізувалася у клітину, у вільній від антигену формі за межі клітини шляхом заміщення гістидином принаймні однієї амінокислоти у антиген-зв'язувальній молекулі або шляхом вставки принаймні одного гістидину в антиген-зв'язувальну молекулу. Крім того, цим винаходом також пропонуються способи виділення антиген-зв'язувальної молекули, яка зв'язалася з антигеном та інтерналізувалася у клітину, у вільній від антигену формі за межі клітини шляхом заміщення, делеції, додавання та/або вставки амінокислот у константу ділянку антитіла антиген-зв'язувальної молекули.

Цим винаходом також пропонуються способи підвищення здатності антиген-зв'язувальної молекули еліминувати антигени у плазмі. Більш специфічно, цим винаходом також пропонуються способи підвищення здатності антиген-зв'язувальної молекули еліминувати антигени у плазмі шляхом зниження антиген-зв'язувальної здатності при кислотному pH порівняно з антиген-зв'язувальною здатністю при нейтральному pH. Крім того, цим винаходом також пропонуються способи підвищення здатності антиген-зв'язувальної молекули еліминувати

антигени у плазмі шляхом заміщення гістидином принаймні однієї амінокислоти в антиген-зв'язувальних молекулах або шляхом вставки принаймні одного гістидину в антиген-зв'язувальні молекули. Крім того, цим винаходом також пропонуються способи підвищення здатності антиген-зв'язувальної молекули еліминувати антигени у плазмі шляхом заміщення, делеції, додавання та/або вставки амінокислот у константу ділянку антитіла антиген-зв'язувальної молекули.

Цим винаходом також пропонуються способи покращення фармакокінетики антиген-зв'язувальних молекул. Більш специфічно, цим винаходом також пропонуються способи покращення фармакокінетики антиген-зв'язувальних молекул (продовження утримання у плазмі) шляхом зниження антиген-зв'язувальної здатності при кислотному рН порівняно з антиген-зв'язувальною здатністю при нейтральному рН. Крім того, цим винаходом також пропонуються способи покращення фармакокінетики антиген-зв'язувальних молекул шляхом заміщення гістидином принаймні однієї амінокислоти в антиген-зв'язувальних молекулах або шляхом вставки принаймні одного гістидину в антиген-зв'язувальні молекули. Крім того, цим винаходом також пропонуються способи покращення фармакокінетики антиген-зв'язувальних молекул шляхом заміщення, делеції, додавання та/або вставки амінокислот у константу ділянку антитіла антиген-зв'язувальних молекул.

Далі, цим винаходом також пропонуються способи підвищення здатності антиген-зв'язувальних молекул еліминувати антигени у плазмі. Більш специфічно, цим винаходом також пропонуються способи підвищення здатності антиген-зв'язувальних молекул еліминувати антигени у плазмі шляхом зниження антиген-зв'язувальної здатності антиген-зв'язувальних молекул при кислотному рН порівняно з антиген-зв'язувальною здатністю при нейтральному рН. Крім того, цим винаходом також пропонуються способи підвищення здатності антиген-зв'язувальних молекул еліминувати антигени у плазмі шляхом заміщення гістидином принаймні однієї амінокислоти у антиген-зв'язувальних молекулах або шляхом вставки принаймні одного гістидину в антиген-зв'язувальних молекулах. Крім того, цим винаходом також пропонуються способи підвищення здатності антиген-зв'язувальних молекул еліминувати антигени у плазмі шляхом заміщення, делеції, додавання та/або вставки амінокислот у константу ділянку антитіла антиген-зв'язувальних молекул.

У цьому описі винаходу словосполучення "покращення фармакокінетики", "поліпшення фармакокінетики", "найкраща фармакокінетика" взаємозамінюються словосполученнями "покращення утримання у плазмі (крові)", "поліпшення утримання у плазмі (крові)" та "найкраще утримання у плазмі (крові)", відповідно, та ці фрази є синонімічними.

У цьому описі винаходу вираз "зниження антиген-зв'язувальної активності при кислотному рН порівняно з антиген-зв'язувальною активністю при нейтральному рН" означає, що антиген-зв'язувальна здатність антиген-зв'язувальної молекули при рН від 4,0 до 6,5 є зниженою порівняно з антиген-зв'язувальною здатністю при рН від 6,7 до 10,0, переважно, що антиген-зв'язувальна активність антиген-зв'язувальної молекули при рН від 5,5 до 6,5 є зниженою порівняно з антиген-зв'язувальною активністю при рН від 7,0 до 8,0, та більш переважно, що антиген-зв'язувальна активність антиген-зв'язувальної молекули при рН 5,8 є зниженою порівняно з антиген-зв'язувальною активністю при рН 7,4. Отже, у цьому винаході кислотний рН зазвичай становить рН від 4,0 до 6,5, переважно рН від 5,5 до 6,5, та більш переважно рН 5,8. Альтернативно, у цьому винаході нейтральне рН зазвичай становить рН від 6,7 до 10,0, переважно рН від 7,0 до 8,0, та більш переважно рН 7,4.

У цьому описі винаходу фразу "зниження антиген-зв'язувальної здатності антиген-зв'язувальної молекули при кислотному рН порівняно з антиген-зв'язувальною здатністю при нейтральному рН" можна взаємозамінювати фразою "підвищення антиген-зв'язувальної здатності антиген-зв'язувальної молекули при нейтральному рН порівняно з антиген-зв'язувальною здатністю при кислотному рН". Інакше кажучи, у цьому винаході різницю в антиген-зв'язувальній здатності антиген-зв'язувальної молекули слід підвищити між значеннями кислотного та нейтрального рН. Наприклад, значення $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ слід підвищити, як описано нижче. Різницю антиген-зв'язувальної здатності антиген-зв'язувальної молекули між значеннями кислотного та нейтрального рН можна підвищити, наприклад, за допомогою одного з наступних способів або їх обох, а саме: за допомогою зниження антиген-зв'язувальної здатності при кислотному рН та підвищення антиген-зв'язувальної здатності при нейтральному рН.

Умови для визначення антиген-зв'язувальної активності, відмінні від рН, можуть бути вибрані відповідним чином фахівцями у цій галузі, та ці умови особливо не обмежуються. Антиген-зв'язувальну активність можна визначити, наприклад, в умовах буферу MES та при 37 °C, як описано у Прикладах цього опису винаходу. Крім того, антиген-зв'язувальну активність

антиген-зв'язувальної молекули можна визначити за способами, відомими фахівцям у цій галузі, наприклад, використовуючи Biacore (GE Healthcare) або йому подібний, як описано у Прикладах цього опису винаходу. Коли антиген - це розчинний антиген, тоді активність зв'язування з розчинним антигеном можна визначити шляхом випорскування антигену, як аналітичного зразка, на чип з іммобілізованою антиген-зв'язувальною молекулою. Альтернативно, коли антиген - це мембранний антиген, тоді активність зв'язування з мембранним антигеном можна визначити шляхом випорскування антиген-зв'язувальної молекули, як аналітичного зразка, на чип з іммобілізованим антигеном.

У цьому винаході різниця значень антиген-зв'язувальної активності при кислотному та нейтральному pH особливо не обмежується, доки антиген-зв'язувальна активність при кислотному pH є нижчою, ніж антиген-зв'язувальна активність при нейтральному pH. Проте, значення $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$, яке є відношенням константи дисоціації (KD) при відокремленні від антигену при pH 5,8 та відношенням константи дисоціації при відокремленні від антигену при pH 7,4, переважно становить 2 або більше, більш переважно 10 або більше, а ще більш переважно 40 або більше. Верхня границя значення $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ особливо не обмежується, та може мати будь-яке значення, наприклад, 400, 1000 або 10000, доки молекулу можна отримувати за способами, відомими фахівцям у цій галузі. Коли антиген - це розчинний антиген, тоді антиген-зв'язувальну активність можна представляти у вигляді константи дисоціації (KD). Альтернативно, коли антиген - це мембранний антиген, тоді антиген-зв'язувальну активність можна представляти у вигляді позірної константи дисоціації. Константу дисоціації (KD) та позірну константу дисоціації (позірну KD) можна визначити за способами, відомими фахівцям у галузі, наприклад, використовуючи Biacore (GE Healthcare), графік Scatchard або FACS.

Альтернативно, можна використовувати, наприклад, k_d - константу швидкості дисоціації як індикатор різниці значень антиген-зв'язувальної активності при кислотному та нейтральному pH. Коли константа швидкості дисоціації (k_d) використовується як індикатор різниці зв'язувальної активності замість константи дисоціації (KD), тоді значення $k_d(pH5,8)/k_d(pH7,4)$, яке є відношенням константи швидкості дисоціації (k_d) при відокремленні від антигену при pH 5,8 та константи швидкості дисоціації при відокремленні від антигену при pH 7,4, переважно становить 2 або більше, більш переважно 5 або більше, навіть більш переважно 10 або більше та ще більш переважно 30 або більше. Верхня границя значення $k_d(pH5,8)/k_d(pH7,4)$ особливо не обмежується та може мати будь-яке значення, наприклад, 50, 100 або 200, доки молекулу можна отримувати за способами, загально відомими фахівцям у цій галузі.

Коли антиген - це розчинний антиген, тоді антиген-зв'язувальну активність можна представляти у вигляді константи швидкості дисоціації (k_d). Альтернативно, коли антиген - це мембранний антиген, тоді антиген-зв'язувальну активність можна представляти у вигляді позірної константи швидкості дисоціації. Константу швидкості дисоціації (k_d) та позірну константу швидкості дисоціації (позірну k_d) можна визначити за способами, відомими фахівцям у галузі, наприклад, використовуючи Biacore (GE healthcare) або FACS.

У цьому винаході, коли антиген-зв'язувальна активність антиген-зв'язувальної молекули визначається при різних значеннях pH, тоді переважно, щоб умови вимірювання, за виключенням pH, були постійними.

Способи зниження антиген-зв'язувальної активності антиген-зв'язувальної молекули при pH 5,8 порівняно з антиген-зв'язувальною активністю при pH 7,4 (способи надання здатності зв'язуватися залежним від pH чином) особливо не обмежуються та можуть бути будь-якими способами. Такі способи включають, наприклад, способи зниження антиген-зв'язувальної активності при pH 5,8 порівняно з антиген-зв'язувальною активністю при pH 7,4 шляхом заміщення гістидином амінокислот в антиген-зв'язувальній молекулі або шляхом вставки гістидину в антиген-зв'язувальну молекулу. Вже відомо, що антитілу можна надати залежної від pH антиген-зв'язувальної активності шляхом заміщення гістидином амінокислот в антитілі (FEBS Letter, 309(1), 8588 (1992)). Такі гістидинові сайти мутації (заміщення) або сайти вставки гістидину особливо не обмежуються, та прийнятним є будь-який сайт, доки антиген-зв'язувальна активність при pH 5,8 є нижчою за антиген-зв'язувальну активність при pH 7,4 (значення $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ стає більшим) порівняно з антиген-зв'язувальною активністю до здійснення мутації або вставки. Коли антиген-зв'язувальна молекула - це антитіло, тоді такі сайти включають, наприклад, сайти усередині варіабельної ділянки антитіла. Відповідну кількість сайтів гістидинової мутації або сайтів вставки гістидину можуть відповідним чином визначити фахівці у галузі. Гістидином можна заміщувати або гістидин можна вставляти на єдиному сайті або на двох сайтах або більше. Можна також одночасно вводити негістидинову мутацію (мутацію амінокислотами, відмінними від гістидину). Крім того, гістидинову мутацію

можна вводити одночасно зі вставкою гістидину. Можна заміщувати гістидином або вставляти гістидин наугад, використовуючи спосіб, такий як гістидинове сканування, який використовує гістидин замість аланіну при аланіновому скануванні, який відомий фахівцям у цій галузі. Альтернативно, антиген-зв'язувальні молекули, значення $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ яких

5 підвищується порівняно зі значенням $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ до мутації, можна вибирати з бібліотеки антиген-зв'язувальних молекул з випадковою гістидиновою мутацією або вставкою гістидину.

Коли гістидин заміщує амінокислоти антиген-зв'язувальної молекули або вставляється між амінокислотами цієї молекули, тоді переважно, проте необов'язково, щоб антиген-зв'язувальна

10 активність антиген-зв'язувальної молекули при pH 7,4 після заміщення гістидином або вставки гістидину була порівняльною з антиген-зв'язувальною активністю при pH 7,4 перед заміщенням гістидином або вставкою гістидину. Фраза "антиген-зв'язувальна активність антиген-

зв'язувальної молекули при pH 7,4 після заміщення гістидином або вставки гістидину є порівняльною з антиген-зв'язувальною активністю при pH 7,4 перед заміщенням гістидином або

15 вставкою гістидину" означає, що навіть після заміщення гістидином або вставки гістидину антиген-зв'язувальна молекула зберігає 10 % або більше, переважно 50 % або більше, більш переважно 80 % або більше та іще більш переважно 90 % або більше антиген-зв'язувальної активності перед заміщенням гістидином або вставки гістидину. Коли антиген-зв'язувальна активність антиген-зв'язувальної молекули ослаблюється внаслідок заміщення гістидином або

20 вставки гістидину, тоді антиген-зв'язувальну активність можна відрегулювати шляхом введення заміщення, делеції, додавання та/або вставки однієї або більше амінокислот в антиген-зв'язувальну молекулу, так щоб антиген-зв'язувальна активність стала порівняльною з антиген-зв'язувальною активністю до заміщення гістидином або вставки гістидину. Цей винахід також включає такі антиген-зв'язувальні молекули, які мають порівняльну зв'язувальну активність, яка

25 є результатом заміщення, делеції, додавання або вставки однієї або більше амінокислот після заміщення гістидином або вставки гістидину.

Альтернативні способи ослаблення антиген-зв'язувальної активності антиген-зв'язувальної молекули при pH 5,8 порівняно з антиген-зв'язувальною активністю при pH 7,4 включають методи заміщення неприродними амінокислотами амінокислот в антиген-зв'язувальній молекулі

30 або методи вставки неприродних амінокислот в амінокислоти антиген-зв'язувальної молекули. Відомо, що pK_a можна штучно регулювати, використовуючи неприродні амінокислоти (Angew. Chem. Int. Ed. 2005, 44, 34; Chem Soc Rev. 2004 Sep 10;33(7):422-30; Amino Acids. 1999;16(3-4):345-79). Отже, у цьому винаході неприродні амінокислоти можна використовувати замість гістидину, описаного вище. Таке заміщення неприродними амінокислотами та/або вставку

35 неприродних амінокислот можна проводити одночасно із заміщенням гістидином та/або вставкою гістидину, що описано вище. У цьому винаході можна використовувати будь-які неприродні амінокислоти. Можна використовувати неприродні амінокислоти, відомі фахівцям у галузі.

Крім того, коли антиген-зв'язувальна молекула - це речовина, що має константну ділянку антитіла, тоді альтернативні способи зниження антиген-зв'язувальної активності антиген-

40 зв'язувальної молекули при pH 5,8 порівняно з антиген-зв'язувальною активністю при pH 7,4 включають способи модифікації константної ділянки антитіла, що міститься в антиген-зв'язувальній молекулі. Такі способи модифікації константної ділянки антитіла включають, наприклад, способи заміщення константної ділянки, описані у Прикладах цього опису винаходу.

Альтернативні способи модифікації константної ділянки антитіла включають, наприклад, способи визначення різних ізотипів константної ділянки (IgG1, IgG2, IgG3 та IgG4) та вибору ізотипу, який знижує антиген-зв'язувальну активність при pH 5,8 (підвищує швидкість дисоціації при pH 5,8). Альтернативно, способи включають способи зниження антиген-зв'язувальної активності при pH 5,8 (підвищення швидкості дисоціації при pH 5,8) шляхом заміщення

50 амінокислот в амінокислотній послідовності ізотипу природного типу (амінокислотній послідовності природного типу IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4). Послідовність шарнірної ділянки константної ділянки антитіла є суттєво різною серед ізотипів (IgG1, IgG2, IgG3 та IgG4), та ця різниця в амінокислотній послідовності шарнірної ділянки має сильний вплив на антиген-зв'язувальну активність. Отже, можна вибрати відповідний ізотип, щоб знизити антиген-

55 зв'язувальну активність при pH 5,8 (підвищити швидкість дисоціації при pH 5,8), враховуючи тип антигену або епітопу. Крім того, оскільки різниця в амінокислотній послідовності шарнірної ділянки має суттєвий вплив на антиген-зв'язувальну активність, то припускають, що переважні сайти амінокислотних заміщень в амінокислотній послідовності ізотипу природного типу будуть знаходитися усередині шарнірної ділянки.

Коли антиген-зв'язувальна активність антиген-зв'язувальної речовини при pH 5,8 ослаблюється порівняно з антиген-зв'язувальною активністю при pH 7,4 (коли збільшується значення $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ шляхом використання вищеописаних способів та їм подібних, тоді зазвичай переважно, щоб значення $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ перебільшувало у 2 рази або

більше, більш переважно у 5 разів або більше та навіть більш переважно у десять разів або більше значення для оригінального антитіла, проте винахід особливо не обмежується цим.

У цьому описі винаходу термін "покращення фармакокінетики" означає пролонгацію часу, необхідного для елімінування антиген-зв'язувальної молекули з плазми (наприклад, досягнення стану, коли антиген-зв'язувальна молекула не може повернутися у плазму внаслідок розпаду у клітинах або за іншими причинами) після введення тварині, такий як людина, миша, щур, мавпа, кроль або собака, а також означає пролонгацію часу утримання у плазмі антиген-зв'язувальної молекули, яка має форму, здатну зв'язуватися з антигенами (наприклад, має вільну від антигену форму) протягом періоду, доки вона не елімінується з плазми після введення. Навіть якщо антиген-зв'язувальна молекула циркулює у плазмі, вона не може зв'язуватися з антигеном, коли вона вже зв'язалася з іншим антигеном. Отже, період, коли антиген-зв'язувальна молекула може знов зв'язатися з іншим антигеном, продовжується (підвищується ймовірність зв'язатися з іншим антигеном) шляхом пролонгації періоду, коли антиген-зв'язувальна молекула знаходиться у вільній від антигену формі. Це дозволяє скоротити період, коли антиген є вільним від антиген-зв'язувальних молекул *in vivo* (інакше кажучи, пролонгувати період, коли антиген зв'язаний з антиген-зв'язувальною молекулою). Наприклад, відношення антигенів, зв'язаних з антиген-зв'язувальними молекулами, до антигенів у плазмі в організмі (загальної кількості молекул антигенів, зв'язаних з антиген-зв'язувальними молекулами та вільних від них) взагалі зменшується протягом певного періоду часу після введення антиген-зв'язувальних молекул. Проте, таке зменшення можна пригальмувати (наприклад, ступінь зменшення можна зробити меншим) шляхом пролонгації часу утримання антиген-зв'язувальних молекул у формі, здатній зв'язуватися з антигенами. Наслідком цього стає підвищення відношення антигенів, зв'язаних з антиген-зв'язувальними молекулами, до антигенів в організмі протягом певного періоду часу після введення антитіла.

Детальніше, у цьому винаході словосполучення "покращення фармакокінетики" необов'язково означає пролонгацію (подовження) часу, необхідного для елімінування антиген-зв'язувальної молекули після введення. Навіть якщо час, що є необхідним для елімінування антиген-зв'язувальної молекули після введення, залишається незмінним, у цьому винаході фармакокінетику можна вважати "покращеною", якщо:

час утримання у плазмі антиген-зв'язувальної молекули, що має форму, здатну зв'язуватися з антигеном (наприклад, антиген-зв'язувальна молекула має вільну від антигену форму) є пролонгованим;

період, коли антиген є вільним від антиген-зв'язувальної молекули в організмі, є скороченим (інакше кажучи, період, коли антиген-зв'язувальна молекула є зв'язаною з антигеном, є пролонгованим) та

відношення антигенів, зв'язаних з антиген-зв'язувальними молекулами, до антигенів в організмі є збільшеним. Отже, у цьому винаході словосполучення "покращення фармакокінетики" охоплює принаймні наступне:

(1) пролонгацію часу, необхідного для елімінування антиген-зв'язувальної молекули з плазми після введення антиген-зв'язувальної молекули;

(2) пролонгацію часу утримання у плазмі антиген-зв'язувальної молекули у формі, здатній зв'язуватися з антигеном після введення антиген-зв'язувальної молекули;

(3) скорочення періоду, коли антиген є вільним від антиген-зв'язувальної молекули в організмі після введення антиген-зв'язувальної молекули (пролонгацію періоду, коли антиген-зв'язувальна молекула є зв'язаною з антигеном в організмі); та

(4) збільшення відношення антигенів, зв'язаних з антиген-зв'язувальними молекулами, до антигенів в організмі.

Коли антиген - це розчинний антиген, що є присутнім у плазмі, навіть якщо фармакокінетика антиген-зв'язувальної молекули (швидкість елімінування з плазми) є еквівалентною, трапляються випадки, коли елімінування антигену, зв'язаного з антиген-зв'язувальною молекулою, прискорюється. Зниження фармакокінетики антигену (прискорення елімінування з плазми) зумовлює відносно покращення фармакокінетики антиген-зв'язувальної молекули та, отже стає причиною пролонгації часу, коли антиген-зв'язувальна молекула є присутньою у плазмі у формі, здатній зв'язуватися з антигенами. Отже, в одному варіанті здійснення словосполучення "покращення фармакокінетики" антиген-зв'язувальних молекул цього винаходу включає підвищення швидкості елімінування розчинних антигенів з плазми після

введення антиген-зв'язувальних молекул (здатність антиген-зв'язувальної молекули еліминувати антигени з плазми).

У цьому винаході, коли антиген - це мембранний антиген, тоді можна визначити за допомогою тесту, чи зв'язується єдина антиген-зв'язувальна молекула з численними антигенами, чи удосконалюється фармакокінетика антиген-зв'язувальної молекули. Визначити, чи "покращилася фармакокінетика", можна наступним способом. Наприклад, визначити, чи подовжився час, необхідний для елімінування антиген-зв'язувальної молекули після введення, можна шляхом визначення будь-якого одного з параметрів для антиген-зв'язувальної молекули, такого як період піврозпаду у плазмі, середній час утримання у плазмі та кліренс у плазмі ("Pharmacokinetics: Enshu-niyom Rikai (Understanding through practice)" Nanzando). Наприклад, коли період піврозпаду у плазмі або середній час утримання у плазмі антиген-зв'язувальної молекули, яку ввели мишам, щурам, мавпам, кролям, собакам, людям або іншим тваринам, подовжився, тоді фармакокінетику антиген-зв'язувальної молекули вважають покращеною. Ці параметри можна визначити за допомогою способів, відомих фахівцям у цій галузі. Наприклад, параметри можна належним чином визначити за допомогою некомпартментального аналізу, використовуючи програмне забезпечення для аналізу фармакокінетики WinNonlin (Pharsight) згідно з доданою інструкцією виробника.

Альтернативно, чи подовжився час утримання у плазмі антиген-зв'язувальної молекули у формі, здатній зв'язуватися з антигенами після введення антиген-зв'язувальної молекули, можна визначити шляхом вимірювання концентрації у плазмі вільної від антигену антиген-зв'язувальної молекули та шляхом визначення будь-якого одного з параметрів для вільної від антигену антиген-зв'язувальної молекули, таких як період піврозпаду у плазмі, середній час утримання у плазмі та кліренс у плазмі. Концентрацію вільної від антигену антиген-зв'язувальної молекули у плазмі можна визначити за допомогою способів, відомих фахівцям у цій галузі. Наприклад, такі вимірювання описано у Clin Pharmacol. 2008 Apr; 48(4):406-17.

Крім того, чи скоротився період, коли антиген є вільним від антиген-зв'язувальних молекул в організмі після введення антиген-зв'язувальних молекул (чи подовжився період, коли антиген-зв'язувальна молекула є зв'язаною з антигеном в організмі), можна визначити шляхом визначення концентрації у плазмі незв'язаного антигену, що є вільним від антиген-зв'язувальних молекул, та враховуючи період, коли концентрація вільного антигену у плазмі або відношення кількості вільного антигену до загальної кількості антигенів залишається низькою. Концентрацію у плазмі вільного антигену або відношення кількості вільного антигену до загальної кількості антигену можна визначити за допомогою способів, відомих фахівцям у цій галузі. Наприклад, такі вимірювання описано у Pharm Res. 2006 Jan; 23(1):95-103. Альтернативно, коли антиген впливає на деяку функцію *in vivo*, тоді визначити, чи зв'язався антиген антиген-зв'язувальною молекулою, яка нейтралізує функцію антигену (антагоністичною молекулою), можна шляхом випробовування того, чи нейтралізувалася функція антигену. Чи нейтралізувалася функція антигену, можна визначити, проаналізувавши *in vivo* маркер, який відбиває функцію антигену. Чи зв'язався антиген антиген-зв'язувальною молекулою, яка активує функцію антигену (агоністичною молекулою), можна визначити, проаналізувавши *in vivo* маркер, який відбиває функцію антигену.

Немає жодного особливого обмеження стосовно визначення концентрації у плазмі вільного антигену та відношення кількості вільного антигену до загальної кількості антигену та стосовно аналізу маркера *in vivo*, проте визначення переважно виконується після певного періоду після введення антиген-зв'язувальної речовини. У цьому винаході такий період після введення антиген-зв'язувальної речовини особливо не обмежується, та належний період можуть визначити фахівці у цій галузі, залежно від властивостей антиген-зв'язувальної речовини, що вводиться, та їм подібного. Приклади періоду є наступними: один день після введення антиген-зв'язувальної речовини; три дні після введення антиген-зв'язувальної речовини; сім днів після введення антиген-зв'язувальної речовини, 14 днів після введення антиген-зв'язувальної речовини та 28 днів після введення антиген-зв'язувальної речовини.

У цьому винаході переважно покращувати фармакокінетику у людини. Навіть коли важко визначити утримання у плазмі у людини, це можна передбачити на підставі утримання у плазмі у мишей (наприклад, звичайних мишей, трансгенних мишей, що експресують антиген людини, та трансгенних мишей, що експресують FcRn людини) або у мавп (наприклад, мавп *cynomolgus*).

Способи визначення утримання у плазмі особливо не обмежуються. Визначення можна виконувати, наприклад, згідно зі способами, описаними у Прикладах цього опису винаходу.

Чи є антиген-зв'язувальна молекула здатною зв'язуватися з антигенами багато разів, можна визначити, здійснивши тестування того, чи відокремлюється антиген, зв'язаний з антиген-

зв'язувальною молекулою за такої ж самої нейтральної умови, що і у плазмі, за такої ж самої кислотної умови, що і в ендосомі, та зі скількома антигенами антиген-зв'язувальна молекула може повторно зв'язатися за нейтральної умови. Специфічно, визначення можна виконувати, дозволивши антиген-зв'язувальній молекулі та антигену утворити комплекс за нейтральної умови, піддавши цей комплекс дії кислотної умови протягом заздалегідь визначеного періоду часу, а потім зробити випробовування, чи може антиген-зв'язувальна молекула повторно зв'язуватися з антигеном за нейтральної умови, використовуючи при цьому пристрій для аналізу реакцій між антигеном та антиген-зв'язувальною молекулою, такий як Bioscore. Коли антиген-зв'язувальна здатність антиген-зв'язувальної молекули, якій надано залежну від рН зв'язувальну здатність, зросла удвічі порівняно з антиген-зв'язувальною здатністю антиген-зв'язувальної молекули перед модифікацією, тоді можна вважати, що кількість разів зв'язування антиген-зв'язувальної молекули, якій надано залежну від рН зв'язувальну здатність, зросла удвічі порівняно з антиген-зв'язувальною здатністю антиген-зв'язувальної молекули перед модифікацією. Альтернативно, коли антиген - це мембранний антиген, та, отже, антиген-зв'язувальна молекула елімінується з плазми внаслідок опосередкованого антигеном захоплення та руйнування у лізосомі, тоді можна визначити, чи зросла кількість разів зв'язування антиген-зв'язувальної молекули, якій надано залежну від рН зв'язувальну здатність, порівняно з кількістю разів зв'язування до модифікації, шляхом порівняння фармакокінетики або тривалості зв'язування антигену між антиген-зв'язувальною молекулою, якій надано залежну від рН зв'язувальну здатність, та антиген-зв'язувальною молекулою до модифікації. Наприклад, коли тривалість зв'язування з антигеном антиген-зв'язувальної молекули, якій надано залежну від рН зв'язувальну здатність, подовжується удвічі порівняно з антиген-зв'язувальною молекулою до модифікації, тоді вважають, що кількість разів зв'язування антиген-зв'язувальної молекули, якій надано залежну від рН зв'язувальну здатність, збільшується удвічі порівняно з антиген-зв'язувальною молекулою до модифікації. Альтернативно, коли визначається концентрація у плазмі незв'язаного антигену, що є вільним від антиген-зв'язувальної молекули, та період, коли концентрація у плазмі вільного антигену або відношення кількості вільного антигену до загальної кількості антигену залишається низькою, подовжується удвічі, тоді вважають, що кількість разів зв'язування антиген-зв'язувальної молекули з наданою рН-залежною зв'язувальною здатністю збільшується удвічі порівняно з антиген-зв'язувальною молекулою до модифікації.

Коли антиген - це розчинний антиген, якщо антиген, зв'язаний з антиген-зв'язувальною молекулою за нейтральної умови у плазмі, відокремлюється в ендосомі, а антиген-зв'язувальна молекула повертається до плазми, тоді антиген-зв'язувальна молекула може знов зв'язатися з антигеном за нейтральної умови у плазмі. Отже, антиген-зв'язувальна молекула, що має властивість відокремлюватися від антигену у кислотній умові ендосоми, є здатною зв'язуватися з антигенами багато разів. Порівняно з тим, коли антиген, зв'язаний з антиген-зв'язувальною молекулою, не відокремлюється в ендосомі (антиген залишається зв'язаним з антиген-зв'язувальною молекулою, коли повертається до плазми), у випадку, коли антиген, зв'язаний з антиген-зв'язувальною молекулою, відокремлюється в ендосомах, антиген доставляється в лізосому, а потім руйнується, та, отже, швидкість елімінування антигену з плазми зростає. Тобто, використовуючи швидкість елімінування антигену з плазми як показник, також можна визначити, чи є антиген-зв'язувальна молекула здатною зв'язуватися з антигенами багато разів. Швидкість елімінування антигену з плазми можна визначити, наприклад, шляхом введення антигенів (наприклад, мембранного антигену) та антиген-зв'язувальних молекул *in vivo*, а потім шляхом вимірювання концентрації антигенів у плазмі. Коли антиген (наприклад, мембранний антиген) виробляється або виділяється *in vivo*, тоді концентрація антигену у плазмі зменшується, якщо швидкість елімінування антигену з плазми зростає. Отже, можна також визначити, чи є антиген-зв'язувальна молекула здатною зв'язуватися з антигенами багато разів, використовуючи при цьому концентрацію антигену у плазмі як показник.

У цьому описі винаходу словосполучення "збільшення кількості разів зв'язування з антигеном антиген-зв'язувальної молекули" означає, що кількість циклів зростає, коли за один цикл враховується процес, де антиген-зв'язувальна молекула, що вводиться людині, миші, мавпі або їм подібним, зв'язується з антигеном та інтерналізується у клітину. Специфічно, у цьому описі винаходу фраза "антиген-зв'язувальна молекула зв'язується двічі з антигеном" означає, що антиген-зв'язувальна молекула, зв'язана з антигеном, інтерналізується у клітину та виділяється у вільній від антигену формі за межі клітини, та виділена антиген-зв'язувальна молекула знов зв'язується з іншим антигеном та знов інтерналізується у клітину.

Коли антиген-зв'язувальна молекула інтерналізується у клітину, тоді вона може бути у формі, зв'язаній з єдиним антигеном, або двома, або більше антигенами.

У цьому описі винаходу фраза "кількість разів зв'язування з антигеном антиген-зв'язувальної молекули зростає" необов'язково означає, що кількість разів зв'язування з антигеном зростає у кожній антиген-зв'язувальній молекулі. Наприклад, серед антиген-зв'язувальних молекул у сукупності антиген-зв'язувальних молекул може зростати пропорція антиген-зв'язувальних молекул, які зв'язуються з антигенами двічі або більше разів, або може зростати середня кількість зв'язувальних подій антиген-зв'язувальних молекул у сукупності антиген-зв'язувальних молекул.

У цьому винаході переважно, щоб кількість разів зв'язування з антигеном антиген-зв'язувальної молекули зростала, коли молекула вводиться людині. Проте, коли важко визначити кількість разів зв'язування антигену у людини, тоді кількість разів зв'язування у людини можна передбачити на підставі результатів, отриманих внаслідок вимірювання або аналізу *in vitro* із використанням мишей (наприклад, трансгенних мишей, що експресують антиген, та трансгенних мишей, що експресують FcRn людини) або мавп (наприклад, мавп *cynomolgus*).

У цьому винаході переважно, щоб антиген-зв'язувальна молекула зв'язувалася з антигенами двічі або більше разів. Наприклад, переважно, щоб антиген-зв'язувальні молекули у сукупності антиген-зв'язувальних молекул принаймні у 10 % випадків або більше, переважно у 30 % випадків або більше, більш переважно у 50 % випадків або більше та іще більш переважно у 80 % випадків або більше (наприклад, у 90 % випадків або більше, у 95 % випадків або більше тощо) зв'язувалися з антигенами двічі або більше разів.

У цьому описі винаходу фраза "збільшення кількості антигенів, які можуть зв'язуватися антиген-зв'язувальною молекулою" означає збільшення кількості антигенів, які можуть зв'язуватися антиген-зв'язувальною молекулою протягом періоду, доки антиген-зв'язувальна молекула не зруйнується у лізосомі клітини після введення антиген-зв'язувальної молекули тварині, такий як людина, миша або мавпа.

Взагалі, антитіла, такі як IgG, мають два зв'язувальні домени, та, отже, єдине антитіло зв'язується максимум з двома антигенами. Антитіло, зв'язане з антигеном (антигенами), інтерналізується у клітину, та антитіло та антиген (антигени) руйнуються у лізосомі. Звичайно, антитіла, такі як IgG, можуть зв'язуватися максимум з двома антигенами. Коли антиген-зв'язувальна активність антиген-зв'язувальної молекули, такої як антитіло, при ендосомному рН ослаблюється порівняно з антиген-зв'язувальною активністю при рН плазми шляхом використання способів цього винаходу, тоді антиген-зв'язувальна молекула, така як антитіло, інтерналізована у клітину, відокремлюється від антигену, та виділяється за межі клітини, та, отже, може знов зв'язуватися з іншим антигеном. Інакше кажучи, способи цього винаходу дозволяють антиген-зв'язувальній молекулі зв'язуватися з більшою кількістю антигенів, ніж кількість її антиген-зв'язувальних ділянок. Специфічно, внаслідок використання способів цього винаходу, наприклад, IgG, що має дві антиген-зв'язувальні ділянки, може зв'язуватися з трьома або більше антигенами, переважно чотирма або більше антигенами, протягом періоду, доки антитіло не руйнується після введення. Наприклад, коли антитіло - це нейтралізуюче антитіло, тоді словосполучення "збільшення кількості антигенів, які можуть зв'язуватися антиген-зв'язувальною молекулою" можна взаємозамінювати словосполученням "збільшення кількості антигенів, які антиген-зв'язувальна молекула може нейтралізувати". Отже, слово "зв'язувати" можна замінити словом "нейтралізувати", коли антитіло - це нейтралізуюче антитіло.

У цьому винаході словосполучення "збільшення кількості антигенів, що можуть зв'язуватися антиген-зв'язувальною молекулою" необов'язково означає збільшення кількості антигенів, що можуть зв'язуватися кожною антиген-зв'язувальною молекулою. Наприклад, середня кількість антигенів, що можуть зв'язуватися антиген-зв'язувальною молекулою у сукупності антиген-зв'язувальних молекул, може збільшуватися, або може збільшуватися пропорція антиген-зв'язувальних молекул, які можуть зв'язуватися з більшою кількістю антигенів, ніж кількість їхніх антиген-зв'язувальних ділянок.

У цьому винаході переважно, щоб кількість антигенів, що можуть зв'язуватися антиген-зв'язувальною молекулою, збільшувалася, коли молекула вводиться людині. Проте, коли важко визначити таку кількість у людини, тоді кількість у людини можна передбачити на підставі результатів, отриманих внаслідок вимірювання або аналізу *in vitro* із використанням мишей (наприклад, трансгенних мишей, що експресують антиген, та трансгенних мишей, що експресують FcRn людини) або мавп (наприклад, мавп *cynomolgus*). Коли антитіло - це нейтралізуюче антитіло, тоді зазвичай припускають, що вищеописана кількість разів зв'язування з антигеном антиген-зв'язувальної молекули корелює з кількістю антигенів, які можуть бути нейтралізовані антиген-зв'язувальною молекулою. Отже, кількість антигенів, які можуть бути нейтралізовані антиген-зв'язувальною молекулою, можна визначити за такими ж самими

способами, які описано вище для визначення кількості разів зв'язування антиген-зв'язувальної молекули.

Крім того, цим винаходом пропонуються способи зв'язування антиген-зв'язувальної молекули з антигенами двічі або більше разів в організмі шляхом введення антиген-зв'язувальної молекули, антиген-зв'язувальна активність якої при кислотному рН є нижчою, ніж при нейтральному рН.

Цей винахід також стосується способів нейтралізації антигенів, кількість яких є більшою, ніж кількість антиген-зв'язувальних ділянок антиген-зв'язувальної молекули, яка має нейтралізуючу активність, шляхом введення антиген-зв'язувальної молекули, антиген-зв'язувальна активність якої при кислотному рН є нижчою, ніж при нейтральному рН. Переважно, цей винахід стосується способів нейтралізації трьох або більше антигенів, переважно чотирьох або більше антигенів шляхом введення IgG, антиген-зв'язувальна активність якого при кислотному рН є нижчою, ніж при нейтральному рН.

Цей винахід також стосується способів відокремлення усередині клітини антигену від антиген-зв'язувальної молекули, яка зв'язалася з ним ззовні клітини, шляхом ослаблення антиген-зв'язувальної здатності антиген-зв'язувальної молекули при кислотному рН порівняно з антиген-зв'язувальною здатністю при нейтральному рН. У цьому винаході антиген може відокремлюватися від антиген-зв'язувальної молекули будь-де усередині клітини; проте, переважно, щоб антиген відокремлювався усередині ранньої ендосоми. У цьому винаході фраза "антиген відокремлюється усередині клітини від зв'язаної з ним ззовні антиген-зв'язувальної молекули" необов'язково означає, що кожен антиген, інтерналізований у клітину внаслідок зв'язування з антиген-зв'язувальною молекулою, відокремлюється від антиген-зв'язувальної молекули усередині клітини. Можна прийняти, що пропорція антигену, який відокремлюється від антиген-зв'язувальної молекули усередині клітини, збільшується порівняно з пропорцією до ослаблення антиген-зв'язувальної здатності антиген-зв'язувальної молекули при кислотному рН порівняно з антиген-зв'язувальною здатністю при нейтральному рН.

Крім того, цей винахід стосується способів підсилення внутрішньоклітинного зв'язування антиген-зв'язувальної молекули, вільної від антигену, з FcRn шляхом ослаблення антиген-зв'язувальної здатності антиген-зв'язувальної молекули при кислотному рН порівняно з антиген-зв'язувальною здатністю при нейтральному рН. Звичайно, FcRn зв'язується з антиген-зв'язувальною молекулою усередині ендосоми. Проте, припускається, що антиген-зв'язувальна молекула, зв'язана з мембранним антигеном, не зв'язується з FcRn. Отже, у переважному варіанті здійснення, коли антиген - це зв'язаний з мембраною антиген, тоді цей винахід включає способи підсилення ендосомного відокремлення антигенів від антиген-зв'язувальних молекул та, внаслідок цього, підсилення зв'язування з FcRn антиген-зв'язувальних молекул шляхом ослаблення антиген-зв'язувальної здатності антиген-зв'язувальної молекули при ендосомному рН (кислотному рН) порівняно з антиген-зв'язувальною здатністю при рН плазми (нейтральному рН). Коли антиген - це розчинний антиген, тоді антиген-зв'язувальна молекула може зв'язуватися з FcRn у присутності або відсутності антигену. Якщо відокремлення антигену від антиген-зв'язувальної молекули усередині ендосом можна стимулювати шляхом ослаблення антиген-зв'язувальної здатності антиген-зв'язувальної молекули при внутрішньоендосомному (кислотному) рН порівняно з антиген-зв'язувальною здатністю при рН плазми (нейтральному рН), тоді зв'язування з FcRn антиген-зв'язувальної молекули, що є "вільною від антигену", можна підсилити за допомогою способів цього винаходу.

Незалежно від того, чи є антиген розчинним або зв'язаним з мембраною, якщо антиген-зв'язувальна молекула, вільна від антигену, може повертатися до плазми з FcRn, то антиген-зв'язувальна молекула може знов зв'язуватися з антигеном. Повторюючи цей процес, антиген-зв'язувальна молекула може зв'язуватися з антигеном багато разів. У цьому винаході словосполучення "підсилення зв'язування з FcRn антиген-зв'язувальної молекули усередині клітини" необов'язково означає, що кожна антиген-зв'язувальна молекула зв'язується з FcRn. Можна прийняти, що пропорція антиген-зв'язувальних молекул, вільних від антигену, які зв'язуються з FcRn усередині клітини, збільшується порівняно з пропорцією до ослаблення антиген-зв'язувальної здатності антиген-зв'язувальної молекули при ендосомному рН порівняно з антиген-зв'язувальною здатністю при рН плазми. Переважні антиген-зв'язувальні молекули у способах цього винаходу підсилення внутрішньоклітинного зв'язування між антиген-зв'язувальною молекулою та FcRn включають, наприклад, антиген-зв'язувальні молекули, які зв'язуються зі зв'язаними з мембраною антигенами (мембранними антигенами), такими як мембранні білки. Інші переважні антиген-зв'язувальні молекули включають антиген-зв'язувальні молекули, які зв'язуються з розчинними антигенами, такими як розчинні білки.

Способи підсилення зв'язування антиген-зв'язувальної молекули та FcRn усередині клітини альтернативно називаються способами стимулювання зв'язування з FcRn антиген-зв'язувальної молекули усередині клітини, наприклад, усередині ендосом.

Крім того, цей винахід стосується способів виділення антиген-зв'язувальної молекули, яка зв'язалася з антигеном та інтерналізувалася у клітину, у вільній від антигену формі за межі клітини шляхом ослаблення антиген-зв'язувальної здатності антиген-зв'язувальної молекули при кислотному рН порівняно з антиген-зв'язувальною здатністю при нейтральному рН. У цьому винаході вираз "виділення антиген-зв'язувальної молекули, яка зв'язалася з антигеном та інтерналізувалася у клітину, у вільній від антигену формі за межі клітини" необов'язково означає, що кожна антиген-зв'язувальна молекула, що зв'язалася з антигеном та інтерналізувалася у клітину, виділяється у вільній від антигену формі за межі клітини. Можна прийняти, що пропорція антиген-зв'язувальних молекул, що виділяються за межі клітини, збільшується порівняно з пропорцією до ослаблення антиген-зв'язувальної здатності антиген-зв'язувальної молекули при кислотному рН порівняно з антиген-зв'язувальною здатністю при нейтральному рН. Переважно, щоб антиген-зв'язувальна молекула, що виділяється за межі клітини, зберігала антиген-зв'язувальну здатність. Крім того, спосіб виділення антиген-зв'язувальної молекули, що зв'язалася з антигеном та інтерналізувалася у клітину, у вільній від антигену формі за межі клітини можна також назвати способом надання антиген-зв'язувальній молекулі такої властивості, що антиген-зв'язувальна молекула стає такою, яку легше виділити за межі клітини у вільній від антигену формі, коли антиген-зв'язувальна молекула зв'язана з антигеном та інтерналізована у клітину.

Крім того, цей винахід стосується способів підвищення здатності антиген-зв'язувальних молекул елімінувати антигени у плазмі шляхом ослаблення антиген-зв'язувальної здатності антиген-зв'язувальних молекул при кислотному рН порівняно з антиген-зв'язувальною здатністю при нейтральному рН. У цьому винаході термін "здатність елімінувати антигени у плазмі" означає здатність елімінувати з плазми антигени, які є присутніми у плазмі, коли антиген-зв'язувальні молекули вводяться *in vivo* або виділяються *in vivo*. Отже, у цьому винаході словосполучення "підвищення здатності антиген-зв'язувальної молекули елімінувати антиген у плазмі" означає, що швидкість елімінування антигенів з плазми, коли антиген-зв'язувальні молекули вводяться *in vivo*, прискорюється порівняно зі швидкістю до зниження антиген-зв'язувальної здатності антиген-зв'язувальних молекул при кислотному рН порівняно з антиген-зв'язувальною здатністю при нейтральному рН. Чи зростає здатність антиген-зв'язувальної молекули елімінувати антигени у плазмі, можна визначити, наприклад, шляхом введення розчинних антигенів та антиген-зв'язувальних молекул *in vivo*, а потім вимірювання концентрації розчинних антигенів у плазмі. Коли концентрація розчинних антигенів у плазмі після введення розчинних антигенів та антиген-зв'язувальних молекул зменшується внаслідок зниження антиген-зв'язувальної здатності антиген-зв'язувальної молекули при кислотному рН порівняно з антиген-зв'язувальною здатністю при нейтральному рН, тоді можна визначити, що здатність антиген-зв'язувальної молекули елімінувати антигени у плазмі підвищилася.

Цей винахід також стосується способів покращення фармакокінетики антиген-зв'язувальної молекули шляхом заміщення гістидином або неприродною амінокислотою принаймні однієї амінокислоти в антиген-зв'язувальній молекулі або шляхом вставки гістидину або неприродної амінокислоти у молекулу.

Крім того, цим винаходом пропонуються способи збільшення кількості разів зв'язування з антигеном антиген-зв'язувальної молекули шляхом заміщення гістидином або неприродною амінокислотою принаймні однієї амінокислоти в антиген-зв'язувальній молекулі або шляхом вставки гістидину або неприродної амінокислоти у молекулу.

Крім того, цей винахід стосується способів збільшення кількості антигенів, які можуть зв'язуватися антиген-зв'язувальною молекулою, шляхом заміщення гістидином або неприродною амінокислотою принаймні однієї амінокислоти в антиген-зв'язувальній молекулі або шляхом вставки гістидину або неприродної амінокислоти у молекулу.

Цим винаходом також пропонуються способи відокремлення антигену усередині клітини від антиген-зв'язувальної молекули, яка зв'язалася з ним ззовні клітини, шляхом заміщення гістидином або неприродною амінокислотою принаймні однієї амінокислоти в антиген-зв'язувальній молекулі або шляхом вставки гістидину або неприродної амінокислоти у молекулу.

Цим винаходом також пропонуються способи виділення антиген-зв'язувальної молекули, яка зв'язалася з антигеном та інтерналізувалася у клітину, у вільній від антигену формі за межі клітини шляхом заміщення гістидином або неприродною амінокислотою принаймні однієї

амінокислоти в антиген-зв'язувальній молекулі або шляхом вставки гістидину або неприродної амінокислоти у молекулу.

Цим винаходом також пропонуються способи підвищення здатності антиген-зв'язувальної молекули еліминувати антигени у плазмі шляхом заміщення гістидином або неприродною амінокислотою принаймні однієї амінокислоти в антиген-зв'язувальній молекулі або шляхом вставки гістидину або неприродної амінокислоти у молекулу.

Сайт гістидинової мутації або мутації неприродною амінокислотою (заміщення, вставка тощо) особливо не обмежується. Заміну гістидином або неприродною амінокислотою можна зробити на будь-якому сайті, або гістидин або неприродну амінокислоту можна вставити на будь-якому сайті. Переважні сайти заміщення або вставки гістидину або неприродної амінокислоти включають, наприклад, сайти усередині ділянки, що має вплив на антиген-зв'язувальну здатність антиген-зв'язувальної молекули. Наприклад, коли антиген-зв'язувальна молекула - це антитіло, тоді такі ділянки включають варіабельну ділянку або гіперваріабельну ділянку (CDR) антитіла. Кількість гістидинових мутацій або мутацій неприродною амінокислотою особливо не обмежується. Гістидином або неприродною амінокислотою можна замістити або їх можна вставити на єдиному сайті або на двох або більше сайтах. Крім того, делецію, додавання, вставку та/або заміщення інших амінокислот можна зробити одночасно із заміщенням або вставкою гістидину або неприродної амінокислоти.

У цьому винаході, коли антиген-зв'язувальна молекула - це антитіло, тоді можливі сайти заміщення гістидином або неприродною амінокислотою включають, наприклад, сайти у послідовності CDR або послідовності, що є відповідальною за структуру CDR антитіла. Такі сайти включають, наприклад, сайти, перелічені нижче. Амінокислотні позиції пронумеровано на підставі нумерації за Kabat (Kabat EA et al, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH).

Важкий ланцюг: H27, H31, H32, H33, H35, H50, H58, H59, H61, H62, H63, H64, H65, H99, H100b та H102.

Легкий ланцюг: L24, L27, L28, L32, L53, L54, L56, L90, L92 та L94.

Серед вищевказаних сайтів H32, H61, L53, L90 та L94 можуть бути універсальними сайтами модифікації.

Коли антиген - це рецептор IL-6 (наприклад, рецептор IL-6 людини), переважні сайти модифікації включають наступні. Проте, сайти модифікації особливо не обмежуються ними.

Важкий ланцюг: H27, H31, H32, H35, H50, H58, H61, H62, H63, H64, H65, H100b та H102.

Легкий ланцюг: L24, L27, L28, L32, L53, L56, L90, L92 та L94.

Коли гістидином або неприродною амінокислотою роблять заміщення на численних сайтах, тоді переважні комбінації сайтів заміщення включають, наприклад, комбінацію H27, H31 та H35; комбінацію H27, H31, H32, H35, H58, H62 та H102; комбінацію L32 та L53 та комбінацію L28, L32 та L53.

Коли антиген - це IL-6 (наприклад, IL-6 людини), тоді переважні сайти модифікації включають наступні. Проте, сайти модифікації особливо не обмежуються ними.

Важкий ланцюг: H32, H59, H61 та H99.

Легкий ланцюг: L53, L54, L90 та L94.

Коли антиген - це рецептор IL-31 (наприклад, рецептор IL-31 людини), тоді переважні сайти модифікації включають H33. Проте, сайти модифікації особливо не обмежуються ним.

Стосовно вищевказаних сайтів, тільки один сайт може заміщуватися гістидином або неприродною амінокислотою. Альтернативно, численні сайти можуть заміщуватися гістидином або неприродною амінокислотою.

Способи цього винаходу можна використовувати для будь-яких антиген-зв'язувальних молекул, незалежно від типу антигену-мішені.

Антиген-зв'язувальні молекули цього винаходу особливо не обмежуються, доки вони мають специфічну зв'язувальну активність з антигеном, що представляє інтерес. Переважні антиген-зв'язувальні молекули цього винаходу включають, наприклад, речовини, що мають антиген-зв'язувальний домен антитіла. Антиген-зв'язувальний домен антитіла включає, наприклад, CDR та варіабельну ділянку. Коли антиген-зв'язувальний домен антитіла - це CDR, тоді антиген-зв'язувальна молекула може включати усі шість CDR цілого антитіла, або одну, або дві, або більше з них. Альтернативно, коли антиген-зв'язувальна молекула включає CDR як зв'язувальний домен антитіла, тоді CDR може включати амінокислотну делецію, заміщення, додавання та/або вставку або може бути частковою CDR.

Крім того, коли антиген-зв'язувальна молекула включає константну ділянку антитіла, тоді цей винахід стосується способів покращення фармакокінетики антиген-зв'язувальних молекул

шляхом модифікації (наприклад, шляхом амінокислотного заміщення, делеції, додавання та/або вставки) константної ділянки антитіла в антиген-зв'язувальній молекулі.

Крім того, коли антиген-зв'язувальна молекула включає константну ділянку антитіла, тоді цей винахід стосується способів збільшення кількості разів зв'язування з антигеном антиген-зв'язувальної молекули шляхом модифікації (наприклад, амінокислотного заміщення, делеції, додавання та/або вставки) константної ділянки антитіла в антиген-зв'язувальній молекулі.

Крім того, коли антиген-зв'язувальна молекула включає константну ділянку антитіла, тоді цей винахід стосується способів збільшення кількості антигенів, що можуть зв'язуватися антиген-зв'язувальною молекулою шляхом модифікації (наприклад, амінокислотного заміщення, делеції, додавання та/або вставки) константної ділянки антитіла в антиген-зв'язувальній молекулі.

Крім того, коли антиген-зв'язувальна молекула включає константну ділянку антитіла, тоді цей винахід стосується способів відокремлення усередині клітини антигену від антиген-зв'язувальної молекули, яка зв'язалася з ним ззовні клітини, шляхом модифікації (наприклад, амінокислотного заміщення, делеції, додавання та/або вставки) константної ділянки антитіла в антиген-зв'язувальній молекулі.

Крім того, коли антиген-зв'язувальна молекула включає константну ділянку антитіла, тоді цей винахід стосується способів вивільнення антиген-зв'язувальної молекули, яка зв'язалася з антигеном та інтерналізувалася у клітину, у вільній від антигену формі за межі клітини шляхом модифікації (наприклад, амінокислотного заміщення, делеції, додавання та/або вставки) константної ділянки антитіла в антиген-зв'язувальній молекулі.

Крім того, коли антиген-зв'язувальна молекула включає константну ділянку антитіла, тоді цей винахід стосується способів підвищення здатності антиген-зв'язувальної молекули елімінувати антигени у плазмі шляхом модифікації (наприклад, амінокислотного заміщення, делеції, додавання та/або вставки) константної ділянки антитіла в антиген-зв'язувальній молекулі.

У переважному варіанті здійснення антиген-зв'язувальна речовина цього винаходу включає антиген-зв'язувальні речовини, які включають FcRn-зв'язувальну ділянку. Після інтерналізації у клітини антиген-зв'язувальні речовини, які включають FcRn-зв'язувальну ділянку, можуть повертатися до плазми FcRn-реутилізаційним шляхом. FcRn-зв'язувальна ділянка - це переважно домен, який безпосередньо зв'язується з FcRn. Переважна FcRn-зв'язувальна ділянка включає, наприклад, ділянки Fc антитіла. Проте, FcRn-зв'язувальна ділянка цього винаходу може бути ділянкою, яка може зв'язуватися з поліпептидом, що має здатність зв'язуватися з FcRn, таким як альбумін або IgG, оскільки така ділянка, яка може зв'язуватися з поліпептидом, що має FcRn-зв'язувальну здатність, може зв'язуватися опосередковано з FcRn за допомогою альбуміну, IgG тощо.

Антигени, що розпізнаються антиген-зв'язувальними молекулами, такими як антитіла, що представляють інтерес у способах цього винаходу, особливо не обмежуються. Такі антитіла, що представляють інтерес, можуть розпізнавати будь-який антиген. Антитіла, фармакокінетику яких слід покращити за способами цього винаходу, включають, наприклад, антитіла, які розпізнають мембранні антигени, такі як рецепторні білки (зв'язані з мембраною рецептори та розчинні рецептори), та клітинні поверхневі маркери, та антитіла, які розпізнають розчинні антигени, такі як цитокіни. Переважні приклади мембранних антигенів цього винаходу включають мембранні білки. Приклади розчинних антигенів цього винаходу включають розчинні білки. Антигени, що розпізнаються антитілами, фармакокінетику яких слід покращити способами цього винаходу, включають, наприклад, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-31, IL-23, рецептор IL-2, рецептор IL-6, рецептор OSM, gp130, рецептор IL-5, CD40, CD4, Fas, остеопонтин, CRTN2, CD26, PDGF-D, CD20, моноцитний хемотактичний фактор, CD23, TNF- α , HMGB-1, інтегрин α 4, ICAM-1, CCR2, CD11a, CD3, IFN γ , BLYS, HLA-DR, TGF- β , CD52 та рецептор IL-31. Особливо переважні антигени включають рецептор IL-6.

Крім того, антиген-зв'язувальна молекула, що представляє інтерес у способах цього винаходу, включає антиген-зв'язувальні молекули, які мають антагоністичну активність (антагоністичні антиген-зв'язувальні молекули) та антиген-зв'язувальні молекули, що мають агоністичну активність (агоністичні антиген-зв'язувальні молекули). У переважному варіанті здійснення антиген-зв'язувальна молекула включає антагоністичні антиген-зв'язувальні молекули, зокрема, антагоністичні антиген-зв'язувальні молекули, що розпізнають мембранні антигени, такі як рецептори, або розчинні антигени, такі як цитокіни. Наприклад, антагоністична антиген-зв'язувальна молекула, яка розпізнає рецептор, інгібує зв'язування ліганду з рецептором шляхом зв'язування з рецептором та, отже, інгібує передачу сигналу, опосередковану рецептором.

У цьому винаході антиген-зв'язувальна молекула, яка представляє інтерес, особливо не обмежується, та вона може бути будь-якою антиген-зв'язувальною молекулою. Антиген-зв'язувальна молекула цього винаходу переважно має як антиген-зв'язувальну активність (антиген-зв'язувальну ділянку), так і FcRn-зв'язувальну ділянку. Зокрема, переважна антиген-зв'язувальна молекула цього винаходу включає ділянку, яка зв'язується з FcRn людини. Антиген-зв'язувальна молекула, яка має як антиген-зв'язувальну активність, так і FcRn-зв'язувальну ділянку, включає, наприклад, антитіла. Антитіла, переважні у контексті цього винаходу, включають, наприклад, антитіла IgG. Коли антитіло, яке слід використовувати, - це антитіло IgG, тоді тип IgG не обмежується; можна використовувати IgG, що належить до будь-якого ізотипу (підкласу), такий як IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4. Крім того, амінокислотні мутації (наприклад, M73) можна вводити у константну ділянку будь-якого з цих ізотипів IgG. Амінокислотні мутації, які слід вводити, включають, наприклад, ті мутації, які підсилюють або ослаблюють зв'язування з рецептором Fe γ (Proc Natl Acad Sci USA. 2006 Mar 14; 103(11):4005-10), або ті, що підсилюють або ослаблюють зв'язування з FcRn (J Biol Chem. 2001 Mar 2; 276(9):6591-604), проте вони не обмежуються цими прикладами. Альтернативно, можна змінювати залежне від рН зв'язування шляхом вибирання відповідної константної ділянки, такої як IgG2.

Коли антиген-зв'язувальна молекула, яка представляє інтерес цього винаходу, - це антитіло, тоді вона може бути антитілом, що походить від будь-якої тварини, таким як мишаче антитіло, антитіло людини, антитіло щура, антитіло кроля, антитіло козла або антитіло верблюда. Крім того, антитіло може бути модифікованим антитілом, наприклад, химерним антитілом, та зокрема, модифікованим антитілом, яке включає амінокислотне заміщення у послідовності гуманізованого антитіла, тощо. Антитіла також включають біспецифічні антитіла, продукти модифікації антитіл, з'єднані з різними молекулами, та поліпептиди, які включають фрагменти антитіл.

"Химерні антитіла" - це антитіла, отримані внаслідок комбінації послідовностей, що походять від різних тварин. Специфічно, химерне антитіло включає, наприклад, антитіла, що мають варіабельні (V) ділянки важкого та легкого ланцюгів від мишачого антитіла та константні (C) ділянки важкого та легкого ланцюгів від антитіла людини.

"Гуманізовані антитіла", які також називаються антитілами людини зі зміненою формою, - це антитіла, у яких гіперваріабельні ділянки (CDR) антитіла, що походять від ссавця, що не є людиною, наприклад, миші, трансплантуються у CDR антитіла людини. Способи ідентифікації CDR є відомими (Kabat et al, Sequence of Proteins of Immunological Interest (1987), National Institute of Health, Bethesda, Md.; Chothia et al, Nature (1989) 342:877). Загальні способи генетичної рекомбінації, що є придатними для цього, є також відомими (дивись Європейську патентну заявку EP 125023 та WO 96/02576).

Термін "біспецифічне антитіло" означає антитіло, яке має у молекулі одного й того ж самого антитіла варіабельні ділянки, які розпізнають різні епітопи. Біспецифічне антитіло може бути антитілом, яке розпізнає два або більше різних антигенів, або антитілом, яке розпізнає два або більше різних епітопів на одному й тому ж антигені.

Крім того, поліпептиди, що включають фрагменти антитіла, включають, наприклад, фрагменти Fab, фрагменти F(ab')₂, scFv (Nat Biotechnol. 2005 Sep; 23(9):126-36), доменні антитіла (dAb) (WO 2004/058821, WO 2003/002609), scFv-Fc (WO 2005/037989), dAb-Fc та злиті білки Fc. З них, молекули, що включають домен Fc, мають активність зв'язування з FcRn, та внаслідок цього є придатними для використання у способах, розкритих у цьому винаході.

Крім того, антиген-зв'язувальні молекули, які можна використовувати у цьому винаході, можуть бути подібними до антитіла молекулами. Антитіло-подібна молекула - це молекула, яка може демонструвати функції шляхом зв'язування з молекулою-мішенню (Current Opinion in Biotechnology 2006, 17:653-658; Current Opinion in Biotechnology 2007, 18:1-10; Current Opinion in Structural Biology 1997, 7:463-469; Protein Science 2006, 15:14-27), та включає, наприклад, DARPins (WO 2002/020565), Affibody (WO 1995/001937), Avimer (WO 2004/044011; WO 2005/040229) та Adnectin (WO 2002/032925). Якщо ці антитіло-подібні молекули можуть зв'язуватися з молекулами-мішенями залежним від рН чином, тоді єдина молекула може зв'язуватися з багатьма молекулами-мішенями.

Крім того, антиген-зв'язувальна молекула може бути рецепторним білком або злитим з рецептором білком Fc, який зв'язується з мішенню, включаючи, наприклад, злитий білок TNFR-Fc, злитий білок IL1R-Fc, злитий білок VEGFR-Fc та злитий білок CTLA4-Fc (Nat Med. 2003 Jan; 9(1):47-52; BioDrugs. 2006; 20(3):151-60). Якщо такі рецепторні білки та злиті з рецептором білки Fc можуть зв'язуватися з молекулами-мішенями залежним від рН чином, тоді єдина молекула може зв'язуватися з багатьма молекулами-мішенями.

Крім того, антиген-зв'язувальна молекула може бути штучним лігандним білком або штучним злитим лігандним білком, який зв'язується з мішенню та має нейтралізуючий ефект, та включає, наприклад, мутантний IL-6 (EMBO J. 1994 Dec 15;13(24):5863-70). Якщо такі штучні лігандні білки або штучні злиті лігандні білки можуть зв'язуватися з молекулами-мішеннями залежним від рН чином, тоді єдина молекула може зв'язуватися з багатьма молекулами-мішеннями.

Крім того, антитіла цього винаходу можуть включати модифіковані цукрові ланцюги. Антитіла з модифікованими цукровими ланцюгами включають, наприклад, антитіла з модифікованою глікозиляцією (WO 99/54342), антитіла з дефіцитом у фукозі, що додається до цукрового ланцюга (WO 00/61739; WO 02/31140; WO 2006/067847; WO 2006/067913) та антитіла, що мають цукрові ланцюги з бісекторним GlcNAc (WO 02/79255).

Хоча способи цього винаходу не обмежуються будь-якою специфічною теорією, взаємозв'язок між послабленням антиген-зв'язувальної здатності при кислотному рН порівняно з антиген-зв'язувальною здатністю при нейтральному рН, покращення фармакокінетики та багаторазове зв'язування з антигеном можна пояснити, наприклад, наступним чином.

Наприклад, коли антитіло - це антитіло, що зв'язується з мембранним антигеном, тоді антитіло, яке введене в організм, зв'язується з антигеном, а потім захоплюється шляхом інтерналізації в ендосоми у клітинах разом з антигеном та при цьому антитіло зберігає зв'язок з антигеном. Потім, антитіло переміщується до лізосом, зберігаючи зв'язок з антигеном, та антитіло руйнується лізосою разом з антигеном. Опосередковане інтерналізацією елімінування з плазми називається антиген-залежним елімінуванням, та повідомлялося про таке елімінування багатьма молекулами-антитілами (Drug Discov Today. 2006 Jan; 11(1-2):81-8). Коли єдина молекула антитіла IgG зв'язується з антигенами двовалентним чином, тоді єдина молекула антитіла інтерналізується, зберігаючи зв'язок з двома молекулами антигену, та руйнується у лізосомі. Отже, у випадку звичайних антитіл одна молекула антитіла IgG не може зв'язуватися з трьома або більше молекулами антигену. Наприклад, єдина молекула антитіла IgG, що має нейтралізуючу активність, не може нейтралізувати три або більше молекул антигену.

Відносно подовжене утримання (повільне елімінування) молекул IgG у плазмі є наслідком функції FcRn, що є відомим як рецептор реутилізації молекул IgG. Коли молекули IgG захоплюються в ендосоми внаслідок піноцитозу, тоді вони зв'язуються з FcRn, що експресується в ендосомах за кислотних умов, що існують в ендосомах. У той час, коли молекули IgG, які не зв'язалися з FcRn, переносяться до лізосом, де вони руйнуються, молекули IgG, що зв'язалися з FcRn, переміщуються до клітинної поверхні та знов повертаються у плазму, при цьому відокремлюючись від FcRn за нейтральних умов у плазмі.

Альтернативно, коли антиген - це антиген, який зв'язується з розчинним антигеном, тоді антитіло, яке введене в організм, зв'язується з антигеном, а потім захоплюється у клітини, при цьому антитіло зберігає зв'язок з антигеном. Багато антитіл, захоплених у клітини, виділяються за межі клітин завдяки FcRn. Проте, оскільки антитіла виділяються за межі клітин та при цьому зберігають зв'язок з антигенами, то антитіла не можуть зв'язуватися з антигенами знов. Отже, подібно до антитіл, що зв'язуються з мембранними антигенами, у випадку звичайних антитіл, одна молекула антитіла IgG не може зв'язуватися з трьома або більше молекулами антигенів.

Автори цього винаходу зробили висновок, що, коли антитіла, які зв'язуються з антигенами, такими як мембранні антигени, захоплюються в ендосоми шляхом інтерналізації, то антитіла, які зберігають зв'язок з антигенами, переміщуються до лізосом та руйнуються, а антитіла IgG, від яких антигени відокремлюються в ендосомах, можуть зв'язуватися з FcRn, які експресуються в ендосомах. Специфічно, автори цього винаходу визначили, що антитіло, яке сильно зв'язується з антигеном у плазмі, проте слабо зв'язується з антигеном усередині ендосоми, може зв'язуватися з антигеном у плазмі та, продовжуючи утворювати комплекс з антигеном, захоплюватися в ендосоми у клітинах внаслідок інтерналізації; потім відокремлюватися від антигену в ендосомі; потім зв'язуватися з FcRn та переміщуватися до клітинної поверхні та повертатися знов у плазму у стані, не зв'язаному з антигенами, внаслідок чого воно нейтралізує численні антигени, зв'язані з мембраною. Крім того, автори цього винаходу визначили, що антитіло, яке має властивість сильно зв'язуватися з антигенами у плазмі, проте слабо зв'язуватися з антигенами в ендосомі, може відокремлюватися від антигенів в ендосомі, навіть коли антитіло зв'язалося з антигенами, такими як розчинні антигени; отже, вони знов виділяються у плазму у незв'язаному з антигенами стані та можуть нейтралізувати численні розчинні антигени.

Зокрема, автори цього винаходу відмітили, що рН у плазмі відрізнялося від рН в ендосомах, та, отже, вони визначили, що антитіла, які сильно зв'язуються з антигенами в умовах рН

плазми, проте слабо зв'язуються з антигенами в умовах ендосомного рН, мали перевагу стосовно утримання у плазмі, оскільки одна молекула антитіла могла зв'язуватися з численними антигенами.

Ендосоми, які є мембранними везикулами, утворюють мережі у цитоплазмі еукаріотних клітин, та вони відповідають за метаболізм макромолекул у процесі від клітинної мембрани до лізосом. Повідомлялося, що рН в ендосомах є зазвичай кислотним рН, яке становить від 5,5 до 6,0 (Nat Rev Mol Cell Biol. 2004 Feb; 5(2):121-32). Проте, відомо, що рН у плазмі є майже нейтральним (звичайно 7,4).

Отже, антиген-зв'язувальна молекула, антиген-зв'язувальна активність якої при кислотному рН є більш слабкою порівняно з антиген-зв'язувальною активністю при нейтральному рН, зв'язується з антигеном у плазмі, яка має нейтральний рН, захоплюється у клітини, а потім відокремлюється від антигену в ендосомах, які мають кислотний рН. Антиген-зв'язувальна молекула, яка відокремилася від антигену, зв'язується з FcRn, переміщується до клітинної поверхні та повертається знов у плазму у незв'язаному з антигенами стані. Внаслідок цього антиген-зв'язувальна молекула може зв'язуватися з антигенами багато разів, що зумовлює покращення фармакокінетики.

Речовини антиген-зв'язувальних молекул

Крім того, цим винаходом пропонуються антиген-зв'язувальні молекули, антиген-зв'язувальна активність яких при рН від 4,0 до 6,5 є нижчою, ніж при рН від 6,7 до 10,0, переважно антиген-зв'язувальні молекули, антиген-зв'язувальна активність яких при рН від 5,0 до 6,0 є нижчою, ніж при рН від 7,0 до 8,0. Специфічно, антиген-зв'язувальні молекули, антиген-зв'язувальна активність яких при рН від 4,0 до 6,5 є нижчою, ніж при рН від 6,7 до 10,0, включають, наприклад, антиген-зв'язувальні молекули, антиген-зв'язувальна активність яких при рН 5,8 є нижчою, ніж при рН 7,4. Антиген-зв'язувальні молекули, антиген-зв'язувальна активність яких при рН 5,8 є нижчою, ніж при рН 7,4, можуть також визначатися як антиген-зв'язувальні молекули, антиген-зв'язувальна активність яких при рН 7,4 є вищою, ніж при рН 5,8.

Що стосується антиген-зв'язувальних молекул цього винаходу, антиген-зв'язувальна активність яких при рН 5,8 є нижчою, ніж при рН 7,4, доки антиген-зв'язувальна активність при рН 5,8 є нижчою, ніж зв'язування при рН 7,4, то нема обмежень стосовно різниці у зв'язувальній активності, та антиген-зв'язувальна активність при рН 5,8 мусить тільки бути нижчою, навіть незначно.

Переважний варіант здійснення антиген-зв'язувальної молекули цього винаходу, антиген-зв'язувальна активність якої при рН 5,8 є нижчою, ніж при рН 7,4, включає антиген-зв'язувальні молекули, антиген-зв'язувальна активність яких при рН 7,4 удвічі або більше перебільшує антиген-зв'язувальну активність при рН 5,8. Більш переважний варіант здійснення антиген-зв'язувальної молекули включає антиген-зв'язувальні молекули, антиген-зв'язувальна активність яких при рН 7,4 у десять разів або більше перебільшує антиген-зв'язувальну активність при рН 5,8. Іще більш переважний варіант здійснення антиген-зв'язувальної молекули включає антиген-зв'язувальні молекули, антиген-зв'язувальна активність яких при рН 7,4 у 40 разів або більше перебільшує антиген-зв'язувальну активність при рН 5,8.

Специфічно, у переважному варіанті здійснення антиген-зв'язувальна молекула цього винаходу має антиген-зв'язувальну активність при рН 5,8, яка є нижчою, ніж при рН 7,4, де значення $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$, яке є відношенням KD для антигену при рН 5,8 та KD для антигену при рН 7,4, переважно становить 2 або більше, більш переважно 10 або більше, та іще більш переважно 40 або більше. Верхня границя значення $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ особливо не обмежується та може мати будь-яке значення, наприклад, 400, 1000 або 10000, доки молекулу можна одержувати за способами, звичайними для фахівців у цій галузі.

В іншому переважному варіанті здійснення антиген-зв'язувальна молекула цього винаходу, антиген-зв'язувальна активність якої при рН 5,8 є нижчою, ніж при рН 7,4, має значення $k_d(pH5,8)/k_d(pH7,4)$, яке є відношенням k_d для антигену при рН 5,8 та k_d для антигену при рН 7,4, яке становить 2 або більше, більш переважно 5 або більше, навіть більш переважно 10 або більше та іще більш переважно 30 або більше. Верхня границя значення $k_d(pH5,8)/k_d(pH7,4)$ особливо не обмежується та може мати будь-яке значення, наприклад, 50, 100 або 200, доки молекулу можна одержувати за способами, звичайними для фахівців у цій галузі.

Умови, відмінні від рН, при яких вимірюється антиген-зв'язувальна активність, можуть відповідним чином бути вибрані фахівцями у цій галузі, та ці умови особливо не обмежуються; проте, вимірювання можна виконувати, наприклад, в умовах буфера MES та при 37 °C, як описано у Прикладах. Крім того, антиген-зв'язувальну активність антиген-зв'язувальної молекули можна визначити за способами, відомими фахівцям у цій галузі, наприклад, використовуючи Biacore T100 (GE Healthcare) або йому подібний, як описано у Прикладах.

Передбачається, що така антиген-зв'язувальна молекула, яка слабо зв'язується з антигеном при кислотному рН, легко відокремлюється від антигену в ендосомних кислотних умовах, та що після інтерналізації у клітини вона зв'язується з FcRn та легко виділяється за межі клітин. Антиген-зв'язувальна молекула, що виділяється за межі клітин, не руйнується усередині клітин, може знов зв'язуватися з іншими антигенами. Отже, коли антиген-зв'язувальна молекула - це, наприклад, антиген-зв'язувальна нейтралізуюча молекула, при цьому - це антиген-зв'язувальна молекула, що може легко відокремитися від антигену при ендосомних кислотних умовах, тоді вона може зв'язуватися з антигенами багато разів та нейтралізувати їх. Внаслідок цього антиген-зв'язувальні молекули, антиген-зв'язувальна активність яких при рН від 4,0 до 6,5 є нижчою, ніж при рН від 6,7 до 10,0, є найкращими стосовно утримання у плазмі.

У переважному варіанті здійснення антиген-зв'язувальна молекула, антиген-зв'язувальна активність якої при рН 5,8 є нижчою, ніж при рН 7,4, включає антиген-зв'язувальні молекули, у яких принаймні одна амінокислота в антиген-зв'язувальній молекулі заміщена гістидином або неприродною амінокислотою або у які вставлений принаймні один гістидин або неприродна амінокислота. Ділянка, у яку вводиться мутація гістидином або неприродною амінокислотою, особливо не обмежується, та вона може бути будь-якою ділянкою, доки антиген-зв'язувальна активність при рН 5,8 є слабшою, ніж при рН 7,4 (значення $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ є більшим або значення $k_d(pH5,8)/k_d(pH7,4)$ є більшим) порівняно з антиген-зв'язувальною активністю до заміщення. Приклади включають варіабельні ділянки та гіперваріабельні ділянки (CDR) антитіла у випадку, коли антиген-зв'язувальна молекула - це антитіло. Кількість амінокислот, які слід замінити гістидином або неприродною амінокислотою, та кількість амінокислот, які слід вставити, можуть відповідним чином визначити фахівці у цій галузі. Одна амінокислота може замінюватися гістидином або неприродною амінокислотою, або одну амінокислоту можна вставити, або дві або більше амінокислот можуть замінюватися гістидином або неприродними амінокислотами, або дві або більше амінокислот можна вставити. Крім того, окрім заміщень гістидином або неприродною амінокислотою або окрім вставки гістидину або неприродної амінокислоти, можна також одночасно здійснювати делецію, додавання, вставку та/або заміщення, та їм подібне, інших амінокислот. Заміщення на гістидин або неприродну амінокислоту або вставку гістидину або неприродної амінокислоти можна виконувати наугад, використовуючи спосіб, такий як гістидинове сканування, при якому використовується гістидин замість аланіну при аланіновому скануванні, який є добре відомим фахівцям у цій галузі. Антиген-зв'язувальні молекули, значення $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ або $k_d(pH5,8)/k_d(pH7,4)$ яких збільшуються порівняно зі значеннями до мутації, можна вибрати з антиген-зв'язувальних молекул, у яких було наугад проведено мутацію гістидином або неприродною амінокислотою.

Переважні антиген-зв'язувальні молекули з мутацією гістидином або неприродною амінокислотою, антиген-зв'язувальна активність яких при рН 5,8 є нижчою, ніж при рН 7,4, включають, наприклад, антиген-зв'язувальні молекули, антиген-зв'язувальна активність яких при рН 7,4 після мутації гістидином або неприродною амінокислотою є еквівалентною антиген-зв'язувальній активності при рН 7,4 до мутації гістидином або неприродною амінокислотою. У цьому винаході фраза "антиген-зв'язувальна молекула після мутації гістидином або неприродною амінокислотою має антиген-зв'язувальну активність, яка є еквівалентною антиген-зв'язувальній активності до мутації гістидином або неприродною амінокислотою" означає, що, коли антиген-зв'язувальна активність антиген-зв'язувальної молекули до мутації гістидином або неприродною амінокислотою становить 100 %, тоді антиген-зв'язувальна активність антиген-зв'язувальної молекули після мутації гістидином або неприродною амінокислотою становить принаймні 10 % або більше, переважно 50 % або більше, більш переважно 80 % або більше та іще більш переважно 90 % або більше. Антиген-зв'язувальна активність при рН 7,4 після мутації гістидином або неприродною амінокислотою може бути більшою, ніж антиген-зв'язувальна активність при 7,4 до мутації гістидином або неприродною амінокислотою. Коли антиген-зв'язувальна активність антиген-зв'язувальної молекули знижується внаслідок заміщення або вставки гістидину або неприродної амінокислоти, тоді антиген-зв'язувальну активність можна відрегулювати шляхом введення заміщення, делеції, додавання та/або вставки, та їм подібного, однієї або більше амінокислот в антиген-зв'язувальну молекулу, так що антиген-зв'язувальна активність стає еквівалентною антиген-зв'язувальній активності до заміщення або вставки гістидину. Цей винахід також включає такі антиген-зв'язувальні молекули, зв'язувальну активність яких зробили еквівалентною за допомогою заміщення, делеції, додавання та/або вставки однієї або більше амінокислот після заміщення або вставки гістидину.

Крім того, коли антиген-зв'язувальна молекула - це речовина, яка включає константну ділянку антитіла, тоді в іншому переважному варіанті здійснення антиген-зв'язувальної молекули, антиген-зв'язувальна активність якої при рН 5,8 є нижчою, ніж при рН 7,4, цей винахід

включає способи модифікації константних ділянок антитіл, які містяться в антиген-зв'язувальних молекулах. Специфічні приклади константних ділянок антитіл після модифікації включають константні ділянки, описані у Прикладах.

Коли антиген-зв'язувальна активність антиген-зв'язувальної речовини при pH 5,8 ослаблюється порівняно з антиген-зв'язувальною активністю при pH 7,4 (коли значення $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ збільшується) внаслідок вищеописаних способів та їм подібних, тоді звичайно переважно, щоб значення $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ перебільшувало у 2 рази або більше, більш переважно у 5 разів або більше та навіть більш переважно у десять разів або більше значення щодо оригінального антитіла, проте, цими значеннями особливо не обмежуються.

Антиген-зв'язувальні молекули цього винаходу можуть, крім того, мати будь-яку іншу властивість, доки їхня антиген-зв'язувальна активність при pH від 4,0 до 6,5 є нижчою, ніж при pH від 6,7 до 10,0. Наприклад, антиген-зв'язувальні молекули можуть бути антагоністичними або агоністичними антиген-зв'язувальними молекулами. Переважні антиген-зв'язувальні молекули цього винаходу включають, наприклад, антагоністичні антиген-зв'язувальні молекули. Зазвичай, антагоністична антиген-зв'язувальна молекула інгібує опосередковану рецептором внутрішньоклітинну передачу сигналу шляхом інгібування зв'язування між лігандом (агоністом) та рецептором.

Крім того, цим винаходом пропонуються антитіла, у яких амінокислота принаймні на одному з сайтів, вказаних нижче, заміщена гістидином або неприродною амінокислотою. Амінокислотні позиції пронумеровано на підставі нумерації за Kabat (Kabat EA et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH).

Важкий ланцюг: H27, H31, H32, H33, H35, H50, H58, H59, H61, H62, H63, H64, H65, H99, H100b та H102.

Легкий ланцюг: L24, L27, L28, L32, L53, L54, L56, L90, L92 та L94.

Серед вищевказаних сайтів H32, H61, L53, L90 та L94 можуть бути універсальними сайтами модифікації.

Коли антиген - це рецептор IL-6 (наприклад, рецептор IL-6 людини), тоді переважні сайти модифікації включають наступні. Проте, сайти модифікації особливо не обмежуються ними.

Важкий ланцюг: H27, H31, H32, H35, H50, H58, H61, H62, H63, H64, H65, H100b та H102.

Легкий ланцюг: L24, L27, L28, L32, L53, L56, L90, L92 та L94.

Коли гістидин або неприродна амінокислота заміщує на численних сайтах, тоді переважні комбінації сайтів заміщення включають, наприклад, комбінацію H27, H31 та H35; комбінацію H27, H31, H32, H35, H58, H62 та H102; комбінацію L32 та L53 та комбінацію L28, L32 та L53. Крім того переважні комбінації сайтів заміщення важкого та легкого ланцюгів включають комбінацію H27, H31, L32 та L53.

Коли антиген - це IL-6 (наприклад, IL-6 людини), тоді переважні сайти модифікації включають наступні. Проте, сайти модифікації особливо не обмежуються ними.

Важкий ланцюг: H32, H59, H61 та H99.

Легкий ланцюг: L53, L54, L90 та L94.

Коли антиген - це рецептор IL-31 (наприклад, рецептор IL-31 людини), тоді переважні сайти модифікації включають H33. Проте, сайти модифікації особливо не обмежуються ним.

Антиген-зв'язувальні молекули цього винаходу можуть розпізнавати будь-який антиген. Антигени, що розпізнаються антитілами цього винаходу, специфічно включають вищезгадані рецепторні білки (зв'язані з мембраною рецептори або розчинні рецептори), мембранні антигени, такі як клітинні поверхневі маркери, та розчинні антигени, такі як цитокіни, наприклад, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-31, IL-23, рецептор IL-2, рецептор IL-6, рецептор OSM, gp130, рецептор IL-5, CD40, CD4, Fas, остеопонтин, CRTN2, CD26, PDGF-D, CD20, фактор моноциту хемоатрактанту, CD23, TNF- α , HMGB-1, інтегрин α 4, ICAM-1, CCR2, CD11a, CD3, IFN γ , BLYS, HLA-DR, TGF- β , CD52 та рецептор IL-31.

Особливо переважні антигени включають рецептор IL-6.

Антиген-зв'язувальні молекули цього винаходу описані вище.

У переважному варіанті здійснення цього винаходу антиген-зв'язувальні молекули включають антитіла. Антитіла, що мають антиген-зв'язувальну активність та FcRn-зв'язувальну ділянку, включають, наприклад, антитіла IgG. Коли антитіло, що використовується, - це антитіло IgG, тоді нема жодного обмеження стосовно його типу. Можна використовувати IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 та їм подібне.

Походження антитіла цього винаходу особливо не обмежується, та воно може мати будь-яке походження. Можна використовувати, наприклад, антитіла миші, антитіла людини, антитіла щурів, антитіла кролів, антитіла козлів, антитіла верблюдів та їм подібні. Крім того, антитіла можуть бути, наприклад, вищеописаними химерними антитілами, та, зокрема, модифікованими

антитілами із заміщеннями в амінокислотних послідовностях, такими як гуманізовані антитіла. Антитіла можуть також бути вищеописаними біспецифічними антитілами, продуктами модифікації антитіл, до яких приєднали різні молекули, поліпептидами, що включають фрагменти антитіл, та антитілами з модифікованими цукровими ланцюгами.

5 Покоління химерних антитіл є відомим. У випадку химерного антитіла людини-миші, наприклад, ДНК, що кодує V-ділянку антитіла, може бути зв'язаною з ДНК, що кодує С-ділянку антитіла людини; це можна вставити у вектор експресії та увести хазяїну для отримання химерного антитіла.

10 "Гуманізовані антитіла", також називаються антитілами людини зі зміненою формою, - це антитіла, у яких гіперваріабельна ділянка (CDR), що походить від ссавця, що не є людиною, наприклад, миші, трансплантуються у CDR антитіла людини. Способи ідентифікації CDR є відомими (Kabat et al, Sequence of Proteins of Immunological Interest (1987), National Institute of Health, Bethesda, Md.; Chothia et al, Nature (1989) 342:877). Загальні способи генетичної рекомбінації, що є придатними для цього, є також відомими (дивись європейську патентну заявку EP 125023 та WO 96/02576). Гуманізовані антитіла можна отримати за відомими способами, наприклад, можна визначити CDR мишачого антитіла та отримати ДНК, що кодує антитіло, у якому CDR приєднана до каркасної ділянки (FR) антитіла людини. Гуманізовані антитіла можна потім отримувати із використанням системи, яка використовує традиційні вектори експресії. Такі ДНК можна синтезувати шляхом ПЛР, використовуючи як праймери декілька олігонуклеотидів, які вироблено так, щоб вони мали частини, які перекривають кінцеві ділянки як CDR, так і FR (дивись спосіб, описаний у WO 98/13388). Каркасні ділянки антитіла людини, з'єднані за допомогою CDR, вибираються так, що CDR утворюють придатну антиген-зв'язувальну ділянку. Якщо необхідно, амінокислоти у каркасних ділянках варіабельної ділянки антитіла можна заміщувати так, щоб CDR антитіла людини зі зміненою формою могли утворювати придатну антиген-зв'язувальну ділянку (Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53:10.01-6). Амінокислотні залишки у каркасних ділянках, які можна модифікувати, включають частини, які безпосередньо зв'язуються з антигеном за допомогою нековалентних зв'язків (Amit et al., Science (1986) 233: 747-53), частини, що впливають або мають вплив на структуру CDR (Chothia et al., J. Mol. Biol. (1987) 196: 901-17), та частини, що залучаються у взаємодії VH-VL (EP 239400).

30 Коли антитіла цього винаходу - це химерні антитіла або гуманізовані антитіла, тоді С-ділянки цих антитіл переважно походять від антитіл людини. Наприклад, С_{у1}, С_{у2}, С_{у3} та С_{у4} можна використовувати для Н-ланцюга, проте С_к та С_л можна використовувати для L-ланцюга. Крім того, якщо необхідно, амінокислотні мутації можна вводити у С-ділянку антитіла людини для підсилення або ослаблення зв'язування з рецептором Fc_γ або FcRn або для покращення стійкості або продуктивності антитіла. Химерне антитіло цього винаходу переважно включає варіабельну ділянку антитіла, що походить від ссавця, який не є людиною, та константну ділянку, що походить від антитіла людини. Проте, гуманізоване антитіло переважно включає гіперваріабельні ділянки (CDR) антитіла, що походить від ссавця, який не є людиною, та каркасні ділянки та С-ділянки, що походять від антитіла людини. Константні ділянки, що походять від антитіл людини, переважно включають FcRn-зв'язувальну ділянку. Такі антитіла включають, наприклад, IgG (IgG1, IgG2, IgG3 та IgG4). Константні ділянки, що використовуються для гуманізованих антитіл цього винаходу, можуть бути константними ділянками антитіл будь-якого ізотипу. Переважно використовується константна ділянка IgG людини, проте нею не обмежуються. Каркасні ділянки, які походять від антитіла людини та які використовуються для гуманізованих антитіл, особливо не обмежуються, та вони можуть походити від антитіла будь-якого ізотипу.

45 Варіабельні та константні ділянки химерних та гуманізованих антитіл цього винаходу можна модифікувати шляхом делеції, заміщення, вставки та/або додавання та їм подібного, доки демонструється зв'язувальна специфічність оригінальних антитіл.

50 Оскільки імуногенність в організмі людини знижується, то вважають, що химерні та гуманізовані антитіла, які використовують похідні від людини послідовності, є корисними, коли їх вводять людям для терапевтичних цілей тощо.

Антитіла цього винаходу можна отримати за будь-яким способом. Наприклад, антитіла, 55 антиген-зв'язувальна активність яких при рН 5,8 є первинно більшою, ніж антиген-зв'язувальна активність при рН 7,4, або порівняльною з нею, можна штучно модифікувати шляхом заміщення гістидином, описаним вище, або йому подібним способом, так щоб їх антиген-зв'язувальна активність при рН 5,8 стала нижчою, ніж при рН 7,4. Альтернативно, антитіла, антиген-зв'язувальна активність яких при рН 5,8 є нижчою, ніж при рН 7,4, можна вибрати шляхом скринінгу ряду антитіл, отриманих з бібліотеки антитіл або гібридом, як описано нижче.

Коли гістидин заміщує амінокислоти в антитілі, тоді можна використовувати відомі послідовності для амінокислотної послідовності важкого ланцюга або легкого ланцюга антитіла до введення мутацій гістидином або можна використовувати амінокислотні послідовності антитіл, щойно отриманих за способами, відомими фахівцям в цій галузі. Наприклад, антитіла можна отримати з бібліотеки антитіл, або їх можна отримати шляхом клонування генів, що кодують антитіла, з гібридом, що утворюють моноклональні антитіла.

Що стосується бібліотек антитіл, то вже відомо багато бібліотек антитіл, та способи виробництва бібліотек антитіл є також відомими; отже, фахівці у цій галузі можуть належним способом отримати бібліотеки антитіл. Наприклад, стосовно фагових бібліотек антитіл можна звернутися до такої літератури, як Clackson et al, *Nature* 1991, 352: 624-8; Marks et al, *J. Mol. Biol.* 1991, 222: 581-97; Waterhouses et al, *Nucleic Acids Res.* 1993, 21: 2265-6; Griffiths et al, *EMBO J.* 1994, 13: 324.0-60; Vaughan et al, *Nature Biotechnology* 1996, 14: 309-14; та Japanese Patent Kohyo Publication No. (JP-A) H20-504970 (публікація щодо японської національної фази заявки, що не пройшла експертизу, яка відповідає міжнародній публікації, яка не є японською). Крім того, можна використовувати відомі способи, такі як способи, що використовують як бібліотеки еукаріотні клітини (WO 95/15393) та способи рибосомного виявлення. Крім того, також відомі способи отримання антитіл людини шляхом пенінгу із використанням бібліотек антитіл людини. Наприклад, варіабельні ділянки антитіл людини можна експресувати на поверхні фатів як одноланцюгові антитіла (scFv), використовуючи способи фагового виявлення, та можна вибрати фаги, що зв'язуються з антигенами. Генетичний аналіз вибраних фагів може визначити послідовності ДНК, що кодують варіабельні ділянки антитіл людини, які зв'язуються з антигенами. Якщо послідовності ДНК scFv, які зв'язуються з антигенами, виявлено, можна отримати придатні вектори експресії на основі цих послідовностей, щоб отримати антитіла людини. Ці способи є вже добре відомими, та стосовно них можна звернутися до WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438 та WO 95/15388.

Що стосується способів отримання генів, які кодують антитіла, з гібридом, взагалі можна використовувати відомі способи, під час яких використовуються бажані антигени або клітини, що експресують бажані антигени, у якості сенсibilізуючих антигенів, використовуючи їх для здійснення імунізації згідно з традиційними способами імунізації, зливаючи отримані імунні клітини з відомими батьківськими клітинами за допомогою традиційних способів злиття клітин, здійснюючи скринінг клітин (гібридом), що виробляють моноклональні антитіла, за допомогою традиційних способів скринінгу, синтезуючи кДНК варіабельних ділянок (V-ділянок) антитіла з мРНК отриманих гібридом із використанням ревертази та зшиваючи їх з ДНК, що кодують бажані константні ділянки (C-ділянки) антитіла.

Більш специфічно, сенсibilізуючі антигени для отримання вищеописаних генів антитіл, що кодують Н-ланцюги та L-ланцюги, включають як повні антигени з імуногенністю, так і неповні антигени, які включають гаптени та їм подібне без антигенності; проте, вони не обмежуються цими прикладами. Наприклад, можна використовувати суцільні білки та часткові пептиди білків, що представляють інтерес. Крім того, відомо, що речовини, які включають полісахариди, нуклеїнові кислоти, ліпіди та їм подібне, можуть бути антигенами. Отже, антигени антитіл цього винаходу особливо не обмежуються. Антигени можна приготувати згідно зі способами, відомими фахівцям у цій галузі, наприклад, способами на основі бакуловірусу (наприклад, WO 98/46777) та їм подібними. Гібридами можна отримати, наприклад, за способом Milstein та інших (G. Kohler and C. Milstein, *Methods Enzymol.* 1981, 73: 3-46) та йому подібним. Коли імуногенність антигену є низькою, тоді імунізацію можна виконувати після з'єднання антигену з макромолекулою, яка має імуногенність, такою як альбумін. Альтернативно, якщо необхідно, то антигени можна перетворювати у розчинні антигени шляхом з'єднання їх з іншими молекулами. Коли трансмембранні молекули, такі як мембранні антигени (наприклад, рецептори) використовуються як антигени, тоді частини зовнішньоклітинних ділянок мембранних антигенів можна використовувати як фрагмент, або клітини, що експресують трансмембранні молекули на їхній клітинній поверхні, можна використовувати як імуногени.

Клітини, що виробляють антитіла, можна отримати шляхом імунізації тварин, використовуючи при цьому відповідні сенсibilізуючі антигени, як описано вище. Альтернативно, клітини, що виробляють антитіла, можна приготувати шляхом імунізації *in vitro* лімфоцитів, які можуть виробляти антитіла. Різних ссавців можна використовувати для імунізації; такі тварини, що зазвичай використовуються, включають гризунів, зайцеподібних (lagomorphs) та приматів. Такі тварини включають, наприклад, гризунів, таких як миші, щури та хом'ячки; зайцеподібних (lagomorphs), таких як кролі; та приматів, які включають мавп, таких як мавпи *cynomolgus*, макаки-резус, бабуїни та шимпанзе. Крім того, також відомими є трансгенні тварини, які є носіями репертуарів генів антитіл людини, та антитіла людини можна отримати,

використовуючи цих тварин (дивись WO 96/34096; Mendez et al., Nat. Genet. 1997, 15: 146-56). Замість використання таких трансгенних тварин, наприклад, бажані антитіла людини, що мають зв'язувальну активність проти антигенів, можна отримати шляхом сенсibilізації *in vitro* лімфоцитів людини бажаними антигенами або клітинами, що експресують бажані антигени, з наступним злиттям сенсibilізованих лімфоцитів з клітинами мієломи людини, такими як U266 (дивись японську патентну заявку Kokoku Publication No. (JP-B) H01-59878 (пройшла експертизу, ухвалена японська патентна заявка, яку опубліковано для опонентів)). Крім того, бажані антитіла людини можна отримати шляхом імунізації трансгенних тварин, що є носіями повного репертуару генів антитіла людини, бажаними антигенами (дивись WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 96/34096 та WO 96/33735).

Імунізацію тварин можна здійснювати шляхом відповідного розведення та суспендування сенсibilізовуючого антигену у сольовому розчині з фосфатним буфером (PBS), фізіологічному сольовому розчині або їм подібному та шляхом змішування цього з ад'ювантом з метою емульгування, якщо це необхідно. Цю суміш потім вводять тваринам шляхом інтраперитонеальної або підшкірної ін'єкції. Потім сенсibilізовуючий антиген, змішаний з неповними ад'ювантом Фрейнда, переважно вводиться декілька разів кожні 4-21 день. Виробництво антитіла можна підтвердити шляхом вимірювання титру антитіла, яке представляє інтерес, у сироватці тварини, використовуючи при цьому традиційні способи.

Клітини, що виробляють антитіла, які отримано з лімфоцитів або тварин, імунізованих бажаним антигеном, можна злити з клітинами мієломи, щоб генерувати гібридоми, використовуючи при цьому традиційні для злиття агенти (наприклад, поліетиленгліколь) (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986, 59-103). Коли це необхідно, клітини гібридом можна культивувати та вирощувати, а зв'язувальну специфічність антитіла, виробленого з цих гібридом, можна вимірювати, використовуючи відомі аналітичні способи, такі як імунопреципітація, радіоімуноаналіз (RIA) та твердофазний імуноферментний аналіз (ЕЛАЙЗА). Після цього гібридоми, що виробляють антитіла, які представляють інтерес, у яких визначили специфічність, афінність або активність, можна субклонувати за способами, такими як обмежувальне розведення.

Після цього, гени, що кодують вибрані антитіла, можна клонувати з гібридом або клітин, що виробляють антитіла (сенсibilізованих лімфоцитів та їм подібних), використовуючи зонди, які можуть специфічно зв'язуватися з цими антитілами (наприклад, олігонуклеотиди, які є комплементарними до послідовностей, що кодують константні ділянки антитіла). Можна також клонувати гени з мРНК, використовуючи RT-PCR (полімеразно-ланцюгову реакцію зі зворотною транскриптазою). Імуноглобуліни поділяються на п'ять різних класів, IgA, IgD, IgE, IgG та IgM. Ці класи далі поділяються на декілька підкласів (ізотипів) (наприклад, IgG-1, IgG-2, IgG-3 та IgG-4; IgA-1 та IgA-2; та їм подібні). Н-ланцюги та L-ланцюги, що використовуються у цьому винаході для виробництва антитіл, особливо не обмежуються, та вони можуть походити від антитіл, які належать до будь-якого з цих класів або підкласів; проте, особливо переважним є IgG.

У цьому описі винаходу можна модифікувати гени, що кодують Н-ланцюги, та гени, що кодують L-ланцюги, використовуючи при цьому способи генної інженерії. Генетично модифіковані антитіла, такі як химерні антитіла та гуманізовані антитіла, які штучно модифікували з метою зниження гетерологічної імуногенності та їй подібного проти людини, можна відповідним чином виробляти для антитіл, таких як мишачі антитіла, щурячі антитіла, кролячі антитіла, антитіла хом'ячків, антитіла овець та антитіла верблюдів. Химерні антитіла - це антитіла, які включають варіабельні ділянки Н-ланцюга та L-ланцюга антитіла ссавця, який не є людиною, такого як мишаче антитіло, та константні ділянки Н-ланцюга та L-ланцюга антитіла людини. Химерні антитіла можна отримати шляхом зшивання ДНК, що кодує варіабельну ділянку мишачого антитіла, з ДНК, що кодує константну ділянку антитіла людини, шляхом вставки цього у вектор експресії та введення вектора хазяїну для виробництва антитіла. Гуманізоване антитіло, яке також називають антитілом людини зі зміненою формою, можна синтезувати шляхом ПЛР, використовуючи декілька олігонуклеотидів, отриманих так, що вони мають перекриваючі частини на кінцях послідовностей ДНК, побудованих для з'єднання гіперваріабельних ділянок (CDR) антитіла ссавця, що не є людиною, такого як миша. Отриману ДНК можна зшити з ДНК, що кодує константну ділянку антитіла людини. Зшиту ДНК можна вставити у вектор експресії, а вектор можна увести хазяїну з метою отримання антитіла (дивись EP 239400 та WO 96/02576). Каркасні ділянки антитіла людини, зшиті за допомогою CDR, вибираються, коли CDR утворює сприятливу антиген-зв'язувальну ділянку. Якщо необхідно, амінокислоти у каркасній ділянці варіабельної ділянки антитіла можна заміщувати так, щоб CDR антитіла людини зі зміненою формою утворювала відповідну антиген-зв'язувальну ділянку (K. Sato et al., Cancer Res. 1993, 53: 10.01-10.06).

Окрім описаної вище гуманізації, антитіла можна модифікувати з метою покращення їх біологічних властивостей, наприклад, шляхом зв'язування з антигеном. У цьому винаході таких модифікацій можна досягнути за допомогою способів, таких як сайт-спрямований мутагенез (дивись, наприклад, Kunkel (1910.0) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488), ПЛР-мутагенез та касетний мутагенез. Взагалі, мутантні антитіла, біологічні властивості яких були покращені, демонструють гомологію та/або подібність амінокислотних послідовностей у 70 % або більше, більш переважно у 80 % або більше та навіть більш переважно у 90 % або більше (наприклад, 95 % або більше, 97 %, 98 % або 99 %) при порівнянні з амінокислотою послідовністю варіабельної ділянки оригінального антитіла. У цьому описі винаходу гомологія та/або подібність послідовності визначається, як відношення амінокислотних залишків, що є гомологічними (такий самий залишок) або подібними (амінокислотні залишки, які класифікуються до такої ж самої групи на основі загальних властивостей амінокислотних бічних ланцюгів) до залишків оригінального антитіла, після того, як значення гомології послідовності досягло максимального значення внаслідок вирівнювання послідовності та введення проміжків, якщо необхідно. Взагалі, природні амінокислотні залишки поділяються на групи на основі характеристик їхніх бічних ланцюгів, а саме:

- гідрофобні: аланін, ізолейцин, валін, метіонін та лейцин;
- нейтральні гідрофільні: аспарагін, глютамін, цистеїн, треонін та серин;
- кислотні: аспарагінова кислота та глютамінова кислота;
- лужні: аргінін, гістидин та лізин;
- залишки, що впливають на орієнтацію ланцюга: гліцин та пролін; та
- ароматичні: тирозин, триптофан та фенілаланін.

Взагалі, усього шість гіперваріабельних ділянок (CDR), що є присутніми у варіабельних ділянках Н-ланцюга та L-ланцюга, взаємодіють одна з одною, утворюючи антиген-зв'язувальну ділянку антитіла. Також відомо, що сама варіабельна ділянка є здатною розпізнавати та зв'язуватися з антигеном, хоча її афінність є нижчою, ніж афінність усієї зв'язувальної ділянки. Отже, гени антитіла, що кодують Н-ланцюг або L-ланцюг цього винаходу, можуть кодувати фрагменти, кожен з яких включає антиген-зв'язувальну ділянку Н-ланцюга або L-ланцюга, доки поліпептид, який кодується генами, зберігає активність зв'язування з бажаним антигеном.

Як описано вище, варіабельна ділянка важкого ланцюга взагалі складається з трьох CDR та чотирьох каркасних ділянок. У переважному варіанті здійснення цього винаходу амінокислотні залишки, які слід "модифікувати", можна відповідним чином вибрати з амінокислотних залишків, наприклад, у CDR або у каркасній ділянці. Взагалі, модифікації амінокислотних залишків у CDR можуть знижувати антиген-зв'язувальну здатність. Отже, відповідні амінокислотні залишки, які слід "модифікувати" у цьому винаході, переважно вибираються з амінокислотних залишків у каркасних ділянках, проте не обмежуються ними. Можна вибирати амінокислоти у CDR, доки підтверджується, що модифікація не знижує зв'язувальну здатність. Альтернативно, використовуючи доступні бази даних та їм подібне, фахівці у цій галузі можуть отримати відповідні послідовності, які можна використовувати як каркасну ділянку варіабельної ділянки антитіла організму, такого як людина або миша.

Крім того, цим винаходом пропонуються гени, що кодують антитіла цього винаходу. Гени, що кодують антитіла цього винаходу, можуть бути будь-якими генами, та вони можуть бути ДНК, РНК, аналогами нуклеїнових кислот та їм подібним.

Крім того, цим винаходом також пропонуються клітини-хазяїни, які є носіями генів, описаних вище. Клітини-хазяїни особливо не обмежуються та включають, наприклад, *E. coli* та різні тваринні клітини. Клітини-хазяїни можна використовувати, наприклад, як системи виробництва для одержання та експресування антитіл цього винаходу. Системи виробництва *in vitro* та *in vivo* є доступними для систем виробництва поліпептидів. Такі системи виробництва *in vitro* включають, наприклад, системи виробництва, що використовують еукаріотні клітини або прокаріотні клітини.

Еукаріотні клітини, які можна використовувати як клітини-хазяїни, включають, наприклад, тваринні клітини, рослинні клітини та клітини грибів. Тваринні клітини включають: клітини ссавців, наприклад, CHO (J. Exp. Med. (1995) 108: 94.0), COS, HEK293, 3T3, мієлому, BHK (нирку дитинча хом'ячка), HeLa та Vero; клітини амфібій, такі як овоцити *Xenopus laevis* (Valle et al., Nature (1981) 291: 338-340); клітини комах, такі як Sf9, Sf21 та Tn5. Клітини CHO-DG44, CHO-DX11B, COS7, клітини HEK293 та клітини BHK переважно використовуються для експресування антитіл цього винаходу. Серед тваринних клітин клітини CHO є особливо переважними для великомасштабної експресії. Вектори можна вводити у клітини-хазяїни, наприклад, за допомогою способів з використанням фосфату кальцію, способів з використанням DEAE-

декстрану, способів, що використовують DOTAP катіонних ліпосом (Boehringer-Mannheim), способів електропорації та способів ліпофекції.

Стосовно рослинних клітин, наприклад, клітини, що походять від *Nicotiana tabacum* та ряски (*Lemna minor*), є відомими як система для виробництва білків. Калюси можна культивувати з цих клітин для виробництва антитіл цього винаходу. Стосовно клітин грибів, відомі системи експресії білків - це ті системи, що використовують клітини дріжджів, наприклад, клітини роду *Saccharomyces* (такі як *Saccharomyces cerevisiae* та *Saccharomyces pombe*); та клітини ниткоподібних грибів, наприклад, роду *Aspergillus* (такі як *Aspergillus niger*). Ці клітини можна використовувати як хазяїв для виробництва антитіл цього винаходу.

Бактеріальні клітини можна використовувати у прокаріотних системах виробництва. Стосовно бактеріальних клітин, окрім вищеописаних систем виробництва, що використовують *E. coli*, відомими є системи виробництва, що використовують *Bacillus subtilis*. Такі системи можна використовувати для виробництва антитіл цього винаходу.

Способи скринінгу

Цим винаходом пропонуються способи скринінгу антиген-зв'язувальних молекул, антиген-зв'язувальна активність яких при кислотному рН є нижчою, ніж при нейтральному рН. Цим винаходом також пропонуються способи скринінгу антиген-зв'язувальних молекул, які можуть окремо зв'язуватися з багатьма антигенами. Цим винаходом також пропонуються способи скринінгу антиген-зв'язувальних молекул, які є найкращими стосовно утримання у плазмі. Цим винаходом також пропонуються способи скринінгу антиген-зв'язувальної молекули, яка відокремлюється усередині клітини від антигену, який був зв'язаний нею ззовні клітини. Цим винаходом також пропонуються способи скринінгу антиген-зв'язувальної молекули, яка зв'язалася з антигеном та інтерналізувалася у клітину та яка виділяється за межі клітини у вільній від антигену формі. Цим винаходом також пропонуються способи скринінгу антиген-зв'язувальної молекули, яка має підвищену здатність еліминувати антигени у плазмі. Крім того, цим винаходом також пропонуються способи скринінгу антиген-зв'язувальних молекул, які є особливо корисними, коли їх використовують як фармацевтичні композиції. Специфічно, цим винаходом пропонуються способи скринінгу антиген-зв'язувальних молекул, які включають наступні етапи:

(а) визначення антиген-зв'язувальної активності антиген-зв'язувальної молекули при рН від 6,7 до 10,0;

(b) визначення антиген-зв'язувальної активності антиген-зв'язувальної молекули при рН від 4,0 до 6,5 та

(c) вибирання антиген-зв'язувальної молекули, антиген-зв'язувальна активність якої при рН від 6,7 до 10,0 перебільшує антиген-зв'язувальну активність при рН від 4,0 до 6,5.

У способах скринінгу цього винаходу антиген-зв'язувальна активність антиген-зв'язувальної молекули при рН від 6,7 до 10,0 особливо не обмежується, доки вона є антиген-зв'язувальною активністю при рН від 6,7 до 10,0. Проте, наприклад, переважна антиген-зв'язувальна активність - це антиген-зв'язувальна активність при рН від 7,0 до 8,0, а більш переважна антиген-зв'язувальна активність - це антиген-зв'язувальна активність при рН 7,4. Далі, антиген-зв'язувальна активність антиген-зв'язувальної молекули при рН від 4,0 до 6,5 особливо не обмежується, доки вона є антиген-зв'язувальною активністю при рН від 4,0 до 6,5. Проте, наприклад, переважна антиген-зв'язувальна активність - це антиген-зв'язувальна активність при рН від 5,5 до 6,5, а більш переважна антиген-зв'язувальна активність - це антиген-зв'язувальна активність при рН 5,8 або 5,5.

Антиген-зв'язувальну активність антиген-зв'язувальної молекули можна визначити за способами, відомими фахівцям у цій галузі. Фахівці у цій галузі можуть відповідним чином визначити умови, відмінні від рН. Антиген-зв'язувальну активність антиген-зв'язувальної молекули можна визначити як константу дисоціації (KD), позірну константу дисоціації (позірну KD), константу швидкості дисоціації (k_d) позірну константу швидкості дисоціації (позірну k_d) та їм подібними. Ці константи можна визначити за способами, відомими фахівцям у цій галузі, наприклад, використовуючи Biacore (GE healthcare), Scatchard plot, або FACS.

У цьому описі винаходу фраза "етап вибирання антиген-зв'язувальної молекули, антиген-зв'язувальна активність якої при рН від 6,7 до 10,0 перебільшує антиген-зв'язувальну активність при рН від 4,0 до 6,5" має таке ж саме значення, що і фраза "етап вибирання антиген-зв'язувальної молекули, антиген-зв'язувальна активність якої при рН від 4,0 до 6,5 є нижчою, ніж антиген-зв'язувальна активність при рН від 6,7 до 10,0".

Різниця між антиген-зв'язувальною активністю при рН від 6,7 до 10,0 та антиген-зв'язувальною активністю при рН від 4,0 до 6,5 особливо не обмежується, доки антиген-зв'язувальна активність при рН від 6,7 до 10,0 перебільшує антиген-зв'язувальну активність при

pH від 4,0 до 6,5. Проте, антиген-зв'язувальна активність при pH від 6,7 до 10,0 переважно перебільшує удвічі або більше, більш переважно у 10 разів або більше та ще більш переважно у 40 разів або більше антиген-зв'язувальну активність при pH від 4,0 до 6,5.

Крім того, цим винаходом також пропонуються способи скринінгу антиген-зв'язувальних молекул, які включають наступні етапи:

(а) зв'язування антиген-зв'язувальної молекули з антигеном при умові pH від 6,7 до 10,0;

(b) поміщення антиген-зв'язувальної молекули, що зв'язалася з антигеном за (а), в умови pH від 4,0 до 6,5; та

(c) отримання антиген-зв'язувальної молекули, яка відокремилася при умові pH від 4,0 до 6,5.

Крім того, цим винаходом також пропонуються способи скринінгу антиген-зв'язувальних молекул, які включають наступні етапи:

(а) вибирання антиген-зв'язувальної молекули, що не зв'язується з антигеном при умові pH від 4,0 до 6,5;

(b) зв'язування антиген-зв'язувальної молекули, вибраної у (а), з антигеном при умові pH від 6,7 до 10,0 та

(c) отримання антиген-зв'язувальної молекули, яка зв'язалася з антигеном при умові pH від 6,7 до 10,0.

Крім того, цим винаходом також пропонуються способи скринінгу антиген-зв'язувальних молекул, які включають наступні етапи:

(а) зв'язування антиген-зв'язувальної молекули з антигеном при умові pH від 6,7 до 10,0;

(b) поміщення антиген-зв'язувальної молекули, що зв'язалася з антигеном за (а), в умови pH від 4,0 до 6,5;

(c) отримання антиген-зв'язувальної молекули, яка відокремилася при умові pH від 4,0 до 6,5;

(d) ампліфікування гена, що кодує антиген-зв'язувальну молекулу, що відокремилася; та

(e) отримання елюйованої антиген-зв'язувальної молекули.

Етапи від (а) до (d) можна повторювати двічі або більше разів. Отже, цим винаходом пропонуються способи, описані вище, які далі включають етап повторювання етапів від (а) до (d) двічі або більше разів. Кількість повторів етапів від (а) до (d) особливо не обмежується; проте, ця кількість зазвичай становить десять разів або менше.

Крім того, цим винаходом також пропонуються способи скринінгу антиген-зв'язувальних молекул, які включають наступні етапи:

(а) вибирання антиген-зв'язувальної молекули, що не зв'язується з антигеном при умові pH від 4,0 до 6,5;

(b) зв'язування антиген-зв'язувальної молекули, вибраної у (а), з антигеном при умові pH від 6,7 до 10,0;

(c) отримання антиген-зв'язувальної молекули, яка зв'язалася з антигеном при умові pH від 6,7 до 10,0;

(d) ампліфікування гена, що кодує антиген-зв'язувальну молекулу, що відокремилася; та

(e) збирання елюйованої антиген-зв'язувальної молекули.

Етапи від (а) до (d) можна повторювати двічі або більше разів. Отже, цим винаходом пропонуються способи, описані вище, які далі включають етап повторювання етапів від (а) до (d) двічі або більше разів. Кількість повторів етапів від (а) до (d) особливо не обмежується; проте, ця кількість зазвичай становить десять разів або менше.

Коли бібліотеку фагів або їй подібне використовують у способах скринінгу цього винаходу, тоді етап ампліфікування гена, що кодує антиген-зв'язувальну молекулу, може також бути етапом ампліфікування фагів.

У способах цього винаходу зв'язування антиген-зв'язувальної молекули та антигену можна здійснювати за умови будь-якого стану без особливого обмеження. Наприклад, зв'язування антиген-зв'язувальної молекули та антигену можна здійснювати шляхом контактування антигену з іммобілізованою антиген-зв'язувальною молекулою або шляхом контактування антиген-зв'язувальної молекули з іммобілізованим антигеном. Альтернативно, зв'язування антиген-зв'язувальної молекули та антигену можна здійснювати шляхом контактування антигену та антиген-зв'язувальної молекули у розчині.

Крім того, цим винаходом пропонуються способи скринінгу антиген-зв'язувальних молекул, зв'язувальна активність яких при першому pH є більшою, ніж при другому pH, які включають наступні етапи:

(а) зв'язування антиген-зв'язувальної молекули з колонкою з іммобілізованим антигеном при умові першого pH;

(b) елюювання антиген-зв'язувальної молекули, яка зв'язалася з колонкою при першому рН, з колонки при умові другого рН та

(c) отримання елюйованої антиген-зв'язувальної молекули.

Крім того, цим винаходом також пропонуються способи скринінгу антиген-зв'язувальних молекул, зв'язувальна активність яких при першому рН є меншою, ніж при другому рН, які включають наступні етапи:

(a) пропускання антиген-зв'язувальної молекули крізь колонку з іммобілізованим антигеном при умові першого рН;

(b) збирання антиген-зв'язувальної молекули, яка елюювалася без зв'язування з колонкою на етапі (a);

(c) зв'язування антиген-зв'язувальної молекули, зібраної у (b), з колонкою при умові другого рН та

(d) отримання антиген-зв'язувальної молекули, що зв'язалася з колонкою на етапі (c).

Крім того, цим винаходом також пропонуються способи скринінгу антиген-зв'язувальних молекул, зв'язувальна активність яких при першому рН є більшою, ніж при другому рН, які включають наступні етапи:

(a) зв'язування бібліотеки антиген-зв'язувальних молекул з колонкою з іммобілізованим антигеном при умові першого рН;

(b) елюювання антиген-зв'язувальної молекули з колонки при умові другого рН;

(c) ампліфікування гена, що кодує елюйовану антиген-зв'язувальну молекулу; та

(d) отримання елюйованої антиген-зв'язувальної молекули.

Етапи від (a) до (c) можна повторювати двічі або більше разів. Отже, цим винаходом пропонуються способи, описані вище, які далі включають етап повторювання етапів від (a) до (c) двічі або більше разів. Кількість повторів етапів від (a) до (c) особливо не обмежується; проте, ця кількість зазвичай становить десять разів або менше.

У цьому винаході перше та друге значення рН може бути будь-яким значенням рН, доки вони не є ідентичними. У переважній комбінації першого та другого значення рН, наприклад, перше значення рН становить від 6,7 до 10,0, а друге значення рН становить від 4,0 до 6,5; у більш переважній комбінації перше значення рН становить від 7,0 до 8,0, а друге значення рН становить від 5,5 до 6,6; а у ще більш переважній комбінації перше значення рН становить 7,4, а друге значення рН становить 5,8 або 5,5.

В іншій переважній комбінації першого та другого значення рН, наприклад, перше значення рН становить від 4,0 до 6,5, а друге значення рН становить від 6,7 до 10,0; у більш переважній комбінації перше значення рН становить від 5,5 до 6,5, а друге значення рН становить від 7,0 до 8,0; а у ще більш переважній комбінації перше значення рН становить 5,8 або 5,5, а друге значення рН становить 7,4.

Антиген-зв'язувальні молекули, що піддаються скринінгу за способами цього винаходу, можуть бути будь-якими антиген-зв'язувальними молекулами. Наприклад, можна використовувати вищеописані антиген-зв'язувальні молекули при скринінгу за цим винаходом. Наприклад, можна піддавати скринінгу антиген-зв'язувальні молекули, які включають природні послідовності, або антиген-зв'язувальні молекули, які включають амінокислотні послідовності із заміщеннями. Переважні антиген-зв'язувальні молекули, які піддаються скринінгу у цьому винаході, включають, наприклад, антиген-зв'язувальні молекули, у яких принаймні одна амінокислота заміщена гістидином або принаймні один гістидин вставлений. Ділянка здійснення заміщення або вставки гістидину особливо не обмежується, та їх можна ввести на будь-якій ділянці. Крім того, заміщення або вставку гістидину можна здійснити на одній ділянці, або його можна здійснити на двох або більше ділянках. Крім того, переважні антиген-зв'язувальні молекули, які піддаються скринінгу у цьому винаході, включають, наприклад, антиген-зв'язувальні молекули, які включають модифіковані константні ділянки антитіла.

Антиген-зв'язувальні молекули, які піддаються скринінгу за способами цього винаходу, можуть являти собою деяку кількість різних антиген-зв'язувальних молекул, яким зробили заміщення або вставки гістидину на різних ділянках, наприклад, шляхом гістидинового сканування.

Отже, способи скринінгу цього винаходу можуть далі включати етап заміщення принаймні однієї амінокислоти в антиген-зв'язувальній молекулі гістидином або етап вставки принаймні одного гістидину в антиген-зв'язувальну молекулу.

У способах скринінгу цього винаходу замість гістидину можна використовувати неприродні амінокислоти. Отже, цей винахід можна також розуміти як такий, де замість вищезгаданого гістидину використовуються неприродні амінокислоти.

Крім того, способи скринінгу цього винаходу можуть далі включати етап модифікації амінокислот константних ділянок антитіл.

Антиген-зв'язувальні речовини, які піддаються скринінгу за способами скринінгу цього винаходу, можна одержати за будь-яким способом. Наприклад, можна використовувати вже існуючі антитіла, вже існуючі бібліотеки (бібліотеки фагів та їм подібне), антитіла та бібліотеки, які одержані з гібридом, отриманих шляхом імунізації тварин, або з В-клітин імунізованих тварин, антитіла та бібліотеки (бібліотеки з високим вмістом гістидину або неприродної амінокислоти, бібліотеки, у які ввели гістидин або неприродну амінокислоту на специфічних ділянках тощо), отримані шляхом здійснення мутацій гістидином або мутацій неприродною амінокислотою у вищезгаданих антитілах та бібліотеках, і так далі.

Антиген-зв'язувальні молекули, які зв'язуються з антигеном багато разів, які, внаслідок цього, мають перевагу стосовно утримання у плазмі, можна отримати за способами скринінгу цього винаходу. Отже, способи скринінгу цього винаходу можна використовувати як способи скринінгу для отримання антиген-зв'язувальних молекул, які мають перевагу стосовно утримання у плазмі.

Крім того, антиген-зв'язувальні молекули, що можуть зв'язуватися з антигеном 2 або більше разів, коли їх вводять тваринам, таким як люди, миші або мавпи, можна отримати за способами скринінгу цього винаходу. Отже, способи скринінгу цього винаходу можна використовувати як способи скринінгу антиген-зв'язувальних молекул, здатних зв'язуватися з антигеном два рази або більше.

Крім того, антиген-зв'язувальні молекули, що є здатними зв'язуватися з більшою кількістю антигенів порівняно з кількістю їхніх антиген-зв'язувальних ділянок, коли їх вводять тваринам, таким як люди, миші або мавпи, можна отримати за способами скринінгу цього винаходу. Отже, способи скринінгу цього винаходу можна використовувати як способи скринінгу для отримання антиген-зв'язувальних молекул, які є здатними зв'язуватися з більшою кількістю антигенів порівняно з кількістю їхніх антиген-зв'язувальних ділянок. Наприклад, коли антитіло - це нейтралізуюче антитіло, тоді способи скринінгу цього винаходу можна використовувати як способи скринінгу для отримання антиген-зв'язувальних молекул, які можуть нейтралізувати більшу кількість антигенів, ніж кількість антиген-зв'язувальних ділянок антиген-зв'язувальних молекул.

Крім того, антиген-зв'язувальні молекули, що є здатними відокремлюватися усередині клітини від антигену, що зв'язався з цією молекулою ззовні клітини, коли їх вводять тваринам, таким як люди, миші або мавпи, можна отримати за способами скринінгу цього винаходу. Отже, способи скринінгу цього винаходу можна використовувати як способи скринінгу для отримання антиген-зв'язувальних молекул, які є здатними відокремлюватися усередині клітини від антигену, що зв'язався з цими молекулами ззовні клітини.

Крім того, антиген-зв'язувальні молекули, які є зв'язаними з антигеном та які інтерналізувалися у клітину та виділилися за межі клітини у вільній від антигену формі, коли їх вводять тваринам, таким як люди, миші або мавпи, можна отримати за способами скринінгу цього винаходу. Отже, способи скринінгу цього винаходу можна використовувати як способи скринінгу для отримання антиген-зв'язувальних молекул, які зв'язалися з антигеном, та інтерналізувалися у клітину, та виділилися за межі клітини у вільній від антигену формі.

Крім того, антиген-зв'язувальні молекули, які можуть швидко елімінувати антигени у плазмі, коли їх вводять тваринам, таким як люди, миші або мавпи, можна отримати за способами скринінгу цього винаходу. Отже, способи скринінгу цього винаходу можна використовувати як способи скринінгу для отримання антиген-зв'язувальних молекул з підвищеною (високою) здатністю елімінувати антигени у плазмі.

Крім того, очікують, що такі антиген-зв'язувальні молекули будуть особливо переважними у якості фармацевтичних препаратів, тому що дозу та частоту введення пацієнтам можна знизити, внаслідок чого зменшується загальна доза. Отже, способи скринінгу цього винаходу можна використовувати як способи скринінгу антиген-зв'язувальних молекул для застосування як фармацевтичних композицій.

Крім того, цим винаходом пропонуються бібліотеки, у яких вміст гістидину збільшений порівняно з оригінальними бібліотеками. Бібліотеки, що містять антиген-зв'язувальні молекули з підвищеним вмістом гістидину, можна використовувати у способах скринінгу, описаних вище, та у способах одержання, описаних далі.

Бібліотеки з підвищеним вмістом гістидину можна отримати за способами, відомими фахівцям у цій галузі. Вони включають наступний спосіб. 20 типів кодонів-триплетів (тринуклеотидів), що кодують 20 типів амінокислот, можна увести за рівною частотою, коли синтезують нуклеїнові кислоти для отримання бібліотеки за способом тринуклеотидів (J Mol

Biol. 2008 Feb 29; 376(4): 1182-200). Внаслідок цього можна зробити так, щоб позиція, мутована для бібліотеки, містила 20 типів амінокислот з однаковою ймовірністю. Частоту гістидину у позиції, мутованої для бібліотеки, можна підвищити, збільшуючи пропорцію тринуклеотиду, що кодує гістидин, порівняно з рештою амінокислот серед 20 типів під час синтезу.

5 Способи одержання антиген-зв'язувальних молекул

Цим винаходом пропонуються способи одержання антиген-зв'язувальних молекул, антиген-зв'язувальна активність яких при ендосомному рН є нижчою, ніж при рН плазми. Цим винаходом також пропонуються способи одержання антиген-зв'язувальних молекул, які є найкращими щодо утримання у плазмі. Цим винаходом також пропонуються способи одержання антиген-зв'язувальних молекул, які є особливо корисними, коли їх використовують як фармацевтичні композиції.

Специфічно, цим винаходом пропонуються способи одержання антиген-зв'язувальних молекул, які включають наступні етапи:

(a) визначення антиген-зв'язувальної активності антиген-зв'язувальної молекули при рН від 6,7 до 10,0;

(b) визначення антиген-зв'язувальної активності антиген-зв'язувальної молекули при рН від 4,0 до 6,5;

(c) вибирання антиген-зв'язувальної молекули, антиген-зв'язувальна активність якої при рН від 6,7 до 10,0 є більшою, ніж антиген-зв'язувальна активність при рН від 4,0 до 6,5;

(d) отримання гена, що кодує антиген-зв'язувальну молекулу, вибрану у (c); та

(e) одержання антиген-зв'язувальної молекули із використанням гена, отриманого у (d).

Цим винаходом також пропонуються способи одержання антиген-зв'язувальних молекул, які включають наступні етапи:

(a) зв'язування антиген-зв'язувальної молекули з антигеном при рН від 6,7 до 10,0;

(b) надання можливості антиген-зв'язувальній молекулі, зв'язаній з антигеном з (a), витримуватися при умові рН від 4,0 до 6,5;

(c) збирання антиген-зв'язувальної молекули, яка відокремилася при умові рН від 4,0 до 6,5;

(d) отримання гена, що кодує антиген-зв'язувальну молекулу, отриману у (c); та

(e) одержання антиген-зв'язувальної молекули із використанням гена, отриманого у (d).

Крім того, цим винаходом пропонуються способи одержання антиген-зв'язувальних молекул, які включають наступні етапи:

(a) вибирання антиген-зв'язувальної молекули, що не зв'язується з антигеном при умові рН від 4,0 до 6,5;

(b) зв'язування антигену при умові рН від 6,7 до 10,0 з антиген-зв'язувальною молекулою, вибраною в (a);

(c) збирання антиген-зв'язувальної молекули, що зв'язалася з антигеном при умові рН від 6,7 до 10,0;

(d) отримання гена, що кодує антиген-зв'язувальну молекулу, зібрану у (c); та

(e) одержання антиген-зв'язувальної молекули із використанням гена, отриманого у (d).

Крім того, цим винаходом пропонуються способи одержання антиген-зв'язувальних молекул, які включають наступні етапи:

(a) зв'язування антиген-зв'язувальної молекули з антигеном при умові рН від 6,7 до 10,0;

(b) надання можливості антиген-зв'язувальній молекулі, зв'язаній з антигеном в (a), витримуватися при умові рН від 4,0 до 6,5;

(c) збирання антиген-зв'язувальної молекули, яка відокремилася при умові рН від 4,0 до 6,5;

(d) ампліфікування гена, що кодує відокремлену антиген-зв'язувальну молекулу;

(e) збирання елюйованої антиген-зв'язувальної молекули;

(f) отримання гена, що кодує антиген-зв'язувальну молекулу, зібрану у (e); та

(g) одержання антиген-зв'язувальної молекули, використовуючи ген, отриманий у (f).

Етапи від (a) до (d) можна повторювати двічі або більше разів. Отже, цим винаходом пропонуються способи, описані вище, які далі включають етап повторювання етапів від (a) до (d) двічі або більше разів. Кількість повторів етапів від (a) до (d) особливо не обмежується; проте, ця кількість зазвичай становить десять разів або менше.

Крім того, цим винаходом пропонуються способи одержання антиген-зв'язувальних молекул, які включають наступні етапи:

(a) вибирання антиген-зв'язувальної молекули, що не зв'язується з антигеном при умові рН від 4,0 до 6,5;

(b) зв'язування антигену за умови рН від 6,7 до 10,0 з антиген-зв'язувальною молекулою, вибраною в (a);

(с) збирання антиген-зв'язувальної молекули, що зв'язалася з антигеном при умові рН від 6,7 до 10,0;

(d) ампліфікування гена, що кодує відокремлену антиген-зв'язувальну молекулу;

(е) збирання елюйованої антиген-зв'язувальної молекули;

5 (f) отримання гена, що кодує антиген-зв'язувальну молекулу, зібрану у (е); та

(g) одержання антиген-зв'язувальної молекули із використанням гена, отриманого у (f).

Етапи від (а) до (d) можна повторювати двічі або більше разів. Отже, цим винаходом пропонуються способи, описані вище, які далі включають етап повторювання етапів від (а) до (d) двічі або більше разів. Кількість повторів етапів від (а) до (d) особливо не обмежується; проте, ця кількість зазвичай становить десять разів або менше.

10 Крім того, цим винаходом пропонуються способи одержання антиген-зв'язувальних молекул, зв'язувальна активність яких при першому рН є більшою, ніж при другому рН, які включають наступні етапи:

15 (а) зв'язування антиген-зв'язувальної молекули з колонкою з іммобілізованим антигеном при умові першого рН;

(b) елюювання антиген-зв'язувальної молекули, яка зв'язалася з колонкою при першому рН, з колонки при умові другого рН;

(с) збирання елюйованої антиген-зв'язувальної молекули;

(d) отримання гена, що кодує антиген-зв'язувальну молекулу, зібрану у (с); та

20 (е) одержання антиген-зв'язувальної молекули із використанням гена, отриманого у (d).

Крім того, цим винаходом пропонуються способи одержання антиген-зв'язувальних молекул, зв'язувальна активність яких при першому рН є більшою, ніж при другому рН, які включають наступні етапи:

25 (а) зв'язування бібліотеки антиген-зв'язувальних молекул з колонкою з іммобілізованим антигеном при умові першого рН;

(b) елюювання антиген-зв'язувальної молекули з колонки при умові другого рН;

(с) ампліфікування гена, що кодує елюйовану антиген-зв'язувальну молекулу;

(d) збирання елюйованої антиген-зв'язувальної молекули;

(е) отримання гена, що кодує антиген-зв'язувальну молекулу, зібрану у (d); та

30 (f) одержання антиген-зв'язувальної молекули із використанням гена, отриманого у (е).

Етапи від (а) до (с) можна повторювати двічі або більше разів. Отже, цим винаходом пропонуються способи, описані вище, які далі включають етап повторювання етапів від (а) до (с) двічі або більше разів. Кількість повторів етапів від (а) до (с) особливо не обмежується; проте, ця кількість зазвичай становить десять разів або менше.

35 Коли бібліотеку фагів або їй подібне використовують у способах одержання цього винаходу, тоді етап ампліфікування гена, що кодує антиген-зв'язувальну молекулу, може також бути етапом ампліфікування фагів.

Антиген-зв'язувальні речовини, що використовуються у способах одержання цього винаходу, можна отримати за будь-яким способом. Наприклад, можна використовувати вже існуючі антитіла, вже існуючі бібліотеки (бібліотеки фагів та їм подібне), антитіла та бібліотеки, які приготували з гібридом, отриманих внаслідок імунізації тварин, або з В-клітин імунізованих тварин, антитіла та бібліотеки (бібліотеки з високим вмістом гістидину або неприродної амінокислоти, бібліотеки, у які ввели гістидин або неприродну амінокислоту на специфічних ділянках тощо), отримані внаслідок здійснення мутацій гістидином або мутацій неприродною амінокислотою у вищезгаданих антитілах та бібліотеках, і так далі.

45 У вищеповисаних способах одержання цього винаходу антиген-зв'язувальна активність антиген-зв'язувальної молекули при рН від 6,7 до 10,0 особливо не обмежується, доки вона є антиген-зв'язувальною активністю при рН від 6,7 до 10,0. Переважна антиген-зв'язувальна активність - це антиген-зв'язувальна активність при рН від 7,0 до 8,0, а більш переважна активність - це антиген-зв'язувальна активність при рН 7,4. Альтернативно, антиген-зв'язувальна активність антиген-зв'язувальної молекули при рН від 4,0 до 6,5 особливо не обмежується, доки вона є антиген-зв'язувальною активністю при рН від 4,0 до 6,5. Переважна антиген-зв'язувальна активність - це антиген-зв'язувальна активність при рН від 5,5 до 6,5, а більш переважна антиген-зв'язувальна активність - це антиген-зв'язувальна активність при рН 5,8 або 5,5.

55 Антиген-зв'язувальну активність антиген-зв'язувальної молекули можна визначити за способами, відомими фахівцям у цій галузі. Фахівці у цій галузі можуть відповідним чином визначити умови, відмінні від рН.

60 "Етап вибирання антиген-зв'язувальної молекули, антиген-зв'язувальна активність якої при рН від 6,7 до 10,0 перебільшує антиген-зв'язувальну активність при рН від 4,0 до 6,5", є

синонімічним до "етапу вибирання антиген-зв'язувальної молекули, антиген-зв'язувальна активність якої при рН від 4,0 до 6,5 є нижчою, ніж антиген-зв'язувальна активність при рН від 6,7 до 10,0".

Різниця між антиген-зв'язувальною активністю при рН від 6,7 до 10,0 та антиген-зв'язувальною активністю при рН від 4,0 до 6,5 особливо не обмежується, доки антиген-зв'язувальна активність при рН від 6,7 до 10,0 перебільшує антиген-зв'язувальну активність при рН від 4,0 до 6,5. Антиген-зв'язувальна активність при рН від 6,7 до 10,0 переважно перебільшує удвічі або більше, більш переважно у десять разів або більше, а іще більш переважно у 40 разів або більше антиген-зв'язувальну активність при рН від 4,0 до 6,5.

У способах одержання цього винаходу зв'язування антиген-зв'язувальної молекули та антигену можна здійснювати за будь-якою умовою, та ця умова особливо не обмежується. Наприклад, зв'язування антиген-зв'язувальної молекули та антигену можна здійснювати шляхом контактування антигену з іммобілізованою антиген-зв'язувальною молекулою або шляхом контактування антиген-зв'язувальної молекули з іммобілізованим антигеном. Альтернативно, зв'язування антиген-зв'язувальної молекули та антигену можна здійснювати шляхом контактування антигену та антиген-зв'язувальної молекули у розчині.

У способах одержання, описаних вище, перше та друге значення рН може бути будь-яким значенням рН, доки вони не є ідентичними. У переважній комбінації першого та другого значення рН, наприклад, перше значення рН становить від 6,7 до 10,0, а друге значення рН становить від 4,0 до 6,5; у більш переважній комбінації перше значення рН становить від 7,0 до 8,0, а друге значення рН становить від 5,5 до 6,5; а у іще більш переважній комбінації перше значення рН становить 7,4, та друге значення рН становить 5,8 або 5,5.

В іншій переважній комбінації першого та другого значень рН, наприклад, перше значення рН становить від 4,0 до 6,5, а друге значення рН становить від 6,7 до 10,0; у більш переважній комбінації перше значення рН становить від 5,5 до 6,5, а друге значення рН становить від 7,0 до 8,0; а у іще більш переважній комбінації перше значення рН становить 5,8 або 5,5, а друге значення рН становить 7,4.

Антиген-зв'язувальні молекули, що одержуються за способами одержання, описаними вище, можуть бути будь-якими антиген-зв'язувальними молекулами. Переважні антиген-зв'язувальні молекули включають, наприклад, антиген-зв'язувальні молекули, у яких принаймні одна амінокислота заміщена гістидином або принаймні один гістидин вставлений. Ділянка, де здійснюється така мутація гістидином, особливо не обмежується, та її можна здійснювати на будь-якій ділянці. Крім того, мутацію гістидином можна здійснювати на одній ділянці або її можна здійснювати на двох або більше ділянках.

Отже, способи одержання цього винаходу можуть далі включати етап заміщення принаймні однієї амінокислоти в антиген-зв'язувальній молекулі гістидином або вставки принаймні одного гістидину в антиген-зв'язувальну молекулу.

У способах одержання цього винаходу замість гістидину можна використовувати неприродні амінокислоти. Отже, цей винахід можна також розуміти як такий, де замість вищезгаданого гістидину використовуються неприродні амінокислоти.

Крім того, в іншому варіанті здійснення цього винаходу, антиген-зв'язувальні молекули, що одержуються за способами одержання, описаними вище, включають, наприклад, антиген-зв'язувальні молекули, які включають модифіковані константні ділянки антитіл. Отже, способи одержання цього винаходу можуть далі включати етап модифікації амінокислот константних ділянок антитіла.

Антиген-зв'язувальні молекули, які одержуються за способами одержання цього винаходу, мають перевагу стосовно утримання у плазмі. Отже, способи одержання цього винаходу можна використовувати як способи одержання антиген-зв'язувальних молекул, які мають перевагу стосовно утримання у плазмі.

Крім того, очікують, що антиген-зв'язувальні молекули, отримані за цими способами одержання, є здатними зв'язуватися з антигеном два або більше разів, коли їх вводять тваринам, таким як люди, миші або мавпи. Отже, способи одержання цього винаходу можна використовувати як способи одержання антиген-зв'язувальних молекул, здатних зв'язуватися з антигеном два рази або більше.

Крім того, очікується, що антиген-зв'язувальні молекули, які отримані за способами одержання цього винаходу, будуть здатними зв'язуватися з більшою кількістю антигенів порівняно з кількістю їхніх антиген-зв'язувальних ділянок, коли їх вводять тваринам, таким як люди, миші або мавпи. Отже способи одержання цього винаходу можна використовувати як способи одержання антиген-зв'язувальних молекул, які є здатними зв'язуватися з більшою кількістю антигенів порівняно з кількістю їхніх антиген-зв'язувальних ділянок.

Крім того, очікується, що антиген-зв'язувальні молекули, отримані за способами одержання цього винаходу, будуть здатними відокремлюватися усередині клітини від антигену, що зв'язався з цими молекулами ззовні клітини, коли їх вводять тваринам, таким як люди, миші або мавпи. Отже, способи одержання цього винаходу можна використовувати як способи одержання антиген-зв'язувальних молекул, які є здатними відокремлюватися усередині клітини від антигену, що зв'язався з цими молекулами ззовні клітини.

Крім того, очікується, що антиген-зв'язувальні молекули, отримані за способами одержання цього винаходу, будуть здатними зв'язуватися з антигеном, інтерналізуватися у клітину, а також виділятися за межі клітини у вільній від антигену формі, коли їх вводять тваринам, таким як люди, миші або мавпи. Отже, способи одержання цього винаходу можна використовувати як способи одержання антиген-зв'язувальних молекул, які здатні зв'язуватися з антигеном, та інтерналізуватися у клітину, та виділятися за межі клітини у вільній від антигену формі.

Крім того, очікується, що антиген-зв'язувальні молекули, отримані за способами одержання цього винаходу, будуть здатними швидко елімінувати антигени з плазми, коли їх вводять тваринам, таким як люди, миші або мавпи. Отже, способи одержання цього винаходу можна використовувати як способи одержання антиген-зв'язувальних молекул з підвищеною (високою) здатністю елімінувати антигени у плазмі.

Крім того, такі антиген-зв'язувальні молекули можуть знижувати кількість доз у пацієнтів, та очікують, що вони будуть особливо переважними у якості фармацевтичних препаратів. Отже, способи одержання цього винаходу можна використовувати як способи одержання антиген-зв'язувальних молекул для застосування як фармацевтичних композицій.

Відповідні вектори зазвичай несуть гени (вони вставлені у вектори), отримані за допомогою способів одержання цього винаходу, а потім вони вводяться у клітини-хазяїни. Вектори особливо не обмежуються, доки вони стабільно утримують вставлені нуклеїнові кислоти. Наприклад, коли у якості хазяїна використовується *Escherichia coli* (*E. coli*), тоді переважні вектори клонування включають вектор pBluescript (Stratagene); проте, можна використовувати різні комерційно доступні вектори. Коли використовуються вектори для одержання антиген-зв'язувальних молекул цього винаходу, тоді вектори експресії є особливо корисними. Вектори експресії особливо не обмежуються, доки ці вектори експресують антиген-зв'язувальні молекули *in vitro*, в *E. coli*, у культуральних клітинах або у організмі. Наприклад, вектор pBEST (Promega) є переважним для експресії *in vitro*; вектор pET (Invitrogen) є переважним для *E. coli*; вектор pME18S-FL3 (GenBank Accession No. AB009864) є переважним для культивованих клітин; а вектор pME18S (Mol Cell Biol. 8:466-472 (1988)) є переважним для організмів. ДНК цього винаходу можна вставити у вектори за традиційними способами, наприклад, шляхом зшивання із використанням сайтів рестрикції ферментів (Current protocols in Molecular Biology, edit. Ausubel et al., (1987) Publish. John Wiley & Sons, Section 11.4-11.11).

Вищевказані клітини-хазяїни особливо не обмежуються, залежно від мети можна використовувати різні клітини-хазяїни. Приклади клітин для експресії антиген-зв'язувальних молекул включають бактеріальні клітини (такі як *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *E. coli*, *Streptomyces* та *Bacillus subtilis*), еукаріотні клітини (такі як дріжджі та *Aspergillus*), клітини комах (такі як *Drosophila* S2 та *Spodoptera* SF9), клітини тварин (такі як CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK293 та клітини меланоми Bowes) та рослинні клітини. Вектори можна вводити у клітину-хазяїна за відомими способами, наприклад, способами преципітації з фосфатом кальцію, способами електропорації (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons, Section 9.1-9.9), способами ліпофекції та способами мікроін'єкцій.

Клітини-хазяїни можна культивувати за відомими способами. Наприклад, коли у якості хазяїна використовуються клітини тварин, тоді у якості культурального середовища можна використовувати DMEM, MEM, RPMI 1640 або IMDM. Їх можна використовувати з сироватковими добавками, такими як фетальна бичача сироватка (FBS) або фетальна теляча сироватка (FCS). Клітини можна культивувати у культурах без сироватки. Переважне pH становить приблизно 6-8 протягом періоду культивування. Інкубацію здійснюють зазвичай при температурі від 30 °C до 40 °C протягом приблизно 15-200 годин. Середовище міняють, піддають аерації або збовтують, якщо необхідно.

Відповідні сигнали секреції можна ввести до поліпептидів, що представляють інтерес, так щоб антиген-зв'язувальні молекули, що експресуються у клітині-хазяїні, виділялися у просвіт ендоплазматичного ретикулуму, у периплазматичний простір або у середовище ззовні клітини. Ці сигнали можуть бути ендегенними до антиген-зв'язувальних молекул, що представляють інтерес, або можуть бути гетерологічними сигналами.

З іншого боку, наприклад, системи одержання, які використовують тварини або рослини, можна використовувати як системи для одержання поліпептидів *in vivo*. Полінуклеотид, що представляє інтерес, вводиться тварині або рослині, та цей поліпептид виробляється у тілі тварини або рослини, а потім збирається. "Хазяїни" цього винаходу включають таких тварин та такі рослини.

Система одержання, що використовує тварин, включає системи одержання, що використовують ссавців або комах. Можна використовувати ссавців, таких як козли, свині, вівці, миші та велика рогата худоба (Vicki Glaser SPECTRUM Biotechnology Applications (1993)). Ссавці можуть бути трансгенними тваринами.

Наприклад, полінуклеотид, що кодує антиген-зв'язувальну молекулу цього винаходу, отримують як ген, злитий з геном, що кодує поліпептид, який специфічно виробляється у молоці, такий як козячий β -казеїн. Після цього у ембріони козла шляхом ін'єкції вводять полінуклеотидні фрагменти, що містять злитий ген, а потім їх трансплантують козам. Бажані антиген-зв'язувальні молекули можна отримати з молока, що виробляється трансгенними козами, народженими від кіз, які отримали ці ембріони, або від їхнього потомства. Гормони можна ввести відповідним чином, щоб збільшити об'єм молока, яке містить антиген-зв'язувальну молекулу, що виробляється трансгенними козами (Ebert et al., Bio/Technology (1994) 12: 699-702).

Кохам, таких як тутовий шовкопряд, можна використовувати для одержання антиген-зв'язувальних молекул цього винаходу. Коли використовують тутових шовкопрядів, тоді можна використовувати бакуловіруси, які є носіями полінуклеотиду, що кодує антиген-зв'язувальну молекулу, що представляє інтерес, для інфікування тутових шовкопрядів, а антиген-зв'язувальну молекулу, що представляє інтерес, можна отримати з рідин їхніх організмів.

Крім того, коли рослини використовуються для одержання антиген-зв'язувальних молекул цього винаходу, тоді, наприклад, можна використовувати тютюн. Коли використовується тютюн, тоді полінуклеотид, що кодує антиген-зв'язувальну молекулу, що представляє інтерес, вставляється у рослинний вектор експресії, наприклад, pMON 530, а потім цей вектор вводять у бактерії, такі як *Agrobacterium tumefaciens*. Цим бактеріям потім дозволяють інфікувати тютюн, такий як *Nicotiana tabacum*, а бажані антиген-зв'язувальні молекули можна збирати з їхнього листя (Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24:131-138). Альтернативно, можна інфікувати ряску (*Lemna minor*) такими ж самими бактеріями. Після клонування бажані антиген-зв'язувальні молекули можна отримати з клітин ряски (Cox KM et al., Nat. Biotechnol. 2006 Dec; 24(12):1591-1597).

Отримані таким чином антиген-зв'язувальні молекули можна виділити зсередини або ззовні (такого як середовище та молоко) клітин-хазяїнів та очистити, щоб отримати по суті чисті та гомогенні антиген-зв'язувальні молекули. Способи виділення та очищення антиген-зв'язувальних молекул особливо не обмежуються, та можна використовувати способи виділення та очищення, які зазвичай використовуються для очищення поліпептидів. Антиген-зв'язувальні молекули можна виділяти та очищувати, відповідним чином вибравши та скомбінувавши, наприклад, хроматографічні колонки, фільтрування, ультрафільтрування, знесолювання, преципітацію з розчинника, екстрагування розчинником, дистиляцію, імунопреципітацію, електрофорез на поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (SDS), ізоелектрофокусування, діаліз та рекристалізацію.

Хроматографія включає, наприклад, афінну хроматографію, іонообмінну хроматографію, гідрофобну хроматографію, гель-фільтрацію, хроматографію з оберненою фазою та адсорбційну хроматографію (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., (1996) Cold Spring Harbor Laboratory Press). Такі способи хроматографії можна здійснювати, використовуючи хроматографію з рідкою фазою, таку як HPLC (рідинну хроматографію високого розв'язання) та FPLC (рідинну хроматографію швидкого розв'язання). Колонки, що використовуються для афінної хроматографії, включають колонки білка А та колонки білка G. Колонки, що використовують колонки білка А, включають, наприклад, Hyper D, POROS та Sepharose F. F. (Pharmacia).

Якщо необхідно, необов'язково можна модифікувати антиген-зв'язувальну молекулу, та пептиди можна частково стерти, дозволивши відповідному ферменту модифікації білків діяти до або після очищення антиген-зв'язувальної молекули. Такі ферменти модифікації білків включають, наприклад, трипсин, хімотрипсин, лізил ендопептидази, протеїнінази та глюкозидази.

Антитіла проти рецептора IL-6

Крім того, цим винаходом пропонуються антитіла проти рецептора IL-6 згідно з пунктами від (a) до (m), переліченими нижче:

(а) антитіло, що включає варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність, у якій принаймні один з Tyr на позиції 27, Asp на позиції 31, Asp на позиції 32, Trp на позиції 35, Tyr на позиції 51, Asn на позиції 59, Ser на позиції 63, Met на позиції 106 та Tyr на позиції 108 в амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 1 (варіабельна ділянка H53) заміщений His;

(b) антитіло, що включає варіабельну ділянку важкого ланцюга (H3pl), яка має амінокислотну послідовність, у якій Tyr на позиції 27, Asp на позиції 31 та Trp на позиції 35 в амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 1 (варіабельна ділянка H53) заміщені His;

(с) антитіло, що включає варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка має амінокислотну послідовність, у якій Тур на позиції 27, Асп на позиції 31, Асп на позиції 32, Тгр на позиції 35, Асп на позиції 59, Сер на позиції 63 та Тур на позиції 108 в амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 1 (варіабельна ділянка H53) заміщені His;

(d) антитіло, що включає варіабельну ділянку важкого ланцюга (H170), яка має амінокислотну послідовність, у якій Tyr на позиції 27, Asp на позиції 31, Asp на позиції 32, Trp на позиції 35, Asn на позиції 59, Ser на позиції 63 та Tyr на позиції 108 заміщені His та у якій Ser на позиції 99 заміщений Val, а Thr на позиції 103 заміщений Ile в амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 1 (варіабельна ділянка H53);

(е) антитіло, що включає варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка має амінокислотну послідовність, у якій Asp на позиції 31, Tyr на позиції 51, Ser на позиції 63, Met на позиції 106 та Tyr на позиції 108 в амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 1 (варіабельна ділянка H53) заміщені His;

(f) антитіло, що включає варіабельну ділянку важкого ланцюга (CLH5), яка має амінокислотну послідовність, у якій Asp на позиції 31, Tyr на позиції 51, Ser на позиції 63, Met на позиції 106 та Tyr на позиції 108 заміщені His та у якій Ser на позиції 99 заміщений Phe, а Thr на позиції 103 заміщений Ile в амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 1 (варіабельна ділянка H53);

(g) антитіло, що включає варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка має амінокислотну послідовність, у якій принаймні один з Asp на позиції 28, Tyr на позиції 32, Glu на позиції 53, Ser на позиції 56 та Asn на позиції 92 в амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 2 (варіабельна ділянка PF1L) заміщений His;

(h) антитіло, що включає варіабельну ділянку легкого ланцюга (L73), яка має амінокислотну послідовність, у якій Asp на позиції 28, Tyr на позиції 32 та Glu на позиції 53 в амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 2 (варіабельна ділянка PF1L) заміщені His;

(i) антитіло, що включає варіабельну ділянку легкого ланцюга (L82), яка має амінокислотну послідовність, у якій Tyr на позиції 32 та Glu на позиції 53 в амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 1 (варіабельна ділянка H53) заміщені His;

(j) антитіло, що включає варіабельну ділянку легкого ланцюга (CLL5), яка має амінокислотну послідовність, у якій Thr на позиції 32, Glu на позиції 53, Ser на позиції 56, та Asn на позиції 92 в амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 2 (варіабельна ділянка PF1L) заміщені His;

(k) антитіло, що включає варіабельну ділянку важкого ланцюга (b) та варіабельну ділянку легкого ланцюга (h);

(l) антитіло, що включає варіабельну ділянку важкого ланцюга (d) та варіабельну ділянку легкого ланцюга (i);

(m) антитіло, що включає варіабельну ділянку важкого ланцюга (f) та варіабельну ділянку легкого ланцюга (h).

Специфічні приклади варіабельної ділянки важкого ланцюга, яка має амінокислотну послідовність, у якій принаймні один з Tyr на позиції 27, Asp на позиції 31, Asp на позиції 32, Trp на позиції 35, Tyr на позиції 51, Asn на позиції 59, Ser на позиції 63, Met на позиції 106 та Tyr на позиції 108 в амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 1 (варіабельна ділянка H53) заміщений His, включають, наприклад, наступні варіабельні ділянки важкого ланцюга:

варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3 (H3pl);

варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4 (H170):

варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 5 (CLH5).

Специфічні приклади варіабельної ділянки легкого ланцюга, яка має амінокислотну послідовність, у якій принаймні один Asp на позиції 28, Tyr на позиції 32, Glu на позиції 53, Ser на позиції 56 та Asn на позиції 92 в амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 2 (варіабельна

ділянка PF1L) заміщений His, включають, наприклад, наступні варіабельні ділянки легкого ланцюга:

варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6 (L73);

5 варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7 (L82);

варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 8 (CLL5).

10 Амінокислотні позиції та заміщення у кожному з вищеописаних антитіл H3pl, H170, CLH5, L73, L82 та CLL5 наведено нижче у Таблиці 1. Амінокислотні позиції представлено на основі нумерації за Kabat.

Таблиця 1

Положення	27	31	32	33	35	50	58	61	62	63	64	65	95	99	100B	102
H3pl	H	H		H	H											
H170	H	H	H	H	H		H		H				V	I		H
CLH5		H		H		H			H				F	I	H	H

Положення	24	27	28	32	53	55	56	90	92	94
L73			H	H	H	H				
LB2				H	H	H				
CLL5				H	H	H	H		H	

* У антитіла природного типу (WT) H-ланцюг має гістидин на позиції 33, тоді як L-ланцюг має гістидин на позиції 55.

15 Цим винаходом пропонуються антитіла, які включають принаймні будь-яке одне амінокислотне заміщення, описане вище в від (а) до (j), та способи одержання цих антитіл. Отже, антитіла цього винаходу також включають антитіла, що включають не лише будь-які амінокислотні заміщення, описані вище у від (а) до (j), але також амінокислотні заміщення, відмінні від тих, які описано вище у від (а) до (j). Амінокислотні заміщення, відмінні від тих, які

20 описано вище у від (а) до (j), включають, наприклад, заміщення, делецію, додавання та/або вставку в амінокислотних послідовностях гіперваріабельних ділянок (CDR) та каркасних ділянок (FR).

Крім того, цим винаходом пропонуються антитіла проти рецептора IL-6 від (1) до (28), які перелічені нижче:

25 (1) антитіло, що має варіабельну ділянку важкого ланцюга (варіабельна ділянка VH1-IgG1), яка має амінокислотну послідовність від позиції 1 до 119 в SEQ ID NO: 21 (VH1-IgG1);

(2) антитіло, що має варіабельну ділянку важкого ланцюга (варіабельна ділянка VH2-IgG1), яка має амінокислотну послідовність від позиції 1 до 119 в SEQ ID NO: 22 (VH2-IgG1);

30 (3) антитіло, що має варіабельну ділянку важкого ланцюга (варіабельна ділянка VH3-IgG1), яка має амінокислотну послідовність від позиції 1 до 119 у SEQ ID NO: 23 (VH3-IgG1);

(4) антитіло, що має варіабельну ділянку важкого ланцюга (варіабельна ділянка VH4-IgG1), яка має амінокислотну послідовність від позиції 1 до 119 у SEQ ID NO: 24 (VH4-IgG1);

(5) антитіло, що включає варіабельну ділянку легкого ланцюга (варіабельна ділянка VL1-CK), яка має амінокислотну послідовність від позиції 1 до 107 у SEQ ID NO: 25 (VL1-CK);

35 (6) антитіло, що включає варіабельну ділянку легкого ланцюга (варіабельна ділянка VL2-CK), яка має амінокислотну послідовність від позиції 1 до 107 у SEQ ID NO: 26 (VL2-CK);

(7) антитіло, що включає варіабельну ділянку легкого ланцюга (варіабельна ділянка VL3-CK), яка має амінокислотну послідовність від позиції 1 до 107 у SEQ ID NO: 27 (VL3-CK);

40 (8) антитіло (Fv1-IgG1), яке включає варіабельну ділянку важкого ланцюга за (2) та варіабельну ділянку легкого ланцюга за (6);

(9) антитіло (Fv2-IgG1), яке включає варіабельну ділянку важкого ланцюга за (1) та варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7 (L82);

(10) антитіло (Fv3-IgG1), яке включає варіабельну ділянку важкого ланцюга за (4) та варіабельну ділянку легкого ланцюга за (5);

45 (11) антитіло (Fv4-IgG1), яке включає варіабельну ділянку важкого ланцюга за (3) та варіабельну ділянку легкого ланцюга за (7);

(12) антитіло (VH3-IgG2AGK), яке включає важкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33;

(13) антитіло (VH3-M58), яке включає важкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 34;

5 (14) антитіло (VH3-M73), яке включає важкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 35;

(15) антитіло (Fv4-IgG2AGK), яке включає важкий ланцюг за (12) та легкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 27 (VL3-CK);

10 (16) антитіло (Fv4-M58), яке включає важкий ланцюг за (13) та легкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 27 (VL3-CK);

(17) антитіло (Fv4-M73), яке включає важкий ланцюг за (14) та легкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 27 (VL3-CK);

(18) антитіло (VH2-M71), яке включає важкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 36 (VH2-M71);

15 (19) антитіло (VH2-M73), яке включає важкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 37 (VH2-M73);

(20) антитіло (VH4-M71), яке включає важкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 38 (VH4-M71);

20 (21) антитіло (VH4-M73), яке включає важкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 39 (VH4-M73);

(22) антитіло (Fv1-M71), яке включає важкий ланцюг за (18) та легкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 26 (VL2-CK);

(23) антитіло (Fv1-M73), яке включає важкий ланцюг за (19) та легкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 26 (VL2-CK);

25 (24) антитіло (Fv3-M71), яке включає важкий ланцюг за (20) та легкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 25 (VL1-CK);

(25) антитіло (Fv3-M73), яке включає важкий ланцюг за (21) та легкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 25 (VL1-CK);

30 (26) антитіло, яке включає легкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 25 (VL1-CK);

(27) антитіло, яке включає легкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 26 (VL2-CK) та

(28) антитіло, яке включає легкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 27 (VL3-CK).

35 Крім того, цим винаходом пропонуються FR (каркасні ділянки) та CDR (гіперваріабельні ділянки) від (a) до (v), які перелічені нижче:

(a) CDR1 важкого ланцюга SEQ ID NO: 40 (VH1, 2, 3, 4);

(b) CDR2 важкого ланцюга SEQ ID NO: 41 (VH1, 2);

(c) CDR2 важкого ланцюга SEQ ID NO: 42 (VH3);

40 (d) CDR2 важкого ланцюга SEQ ID NO: 43 (VH4);

(e) CDR3 важкого ланцюга SEQ ID NO: 44 (VH1, 2);

(f) CDR3 важкого ланцюга SEQ ID NO: 45 (VH3, 4);

(g) FR1 важкого ланцюга SEQ ID NO: 46 (VH1, 2);

(h) FR1 важкого ланцюга SEQ ID NO: 47 (VH3, 4);

45 (i) FR2 важкого ланцюга SEQ ID NO: 48 (VH1, 2, 3, 4);

(j) FR3 важкого ланцюга SEQ ID NO: 49 (VH1);

(k) FR3 важкого ланцюга SEQ ID NO: 50 (VH2);

(l) FR3 важкого ланцюга SEQ ID NO: 51 (VH3, 4);

(m) FR4 важкого ланцюга SEQ ID NO: 52 (VH1, 2, 3, 4);

50 (n) CDR1 легкого ланцюга SEQ ID NO: 53 (VL1, 2);

(o) CDR1 легкого ланцюга SEQ ID NO: 54 (VL3);

(p) CDR2 легкого ланцюга SEQ ID NO: 55 (VL1, VL3);

(q) CDR2 легкого ланцюга SEQ ID NO: 56 (VL2);

(r) CDR3 легкого ланцюга SEQ ID NO: 57 (VL1, 2, 3);

55 (s) FR1 легкого ланцюга SEQ ID NO: 58 (VL1, 2, 3);

(t) FR2 легкого ланцюга SEQ ID NO: 59 (VL1, 2, 3);

(u) FR3 легкого ланцюга SEQ ID NO: 60 (VL1, 2, 3) та

(v) FR4 легкого ланцюга SEQ ID NO: 61 (VL1, 2, 3).

Відповідні послідовності, які вказано вище від (a) до (v), представлено на Фіг. 25. Крім того, цим винаходом пропонуються поліпептиди, що включають будь-яку одну з перелічених вище від (a) до (v) FR та CDR.

Антитіла проти рецептора IL-6 цього винаходу також включають фрагменти та модифіковані продукти антитіл, які включають будь-яке амінокислотне заміщення, описане вище. Такі фрагменти антитіл включають, наприклад, Fab, F(ab')₂, Fv, сигнальний ланцюг Fv (scFv), у якому Fv Н- та L-ланцюгів з'єднані разом за допомогою відповідного лінкера, однодоменний Н-ланцюг та однодоменний L-ланцюг (наприклад, Nat. Biotechnol. 2005 Sep; 23(9):1126-36), унітіла (Unibody) (WO 2007/059782 A1) та SMIP (WO 2007/014278 A2). Походження антитіл особливо не обмежується. Антитіла включають антитіла людини, миші, щурів та кролів. Антитіла цього винаходу можуть також бути химерними, гуманізованими, повністю гуманізованими антитілами, та їм подібними.

Специфічно, такі фрагменти антитіл отримують шляхом обробки антитіл ферментами, наприклад, папаїном або пепсином, або шляхом побудови генів, які кодують такі фрагменти антитіл, вставляючи їх у вектори експресії, а потім експресуючи їх у відповідні клітини-хазяїни (дивись, наприклад, Co, M.S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496; Plueckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663; Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-66; Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137).

Цим винаходом пропонуються способи одержання (i) поліпептиду цього винаходу або (ii) поліпептиду, кодованого геном, який кодує поліпептид цього винаходу, де ці способи включають етап культивування клітини-хазяїна, яка містить вектор, у який введений полінуклеотид, що кодує поліпептид цього винаходу.

Більш специфічно, цим винаходом пропонуються способи одержання поліпептиду цього винаходу, які включають етапи:

(a) культивування клітини-хазяїна, яка містить вектор, у який введений ген, що кодує поліпептид цього винаходу; та

(b) отримання поліпептиду, кодованого цим геном.

scFv отримують шляхом з'єднання V-ділянок Н- та L-ланцюгів антитіла. У такому scFv варіабельна ділянка важкого ланцюга з'єднана з варіабельною ділянкою легкого ланцюга за допомогою лінкера, переважно пептидного лінкера (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 10.0, 5879-5883). Варіабельні ділянки важкого ланцюга та легкого ланцюга у scFv можуть походити від будь-яких антитіл, описаних вище. Пептидний лінкер для з'єднання варіабельних ділянок включає, наприклад, довільні одноланцюгові пептиди від 12 до 19 амінокислотних залишків.

Коли антитіло проти рецептора IL-6 цього винаходу включає константну ділянку, тоді константна ділянка може мати будь-який тип, наприклад, можна використовувати IgG1, IgG2 або IgG4. Константна ділянка - це переважно константна ділянка антитіла людини. Альтернативно, константна ділянка може мати модифіковану форму, яка включає заміщення, делецію, додавання та/або вставку в амінокислотну послідовність константних ділянок IgG1 людини, IgG2 людини або IgG4 людини.

Переважний рецептор IL-6, з яким зв'язується антитіло проти рецептора IL-6 цього винаходу, - це рецептор IL-6 людини.

Антитіла проти рецептора IL-6 цього винаходу мають перевагу стосовно утримання у плазмі, та вони існують протягом подовженого періоду у плазмі у формі, здатній зв'язуватися з антигеном, тобто, з розчинними або пов'язаними з мембраною рецепторами IL-6. Отже, антитіла проти рецептора IL-6 зв'язуються *in vivo* з розчинними або пов'язаними з мембраною рецепторами IL-6 протягом подовженого періоду. Крім того, антитіла проти рецептора IL-6 є здатними зв'язуватися з рецепторами IL-6 двічі або більше разів, та, внаслідок цього, припускають, що вони є здатними нейтралізувати три або більше рецепторів IL-6.

Фармацевтичні композиції

Цей винахід також стосується фармацевтичних композицій, які включають антиген-зв'язувальні молекули цього винаходу, при цьому антиген-зв'язувальні молекули виділені за допомогою способів скринінгу цього винаходу або антиген-зв'язувальні молекули одержані за допомогою способів одержання цього винаходу. Антиген-зв'язувальні молекули цього винаходу та антиген-зв'язувальні молекули, що одержані за допомогою способів одержання цього винаходу мають переваги стосовно утримання у плазмі, та, внаслідок цього, очікують, що вони будуть знижувати частоту введення антиген-зв'язувальних молекул та, як наслідок, будуть корисними як фармацевтичні композиції. Фармацевтична композиція цього винаходу може включати фармацевтично прийнятні носії.

У цьому винаході фармацевтичні композиції зазвичай означають агенти для лікування або профілактики або тестування та діагностування хвороб.

Фармацевтичні композиції цього винаходу можна виготовляти за способами, відомими фахівцям у цій галузі. Наприклад, їх можна використовувати парентерально, у формі ін'єкцій, стерильних розчинів або суспензій, які включають воду або іншу фармацевтично прийнятну рідину. Наприклад, такі композиції можна виготовляти шляхом змішування у стандартній лікарській формі, яка взагалі дозволяється згідно із загально ухваленою практикою виробництва ліків, шляхом відповідного комбінування з фармацевтично прийнятними носіями або середовищами, особливо зі стерильною водою, фізіологічним сольовим розчином, рослинною олією, емульгатором, суспензією, сурфактантом (ПАР), стабілізатором, ароматизатором, екципієнтом, наповнювачем, консервантом, зв'язувальним агентом тощо. У таких складах кількість активного інгредієнта регулюється з метою отримання відповідної кількості у попередньо визначеному діапазоні.

Стерильні композиції для ін'єкції можна виготовити, використовуючи наповнювачі, такі як дистильована вода для ін'єкцій, згідно зі стандартною практикою виготовлення фармацевтичних складів.

Водні розчини для ін'єкції включають, наприклад, фізіологічний сольовий розчин та ізотонічні розчини, що містять декстрозу або інші ад'юванти (наприклад, D-сорбіт, D-манозу, D-маніт та натрію хлорид). Можна також використовувати у комбінації відповідні солюбілізатори, наприклад, спирти (етанол та їм подібне), поліспирти (пропіленгліколь, поліетиленгліколь та їм подібне), неіонні сурфактанти (полісорбат 80 (TM), HCO-50 та їм подібне).

Олії включають кунжутну олію та соєву олію. Бензилбензоат та/або бензиловий спирт можна використовувати у комбінації як солюбілізатори. Можна також комбінувати буфери (наприклад, фосфатний буфер та натрій ацетатний буфер), заспокійливі агенти (наприклад, прокаїну гідрохлорид), стабілізатори (наприклад, бензиловий спирт та фенол) та/або антиоксиданти. Відповідні ампули наповнюються приготованими препаратами для ін'єкцій.

Фармацевтичні композиції цього винаходу переважно вводяться парентерально. Наприклад, композиції можуть бути у дозованій формі для ін'єкцій, введення крізь ніс, введення крізь легені або введення крізь шкіру. Наприклад, їх можна вводити системно або місцево шляхом внутрішньовенної ін'єкції, внутрішньом'язової ін'єкції, внутрішньочеревної ін'єкції, підшкірної ін'єкції тощо.

Способи введення можна відповідним чином вибрати з урахуванням віку та симптомів пацієнта. Доза фармацевтичної композиції, що містить антиген-зв'язувальну молекулу, може становити, наприклад, від 0,0001 до 1000 мг/кг для кожного введення. Альтернативно, доза може становити, наприклад, від 0,001 до 100000 мг на пацієнта. Проте, цей винахід не обмежується числовими значеннями, описаними вище. Дози та способи введення різняться залежно від ваги, віку, симптомів пацієнта тощо. Фахівці у цій галузі можуть встановити відповідні дози та способи введення, враховуючи описані вище фактори.

Амінокислоти, що містяться в амінокислотних послідовностях цього винаходу, можна модифікувати після трансляції. Наприклад, фахівцям у цій галузі добре відома модифікація залишку глютаміну (Gln) на N-закінченні у залишок піроглутамінової кислоти (pGlu) шляхом піроглутамінування. Природно, що такі модифіковані після трансляції амінокислоти включаються в амінокислотні послідовності у цьому винаході.

Усі документи попереднього рівня техніки, які процитовано в цьому описі винаходу, включені до нього шляхом посилання.

Приклади

Далі у цьому описі винаходу цей винахід буде докладно описаний з посиланням на Приклади, але їх не слід вважати обмежувальними.

Приклад 1. Одержання модифікованого гуманізованого антитіла PM1

Одержання рекомбінантного розчинного рецептора IL-6 людини (SR344)

Рекомбінантний IL-6 рецептор людини рецептора IL-6 людини, який служив антигеном, приготували, як описано нижче. Отримали клітинну лінію CHO, яка постійно експресує розчинний рецептор IL-6 людини (далі позначається як SR344) (Yamasaki, et al., Science 1988; 241: 825-828 (GenBank #X12830)), який складається з амінокислотної послідовності від 1-ї амінокислоти до 344-ї амінокислоти на N-закінченні, як повідомлялося у J. Biochem., 108, 673-676 (1990).

SR344 очистили від культуральної надосадової рідини, отриманої з клітин CHO, що експресують SR344, використовуючи три колонкові хроматографії: колонкову хроматографію Blue Sepharose 6 FF, афінну хроматографію, де використовується колонка, у якій антитіло, що є специфічним до SR344, іммобілізоване, та колонкову хроматографію з гелю-фільтрацією. Фракцію, що елюювалася як головний пік, використовували як кінцевий очищений продукт.

Приготування рекомбінантного розчинного рецептора IL-6 мавп *Cynomolgus* (cIL-6R)

Праймери оліго-ДНК Rhe6Rf1 (SEQ ID NO: 16) та Rhe6Rr2 (SEQ ID NO: 17) отримали на основі загально доступної послідовності гена рецептора IL-6 макаки резус (Birney et al., Ensemble 2006, Nucleic Acids Res., 2006, Jan. 1; 34 (Database issue): D556-61). Використовуючи кДНК, отриману з підшлункової залози *cynomolgus* як матрицю, фрагмент ДНК, який кодує ген рецептора IL-6 мавп *cynomolgus* повної довжини, приготували шляхом ПЛР із використанням праймерів Rhe6Rf1 та Rhe6Rr2. Використовуючи отриманий фрагмент ДНК як матрицю, фрагмент ДНК у 1131 пар основ (bp) (SEQ ID NO: 20), який кодує білок, у якому 6xHis додано до С-закінчення розчинної ділянки (Met1-Pro363), що містить сигнальну ділянку гена рецептора IL-6 мавп *cynomolgus*, ампліфікували шляхом ПЛР, використовуючи праймери оліго-ДНК CynoIL6R N-EcoRI (SEQ ID NO: 18) та CynoIL6R C-NotI-His (SEQ ID NO: 19). Отриманий фрагмент ДНК перетравлювали EcoRI та NotI та вставили у вектор експресії для клітин ссавців, та це потім використовували для виробництва лінії CHO зі стабільною експресією (клітини CHO, що виробляють супо.sIL-6R).

Культуральне середовище клітин CHO, що виробляють супо.sIL-6R, очистили колонкою HisTrap (GE Healthcare Biosciences), концентрували, використовуючи Amicon Ultra-15 Ultracel-10k (Millipore), а потім очистили гель-фільтраційною колонкою Superdex 200 pg 16/60 (GE Healthcare Biosciences), внаслідок чого отримали кінцевий очищений продукт - розчинний рецептор IL-6 мавп *cynomolgus* (далі у цьому описі винаходу позначається як cIL-6R).

Приготування рекомбінантного IL-6 мавп *cynomolgus* (cIL-6)

IL-6 мавп *cynomolgus* приготували наступним способом. Отримали нуклеотидну послідовність, що кодує 212 амінокислот, зареєстрованих під номером доступу SWISSPROT №. P79341, її клонували у вектор експресії для клітин ссавців та ввели у клітини CHO, внаслідок чого отримали клітинну лінію зі стабільною експресією (клітини CHO, що виробляють супо.IL-6). Культуральне середовище клітин CHO, що виробляють супо.IL-6, очистили колонкою SP-Sephacrose/FF (GE Healthcare Biosciences), концентрували, використовуючи Amicon Ultra-15 Ultracel-5k (Millipore), а потім далі очищували гель-фільтраційною колонкою Superdex 75 pg 26/60 (GE Healthcare Biosciences). Це концентрували, використовуючи Amicon Ultra-15 Ultracel-5k (Millipore), внаслідок чого отримали кінцевий очищений продукт IL-6 мавп *cynomolgus* (далі у цьому описі винаходу позначається cIL-6).

Створення клітинної лінії BaF3, що експресує gp130 людини

Клітинну лінію BaF3, що експресує gp130 людини, створили так, як вказано нижче, з метою отримання клітинної лінії, що демонструє IL-6-залежне зростання.

кДНК повної довжини gp130 людини (Hibi et al., Cell 1990; 63: 1149-1157 (GenBank #NM_002184)) ампліфікували шляхом ПЛР та клонували у вектор експресії pCOS2Zeo, який отримали внаслідок видалення ділянки експресії гена DHFR з pCHOI (Hirata, et al., FEBS Letter 1994; 356: 244-248) та вставки ділянки експресії стійкого до Zeocin гена, внаслідок чого побудували pCOS2Zeo/gp130. кДНК повної довжини IL-6R людини ампліфікували шляхом ПЛР та клонували у pcDNA3.1(+) (Invitrogen), внаслідок чого побудували hIL-6R/pcDNA3.1(+). 10 мкг pCOS2Zeo/gp130 вмішали у клітини BaF3 ($0,8 \times 10^7$ клітин), суспендовані у сольовому розчині з фосфатним буфером (PBS), та піддали пульсаційній обробці із використанням Gene Pulser (Bio-Rad) з напругою 0,33 кВ та електричною ємністю 950 мкФ. Клітини BaF3, що зазнали введення гена внаслідок обробки шляхом електропорації, культивували протягом одного дня та ночі у середовищі RPMI1640 (Invitrogen), що містило 0,2 нг/мл інтерлейкіну-3 миші (Peprotech) та 10 % фетальну бичачу сироватку (далі у цьому описі винаходу позначається як FBS, HyClone), а потім піддали скринінгу, додавши середовище RPMI1640, що містило 100 нг/мл інтерлейкіну-6 людини (R&D Systems), 100 нг/мл розчинного рецептора інтерлейкіну-6 людини (R&D Systems) та 10 % FBS, внаслідок чого утворилася клітинна лінія BaF3, що експресує gp130 людини (далі у цьому описі винаходу позначається як BaF3/gp130). Оскільки ця клітинна лінія BaF3/gp130 проліферується у присутності інтерлейкіну-6 людини (R&D Systems) та SR344, її можна використовувати для оцінки активності антитіла проти рецептора IL-6 інгібувати зростання (а саме, активності нейтралізувати рецептор IL-6).

Виробництво гуманізованого антитіла проти рецептора IL-6 У контексті цього прикладу та будь-де у цьому описі винаходу термін "природний тип" скорочується як WT, термін "важкий ланцюг природного типу" скорочується як H(WT) (амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 9), та термін "легкий ланцюг природного типу" скорочується як L(WT) (амінокислотна послідовність SEQ ID NO. 10). У цьому контексті, мутації були зроблені у каркасній послідовності та послідовності гіперваріабельної ділянки (CDR) гуманізованого мишачого антитіла PM1, описаного у Cancer Res. 1993, Feb. 15; 53(4): 851-6, внаслідок чого отримали модифіковані Н-ланцюги H53 (амінокислотна послідовність: SEQ ID NO: 1) та PF1H (амінокислотна

послідовність: SEQ ID NO: 11), та модифіковані L-ланцюги L28 (амінокислотна послідовність: SEQ ID NO: 12) та PF1L (амінокислотна послідовність: SEQ ID NO: 2). Більш специфічно, мутантів отримали, використовуючи набір для сайт-спрямованого мутагенезу QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) згідно зі способом, описаним в доданих інструкціях, та отримані плазмідні фрагменти вставили у вектор експресії для клітин ссавців, внаслідок чого отримали бажані вектори експресії Н-ланцюгів та вектори експресії L-ланцюгів. Нуклеотидні послідовності отриманих векторів експресії визначили, використовуючи традиційні способи, відомі фахівцям у цій галузі.

Експресія та очищення гуманізованого антитіла проти рецептора IL-6 Антитіла експресували за способом, описаним нижче. Клітинну лінію HEK293H, що походить від раку нирки ембріону людини (Invitrogen), суспендували у DMEM (Invitrogen), доповненому 10 % FBS (Invitrogen). Клітини розташували по 10 мл на чашку у чашках для прилипаючих клітин (10 см в діаметрі; CORNING) з щільністю клітин від 5 до 6×10^5 клітин/мл та культивували в інкубаторі з CO₂ (37 °C, 5 % CO₂) протягом одного усього дня та ночі. Потім середовище видалили шляхом відсмоктування та додали 6,9 мл середовища CHO-S-SFM-II (Invitrogen). Отриману плазмиду ввели у клітини способом ліпофекції. Отримані культуральні надосадові рідини зібрали, центрифугували (приблизно 2000 g, 5 хвилин, кімнатна температура), щоб видалити клітини, та стерилізували шляхом фільтрування крізь фільтр 0,22-мкм MILLEX®-GV (Millipore), внаслідок чого отримали надосадові рідини. Антитіла очистили від отриманих культуральних надосадових рідин за способом, відомим фахівцям у цій галузі, використовуючи rProtein A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences). Щоб визначити концентрацію очищеного антитіла, вимірювали поглинання при 280 нм, використовуючи спектрофотометр. Концентрацію антитіл розраховували з визначених значень, використовуючи коефіцієнт поглинання, визначений за способом PACE (Protein Science 1995; 4:2411-2423).

Приклад 2. Виробництво антитіла H3pl/L73, що зв'язується залежним від рН чином

Спосіб утворення антитіла, здатного нейтралізувати антиген багато разів

Оскільки молекули IgG є бівалентними, то єдина молекула IgG може нейтралізувати до двох молекул антигенів, коли дві ділянки зв'язуються з антигенами; проте, вона не може нейтралізувати три або більше молекул антигенів. Отже, для підтримання нейтралізуючого ефекту нейтралізуючого антитіла протягом певного періоду часу, необхідно вводити таку кількість антитіла, яка є еквівалентною або більшою, ніж кількість антигену, що виробляється протягом цього періоду часу. Отже, є обмеження стосовно ступеню, до якого необхідну дозу антитіла можна знижувати внаслідок покращення фармакокінетики або афінності антитіла. Отже, якщо можна було б нейтралізувати дві або більше молекули антигенів єдиною молекулою IgG, то така ж сама доза могла б подовжити тривалість нейтралізуючого ефекту, або, альтернативно, дозу антитіла, що є необхідною для досягнення такої ж самої тривалості, можна було б знизити.

Для нейтралізуючих антитіл існує два типи антигенів-мішеней: антигени розчинного типу, які є присутніми у плазмі, та пов'язані з мембраною антигени, які експресуються на поверхні клітин.

Коли антиген - це пов'язаний з мембраною антиген, тоді введені антитіла зв'язуються з мембранним антигеном на клітинній поверхні, та це антитіло потім захоплюється в ендосоми усередині клітини шляхом інтерналізації разом з мембранним антигеном, зв'язаним з антитілом. Після цього антитіло, що зберігає зв'язок з антигеном, рухається до лізосоми, де воно руйнується лізосомою разом з антигеном. Елімінування антитіла з плазми, опосередковане інтерналізацією мембранним антигеном, називається антиген-залежним елімінуванням, та про нього повідомлялося для багатьох молекул антитіл (Drug Discov. Today, 2006 Jan; 11(1-2): 81-8). Оскільки єдина молекула антитіла IgG зв'язується з двома молекулами антигенів, коли вона бівалентно зв'язується з антигенами, а потім інтерналізується та безпосередньо руйнується лізосомою, то єдине звичайне антитіло IgG не може нейтралізувати дві або більше молекул антигенів (Фіг. 1).

Причина тривалого утримання (повільного елімінування) молекул IgG у плазмі полягає у тому, що діє FcRn, відомий як рецептор реутилізації молекули IgG (Nat. Rev. Immunol. 2007 Sep; 7(9): 715-25). Молекули IgG, які захопилися в ендосоми внаслідок піноцитозу, зв'язуються з FcRn, що експресується в ендосомах за внутрішньоендосомними кислотними умовами. Молекули IgG, зв'язані з FcRn, рухаються до клітинної поверхні, де вони відокремлюються від FcRn у нейтральних умовах у плазмі та повертаються до плазми, тоді як молекули IgG, нездатні зв'язуватися з FcRn, продовжують рухатися до лізосом, де вони руйнуються (Фіг. 2).

Молекули IgG, зв'язані з мембранним антигеном, захоплюються у внутрішньоклітинні ендосоми шляхом інтерналізації, рухаються у лізосоми, зберігаючи зв'язок з антигеном, та зазнають руйнування. Коли антитіло IgG бівалентно зв'язується з антигенами, тоді воно

нейтралізує дві молекули антигенів та піддається руйнуванню разом з антигенами. Якщо антитіло IgG, коли воно захоплюється у внутрішньоклітинні ендосоми шляхом інтерналізації, може відокремлюватися від антигену при внутрішньоендосомних кислотних умовах, тоді відокремлене антитіло може бути здатним зв'язатися з FcRn, що експресується в ендосомах.

5 Молекула IgG, відокремлена від антигену та зв'язана з FcRn, переноситься до клітинної поверхні, а потім відокремлюється від FcRn при нейтральних умовах у плазмі, тим самим повертаючись назад до плазми. Молекула IgG, що повернулася до плазми, є здатною знов зв'язатися з новим мембранним антигеном. Повторення цього процесу дозволяє єдиній молекулі IgG неодноразово зв'язуватися з мембранними антигенами, тим самим сприяючи

10 нейтралізації численних антигенів єдиною молекулою IgG (Fig. 3).

У випадку розчинного антигену, введене антитіло зв'язується з антигеном у плазмі та залишається у плазмі у формі комплексу антиген-антитіло. Зазвичай, тоді як утримання антитіла у плазмі триває дуже довго (швидкість елімінування є дуже повільною) внаслідок дії FcRn, як описано вище, утримання антигену у плазмі є коротким (швидкість елімінування є високою). Отже, зв'язані з антитілом антигени демонструють утримання у плазмі, яке є порівняльним з утриманням у плазмі антитіла (швидкість елімінування є дуже повільною). Антигени виробляються в організмі з постійною швидкістю та при відсутності антитіла є присутніми у плазмі у концентрації, при якій швидкість виробництва антигенів та швидкість елімінування антигенів знаходяться у рівновазі. У присутності антитіла більшість антигенів зв'язуються з антитілами, наслідком чого є дуже повільна швидкість елімінування антигенів. Отже, концентрація антигенів у плазмі підвищується порівняно з концентрацією при відсутності антитіла (Kidney Int. 2003, 64, 697-703; J. National Cancer Institute 2002, 94(19), 1484-1493; J. Allergy and Clinical Immunology 1997, 100(1), 110-121; Eur. J. Immunol. 1993, 23; 2026-2029). Навіть якщо афінність антитіла до антигену є безмежною, то концентрація антигенів підвищується, коли антитіло повільно вилучається з плазми, та нейтралізуючий ефект антитіла припиняється після того, як концентрація антитілу буде дорівнювати концентрації антигенів. Незважаючи на те, що антитіла з більш сильною константою дисоціації (KD) можуть нейтралізувати розчинні антигени при низькій концентрації антитілу, антитіла при концентрації, що становить половину або менше концентрації присутнього антигену, є нездатними

20 нейтралізувати антигени незалежно від того, наскільки сильною є афінність антитіла (Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005 Sep 9; 334(4): 1004-13). Як і у випадку з молекулами IgG, не зв'язаними з антигенами, молекули IgG, зв'язані з антигенами у плазмі, також захоплюються в ендосоми внаслідок піноцитозу та зв'язуються з FcRn, що експресується в ендосомах при внутрішньоендосомних кислотних умовах. Молекули IgG, зв'язані з FcRn, рухаються до

35 клітинної поверхні, при цьому антитіло зберігає зв'язок з антигеном, а потім відокремлюється від FcRn за нейтральних умов у плазмі. Оскільки молекули IgG повертаються до плазми, зберігаючи зв'язок з антигеном, то вони не можуть зв'язуватися з новими антигенами у плазмі. У випадку, якщо молекули IgG можуть відокремлюватися від антигену за внутрішньоендосомних кислотних умов, то відокремлений антиген не буде здатним зв'язатися з FcRn та внаслідок цього може руйнуватися лізосомами. З іншого боку, молекули IgG можуть повертатися до

40 плазми знов, зв'язуючись при цьому з FcRn. Оскільки молекули IgG, що повернулися до плазми, вже відокремилися від антигену в ендосомах, вони є здатними зв'язуватися знов з новим антигеном у плазмі. Повторення цього процесу дозволяє єдиній молекулі IgG неодноразово зв'язуватися з розчинними антигенами. Це сприяє тому, що єдина молекула IgG нейтралізує

45 численні антигени (Fig. 4).

Отже, незважаючи на те, чи є антиген мембранним антигеном або розчинним антигеном, якщо відокремлення антитіла IgG від антигену є можливим за внутрішньоендосомних кислотних умов, то єдина молекула IgG буде здатною багаторазово нейтралізувати антигени. Для того, щоб антитіла IgG відокремлювалися від антигенів за внутрішньоендосомними кислотними умовами, необхідно, щоб зв'язок антиген-антитіло був суттєво слабкішим при кислотних умовах порівняно з нейтральними умовами. Оскільки мембранні антигени на клітинній поверхні слід нейтралізувати, то антитіла мусять сильно зв'язуватися з антигенами при pH біля клітинної поверхні, а саме при pH 7,4. Оскільки повідомлялося, що внутрішньоендосомне pH зазвичай становить від 5,5 до 6,0 (Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2004 Feb; 5(2): 121-32), то вважають, що

50 антитіло, яке слабо зв'язується з антигеном при pH від 5,5 до 6,0, відокремлюється від антигену за внутрішньоендосомними кислотними умовами. Більш специфічно, єдина молекула IgG, яка сильно зв'язується з антитілом при pH 7,4 біля клітинної поверхні та слабо зв'язується з антигеном при внутрішньоендосомному pH від 5,5 до 6,0, може бути здатною нейтралізувати численні антигени, а, тим самим, покращити фармакокінетику.

Взагалі, взаємодії білок-білок складаються з гідрофобної взаємодії, електростатичної взаємодії та водневого зв'язку, та міцність зв'язування зазвичай виражається як константа зв'язування (афінність) або позірна константа зв'язування (авідність). Залежне від рН зв'язування, міцність зв'язування якого різниться для нейтральних умов (рН 7,4) та кислотних умов (рН від 5,5 до 6,0), відбувається у природно виникаючих взаємодіях білок-білок. Наприклад, вищезгадане зв'язування між молекулами IgG та FcRn, відомого як рецептор реутилізації для молекул IgG, є сильним при кислотних умовах (рН від 5,5 до 6,0), проте є помітно слабким при нейтральних умовах (рН 7,4). Більшість таких взаємодій білок-білок, що змінюються залежно від рН, пов'язані із залишками гістидину. Оскільки рКа залишку гістидину дорівнює приблизно рН від 6,0 до 6,5, то стан відокремлення протонів залишків гістидину є різним для нейтральних умов (рН 7,4) та кислотних умов (рН від 5,5 до 6,0). Специфічно, залишки гістидину не заряджені та діють як акцептори атому водню при нейтральних умовах (рН 7,4), проте вони стають позитивно зарядженими та діють як донори атому водню при кислотних умовах (рН 5,5-6,0). Повідомлялося, що залежне від рН зв'язування вищеописаної взаємодії IgG-FcRn також пов'язується із залишками гістидину, присутніми в IgG (Mol. Cell. 2001 Apr; 7(4): 867-77).

Отже, взаємодіям білок-білок можна надати залежності від рН шляхом заміщення амінокислотного залишку, що залучається у взаємодії білок-білок, залишком гістидину або шляхом введення гістидину у ділянку взаємодії. Такі спроби також робилися у взаємодіях білок-білок між антитілами та антигенами, та мутантне антитіло з антиген-зв'язувальною здатністю, зниженою при кислотних умовах, успішно отримали шляхом введення гістидину у послідовність CDR антитіла проти лізоциму яєчного білку (FEBS Letter (vol. 309, No. 1, 85-88, 1992)). Крім того, повідомлялося про антитіло, отримане внаслідок введення гістидину у його послідовність CDR, яке специфічно зв'язується з антигеном при низькому рН ракових клітин, проте слабо зв'язується при нейтральних умовах (WO 2003-105757).

Хоча повідомлялося про способи надання залежності від рН у реакціях антиген-антитіло, як описано вище, але не повідомлялося про молекулу IgG, яка нейтралізує численні антигени внаслідок сильного зв'язування з антигенами при рН 7,4 рідини організму та слабого зв'язування з антигенами при внутрішньоендосомному рН від 5,5 до 6,0. Інакше кажучи, не було жодних повідомлень стосовно модифікацій, які суттєво ослаблюють зв'язування при кислотних умовах, проте зберігають зв'язування при нейтральних умовах, так що, порівняно з немодифікованим антитілом, модифіковане антитіло зв'язується з антигенами багато разів *in vivo* та, внаслідок цього, демонструє покращену фармакокінетику, а також подовжену тривалість нейтралізуючого ефекту при одній і тій же дозі.

Рецептор IL-6 є присутнім в організмі у формі або розчинного рецептора IL-6, або мембранного рецептора IL-6 (Nat. Clin. Pract. Rheumatol. 2006 Nov; 2(11): 619-26). Антитіла проти рецептора IL-6 зв'язуються як з розчинним рецептором IL-6, так і з мембранним рецептором IL-6, та нейтралізують їхню біологічну дію. Вважають, що після зв'язування з мембранним рецептором IL-6 антитіла проти рецептора IL-6 захоплюються у внутрішньоклітинні ендосоми шляхом інтерналізації, зберігаючи при цьому зв'язок з мембранним рецептором IL-6, потім рухаються у лізосоми, зберігаючи зв'язок з мембранним рецептором IL-6, та зазнають руйнування лізосомами разом з мембранним рецептором IL-6. Фактично повідомлялося, що гуманізоване антитіло проти рецептора IL-6 демонструє нелінійний кліренс, та його антиген-залежне елімінування суттєво впливає на елімінування гуманізованого антитіла проти рецептора IL-6 (The Journal of Rheumatology, 2003, 30; 71426-1435). Отже, одне гуманізоване антитіло проти рецептора IL-6 зв'язується з одним або двома мембранними рецепторами IL-6 (одновалентно або бівалентно), а потім інтерналізується та руйнується у лізосомах. Отже, якщо можна одержати модифіковані антитіла, які б демонстрували суттєво знижену зв'язувальну здатність при кислотних умовах, проте зберігали б таку ж саму зв'язувальну здатність, що і гуманізоване антитіло природного типу проти рецептора IL-6 при нейтральних умовах (залежне від рН зв'язування антитіла проти рецептора IL-6), тоді численні рецептори IL-6 можна було б нейтралізувати єдиним гуманізованим антитілом проти рецептора IL-6. Отже, на відміну від гуманізованих антитіл природного типу проти рецептора IL-6, антитіла проти рецептора IL-6, що зв'язуються залежним від рН чином, можуть подовжити тривалість нейтралізуючого ефекту *in vivo* при однаковій дозі.

Виробництво гуманізованого антитіла H3pL/L73 проти рецептора IL-6, що зв'язується залежним від рН чином

Про введення гістидину у CDR повідомлялося як про спосіб надання залежного від рН зв'язування реакції антиген-антитіло (FEBS Letter (vol. 309, No. 1, 85-88, 1992)). Для того, щоб знайти амінокислотні залишки на поверхні варіабельної ділянки H53/PF1L, отриманої у

Прикладі 1, та можливі залишки, що взаємодіють з антигеном, утворили модель ділянки Fv H53/PF1L шляхом гомологічного моделювання, використовуючи програмне забезпечення MOE (Chemical Computing Group Inc.). Тривимірну модель, побудовану на основі інформації про послідовність H53/PF1L, використовували для вибору H27, H31, H35, L28, L32 та L53 (нумерація за Kabat, Kabat, E.A. et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH) як сайти мутації, які можуть надавати залежне від pH зв'язування з антигеном шляхом введення гістидину. Продукт, у якому залишки на H27, H31 та H35 у H53, отриманому у Прикладі 1, замінили гістидинами, позначили як H3pl (амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 3), а продукт, у якому залишки на L28, L32 та L53 у PF1L, отриманому у Прикладі 1, замінили гістидинами, позначили як L73 (амінокислотна послідовність: SEQ ID NO: 6).

Виробництво, експресія та очищення вектора експресії H3pl/L73

Амінокислотну модифікацію здійснювали з метою отримання антитіл, модифікованих на вибраних сайтах. Мутації здійснили в H53 (нуклеотидна послідовність: SEQ ID NO: 13) та PF1L (нуклеотидна послідовність: SEQ ID NO: 14), які отримали у Прикладі 1, внаслідок чого отримали H3pl (амінокислотна послідовність: SEQ ID NO: 3) та L73 (амінокислотна послідовність: SEQ ID NO: 6). Більш специфічно, набір для сайт-спрямованого мутагенезу QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) використовували згідно зі способом, описаним в інструкціях, що додаються, та отримані фрагменти плазмід вставили у вектор експресії для клітин ссавців, внаслідок чого отримали бажаний вектор експресії важкого ланцюга та вектор експресії легкого ланцюга. Нуклеотидні послідовності отриманих векторів експресії визначили за способом, відомим фахівцям у цій галузі. H3pl/L73, що використовує H3pl для важкого ланцюга та L73 для легкого ланцюга, експресували та очистили за способом, описаним у Прикладі 1.

Приклад 3. Надання залежної від pH антиген-зв'язу вальної здатності шляхом His-модифікації CDR, використовуючи спосіб фагового виявлення

Виробництво молекули scFv гуманізованого антитіла PM1

Гуманізоване антитіло PM1, яке є гуманізованим антитілом проти IL-6R (Cancer Res. 1993 Feb 15; 53(4): 851-6), перетворили у scFv. Ділянки VH та VL ампліфікували шляхом ПЛР та отримали гуманізоване PM1 HL scFv, що має лінкерну послідовність GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO. 15) між VH та VL.

Вибір позицій, у які можна вводити гістидин, шляхом гістидинового сканування

ПЛР виконували, використовуючи ДНК гуманізованого PM1 HL scFv як матрицю для отримання гістидинової бібліотеки, у якій будь-яка одна з амінокислот CDR заміщена гістидином. Частини бібліотеки побудували шляхом ПЛР, використовуючи праймери, у яких кодон амінокислоти, яку бажано мутувати для бібліотеки, замінили CAT, при цьому кодон відповідає гістидину, а інші частини побудували шляхом звичайної ПЛР. Ці частини потім з'єднали шляхом ПЛР-складання. Побудовану бібліотеку перетравлювали Sfil, вставили у фагемідний вектор pELBG lad, який також перетравили Sfil, а потім використовували для перетворення XL I-Blue (Stratagene). Отримані колонії використовували для визначення зв'язування з антигеном шляхом фагового ЕЛАЙЗА та аналізу послідовності HL scFv. Фаговий ЕЛАЙЗА виконували, використовуючи планшет, покритий SR344 при 1 мкг/мл згідно з J. Mol. Biol. 1992; 227: 381-388. Клоні, які, як визначили, зв'язуються з SR344, піддали секвенуванню із використанням специфічних праймерів.

Титр фагів визначили шляхом ЕЛАЙЗА з антитілом проти Etag (GE Healthcare) та антитілом проти MI 3 (GE Healthcare). Це значення потім використовували для вибору позицій, де заміщення залишку CDR гістидином суттєво не змінювало зв'язувальну здатність порівняно з гуманізованим PM1 HL scFv, на основі результатів фагового ЕЛАЙЗА для SR344. Вибрані позиції наведено у Таблиці 2. Нумерація кожного залишку відповідала нумерації за Kabat (Kabat, et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH).

Таблиця 2. Позиції заміщення гістидином, які суттєво не впливають на зв'язувальну здатність

H31, H50, H54, H56, H57, H58, H59, H60, H61, H62, H63, H64, H65, H100a, H100b, H102 L24, L26, L27, L28, L30, L31, L32, L52, L53, L54, L56, L90, L92, L93, L94.

Побудова модифікованої гістидином бібліотеки CDR

Побудували бібліотеку, у якій амінокислоти залишків CDR, які суттєво не змінювали зв'язувальну здатність, коли їх заміщували гістидином, та які наведено у Таблиці 2 (позиції, у які можна вводити гістидин), - це їхня оригінальна послідовність (послідовність природного типу) або гістидин. Бібліотеку побудували на основі послідовностей PF1H важкого ланцюга та PF1L легкого ланцюга, отриманих у Прикладі 1, так що мутовані позиції для бібліотеки мають оригінальні послідовності або гістидини (або оригінальну послідовність, або гістидини).

Частини бібліотеки побудували шляхом ПЛР, використовуючи праймери, побудовані так, що позиція, яку бажано мутувати для бібліотеки, має оригінальний амінокислотний кодон або кодон гістидину, а інші частини отримали шляхом звичайної

ПЛР або ПЛР із використанням синтетичних праймерів, як у частинах бібліотеки. Ці позиції потім з'єднали за допомогою ПЛР-складання (J. Mol. Biol. 1996; 256: 77-88).

Цю бібліотеку використовували для будівництва бібліотеки рибосомного виявлення згідно з J. Immunological Methods 1999; 231: 119-135. Для того, щоб здійснити трансляцію *in vitro* без клітин *Escherichia coli*, послідовність SDA (рибосомна ділянка зв'язування) та промотор T7 додали до 5'-кінця, а часткову послідовність гену 3, що служить лінкером для рибосомного виявлення, пришили до 3'-кінця, використовуючи SfiI.

Отримання залежного від pH зв'язувального scFv з бібліотеки шляхом пенінгу на гранулах

Для того, щоб концентрувати тільки scFv, що має здатність зв'язуватися з SR344, двічі здійснювали пенінг за способом рибосомного виявлення згідно з Nature Biotechnology 2000 Dec; 18: 1287-1292. Отриманий SR344 біотинілювали, використовуючи NHS-PEO4-Biotin (Pierce), внаслідок чого отримали антиген. Пенінг здійснювали, використовуючи 40 нМ біотинілизованого антигену.

Використовуючи отриману сукупність ДНК як матрицю, HL scFv відновили шляхом ПЛР, використовуючи специфічні праймери. Після перетравлювання SfiI перетравлений HL scFv вставили у фагемідний вектор pELBG lad, який також перетравили SfiI, а потім використовували для перетворення XL I-Blue (Stratagene).

Клітини *Escherichia coli*, які є носіями бажаної плазмиди, вирощували до 0,4-0,6 O.D. (оптична щільність)/мл у середовищі 2YT, що містило 100 мкг/мл ампіциліну та 2 % глюкози. До цього додали фаг-хелпер ($M13KO7,4,5 \times 10^{11}$ бляшкоутворюючих одиниць (pfu)), статично культивували протягом 30 хвилин при 37 °C, а потім культивували при збовтуванні протягом 30 хвилин при 37 °C. Культуру перенесли до 50-мл пробірки Falcon, центрифугували протягом 10 хвилин при 3000 обертів/хвилину, ресуспендували у середовищі 2YT, що містило 100 мкг/мл ампіциліну, 25 мкг/мл канаміцину та 0,5 мМ IPTG, а потім інкубували протягом ночі при 30 °C.

Інкубовану протягом ночі культуру осадили 2,5 М NaCl та 10 % ПЕГ, а потім розвели PBS, внаслідок чого отримали розчин фагової бібліотеки. 10 % М-PBS (PBS містив 10 % знятого молока) та 1 М Tris-HCl додавали до розчину фагової бібліотеки, доки не отримали кінцеву концентрацію 2,5 % М-PBS та pH 7,4. Пенінг здійснювали за способом типового пенінгу, використовуючи антиген, іммобілізований на магнітних гранулах (J. Immunol. Methods 2008 Mar 20; 332(1-2): 2-9; J. Immunol. Methods 2001 Jan 1; 247(1-2): 191-203; Biotechnol. Prog. 2002 Mar-Apr; 18(2): 212-20). Більш специфічно, 40 пмоль міченого біотином SR344 додали до отриманої фагової бібліотеки та цю бібліотеку піддали контактуванню з антигеном протягом 60 хвилин при 37 °C. Додали покриті стрептавідином гранули (DynaMyl M-280), промиті 5 % М-PBS (PBS, який містить 5 % знятого молока), та дозволили зв'язуватися протягом 15 хвилин при 37 °C. Гранули промили 5 разів як 0,5 мл PBST (PBS, який містить 0,1 % Tween-20, pH 7,4), так і PBS (pH 7,4). Гранули потім суспендували в 1 мл PBS (pH 5,5) при 37 °C та негайно відновили фаг. Відновлений фаговий розчин додали до 10 мл XL I-Blue (OD600 0,4-0,5) у фазі логарифмічного зростання та залишили настоюватися протягом 30 хвилин при 37 °C для інфікування. Інфіковані Е. сої помістили у планшет 225 мм × 225 мм, що містив 2YT, 100 мкг/мл ампіциліну та 2 % глюкози. Ці клітини Е. Сої використовували, щоб започаткувати додаткову фагову культуру таким самим способом, як описано вище, та повторювали пенінг 8 разів.

Оцінка шляхом фагового ЕЛАЙЗА

Вищевказані єдині колонії інокулювали у 100 мкл 2YT, 100 мкг/мл ампіциліну, 2 % глюкози та 12,5 мкг/мл тетрацикліну та культивували протягом ночі при 30 °C. 2 мкл цієї культури інокулювали у 300 мкл 2YT, 100 мкг/мл ампіциліну та 2 % глюкози, а потім культивували протягом 4 годин при 37 °C. Фаг-хелпер (M13KO7) додали до культури при 9×10^8 pfu, залишили настоюватися протягом 30 хвилин при 37 °C та збовтували протягом 30 хвилин при 37 °C для інфікування. Після цього середовище замінили 300 мкл 2YT, 100 мкг/мл ампіциліну, 25 мкг/мл канаміцину та 0,5 мМ IPTG. Після культивування протягом ночі при 30 °C відновили центрифуговану надосадову речовину. 360 мкл 50 мМ PBS (pH 7,4) додали до 40 мкл центрифугованої надосадової рідини та піддали ЕЛАЙЗА. На мікротитраційний планшет з 96 комітками StreptaWell (Roche) нанесли покриття на ніч за допомогою 100 мкл PBS, що містив 62,5 нг/мл міченого біотином SR344. Після видалення антигену шляхом промивання PBST здійснювали блокування 250 мкл 2 % BSA-PBS протягом 1 години або більше. Після видалення 2 % BSA-PBS додали отриману надосадову рідину та дозволили настоюватися протягом 1 години при 37 °C для зв'язування з антитілом. Після промивання додали 50 мМ PBS (pH 7,4) або 50 мМ PBS (pH 5,5) та інкубували, настоюючи протягом 30 хвилин при 37 °C. Після

промивання виконували виявлення за допомогою HRP-кон'югованого антитіла проти M14 (Amersham Pharmacia Biotech), розведеного єдиним розчином 2 % BSA-PBS та TMB (Zymed), потім додали сірчану кислоту, щоб припинити реакцію, та здійснювали вимірювання поглинання при 450 нм.

Проте, за допомогою пенінгу із використанням іммобілізованого на магнітних гранулах антигену не отримали жодного клону, що демонстрував би сильну залежну від рН зв'язувальну здатність. Клони, які, як визначили, демонстрували слабку залежну від рН зв'язувальну здатність, піддали секвенуванню із використанням специфічних праймерів. Позиції у цих клонах, де гістидин був присутнім у великому співвідношенні, наведено у Таблиці 3.

Таблиця 3. Позиції заміщення гістидином, виявленні із використанням фагової бібліотеки (пенінг на магнітних гранулах)

H50, H58, H61, H62, H63, H64, H65, H102
L24, L27, L28, L32, L53, L56, L90, L92, L94.

Отримання залежного від рН зв'язувального scFv з бібліотеки шляхом пенінгу на колонці

Жодних клонів, що мали сильну залежну від рН зв'язувальну здатність не отримали внаслідок типового пенінгу із використанням іммобілізованого на магнітних гранулах антигену. Це може бути наслідком наступних причин. У пенінгу із використанням антигену, іммобілізованого на магнітних гранулах або на планшеті, зібрали усі фаги, що відокремилися від магнітних гранул або планшета при кислотних умовах. Отже, фагові клони, які мають слабку залежність від рН та які відновлюються разом, зменшують подібність того, що клони, які мають сильну залежність від рН, включаються у кінцеві концентровані клони.

Отже, пенінг із використанням колонки з іммобілізованим антигеном використовували як більш точний спосіб пенінгу (Фіг. 5). Нема жодних попередніх повідомлень щодо отримання клонів, які мають залежну від рН зв'язувальну здатність, шляхом використання пенінгу на колонці з іммобілізованим антигеном. У пенінгу із використанням колонки з іммобілізованим антигеном, коли фаги, які зв'язалися за нейтральними умовами, елюються за кислотними умовами, тоді клони, які мають слабку залежність від рН, знов зв'язуються з антигеном усередині колонки та, внаслідок цього, менше елюються, зумовлюючи вибіркоче елювання з колонки клонів з більш сильною залежністю від рН, які менше зв'язуються усередині колонки. Крім того, хоча "усі" фаги, що відокремилися за кислотними умовами, відновлюються при пенінгу із використанням антигену, іммобілізованого на магнітних гранулах або планшеті, пенінг із використанням колонки з іммобілізованим антигеном дозволяє вибірково відновлювати фаги, які мають сильну залежну від рН зв'язувальну здатність, дозволяючи кислотному буферу протікати крізь колонку, щоб розпочати елювання та відновлення тільки "відповідних фракцій".

По-перше, приготували колонку, у якій антиген SR344 був іммобілізований. 200 мкл Streptavidin Sepharose (GE Healthcare) промили 1 мл PBS, суспендували у 500 мкл PBS та дозволили контактувати з 400 пмоль міченого біотином SR344 протягом 1 години при кімнатній температурі. Після цього порожню колонку (Amersham Pharmacia Biotech) наповнили вищевказаною сефарозою та промили приблизно 3 мл PBS. Вищезазначену

PEG-осаждену бібліотеку фагів розвели до 1/25 із застосуванням 0,5 % BSA-PBS (рН 7,4), пропустили крізь фільтр 0,45 мкм, а потім додали до колонки. Після промивання приблизно 6 мл PBS (рН 7,4), дозволили 50 мМ MES-NaCl (рН 5,5) протікати крізь колонку, щоб елювати антитіла, які відокремилися за низьким рН. Зібрали відповідні елюовані фракції та відновлений фаговий розчин додали до 10 мл XLI-Blue (OD600 0,4-0,5) у логарифмічній фазі зростання та дозволили настоюватися протягом 30 хвилин при 37 °C.

Інфіковані *E. coli* нанесли на планшет 225 мм × 225 мм, що містив 2YT, 100 мкг/мл ампіциліну та 2 % глюкози. Ці *E. coli* використовували для того, щоб започаткувати додаткову фагову культуру за таким самим способом, як описано вище, та пенінг повторювали 6 разів.

Оцінка шляхом фагового ЕЛАЙЗА

Отримані фаги оцінили шляхом фагового ЕЛАЙЗА. Клони, які, як визначили, мали сильну залежність від рН, піддали секвенуванню із використанням специфічних праймерів. Внаслідок цього отримали декілька клонів, що демонстрували сильну залежність зв'язування від рН порівняно з клонами природного типу. Як показано на Фіг. 6, визначили, що клон CLH5 (Н-ланцюг: CLH5, Л-ланцюг: CLL5) (CLH5:амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 5, CLL5:амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 8) демонстрував особливо сильне залежне від рН зв'язування порівняно з антитілом природного типу. Тим самим підтвердили, що антитіла, які демонструють сильне залежне від рН зв'язування, які при цьому не можна отримати шляхом типового пенінгу із використанням антигену, іммобілізованого на магнітних гранулах, можна отримати шляхом пенінгу із використанням колонки з іммобілізованим антигеном. Отже, визначили, що пенінг із використанням колонки з іммобілізованим антигеном є надзвичайно ефективним способом

отримання з бібліотеки антитіл з залежним від рН зв'язуванням. Проаналізували амінокислотні послідовності клонів, що демонструють залежне від рН зв'язування, та позиції, де гістидин був присутнім з високою ймовірністю у концентрованих клонах, наведено у Таблиці 4.

Таблиця 4. Позиції заміщення гістидином, визначені за допомогою фагової бібліотеки (пенінг на колонці)

H31, H50, H58, H62, H63, H65, H100b, H102

L24, L27, L28, L32, L53, L56, L90, L92, L94

Приклад 4. Експресія та очищення модифікованого гістидином гуманізованого антитіла проти рецептора IL-6

Одержання, експресія та очищення вектора експресії модифікованого гістидином гуманізованого антитіла проти рецептора IL-6

Для того, щоб перетворити клони, які демонструють сильну залежність від рН у фаговому ЕЛАЙЗА до IgG, ампліфікували VH та VL, відповідно, шляхом ПЛР, перетравили XhoI/NheI та EcoRI та вставили у вектор експресії для клітин ссавців. Нуклеотидну послідовність кожного фрагмента ДНК визначили за способом, відомим фахівцям у цій галузі. CLH5/L73, у якому CLH5 використовували для важкого ланцюга, а L73, отриманий у Прикладі 2, використовували для легкого ланцюга, експресували та очистили як IgG. Експресію та очищення здійснювали за способом, описаним у Прикладі 1.

Антитіло, що має навіть більш високу залежність від рН, отримали шляхом комбінування ділянок мутації. На основі позицій, де His концентрувався у фаговій бібліотеці, а також на основі інформації про структуру тощо, замінили гістидином H32, H58, H62 та H102 у H3pl, який отримали як важкий ланцюг у Прикладі 2, а H95 та H99 далі замінили валіном та ізолейцином, відповідно, внаслідок чого отримали H170 (SEQ ID NO: 4). Цей варіант одержання здійснювали за способом, описаним у Прикладі 1. Крім того, L82 (SEQ ID NO: 7) отримали, замінивши 28-й гістидин L73, який отримали як легкий ланцюг у Прикладі 2, аспарагіною кислотою. Цей варіант одержання здійснювали за способом, описаним у Прикладі 1. H170/L82, у якому H170 використовували для важкого ланцюга, а L82 використовували для легкого ланцюга, експресували та очищували як IgG, використовуючи спосіб описаний у Прикладі 1.

Приклад 5. Оцінка IL-6R-нейтралізуючої активності залежного від рН зв'язувального антитіла

Оцінка нейтралізуючої активності клонів, перетворених в IgG, стосовно рецептора IL-6 людини

Оцінили нейтралізуючу активність стосовно рецептора IL-6 чотирьох антитіл: гуманізованого антитіла PM1 (природного типу) та H3pl/L73, CLH5/L73 та H170/L82, отриманих у Прикладах 2 та 4.

Більш специфічно, нейтралізуючу активність стосовно рецептора IL-6 визначили із використанням BaF3/gpl30, що демонструють залежне від рецептора IL-6/IL-6 зростання. BaF3/gpl30 промили тричі середовищем RPMI1640, що містило 10 % FBS, потім суспендували при 5×10^4 клітин/мл у середовищі RPMI1640, що містило 60 нг/мл інтерлейкіну-6 людини (Toyaу), 60 нг/мл рекомбінантного розчинного рецептора IL-6 людини (SR344) та 10 % FBS. 50 мкл суспензії помістили у кожну комірку планшета з 96 комірками (Corning). Після цього очищене антитіло розвели RPMI1640, що містило 10 % FBS, та 50 мкл антитіла підмішали до кожної комірки. Після культивування протягом 3 днів при 37 °C та в умовах 5 % CO₂ реагент WST-8 (Cell Counting Kit-8, Dojindo

Laboratories), розведений удвічі PBS, додали по 20 мкл/комірку, а потім негайно вимірили поглинання при 450 нм (контрольна довжина хвилі: 620 нм), використовуючи Sunrise Classic (Tecan). Після культивування протягом 2 годин знов вимірили поглинання при 450 нм (контрольна довжина хвилі: 620 нм). Нейтралізуючу активність стосовно рецептора IL-6 оцінювали на основі зміни поглинання після 2 годин. Внаслідок цього, як показано на Фіг. 7, було продемонстровано, що H3pl/L73, CLH5/L73 та H170/L82 мали еквівалентну біологічну нейтралізуючу активність порівняно з гуманізованим антитілом PM1 (природного типу).

Приклад 6. Аналіз антитіла, що зв'язується залежним від рН чином, з використанням Biacore

Аналіз зв'язування клонів, що зв'язуються залежним від рН чином, з розчинним рецептором IL-6

Аналіз кінетики реакцій антиген-антитіло при рН 5,8 та рН 7,4 здійснювали, використовуючи Biacore T100 (GE Healthcare), на чотирьох антитілах: гуманізованому антитілі PM1 (природного типу) та H3pl/L73, CLH5/L73 та H170/L82, які отримали у Прикладах 2 та 4 (буфер: 10 mM MES (рН 7,4 або рН 5,8), 150 mM NaCl та 0,05 % Tween 20). Різні антитіла зв'язувалися на сенсорному чипі з іммобілізованим рекомбінантним білком A/G (Pierce) шляхом амінного з'єднання. SR344, доведений до концентрації від 9,8 до 400 нМ, випорснули на чип, як аналітичний зразок. Асоціацію та відокремлення клонів, що зв'язуються залежним від рН чином

з SR344, спостерігали у реальному часі (Фіг. 8 та 9). Усі вимірювання виконували при 37 °С. Константи швидкості асоціації k_a (1/Мс) та константи швидкості дисоціації k_d (1/с) розраховували, використовуючи програмне забезпечення Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare), а константи дисоціації KD (М) розраховували на основі цих значень (Таблиця 5).

Крім того, відношення афінності при pH 5,8 та pH 7,4 розраховували для кожного клону, внаслідок чого визначили залежне від pH зв'язування. Усі вимірювання виконували при 37 °С.

Внаслідок розрахунку відношення афінності між pH 5,8 та pH 7,4 для кожного клону визначили, що залежне від pH зв'язування (афінність) H3pl/L73, H170/L82 та CLH5/L73 з SR344 перебільшувало у 41 раз, 394 разів та 66 разів, відповідно, порівняно із зв'язуванням антитіла природного типу (WT), при цьому кожен демонстрував залежне від pH зв'язування, яке перебільшувало більш ніж у 15 разів зв'язування антитіла природного типу.

Ще не повідомлялося про антитіла проти рецептора IL-6, які б сильно зв'язувалися з антигеном при pH 7,4 плазми, проте слабо зв'язувалися б з антигеном при внутрішньоендосомному pH від 5,5 до 6,0. У цьому дослідженні отримали антитіла, які зберігають біологічну нейтралізуючу активність, що є еквівалентною активності гуманізованого антитіла природного типу проти рецептора IL-6, та афінність при pH 7,4, проте демонструють афінність при pH 5,8, яка є специфічно зниженою більш ніж у 10 разів.

Таблиця 5

Порівняння зв'язування клонів, що зв'язуються залежним від pH чином, спрямованих проти SR344, з розчинним рецептором IL-6

	pH7.4			pH5.8			
	$k_a(1/Мс)$	$k_d(1/с)$	KD(М)	$k_a(1/Мс)$	$k_d(1/с)$	KD(М)	KD(pH5.8)/KD(pH7.4)
WT	5.1E+05	1.0E-03	2.1 E-09	7.6E+05	3.8E-03	5.0E-09	2.4
H3pl/L73	5.4E+05	7.4E-04	1.4E-09	1.7E+05	9.7E-03	5.7E-08	41.3
H170/L82	6.8E+05	1.1E-03	1.6E-09	2.6E+04	1.7E-02	6.4E-07	393.5
CLH5/L73	7.1 E+05	7.9E-04	1.1 E-09	3.8E+05	2.8E-02	7.4E-08	66.1

Аналіз зв'язування клонів, що зв'язуються залежним від pH чином, з мембранним рецептором IL-6

Реакції антиген-антитіло з мембранним рецептором IL-6 при pH 5,8 та pH 7,4 спостерігали для вищеотриманих клонів, що зв'язуються залежним від pH чином, використовуючи Biacore T100 (GE Healthcare). Зв'язування з мембранним рецептором IL-6 оцінювали шляхом визначення зв'язування з рецептором IL-6, іммобілізованим на сенсорному чипі. SR344 піддали біотинілуванню згідно зі способом, відомим фахівцям у цій галузі, та біотинілований SR344 іммобілізували на сенсорному чипі стрептавідином, використовуючи афінність між стрептавідином та біотином. Усі вимірювання здійснювали при 37 °С, та буфер рухомої фази містив 10 mM MES (pH 5,8), 150 mM NaCl та 0,05 % Tween 20. Клони, що зв'язуються залежним від pH чином, випорснули при умові pH 7,4, та дозволили зв'язатися з SR344 (буфер для випорскування зразка: 10 mM MES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20), та спостерігали залежну від pH відокремлення кожного клону при pH 5,8 рухомої фази (Фіг. 10).

Швидкість дисоціації ($k_d(1/с)$) при pH 5,8 розраховували, використовуючи програмне забезпечення Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare), шляхом приведення у відповідність тільки відокремленої фази при pH 5,8, де 0,5 мкг/мл зразка зв'язалися у 10 mM MES (pH 7,4), 150 mM NaCl та 0,05 % Tween 20 та відокремилися у 10 mM MES (pH 5,8), 150 mM NaCl та 0,05 % Tween 20. Подібно до цього швидкість дисоціації ($k_d(1/с)$) при pH 7,4 розраховували, використовуючи програмне забезпечення Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare), шляхом приведення у відповідність тільки відокремленої фази при pH 7,4, де 0,5 мкг/мл зразка зв'язалися у 10 mM MES (pH 7,4), 150 mM NaCl та 0,05 % Tween 20 та відокремилися у 10 mM MES (pH 7,4), 150 mM NaCl та 0,05 % Tween 20. Константу залежної від pH швидкості дисоціації для кожного клону наведено у Таблиці 6.

Таблиця 6

Порівняння константи швидкості дисоціації клонів, що зв'язуються залежним від pH чином, спрямованих проти SR344, що походить від мембранного рецептора IL-6

	kd (1/s)		Відношення kd
	pH7.4	pH5.8	pH5.8/pH7.4
WT	4.84E-04	7.15E-04	1.5
H3pIL 73	3.44E-04	3.78E-03	11.0
H170/L82	7.70E-04	1.44E-03	1.9
CLH5/L73	1.04E-03	5.67E-03	5.5

Найвищу залежність швидкості дисоціації від pH спостерігали у H3p/L73, потім у CLH5/L73 та H170/L82 у порядку зниження, та кожен клон демонстрував більш високе залежне від pH відокремлення від мембранного рецептора IL-6 порівняно з антитілом природного типу. Проте, ступінь залежних від pH асоціації/відокремлення різнився між розчинним рецептором IL-6 та мембранним рецептором IL-6. Виявили, що H170/L82, який демонстрував найвищий ступінь залежного від pH зв'язування в аналізі зв'язування з розчинним рецептором IL-6, демонстрував найнижчий ступінь залежного від pH зв'язування у аналізі зв'язування з мембранним рецептором IL-6. Взагалі, відомо, що коли молекули IgG одновалентно зв'язуються з розчинним антигеном (афінність), вони бівалентно зв'язуються з мембранними антигенами (авідність). Припускають, що ця різниця у режимі зв'язування між розчинними антигенами та мембранними антигенами впливала на залежне від pH зв'язування H170/L82.

Приклад 7. Підтвердження багаторазового зв'язування з антигеном антитіла, що зв'язується залежним від pH чином

Як описано у Прикладі 2, антитіла, що зв'язуються залежним від pH чином, можуть бути здатними зв'язуватися з антигенами багато разів. Специфічно, антитіло, що зв'язується залежним від pH чином, яке зв'язалося з антигеном, неспецифічно захоплюється в ендосоми, проте відокремлюється від розчинного антигену за внутрішньоендосомними кислотними умовами. Антитіло зв'язується з FcRn та, тим самим, повертається до плазми. Оскільки антитіло, що повернулося до плазми, не зв'язане з антигеном, то воно здатне зв'язуватися з антигенами багато разів. Повторення цього процесу дозволяє антитілам, що зв'язуються залежним від pH чином, зв'язуватися з антигенами багато разів. Проте, для антитіл IgG, які не мають залежної від pH зв'язувальної здатності, не усі антигени відокремлюються від антитіл за внутрішньоендосомними кислотними умовами. Отже, такі антитіла, що повернулися до плазми за допомогою FcRn, залишаються зв'язаними з антигеном та, внаслідок цього, не можуть зв'язуватися з новими антигенами. Внаслідок цього, майже в усіх випадках кожна єдина молекула антитіла IgG є здатною нейтралізувати тільки два антигени (у випадку бівалентного зв'язування).

Отже, було визначено, чи були здатними три антитіла (H3p/L73, CLH5/L73 та H170/L82), які зв'язуються залежним від pH чином та які побудовано у Прикладах 2 та 4, зв'язуватися з антигеном SR344 багато разів порівняно з гуманізованим антитілом PM1 (природного типу, WT).

Використовували Biotac (GE Healthcare) для визначення того, що антитіла, які зв'язуються при pH 7,4 та відокремлюються при pH 5,8, були здатними зв'язуватися з антигеном багато разів. Антитіло, яке слід оцінити, зв'язали з іммобілізованим на сенсорному чипі рекомбінантним білком A/G (Pierce) за допомогою способу амінного з'єднання та дозволили рухомій фазі з pH 7,4 текти (етап 1). Розчину SR344, відрегульованому до pH 7,4, потім дозволили текти як аналітичному зразку, щоб зв'язати SR344 з антитілом при pH 7,4 (етап 2). Це зв'язування при pH 7,4 моделює зв'язування антигену у плазмі. Після цього буфер, доведений до pH 5,8, самостійно (не містив SR344) додали як аналітичний зразок, для того щоб піддати зв'язок антигену з антитілом дії кислотних умов (етап 3). Це відокремлення при pH 5,8 моделює стан зв'язування комплексів антиген-антитіло в ендосомах. Після цього етап 2 повторили. Це моделює повторне зв'язування антитіла, яке повернулося до плазми за допомогою FcRn, з новим антигеном. Після цього етап 2 повторили, щоб піддати комплекс антиген-антитіло дії кислотних умов. Повторювання "етапу 2 - етапу 3" багато разів при 37 °C, як описано вище, може моделювати стан *in vivo*, при якому антитіла багато разів захоплюються з плазми в ендосоми шляхом піноцитозу та повертаються до плазми за допомогою FcRn (Nat. Rev. Immunol. 2007 Sep; 7(9): 715-25).

Отримані клони, які зв'язуються залежно від рН та які описано вище, проаналізували, використовуючи Biacore T100 (GE Healthcare), стосовно їх здатності зв'язуватися з антигеном SR344 багато разів при рН 5,8 та рН 7,4. Більш специфічно, аналіз здійснювали наступним способом. Усі вимірювання виконували при 37 °С. По-перше, антитіла-зразки, описані вище, зв'язали на сенсорному чипі з іммобілізованим рекомбінантним білком A/G (Pierce) шляхом амінного з'єднання, де буфер рухомої фази був наступним: 10 мМ MES (рН 5,8), 150 мМ NaCl та 0,05 % Tween 20 (етап 1). SR344, доведений до концентрації приблизно 40 нМ, випорскували як аналітичний зразок протягом 3 хвилин при рН 7,4 та дозволили зв'язуватися (буфер для випорскування SR344 був наступним: 10 мМ MES (рН 7,4), 150 мМ NaCl та 0,05 % Tween 20) (етап 2). Після цього випорскування SR344 припинили та дозволили рухомій фазі з рН 5,8 текти протягом приблизно 70 секунд, щоб піддати комплекс аНТНТмо/SR344 дії кислотних умов (етап 3). Цей процес зв'язування (етап 2)/піддавання дії кислотних умов (етап 3) повторювали десять разів безперервно, внаслідок чого спостерігали сенсор граму у реальному часі, яку зображено на Фіг. 11. Антитіло природного типу демонструвало менший ступінь відокремлення SR344 під час дії кислотних умов на етапі 3, та, внаслідок цього, пропорція антитіла, здатного зв'язуватися з новими антигенами після етапу 2, була надзвичайно низькою. Навпаки, визначили, що клони, які зв'язуються залежно від рН, особливо H170/L82 та CLH5/L73, демонстрували настільки сильне відокремлення протягом дії кислотних умов на етапі 3, що більша частина зв'язаного SR344 відокремилася, та, отже, майже усі антитіла були здатними зв'язуватися з новими антигенами після етапу 2. Під час 10-разового повторення зв'язування (етапу 2) та дії кислотних умов (етапу 3) майже усі антитіла H170/L82 та CLH5/L73 були здатними зв'язуватися з новими антигенами у кожному повторі.

Отримані сенсорграми використовували для розрахунку зв'язувальної кількості SR344 у кожному повторі етапів 2 та 3 для кожного зразка із використанням програмного забезпечення Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare). Сумарні значення в залежності від часу 10 повторів етапів 2 та 3 наведено на Фіг. 12. Сумарні значення RU, отримані на 10-му повторі етапів 2 та 3 дорівнюють загальній кількості антигенів, що зв'язалися під час 10 циклів. Клони, що зв'язуються залежно від рН, особливо H170/L82 та CLH5/L73, демонстрували найбільшу загальну кількість зв'язаних антигенів порівняно з антитілом природного типу, та було продемонстровано, що вони здатні неодноразово зв'язуватися з приблизно у 4 рази більшою кількістю антигенів, ніж кількість антигенів, зв'язаних антитілом природного типу. Отже, було виявлено, що, надаючи антитілу природного типу здатності зв'язуватися залежно від рН, такі антитіла можуть неодноразово зв'язуватися з антигенами та, як слідство, нейтралізувати численні антигени.

Приклад 8. Тестування ФК/ФД антитіла, що зв'язується залежно від рН, із використанням трансгенних мишей з рецептором IL-6 людини

Рецептори IL-6 присутні у тілі як у формі розчинного рецептора IL-6, так і у формі рецептора IL-6 мембранного типу (Nat. Clin. Pract. Rheumatol. 2006 Nov; 2(11): 619-26). Антитіла проти рецептора IL-6 зв'язуються з розчинними рецепторами IL-6 та рецепторами IL-6 мембранного типу та нейтралізують їхню біологічну активність. Вважають, що антитіло проти рецептора IL-6 зв'язується з рецептором IL-6 мембранного типу, потім захоплюється в ендосому усередині клітини шляхом інтерналізації, при цьому антитіло зберігає зв'язок з рецептором IL-6 мембранного типу, а потім рухається до лізосоми, продовжуючи зберігати зв'язок з рецептором IL-6 мембранного типу, де воно руйнується лізосомою разом з рецептором IL-6 мембранного типу. Якщо H3p1/L73, CLH5/L73 та H170/L82 які є проаналізованими у Прикладі 6 антитілами проти рецептора IL-6, що зв'язуються залежно від рН, є здатними повертатися до плазми за допомогою FcRn внаслідок відокремлення за кислотними умовами усередині ендосом, то ці антитіла, що повернулися до плазми, можуть знов зв'язуватися з антигенами. Це зумовлює нейтралізацію численних рецепторів IL-6 мембранного типу єдиною молекулою антитіла. Чи є повернення до плазми за допомогою FcRn наслідком відокремлення за кислотними умовами усередині ендосом побудованих антитіл проти рецептора IL-6, які зв'язуються залежно від рН, чи ні, можна визначити шляхом оцінювання, чи покращилася фармакокінетика цих антитіл порівняно з фармакокінетикою антитіл природного типу.

Отже, фармакокінетику у трансгенних мишей з рецептором IL-6 людини (миші hIL-6R tg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995 May 23; 92(11): 4862-6) визначали для чотирьох типів антитіл, а саме: гуманізованого антитіла PM1 (антитіла природного типу, WT) та H3p1/L73, CLH5/L73 та H170/L82, побудованих у Прикладах 2 та 4. WT, H3p1/L73, CLH5/L73 або H170/L82 ввели шляхом внутрішньовенної ін'єкції у вигляді єдиної дози мишам hIL-6R tg у дозі 25 мг/кг, а зразки крові узяли до ведення та після певного періоду часу. Узяті кров негайно центрифугували протягом 15 хвилин при 15000 обертів за хвилину при 4 °С, внаслідок чого отримали плазму.

Відокремлену плазму зберігали у морозильнику при температурі -20°C або нижче, доки не розпочали здійснювати вимірювання.

Вимірювання концентрації у мишачій плазмі здійснювали шляхом ЕЛАЙЗА. Зразки для калібрувальної кривої приготували при наступних значеннях концентрації у плазмі: 6,4, 3,2, 1,6, 0,8, 0,4, 0,2 та 0,1 мкг/мл. Зразки для калібрувальної кривої та зразки для вимірювання у мишачій плазмі помістили в імунопланшет (Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp (Nalge Nunc International)) з іммобілізованим F(ab')₂ проти людського IgG (специфічний до γ -ланцюга) (Sigma) та залишили відстоюватися, не турбуючи його, протягом 1 години при кімнатній температурі. Козлячому анти-людському IgG-BIOT (Southern Biotechnology Associates) та кон'югату стрептавідин-лужна фосфатаза (Roche Diagnostics) дозволили після цього реагувати та здійснювали хромогенну реакцію, використовуючи систему BluePhos Microwell Phosphatase Substrates System (Kirkegaard & Perry Laboratories) як субстрат. Поглинання при 650 нм вимірювали за допомогою апарата для читання мікропланшетів. Концентрації у мишачій плазмі розраховували за поглинання за калібрувальною кривою, використовуючи аналітичне програмне забезпечення SOFTmax PRO (Molecular Devices). Зміну за частоту концентрацій у плазмі для антитіла природного типу (WT), а також для H3pl/L73, CLH5/L73 та H170/L82 наведено на Фіг. 13.

Фармакокінетика покращилася для усіх з H3pl/L73, CLH5/L73 та H170/L82 порівняно з антитілом природного типу. Зокрема, фармакокінетика H3pl/L73 та CLH5/L73 покращилася суттєво. Антитіло природного типу проти рецептора IL-6, зв'язане з рецептором IL-6 мембранного типу, залучається в ендосому усередині клітини шляхом інтерналізації, рухається до лізосоми, зберігаючи при цьому зв'язок з антигеном, а потім руйнується; отже, воно має короткий період перебування у плазмі. На відміну від цього, оскільки фармакокінетика антитіл проти рецептора IL-6, які зв'язуються залежно від рН, покращилася суттєво, вважають, що антитіла проти рецептора IL-6, які зв'язуються залежно від рН, повертаються знов до плазми за допомогою FcRn внаслідок відокремлення від антигену, рецептора IL-6 мембранного типу, за кислотними умовами усередині ендосом.

Незважаючи на те, що фармакокінетика покращилася для усіх з H3pl/L73, CLH5/L73 та H170/L82 порівняно з антитілом природного типу, ефект пролонгованого періоду присутності у плазмі H170/L82 був слабкішим порівняно з ефектом H3pl/L73 та CLH5/L73. Оскільки вважають, що молекули IgG зазвичай зв'язуються бівалентно зі зв'язаним з мембраною антигеном, вважають, що антитіла проти рецептора IL-6 також зв'язуються бівалентно (авідність) з рецепторами IL-6 мембранного типу, а потім вони інтерналізуються. Як показано у Прикладі 6, аналіз із використанням Віасоге виявив, що H170/L82 швидко відокремлювався від рецептора IL-6 при рН 5,8 під час зв'язування з розчинним рецептором IL-6 (Фіг. 9), проте швидкість його відокремлення від рецептора IL-6 при рН 5,8 під час зв'язування з рецептором IL-6 мембранного типу була надзвичайно повільною (Фіг. 10). Виходячи з цього, вважають, що причина слабого ефекту пролонгації періоду присутності у плазмі H170/L82 полягає у тому, що антитіло було нездатним адекватно відокремлюватися усередині ендосом після його інтерналізації, що є наслідком його повільного відокремлення при рН 5,8 під час зв'язування з рецептором IL-6 мембранного типу. А саме, щодо випадку стосовно мембранних антигенів, визначили, що для того, щоб єдина молекула IgG нейтралізувала численні мембранні антигени, рН-залежність відокремлення для бівалентного зв'язування (авідність) є більш важливою порівняно з рН-залежністю для одновалентного зв'язування (афінність).

Приклад 9. Тестування ФК/ФД антитіла, що зв'язується залежно від рН, із використанням мавп сунотоглус

Оскільки фармакокінетика антитіл проти рецептора IL-6, що зв'язуються залежно від рН, покращилася суттєво у Прикладі 8, то вважали, що антитіла проти рецептора IL-6, які зв'язуються залежно від рН, повертаються до плазми за допомогою FcRn внаслідок відокремлення від антигену, рецептора IL-6 мембранного типу, при кислотних умовах усередині ендосом. Якщо антитіла, що повернулися до плазми, можуть зв'язуватися знов з рецепторами IL-6 мембранного типу, то вважають, що нейтралізація антигену, рецептора IL-6 мембранного типу, антитілами проти рецептора IL-6, які зв'язуються залежно від рН, триває довше для такої ж самої дози порівняно з антитілами природного типу проти рецептора IL-6. Крім того, оскільки розчинний рецептор IL-6 також присутній серед рецепторів IL-6, то вважають, що нейтралізація антигену триває довше для такої ж самої дози також і у відношенні розчинних рецепторів IL-6.

Фармакокінетику у мавп сунотоглус оцінювали для антитіла природного типу та для H3pl/L73. Антитіло природного типу або H3pl/L73 ввели мавпам сунотоглус шляхом внутрішньовенної ін'єкції у вигляді єдиної дози 1 мг/кг, та зразки крові брали до ведення та з часом. Узяті кров негайно центрифугували протягом 15 хвилин при 15000 обертів за хвилину

при 4 °С, внаслідок чого отримали плазму. Відокремлену плазму зберігали у морозильнику при температурі -20 °С або нижче, доки не розпочали здійснювати вимірювання.

Вимірювання концентрації у плазмі мавп сунотоглус здійснювали шляхом ЕЛАЙЗА. По-перше, фрагмент F(ab')₂ антитіла проти людського IgG (специфічний до γ-ланцюга) (Sigma) помістили у імунопланшет (Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp (Nalge Nunc International)) та залишили відстоюватися, не турбуючи його, протягом ночі при 4 °С, внаслідок чого отримали планшети з іммобілізацією проти людського IgG. Приготували зразки для калібрувальної кривої, що мали наступні значення концентрації у плазмі: 3,2, 1,6, 0,8, 0,4, 0,2, 0,1 та 0,05 мкг/мл, та приготували зразки для вимірювання у плазмі мавп сунотоглус, розведені у 100 разів; 200 мкл 20 нг/мл IL-6R мавп сунотоглус додали до 100 мкл зразків для калібрувальної кривої та зразків для вимірювання у плазмі; а потім їм дозволили відстоюватися, не турбуючи їх, протягом 1 години при кімнатній температурі. Після цього зразки помістили в планшет з іммобілізацією проти людського IgG та дозволили відстоюватися, не турбуючи їх, протягом ще 1 години при кімнатній температурі. Біотинілованому антитілу проти IL-6R людини (R&D) дозволили вступати в реакцію протягом 1 години при кімнатній температурі, а потім дозволили реагувати протягом 1 години з стрептавідин-По1уHKP80 (Stereospecific Detection Technologies). Хромогенну реакцію здійснювали, використовуючи TMP One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories) як субстрат, потім реакцію припинили IN сірчаною кислотою (Showa Chemical) та вимірювали поглинання при 450 нм за допомогою апарата для читання мікропланшетів. Концентрації у плазмі мавп сунотоглус розраховували з поглинання за калібрувальною кривою із використанням аналітичного програмного забезпечення SOFTmax PRO (Molecular Devices). Зміну за часом концентрацій у плазмі для антитіла природного типу та для H3pl/L73 після внутрішньовенного введення зображено на Фіг. 14. Як наслідок, фармакокінетика H3pl/L73 суттєво покращилася порівняно з фармакокінетикою антитіла природного типу у мавп сунотоглус у такий самий спосіб, що і у випадку трансгенних мишей з рецептором IL-6 людини. Оскільки фармакокінетика антитіла проти рецептора IL-6, яке зв'язується залежно від pH, H3pl/L73, покращилася суттєво, то вважали, що H3pl/L73 повертається до плазми за допомогою FcRn внаслідок відокремлення від антигену, рецептора IL-6 мембранного типу, при кислотних умовах усередині ендосом.

Для того, щоб оцінити ступінь, до якого рецептор IL-6 мембранного типу мавп сунотоглус нейтралізується внаслідок внутрішньовенного введення антитіла природного типу та H3pl/L73, досліджували вплив зразків антитіл на С-реактивний білок плазми (CRP), індукований IL-6 мавп сунотоглус. Оскільки CRP вивільняється, коли IL-6 зв'язується з рецепторами IL-6 мембранного типу, то CRP служить індикатором нейтралізації рецепторів IL-6 мембранного типу. IL-6 мавп сунотоглус (супо.IL-6, отриманий у Прикладі 1), що містив 1 % інактивовану плазму мавп сунотоглус, вводили підшкірно у нижню частину спини тварин щоденно по 5 мкг/кг з третього по десятий день після введення антитіла природного типу або H3pl/L73. Зразки крові узяли з підшкірної вени мавп сунотоглус безпосередньо перед початком введення IL-6 (день 3) та після введення з інтервалами у 24 години (з 4-го по 11-й день), а потім відокремили плазму. Концентрації CRP окремих тварин вимірювали за допомогою Cias R CRP (Kanto Chemical), використовуючи автоматичний аналізатор (TBA-120FR, Toshiba Medical Systems). Зміна за часом концентрації CRP після введення IL-6 сунотоглус стосовно антитіла природного типу та H3pl/L73 наведена на Фіг. 15. Внаслідок цього тривалість пригнічення CRP була суттєво подовжена H3pl/L73 порівняно з антитілом природного типу. На основі цих результатів вважали, що антитіло проти рецептора IL-6, яке зв'язується залежно від pH, H3pl/L73, повертається до плазми за допомогою FcRn внаслідок відокремлення його від антигену, рецептора IL-6 мембранного типу, при кислотних умовах усередині ендосом; та воно нейтралізує рецептор IL-6 мембранного типу, знов зв'язуючись з ним; та тим самим пригнічує виробництво CRP протягом більш тривалого періоду часу порівняно з антитілом природного типу. Інакше кажучи, було продемонстровано, що єдина молекула антитіла H3pl/L73 здатна зв'язуватися з рецепторами IL-6 мембранного типу та нейтралізувати їх більш ніж один раз. Оскільки тривалість пригнічення виробництва CRP H3pl/L73 подовжується порівняно з тривалістю пригнічення антитілом природного типу, то було показано, що тривалість часу, коли антиген, рецептор IL-6 мембранного типу, зв'язується антитілами, подовжується для H3pl/L73 порівняно з антитілом природного типу.

Для того, щоб оцінити ступінь, до якого розчинний рецептор IL-6 мавп сунотоглус нейтралізується внаслідок внутрішньовенного введення антитіла природного типу та H3pl/L73, вимірили концентрацію незв'язаного розчинного рецептора IL-6 мавп сунотоглус у плазмі мавп сунотоглус. Усі антитіла типу IgG (IgG мавп сунотоглус, антитіло проти людського рецептора IL-6, та комплекс антитіла проти людського рецептора IL-6 та розчинного рецептора IL-6 мавп сунотоглус), що є присутніми у плазмі, адсорбували на Білок А шляхом додавання 30 мкл

плазми мавп *synomolgus* до відповідної кількості полімеру rProtein A Sepharose Fast Flow (GE Healthcare), висушеного у 0,22 мкм фільтрувальній чашці (Millipore). Після зупинення високошвидкісної центрифуги відновили розчин, який пройшов наскрізь (далі позначається "розчин, що пройшов"). Оскільки розчин, що пройшов, не містить комплекс антитіла проти рецептора IL-6 людини та розчинного рецептора IL-6 мавп *synomolgus*, який зв'язується з білком А, то концентрацію незв'язаного розчинного рецептора IL-6 можна вимірити шляхом вимірювання концентрації розчинного рецептора IL-6 мавп *synomolgus* у розчині, що пройшов. Моноклональне антитіло проти IL-6R людини (R&D), мічене рутенієм за допомогою Sulfo-Tag NHS Ester (Meso Scale Discovery), та біотинізоване антитіло проти IL-6R людини (R&D) змішали зі зразками для калібрувальної кривої рецептора IL-6 мавп *synomolgus*, концентрацію яких довели до 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125 та 62,5 пг/мл, та зразки плазми обробили Білком А, як описано вище. Сумішам дозволили реагувати протягом 1 години при кімнатній температурі. Після цього суміші помістили у планшет з 96 комітками SA-Coated Standard MA2400 (Meso Scale Discovery). Після реакції протягом ще однієї години та промивання, помістили Read Buffer T (x4) (Meso Scale Discovery). Одразу після цього виконали вимірювання за допомогою Sector Imager 2400 (Meso Scale Discovery). Концентрації рецептора IL-6 мавп *synomolgus* розраховували з даних калібрувальної кривої із використанням аналітичного програмного забезпечення SOFTmax PRO (Molecular Devices). Зміна за часом концентрацій незв'язаного розчинного рецептора IL-6 мавп *synomolgus* для антитіла природного типу та H3pl/L73 наведено на Фіг. 16. Внаслідок цього тривалість нейтралізації розчинного рецептора IL-6 мавп *synomolgus* за допомогою H3pl/L73 було суттєво подовжено порівняно з антитілом природного типу. На основі цього результату вважали, що антитіло проти рецептора IL-6, яке зв'язується залежно від рН, H3pl/L73, відокремлюється від антигену, розчинного рецептора IL-6, при кислотних умовах в ендосомах; та воно повертається до плазми за допомогою FcRn; та зв'язується з розчинним рецептором IL-6 та знов нейтралізує його.

Оскільки тривалість пригнічення незв'язаного розчинного рецептора IL-6 мавп *synomolgus* за допомогою H3pl/L73 подовжується порівняно з пригніченням антитілом природного типу, то було вказано, що тривалість часу, коли антиген, розчинний рецептор IL-6, зв'язується антитілами, подовжується для H3pl/L73 порівняно з антитілом природного типу.

Ці результати вказують на те, що час, доки антитіло не зникає з плазми, а також час, коли розчинний та мембранний рецептори IL-6 зв'язуються антитілом в організмі, суттєво подовжився для антитіл проти рецептора IL6, які зв'язуються залежно від рН, які було розроблено для сильного зв'язування з антигеном при рН 7,4, яке є рН у плазмі, але для слабкого зв'язування з антигеном при рН 5,8, яке є рН усередині ендосом, порівняно з антитілом природного типу проти рецептора IL-6. Це дозволяє зменшити дозу та частоту введення пацієнтам, та, як слідство, загальну дозу введення. Отже, вважають, що антитіло проти рецептора IL-6, яке зв'язується залежно від рН, є особливо переважним як фармацевтичний препарат для використання як антагоніста IL-6.

Приклад 10. Покращення залежного від рН зв'язування з рецептором IL-6 мембранного типу шляхом оптимізації варіабельної ділянки.

Оптимізація варіабельних ділянок H3pl/L73 та CLH5/L82

У Прикладі 9 було показано, що антитіла, які мають залежну від рН зв'язувальну здатність, демонструють переважні ефекти. Отже, для того, щоб далі покращити залежні від рН зв'язувальні здатності, зробили мутації у послідовності CDR CLH5, отриманого у Прикладі 3, внаслідок чого побудували VH1-IgG1 (SEQ ID NO: 21) та VH2-IgG1 (SEQ ID NO: 22). Крім того, зробили мутації у каркасній послідовності та у послідовності CDR H3pl, внаслідок чого побудували модифіковані важкі ланцюги VH3-IgG1 (SEQ ID NO: 23) та VH4-IgG1 (SEQ ID NO: 24). Зробили мутації у послідовностях CDR L73 та L82, внаслідок чого побудували модифіковані легкі ланцюги VL1-CK (SEQ ID NO: 25), VL2-CK (SEQ ID NO: 26) та VL3-CK (SEQ ID NO: 27). Більш специфічно, мутантів побудували, використовуючи набір для сайт-спрямованого мутагенезу QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene), згідно зі способом, описаним в доданих інструкціях, та отримані плазмідні фрагменти вставили у вектор експресії для клітин ссавців, внаслідок чого побудували бажані вектори експресії важкого ланцюга та вектори експресії легкого ланцюга. Нуклеотидні послідовності отриманих векторів експресії визначили за способами, відомими звичайним фахівцям у цій галузі.

Антитіло, що має VH2-IgG1 (SEQ ID NO: 22) у якості важкого ланцюга та VL2-CK (SEQ ID NO: 26) у якості легкого ланцюга, позначили як Fv1-IgG1, антитіло, що має VH1-IgG1 (SEQ ID NO: 21) у якості важкого ланцюга та L82 у якості легкого ланцюга, позначили як Fv2-IgG1, антитіло, що має VH4-IgG1 (SEQ ID NO: 24) у якості важкого ланцюга та VL1-CK (SEQ ID NO: 25) у якості легкого ланцюга, позначили як Fv3-IgG1, та антитіло, що має VH3-IgG1 (SEQ ID NO: 23) у якості важкого

ланцюга та VL3-CK (SEQ ID NO: 27) у якості легкого ланцюга, позначили як Fv4-IgG1. З них Fv2-IgG1 та Fv4-IgG1 експресували та очистили. Експресію та очищення виконували за способом, описаним у Прикладі 1.

Аналіз зв'язування клонів, що зв'язуються залежно від pH, з розчинним рецептором IL-6

- 5 Аналіз кінетики реакцій антиген-антитіло при pH 7,4 виконували на чотирьох типах антитіл, а саме: гуманізованому антитілі PM1 (природний тип, WT), та WT, H3pl/L73-IgG1, Fv2-IgG1 та Fv4-IgG1, побудованим у Прикладах 2 та 10, використовуючи Biacore T100 (GE Healthcare) (буфер: 10 mM MES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20). Кожне антитіло зв'язали на сенсорному чипі, на якому був іммобілізований F(ab)2 проти IgG, специфічний до ланцюга γ (Pierce), шляхом амінного з'єднання, а потім SR344, доведений до концентрації від 9,8 до 40 nM, випорснули як аналітичний зразок. Асоціацію з SR344 та відокремлення від нього спостерігали у реальному часі для клонів, що зв'язуються залежно від pH. Усі вимірювання виконували при 37 °C. Константи швидкості асоціації k_a (1/Ms) та константи швидкості дисоціації k_d (1/c) розраховували, використовуючи програмне забезпечення Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare), та константи дисоціації KD (M) розраховували на основі цих значень (
- 10
- 15

Таблиця 7

Порівняння констант швидкості дисоціації клонів, що зв'язуються залежно від pH, які відокремлюються від розчинного рецептора IL-6, SR344

Зразок	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
WT	4.0E+05	1.1E-03	2.7E-09
H3pl/L73	4.1E+05	5.9E-04	1.4E-09
Fv2-IgG1	3.9E+05	7.7E-04	2.0E-09
Fv4-IgG1	7.2E+05	1.0E-03	1.4E-09

- Внаслідок розрахунку афінності при pH 7,4 для кожного клону визначили, що константи дисоціації (афінність, значення KD) WT, H3pl/L73-IgG1, Fv2-IgG1 та Fv4-IgG1 щодо SR344 становили, відповідно, 2,7 nM, 1,4 nM, 2,0 nM та 1,4 nM, та вони були майже еквівалентними. Продемонстрували, що Fv2-IgG1 та Fv4-IgG1 мають зв'язувальну здатність з розчинним рецептором IL-6, яка є еквівалентною або більшою порівняно зі зв'язувальною здатністю антитіла природного типу.
- 20

- Аналіз зв'язування клонів, що зв'язуються залежно від pH, з рецептором IL-6 мембранного типу
- 25

- Реакції антиген-антитіло щодо рецептора IL-6 мембранного типу спостерігали при pH 5,8 та при pH 7,4 для чотирьох типів побудованих клонів: WT, H3pl/L73-IgG1, Fv2-IgG1 та Fv4-IgG1, використовуючи Biacore T100 (GE Healthcare). Зв'язування з рецептором IL-6 мембранного типу визначили шляхом оцінювання зв'язування з рецептором IL-6, іммобілізованим на сенсорному чипі. SR344 біотинілювали згідно зі способом, відомим фахівцям у цій галузі, та біотинілований SR344 іммобілізували на сенсорному чипі за допомогою стрептавідину, використовуючи афінність між стрептавідином та біотином. Усі вимірювання виконували при 37 °C. Буфер рухомої фази був наступним: 10 mM MES (pH 5,8), 150 mM NaCl та 0,05 % Tween 20. До цього випорснули клони, що зв'язуються залежно від pH, при pH 7,4, дозволивши їм зв'язатися з SR344 (буфер для випорскування зразка: 10 mM MES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20), потім залежно від pH відокремлення кожного клону спостерігали при pH рухомої фази 5,8 (Фіг. 17).
- 30
- 35

- Концентрації зразків довели до 0,25 мкг/мл. Зв'язування здійснювали у 10 mM MES (pH 7,4), 150 mM NaCl та 0,05 % Tween 20. Відокремлення здійснювали у 10 mM MES (pH 5,8), 150 mM NaCl та 0,05 % Tween 20. Для цього випадку константи швидкості дисоціації (k_d (1/c)) при pH 5,8 розраховували, приводячи у відповідність тільки фазу відокремлення при pH 5,8, використовуючи при цьому програмне забезпечення Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare). Подібним способом концентрації зразків довели до 0,25 мкг/мл, зв'язування здійснювали у 10 mM MES (pH 7,4), 150 mM NaCl та 0,05 % Tween 20, відокремлення виконували у 10 mM MES (pH 7,4), 150 mM NaCl та 0,05 % Tween 20, та константи швидкості дисоціації (k_d (1/c)) при pH 7,4 розраховували, приводячи у відповідність тільки фазу відокремлення при pH 7,4, використовуючи при цьому програмне забезпечення Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare). Залежні від pH константи швидкості дисоціації для кожного клону наведено у Таблиці 8.
- 40
- 45

Таблиця 8

Порівняння констант швидкості дисоціації клонів, що зв'язуються залежно від pH, при відокремленні від рецептора IL-6 мембранного типу, SR344

Зразок	pH7.4 kd(1/s)	pH5.8 kd(1/s)	Залежність від pH kd(pH5.8)/kd(pH7.4)
WT	2.5E-04	2.5E-04	1.00
H3pl/L73	2.6E-04	6.7E-04	2.59
Fv2-IgG1	3.4E-04	2.4E-03	7.18
Fv4-IgG1	4.7E-04	2.6E-03	5.56

Внаслідок розрахунку залежності від pH для кожного клону значення залежності від pH зв'язування з рецептором IL-6 мембранного типу чотирьох клонів, WT, H3pl/L73-IgG1, Fv2-IgG1 та Fv4-IgG1, стосовно SR344 перебільшували у 1,0 раз, 2,59 рази, 7,18 рази та 5,56 рази, відповідно. Fv2-IgG1 та Fv4-IgG1 продемонстрували більш високу залежність від pH при відокремленні від рецептора IL-6 мембранного типу порівняно з H3pl/L73-IgG1.

На підставі вищевказаного, було продемонстровано, що Fv2-IgG1 та Fv4-IgG1 демонструють більш сильне залежне від pH зв'язування з рецептором IL-6 мембранного типу, ніж H3pl/L73-IgG1, при цьому підтримуючи афінність щодо розчинного рецептора IL-6 таку саму або сильнішу порівняно з афінністю антитіла природного типу.

Приклад 11. Тестування ФК/ФД антитіл, що зв'язуються залежно від pH, з оптимізованими варіабельними ділянками з використанням трансгенних мишей з рецептором IL-6 людини

Фармакокінетику Fv2-IgG1 та Fv4-IgG1, а також антитіла природного типу та H3pl/L73-IgG1, отриманого та оціненого у Прикладі 1, оцінювали, використовуючи трансгенних мишей з рецептором IL-6 людини, яких використовували у Прикладі 8. Антитіло природного типу, H3pl/L73-IgG1, Fv2-IgG1 або Fv4-IgG1 вводили шляхом внутрішньовенної ін'єкції у вигляді єдиної дози мишам hIL-6R tg у дозі 25 мг/кг, та концентрацію кожного антитіла у плазмі вимірювали таким самим способом, як і у Прикладі 8. Зміну за часом концентрацій у плазмі антитіла природного типу, H3pl/L73-IgG1, Fv2-IgG1 та Fv4-IgG1 наведено на Фіг. 18.

Фармакокінетика H3pl/L73-IgG1 була покращена порівняно з антитілом природного типу за таким самим способом, що і у Прикладі 8, проте фармакокінетика Fv2-IgG1 та Fv4-IgG1 іще більше покращилася порівняно з H3pl/L73-IgG1. Вимірювання стосовно концентрацій незв'язаного рецептора IL-6, які вимірювалися у мавп cynomolgus у Прикладі 9, у цьому тесті здійснювали у мишей hIL-6R tg, використовуючи такий самий спосіб. Внаслідок цього, подовження тривалості нейтралізації розчинного рецептора IL-6 підтвердили для Fv2-IgG1 та Fv4-IgG1 порівняно з подовженням тривалості нейтралізації для H3pl/L73-IgG1 (дані не наведено). Як вказано у Прикладі 10, залежне від pH зв'язування з рецептором IL-6 мембранного типу покращилося для Fv2-IgG1 та Fv4-IgG1 порівняно з H3pl/L73-IgG1. Отже, було вказано, що подальше покращення фармакокінетики та тривалості нейтралізації розчинного рецептора IL-6 порівняно з H3pl/L73-IgG1 є можливим за рахунок покращення залежного від pH зв'язування з рецептором IL-6 мембранного типу.

Приклад 12. Покращення залежного від pH зв'язування з рецептором IL-6 мембранного типу шляхом оптимізації константної ділянки

Оптимізація константної ділянки Fv4-IgG1

Взагалі повідомлялося, що зв'язування з антигенами, пов'язаними з мембраною, різняться залежно від константної ділянки антитіла (J. Immunol. Methods 1997 Jun 23; 205(1): 67-72). Константні ділянки антитіл, що зв'язуються залежно від pH, які отримали вище, мали тип IgG1. Отже, виконали дослідження щодо оптимізації константної ділянки з метою покращення залежного від pH зв'язування з рецептором IL-6 мембранного ізотипу. Мутацію зробили у природно виникаючій константній ділянці, а саме, константній ділянці IgG2 (SEQ ID NO: 28), внаслідок чого побудували константну ділянку IgG2ΔGK (SEQ ID NO: 29). Іншу мутацію зробили у константній ділянці IgG2ΔGK, внаслідок чого побудували константну ділянку M58 (SEQ ID NO: 30). Мутації далі зробили у константній ділянці IgG2 та M58, внаслідок чого побудували константні ділянки M71 (SEQ ID NO: 31) та M73 (SEQ ID NO: 32).

VH3-IgG2ΔGK (SEQ ID NO: 33) побудували шляхом заміщення константної ділянки VH3-IgG1, отриманої у Прикладі 10, константною ділянкою IgG2ΔGK, VH3-M58 (SEQ ID NO: 34) побудували шляхом заміщення константної ділянки константною ділянкою M58 та VH3-M73 (SEQ ID NO: 35) побудували шляхом заміщення константної ділянки константною ділянкою M73.

Більш специфічно, побудували вектори експресії, у яких частину константної ділянки VH3, що використовувалася у Прикладі 10, замінили бажаною константною ділянкою шляхом перетравлення NheI/NotI та зшивання. Нуклеотидні послідовності отриманих векторів експресії визначили, використовуючи спосіб, відомий звичайним фахівцям у цій галузі.

Експресію та очищення здійснювали для наступних антитіл: Fv4-IgG2, використовуючи VH3-IgG2ΔGK (SEQ ID NO: 33) для важкого ланцюга та VL3-CK (SEQ ID NO: 27) для легкого ланцюга; Fv4-M58, використовуючи VH3-M58 (SEQ ID NO: 34) для важкого ланцюга та VL3-CK (SEQ ID NO: 27) для легкого ланцюга; та Fv4-M73, використовуючи VH3-M73 (SEQ ID NO: 35) для важкого ланцюга та VL3-CK (SEQ ID NO: 27) для легкого ланцюга. Експресію та очищення здійснювали за способом, описаним у Прикладі 1.

Аналіз зв'язування Fv4, який має оптимізовану константну ділянку, з розчинним рецептором IL-6

Асоціацію з SR344 та відокремлення від нього спостерігали у реальному часі, використовуючи такий самий спосіб, що і у Прикладі 10, для отриманих таким способом Fv4-IgG1, Fv4-IgG2, Fv4-M58 та Fv4-M73, а також для антитіла природного типу. Константи швидкості асоціації k_a (1/Ms) та константи швидкості дисоціації k_d (1/s) розраховували після аналізу за таким же способом, а потім константи дисоціації KD (M) розраховували на основі цих значень (Таблиця 9).

Таблиця 9

Порівняння констант швидкості дисоціації клонів, які зв'язуються залежно від pH та які відокремлюються від розчинного рецептора IL-6, SR344

Зразок	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
Fv4-IgG1	7.2E+05	1.0E-03	1.4E-09
Fv4-IgG2	9.6E+05	1.2E-03	1.3E-09
Fv4-M58	8.3E+05	1.1E-03	1.4E-09
Fv4-M73	7.5E+05	1.0E-03	1.4E-09

Внаслідок розрахунку афінності при pH 7,4 для кожного клону встановили, що константи дисоціації (афінність, значення KD) Fv4-IgG1, Fv4-IgG2, Fv4-M58 та Fv4-M73 щодо SR344 становили 1,4 нМ, 1,3 нМ, 1,4 нМ та 1,4 нМ, відповідно, та вони є майже еквівалентними. Це вказує на те, що зв'язувальна здатність клонів, що зв'язуються залежно від pH, з розчинним рецептором IL-6, SR344, не змінюється навіть після модифікування константної ділянки. На основі цього результату вважали, що зв'язувальна здатність з розчинним рецептором IL-6 не змінюється для Fv1, Fv2 та Fv3, навіть якщо константну ділянку модифікують подібним способом.

Аналіз зв'язування Fv4, що має оптимізовану константну ділянку, з рецептором IL-6 мембранного типу

Реакції антиген-антитіло з рецептором IL-6 мембранного типу при pH 5,8 та pH 7,4 спостерігали для отриманих таким способом Fv4-IgG1, Fv4-IgG2, Fv4-M58 та Fv4-M73, а також для антитіла природного типу за таким самим способом, як і у Прикладі 10, використовуючи Biotinylated T100 (GE Healthcare). На Фіг. 19 наведено результати, отримані внаслідок випорскування клонів, що зв'язуються залежно від pH, за умовами pH 7,4, для того, щоб сприяти зв'язуванню з SR344, та внаслідок спостереження залежного від pH відокремлення кожного клону у рухомій фазі з pH 5,8. Наступні аналізи виконували за таким самим способом, як і у Прикладі 10, та швидкості залежного від pH відокремлення для кожного клону наведено у Таблиці 10.

Таблиця 10

Порівняння констант швидкості дисоціації клонів, що зв'язуються залежно від pH, при відокремленні від рецептора IL-6 мембранного типу, SR344

Зразок	pH7.4 k_d (1/s)	pH5.8 k_d (1/s)	Залежність від pH $k_d(\text{pH}5.8)/k_d(\text{pH}7.4)$
Fv4-IgG1	4.7E-04	2.6E-03	5.56
Fv4-IgG2	1.0E-03	1.8E-02	16.99

Таблиця 10 (продовження)

Зразок	pH7.4 kd(1/s)	pH5.8 kd(1/s)	Залежність від pH kd(pH5.8)/kd(pH7.4)
Fv4-M58	5.4E-04	9.5E-03	17.64
Fv4-M73	5.1E-04	5.1E-03	10.06

Внаслідок розрахунку залежності від pH для кожного клону встановили, що залежність від pH Fv4-IgG1, Fv4-IgG2, Fv4-M58 та Fv4-M73 щодо SR344 перебільшувала у 5,6 разів, 17,0 разів, 17,6 разів та 10,1 разів, відповідно; отже, усі з Fv4-IgG2, Fv4-M58 та Fv4-M73 демонстрували більш високе залежне від pH відокремлення від рецептора IL-6 мембранного типу порівняно з Fv4-IgG1.

На підставі результатів аналізу зв'язування з розчинним рецептором IL-6 та зв'язування з рецептором IL-6 мембранного типу із використанням варіабельної ділянки Fv4, визначили, що заміщення константної ділянки від IgG1 на IgG2, M58 або M73 могло б покращити залежне від pH зв'язування з рецептором IL-6 мембранного типу, не спричиняючи змін в афінності з розчинним рецептором IL-6. Вважали, що це є доречним для Буї, Fv2 та Fv3.

Приклад 13. Тестування ФК/ФД антитіл, які зв'язуються залежно від pH та мають оптимізовану константну ділянку, із використанням трансгенних мишей з рецептором IL-6 людини

Фармакокінетику Fv4-IgG1, Fv4-IgG2 та Fv4-M58, отриманих у Прикладі 12, оцінювали, використовуючи трансгенних мишей з рецептором IL-6 людини (миші hIL-6R tg), яких використовували у Прикладі 8 для дослідження впливу константної ділянки на фармакокінетику. Антитіло природного типу, Fv4-IgG1, Fv4-IgG2 або Fv4-M58 ввели мишам hIL-6R tg шляхом внутрішньовенної ін'єкції єдиною дозою, що становила 25 мг/кг, а потім виконували вимірювання концентрацій у плазмі кожного антитіла за таким самим способом, як і у Прикладі 8. Зміну за часом концентрацій у плазмі для антитіла природного типу, Fv4-IgG1, Fv4-IgG2 та Fv4-M58 наведено на Фіг. 20.

Подібно до Прикладу 11, фармакокінетика Fv4-IgG1 покращилася порівняно з антитілом природного типу, а фармакокінетика Fv4-IgG2 та Fv4-M58 далі покращилася порівняно з Fv4-IgG1. Вимірювання стосовно концентрацій незв'язаного рецептора IL-6, які вимірювалися у мавп *cynomolgus* у Прикладі 9, здійснювали у мишей hIL-6R tg у цьому тесті, використовуючи такий самий спосіб. Внаслідок цього визначили, що подовження тривалості нейтралізації розчинного рецептора IL-6 підтвердилося для Fv4-IgG2 та Fv4-M58 порівняно з Fv4-IgG1 (дані не наведено). Подібно вказаному у Прикладі 10, залежне від pH зв'язування з рецептором IL-6 мембранного типу покращилося для Fv4-IgG2 та Fv4-M58 порівняно з Fv4-IgG1. Отже, було показано, що покращення залежного від pH зв'язування з рецептором IL-6 мембранного типу та покращення фармакокінетики та тривалості нейтралізації розчинного рецептора IL-6 є можливим за рахунок заміщення константної ділянки від IgG1 на IgG2 або M58. На основі цих результатів вважали, що фармакокінетику та тривалість нейтралізації розчинного рецептора IL-6, не тільки у випадку Fv4, але також у випадках Fv1, Fv2 та Fv3, можна покращити порівняно з IgG1 за рахунок заміщення константної ділянки від IgG1 на IgG2 або M58.

Приклад 14. Побудова антитіл, які зв'язуються залежно від pH та мають оптимізовані варіабельні та константні ділянки VH2-M71 (SEQ ID NO: 36) та VH2-M73 (SEQ ID NO: 37), що мають M71 та M73 для константної ділянки VH2-IgG1, та VH4-M71 (SEQ ID NO: 38) та VH4-M73 (SEQ ID NO: 39), що мають M71 та M73 для константної ділянки VH4-IgG1, побудували, використовуючи такий самий спосіб, як описано вище.

Fv1-M71, що використовує VH2-M71 для важкого ланцюга та VL2-CK для легкого ланцюга, Fv1-M73, що використовує VH2-M73 для важкого ланцюга та VL2-CK для легкого ланцюга, Fv3-M71, що використовує VH4-M71 для важкого ланцюга та VL1-CK для легкого ланцюга, та Fv3-M73, що використовує VH4-M73 для важкого ланцюга та VL1-CK для легкого ланцюга, експресували та очистили. Експресію та очищення здійснювали за способом, описаним у Прикладі 1.

Аналізи зв'язування антитіл, які зв'язуються залежно від pH та мають оптимізовані варіабельні та константні ділянки, з розчинним рецептором IL-6

Асоціацію з та відокремлення від SR344 спостерігали у реальному часі, використовуючи такий самий спосіб, як і у Прикладі 10, для 11 типів антитіл, а саме: гуманізованого антитіла PM1 (природного типу) та H3pl/L73-IgG1, Fv1-M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M71, Fv3-M73, Fv4-IgG1, Fv4-IgG2, Fv4-M58 та Fv4-M73, побудованих, як описано вище. Константи швидкості

асоціації k_a (1/Ms) та константи швидкості дисоціації k_d (1/s) розраховували за допомогою аналізу за таким самим способом, та константи дисоціації KD (M) розраховували на основі цих значень (Таблиця 11).

Таблиця 11

Порівняння констант швидкості дисоціації клонів, що зв'язуються залежно від pH, при відокремленні від розчинного рецептора IL-6, SR344

Зразок	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
WT	4.0E+05	1.1E-03	2.7E-09
H3pl/L73	4.1E+05	5.9E-04	1.4E-09
Fv1-M71	5.5E+05	5.4E-04	9.7E-10
Fv1-M73	6.1E+05	5.5E-04	9.1E-10
Fv2-IgG1	3.9E+05	7.7E-04	2.0E-09
Fv3-M71	7.8E+05	8.2E-04	1.1E-09
Fv3-M73	8.5E+05	8.7E-04	1.0E-09
Fv4-IgG1	7.2E+05	1.0E-03	1.4E-09
Fv4-IgG2	9.6E+05	1.2E-03	1.3E-09
Fv4-M58	8.3E+05	1.1E-03	1.4E-09
Fv4-M73	7.5E+05	1.0E-03	1.4E-09

5

Визначили, що усі з отриманих 10 типів клонів, що зв'язуються залежно від pH, мають константи дисоціації (афінність, значення KD) при відокремленні від розчинного рецептора IL-6, які дорівнюють або є більш сильними порівняно з антитілом природного типу.

10 Аналізи зв'язування антитіл, які зв'язуються залежно від pH та мають оптимізовані варіабельні та константні ділянки, з рецептором IL-6 мембранного типу

15 Реакції антиген-антитіло з рецептором IL-6 мембранного типу при pH 5,8 та pH 7,4 спостерігали за таким самим способом, як і у Прикладі 10, використовуючи Biacore T100 (GE Healthcare), для 11 типів антитіл, а саме: гуманізованого антитіла PM1 (природного типу) та H3pl/L73-IgG1, Fv1-M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M71, Fv3-M73, Fv4-IgG1, Fv4-IgG2, Fv4-M58 та Fv4-M73, отриманих, як описано вище. Клоні, що зв'язуються залежно від pH, випорснули при умові pH 7,4, дозволивши їм зв'язатися з SR344, а потім спостерігали залежно від pH відокремлення кожного клону при pH рухомої фази, pH 5,8. Результати наведено на Фіг. 21 (результати для Fv1-M71, Fv1-M73, Fv3-M71 та Fv3-M73 наведено на Фіг. 21, тоді як результати для інших клонів наведено на Фіг. 17 та 19). Аналізи здійснювали за таким самим способом, і як у Прикладі 10, та залежність від pH констант швидкості дисоціації усіх 11 типів клонів наведено у Таблиці 12.

20

Таблиця 12

Залежність від pH констант швидкості дисоціації клонів, що зв'язуються залежно від pH, при відокремленні від рецептора IL-6 мембранного типу, SR344

Зразок	pH7.4 k_d (1/s)	pH5.8 k_d (1/s)	Залежність від pH $k_d(\text{pH}5.8)/k_d(\text{pH}7.4)$
WT	2.5E-04	2.5E-04	1.00
H3pl/L73	2.6E-04	6.7E-04	2.59
Fv1-M71	6.1 E-04	6.9E-03	11.29
Fv1-M73	3.7E-04	3.2E-03	8.80
Fv2-IgG1	3.4E-04	2.4E-03	7.18
Fv3-M71	9.1 E-04	9.7E-03	10.74
Fv3-M73	4.9E-04	5.3E-03	10.88
Fv4-IgG1	4.7E-04	2.6E-03	5.56
Fv4-IgG2	1.0E-03	1.8E-02	16.99
Fv4-M58	5.4E-04	9.5E-03	17.64
Fv4-M73	5.1E-04	5.1E-03	10.06

Десять тинів отриманих клонів, що зв'язуються залежно від рН, демонстрували залежну від рН зв'язувальну здатність з рецептором IL-6 мембранного типу. Крім того, визначили, що усі з Fv1-M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M71, Fv3-M73, Fv4-IgG1, Fv4-IgG2, Fv4-M58 та Fv4-M73 демонстрували покращене залежне від рН зв'язування з рецептором IL-6 мембранного типу порівняно з H3pl/L73-IgG1, та для них було визначено, що час, доки антитіло не зникне з плазми, а також час, коли розчинний рецептор IL-6 та рецептор IL-6 мембранного типу зв'язуються з антитілом в організмі, подовжується суттєво порівняно з антитілом природного типу, як показано для мавп *супомоглус* у Прикладі 9.

Приклад 15. Тестування ФК/ФД антитіл, які зв'язуються залежно від рН та які мають оптимізовані варіабельні та константні ділянки, із використанням мавп *супомоглус*

Побудова відомого високоафінного антитіла проти рецептора IL-6

Вектор експресії для клітин ссавців побудували для експресування високоафінного антитіла проти рецептора IL-6 VQ8F11-21 hlgG1, описаного у US 2007/0280945 A1 (US 2007/0280945 A1, амінокислотні послідовності 19 та 27) у якості відомого високоафінного антитіла проти рецептора IL-6. Варіабельну ділянку антитіла побудували шляхом ПЛР, об'єднавши синтетичні оліго-ДНК (ПЛР-складання). Константну ділянку ампліфікували шляхом ПЛР з вектора експресії, що використовувався у Прикладі 1. Варіабельну ділянку антитіла та константну ділянку антитіла зшили шляхом ПЛР-складання та вставили у вектор для експресії у ссавців. Отримані фрагменти ДНК важкого та легкого ланцюгів вставили у вектори експресії для клітин ссавців, внаслідок чого побудували вектор експресії важкого ланцюга та вектор експресії легкого ланцюга, які представляють інтерес. Нуклеотидні послідовності отриманих векторів експресії визначили за способом, відомим звичайним фахівцям у цій галузі. Експресію та очищення здійснювали, використовуючи побудовані вектори експресії. Експресію та очищення здійснювали за способом, описаним у Прикладі 1, внаслідок чого отримали високоафінне антитіло проти рецептора IL-6 (високоафінне Ab).

Тестування ФК/ФД у мавп *супомоглус*

Фармакокінетику та фармакологічну ефективність оцінювали у мавп *супомоглус* для антитіл H3pl/L73-IgG1 та Fv1-M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M73 та Fv4-M73, які зв'язуються залежно від рН, та для відомого високоафінного антитіла проти рецептора IL-6 (високоафінного Ab). H3pl/L73-IgG1, Fv1-M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M73 або Fv4-M73 ввели мавпам *супомоглус* шляхом внутрішньовенної ін'єкції єдиною дозою у 0,5 мг/кг, тоді як високоафінне Ab вводили єдиною дозою у 1,0 мг/кг шляхом внутрішньовенної ін'єкції. Зразки крові узяли до ведення та з часом. Концентрацію у плазмі кожного антитіла вимірювали за таким самим способом, як і у Прикладі 9. Зміну за часом концентрацій у плазмі H3pl/L73-IgG1, Fv1-M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M73 та Fv4-M73, а також високоафінного Ab наведено на Фіг. 21. Для того, щоб оцінити фармакологічну ефективність як ступінь, до якого рецептор IL-6 мембранного типу у мавп *супомоглус* нейтралізується, IL-6 мавп *супомоглус* вводили підшкірно у нижні частини спини тварин щоденно по 5 мкг/кг з 3-го по 10-ий день (з 6-го по 10-ий день у випадку високоафінного Ab) після введення антитіла за таким самим способом, як і у Прикладі 9. Концентрацію CRP у кожної тварини вимірювали через 24 години після кожного введення. Зміну за часом концентрацій CRP з введенням кожного антитіла наведено на Фіг. 22. Для того, щоб оцінити фармакологічну ефективність як ступінь нейтралізації розчинного рецептора IL-6 мавп *супомоглус*, концентрацію незв'язаного розчинного рецептора IL-6 мавп *супомоглус* у плазмі мавп *супомоглус* вимірювали за таким самим способом, як і у Прикладі 9. Зміну за часом концентрацій незв'язаного розчинного рецептора IL-6 мавп *супомоглус* з введенням кожного антитіла наведено на Фіг. 23.

Внаслідок цього концентрації антитіл у плазмі підтримувалися на високому рівні для кожного з Fv1-M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M73 та Fv4-M73 порівняно з H3pl/L73-IgG1, проте концентрації CRP та незв'язаного розчинного рецептора IL-6 мавп *супомоглус* підтримувалися на низькому рівні. А саме, цей результат показав, що час, коли рецептори IL-6 мембранного типу та розчинного типу зв'язуються антитілом (або, інакше кажучи, тривалість нейтралізації), подовжився завдяки антитілам порівняно з H3pl/L73-IgG1.

Крім того, стосовно цих антитіл проти рецептора IL-6, які зв'язуються залежно від рН, було підтверджено їхні ефекти нейтралізації та безперервну ефективність, які дорівнювали або перебільшували нейтралізацію та ефективність відомого високоафінного антитіла проти рецептора IL-6 (високоафінного Ab), яке вводилося у дозі 1,0 мг/кг, тільки при половині його дози, а саме при 0,5 мг/кг. Отже, було визначено, що антитіла, які зв'язуються залежно від рН, мають ефекти нейтралізації та безперервну ефективність, переважну, порівняно з нейтралізацією та ефективністю відомого високоафінного антитіла проти рецептора IL-6.

Було також підтверджено, що ті антитіла, які наведені у Таблиці 12 та для яких не виконувалися тестування ФК/ФД із використанням мавп супомоглус, як у цьому тесті, демонструють покращене залежне від рН зв'язування з рецептором IL-6 мембранного типу порівняно з H3pl/L73-IgG1. Отже, також вважають, що час, протягом якого розчинний та мембранний рецептори IL-6 зв'язуються антитілами (або, інакше кажучи, ефекти тривалості нейтралізації та безперервної нейтралізації), подовжується для антитіл порівняно з H3pl/L73-IgG1.

У Прикладі 9 визначили, що для H3pl/L73-IgG1 час, доки антитіло не зникає з плазми, а також час, коли розчинний рецептор IL-6 та рецептор IL-6 мембранного типу зв'язуються антитілом в організмі (ефект безперервної нейтралізації), подовжується суттєво порівняно з антитілом природного типу. Отже, вважають, що Fv1-M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M71, Fv3-M73, Fv4-IgG1, Fv4-IgG2, Fv4-M58 та Fv4-M73, які мають переважні ефекти безперервної нейтралізації відносно H3pl/L73-IgG1, мають суттєво покращені ефекти безперервної нейтралізації порівняно з антитілом природного типу.

На відміну від антитіл проти рецептора IL6, антитіла проти рецептора IL-6, які зв'язуються залежно від рН та які було розроблено для сильного зв'язування з антигеном при рН 7,4 у плазмі, проте тільки для слабого зв'язування з антигеном при рН 5,8 в ендосомах, дозволяють знизити дозу пацієнту та частоту введення антитіла проти рецептора IL-6, та, як наслідок, вони можуть суттєво знизити загальну кількість введення. Отже, вважають, що антитіла проти рецептора IL-6, що зв'язуються залежно від рН, є надзвичайно переважними як фармацевтичні препарати для використання у якості антагоніста IL-6.

Приклад 16. Побудова антитіла проти IL-6, що зв'язується залежно від рН

Експресія та очищення антитіла проти IL-6

У Прикладах від 1 до 15 багато гуманізованих антитіл проти рецептора IL6, які зв'язуються залежно від рН з рецептором IL-6, були успішно створені шляхом надання залежності внаслідок введення заміщень гістидином та їм подібного у варіабельну ділянку, зокрема, у послідовності CDR гуманізованих антитіл проти рецептора IL-6. Визначили, що усі ці антитіла неодноразово зв'язуються з рецептором IL-6 та демонструють суттєве покращення у ФК/ФД.

Отже, було підтверджено, що залежну від рН здатність антитіла зв'язуватися з антигеном можна надати іншому антитілу, яке зв'язується з антигеном, відмінним від рецептора IL-6, використовуючи при цьому подібний спосіб. IL-6 людини вибрали як антиген, та побудували антитіло проти IL-6, яке включає важкий ланцюг (природний тип) (амінокислотна послідовність: SEQ ID NO: 62) та легкий ланцюг (природний тип) (амінокислотна послідовність: SEQ ID NO: 63), яке зв'язується з IL-6, як описано у WO 2004/039826, ("природний тип проти IL6" ("Anti-IL6 wild type")). Використовуючи відомий для фахівців у цій галузі спосіб, генні фрагменти, що кодують амінокислотні послідовності антитіла, які представляють інтерес, вставили у вектори експресії для клітин ссавців, внаслідок чого побудували вектор експресії важкого ланцюга та вектор експресії легкого ланцюга, які представляють інтерес. Нуклеотидні послідовності отриманих векторів експресії визначили, використовуючи відомий фахівцям спосіб. Природний тип проти IL-6 експресували та очистили за способом, описаним у Прикладі 1.

Побудова антитіла проти IL-6, що зв'язується залежно від рН

Щоб надати антитілу залежної від рН здатності зв'язуватися з IL-6, зробили гістидинові заміщення амінокислот у CDR антитіла проти IL-6 (проти IL-6 природного типу), включаючи важкий ланцюг (природний тип) (амінокислотна послідовність: SEQ ID NO: 62) та легкий ланцюг (природний тип) (амінокислотна послідовність: SEQ ID NO: 63). Внаслідок заміщення гістидином в амінокислотах CDR та наступного скринінгу отримали декілька клонів, що демонструють залежне від рН зв'язування. Зв'язування при рН 5,5 суттєво зменшилося порівняно зі зв'язуванням при рН 7,4. Позиції заміщення гістидином у залежних від рН клонах наведено у Таблиці 13. Приклади включають "клон 1 проти IL-6", що включає важкий ланцюг (c1) (амінокислотна послідовність: SEQ ID NO: 64) та легкий ланцюг (c1) (амінокислотна послідовність: SEQ ID NO: 65), та "клон 2 проти IL-6", що включає важкий ланцюг (c1) (амінокислотна послідовність: SEQ ID NO: 64) та легкий ланцюг (c2) (амінокислотна послідовність: SEQ ID NO: 66). Клон 1 проти IL-6 та клон 2 проти IL-6 експресували та очистили за способом, описаним у Прикладі 1.

Таблиця 13. Позиції заміщення гістидином у залежних від рН клонах

H32, H59, H61, H99

L53, L54, L90, L94

Аналіз зв'язування залежних від рН клонів з IL-6 людини

Аналіз кінетики реакцій антиген-антитіло при рН 5,5 та рН 7,4 здійснювали, використовуючи Біасcore T100 (GE Healthcare) для трьох типів антитіл, отриманих, як описано вище: природний

тип проти IL-6, клон 1 проти IL-6 та клон 2 проти IL-6 (буфер: DPBS(-) (pH 7,4 або pH 5,5), 150 mM NaCl). Антитіла зв'язали з сенсорним чипом, на якому був іммобілізований рекомбінантний білок A/G (Pierce), шляхом амінного з'єднання, а потім IL-6 людини (ToGen), доведений до відповідної концентрації, випорснули на чип як аналітичний зразок. Усі вимірювання виконували при 37 °C. Константи швидкості асоціації k_a (1/Ms) та константи швидкості дисоціації k_d (1/c) розраховували, використовуючи програмне забезпечення Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare), а константи дисоціації KD (M) розраховували на основі цих значень (Таблиця 14). Крім того, відношення афінності при pH 5,5 та pH 7,4 розраховували для кожного клону, щоб оцінити залежне від pH зв'язування.

Таблиця 14

Порівняння зв'язування з IL-6 залежних від pH клонів

Зразок	pH	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD(M)	KD(pH5.5)/ KD(pH7.4)
Природний тип	pH7.4	2.05E+07	3.91E-04	1.91E-11	0.8
	pH5.5	1.52E+07	2.45E-04	1.61E-11	
Клон 1	pH7.4	1.07E+07	4.71E-03	4.38E-10	10.3
	pH5.5	2.05E+07	9.26E-03	4.52E-09	
Клон 2	pH7.4	8.96E+06	2.63E-03	2.94E-10	13.5
	pH5.5	2.76E+06	1.10E-02	3.98E-09	

Розраховували відношення афінності при pH 5,5 та pH 7,4 ($(KD)(pH\ 5,5)/(KD)(pH\ 7,4)$), яке вказує на те, що залежне від pH зв'язування з IL-6 людини становило 0,8, 10,3 та 13,5 для антитіла природного типу проти IL-6, клону 1 проти IL-6 та клону 2 проти IL-6, відповідно. Тобто, здатність до залежного від pH зв'язування кожного клону більш ніж у десять разів перебільшувала здатність антитіла природного типу. Сенсорграми клону 2 проти IL-6 при pH 7,4 та при pH 5,5 наведено на Фіг. 26.

Отже, було показано, що, як у випадку антитіл проти рецептора IL-6, антитіла проти IL-6, що зв'язуються залежно від pH, які зв'язуються з антигеном сильно за нейтральних умов у плазмі, але зв'язуються слабо за внутрішньоендосомних кислотних умов, можна побудувати шляхом здійснення заміщень гістидином та йому подібним здебільшого в амінокислотній послідовності CDR. Як показано у Прикладах від 1 до 15, антитіло проти рецептора IL-6, яке має здатність до залежного від pH зв'язування, неодноразово зв'язується з рецептором IL-6, та ФК/ФД помітно покращується. Отже, припустили, що клон 1 проти IL-6 та клон 2 проти IL-6, які мають залежну від pH зв'язувальну здатність, неодноразово зв'язуються з більшою кількістю антигенів, при цьому ФК/ФД є суттєво покращеною порівняно з антитілом природного типу проти IL-6.

Приклад 17. Побудова антитіла проти рецептора IL-6, яке зв'язується залежно від pH

Експресія та очищення антитіла проти рецептора IL-6

У Прикладах від 1 до 15 багато гуманізованих антитіл проти рецептора IL-6, які зв'язуються залежно від pH з рецептором IL-6, успішно утворили шляхом надання залежності від pH завдяки здійсненню заміщень гістидином та йому подібним у варіабельній ділянці, зокрема, у послідовності CDR гуманізованих антитіл проти IL-6. Визначили, що усі з цих антитіл неодноразово зв'язувалися з рецептором IL-6 та демонстрували суттєве покращення ФК/ФД.

Отже, підтвердили, що залежну від pH здатність антитіла зв'язуватися з антигеном можна надати іншому антитілу, яке зв'язується з антигеном, відмінним від рецептора IL-6, використовуючи такий самий спосіб. Мишачий рецептор IL-31 вибрали як антиген та побудували антитіло проти рецептора IL-31, яке включає важкий ланцюг (природний тип) (амінокислотна послідовність: SEQ ID NO: 67) та легкий ланцюг (природний тип (амінокислотна послідовність: SEQ ID NO: 68) та яке зв'язується з мишачим рецептором IL-31, як описано у WO 2007/142325 ("природний тип проти IL31R"). Використовуючи відомий фахівцям у цій галузі спосіб, генні фрагменти, що кодують амінокислотні послідовності, що представляють інтерес, вставили у вектори експресії для клітин ссавців, внаслідок чого побудували вектор експресії важкого ланцюга та вектор експресії легкого ланцюга, які представляють інтерес. Нуклеотидні послідовності отриманих векторів експресії визначили, використовуючи відомий фахівцям у цій галузі спосіб. Антитіло природного типу проти IL31R експресували та очистили за способом, описаним у Прикладі 1.

Побудова залежного від pH антитіла проти рецептора IL-31

Щоб надати залежної від рН здатності антитілу зв'язуватися з рецептором IL-31, зробили заміщення гістидином в амінокислотах CDR антитіла проти рецептора IL-31 (антитіло природного типу проти IL31R), яке включає важкий ланцюг (природного типу) (амінокислотна послідовність: SEQ ID NO: 67) та легкий ланцюг (природного типу) (амінокислотна послідовність: SEQ ID NO: 68). Внаслідок заміщень гістидином в амінокислотах CDR та наступного скринінгу отримали декілька клонів, які демонструють залежне від рН зв'язування. Зв'язування при рН 5,5 було суттєво зменшеним порівняно зі зв'язуванням при рН 7,4. Позицію заміщення гістидином у залежних від рН клонах наведено у Таблиці 15. Приклад - це "клон 1 проти IL31R", який включає важкий ланцюг (сі) (амінокислотна послідовність: SEQ ID NO: 69) та легкий ланцюг (природного типу). Клон 1 проти IL31R експресували та очистили, використовуючи спосіб, описаний у Прикладі 1.

Таблиця 15. Позиція заміщення гістидином у залежних від рН клонах H33

Аналіз зв'язування залежних від рН клонів з розчинним рецептором IL-31

Аналіз кінетики реакцій антиген-антитіло при рН 5,5 та рН 7,4 здійснювали, використовуючи Biacore TI 00 (GE Healthcare) для двох типів антитіл, отриманих, як описано вище: антитіло природного типу проти IL-31 та клон 1 проти IL31R (буфер: DPBS(-) (рН 7,4 або рН 5,5), 150 mM NaCl, 0,01 % Tween 20, 0,02 % NaN₃). Ці антитіла зв'язали з сенсорним чипом, на якому був іммобілізований рекомбінантний білок A/G (Pierce), шляхом амінного з'єднання, а потім розчинний мишачий рецептор IL-31 (отриманий згідно зі способом, описаним у WO 2007/142325), доведений до відповідної концентрації, випорснули на чип як аналітичний зразок. Усі вимірювання виконували при 25 °C. Константи швидкості асоціації k_a (1/Mc) та константи швидкості дисоціації k_d (1/c) розраховували, використовуючи програмне забезпечення Biacore TI00 Evaluation Software (GE Healthcare), а константи дисоціації KD (M) розраховували на основі цих значень (Таблиця 16). Крім того, відношення афінності при рН 5,5 та рН 7,4 розраховували для кожного клону, щоб оцінити залежне від рН зв'язування.

Таблиця 16

Порівняння зв'язування залежних від рН клонів з мишачим рецептором IL-31

Зразок	РН	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD(M)	KD(pH5.5)/ KD(pH7.4)
Природний тип	pH7.4	1.40E+05	3.40E-03	2.30E-08	3.2
	pH5.5	5.10E+05	3.80E-03	7.40E-08	
Клон 1	pH7.4	1.70E+05	3.30E-03	2.20E-08	1000.0
	pH5.5	1.10E+03	2.40E-02	2.20E-05	

Розраховували відношення афінності при рН 5,5 та рН 7,4 ($((KD)(pH\ 5,5))/(KD)(pH\ 7,4)$), яке вказує на те, що залежне від рН зв'язування з мишачим рецептором IL-31 становило 3,2 та 1000 для антитіла природного типу проти IL31R та для клону 1 проти IL31R, відповідно. Тобто, здатність до залежного від рН зв'язування клону 1 проти IL31R приблизно у 300 разів перебільшувала здатність антитіла природного типу. Сенсорграми клону 1 проти IL31R при рН 7,4 та при рН 5,5 наведено на Фіг. 27.

Отже, було показано, що як і у випадку антитіл проти рецептора IL-6 та антитіл проти IL-6, антитіла проти рецептора IL-31, що зв'язуються залежно від рН, які сильно зв'язуються з антигеном за нейтральних умов у плазмі, але слабо зв'язуються за внутрішньоендосомних кислотних умов, можна побудувати шляхом здійснення заміщень гістидином та йому подібним здебільшого в амінокислотній послідовності CDR. Як показано у Прикладах від 1 до 15, антитіло проти рецептора IL-6, яке має здатність до залежного від рН зв'язування, неодноразово зв'язується з рецептором IL-6, та ФК/ФД помітно покращується. Отже, припустили, що клон 1 проти IL31R, який має залежну від рН зв'язувальну здатність, неодноразово зв'язується з більшою кількістю антигенів із суттєво покращеною ФК/ФД порівняно з антитілом природного типу проти IL31R.

Приклад 18. Неодноразове зв'язування з антигеном антитіла, що зв'язується залежно від рН
Експресія та очищення антитіла, що вводиться мишам

Отримали чотири типи гуманізованих антитіл рецептора IL-6, які описано нижче. У якості антитілу, що не зв'язується залежно від рН з рецептором IL-6, WT-IgG1, що включає Н (природний тип) (амінокислотна послідовність: SEQ ID NO: 9) та L (природний тип) (амінокислотна послідовність: SEQ ID NO: 10), та H54/L28-IgG1, що включає H54 (амінокислотна

послідовність: SEQ ID NO: 70) та L28 (амінокислотна послідовність: SEQ ID NO: 12), експресували та очищували, використовуючи спосіб, описаний у Прикладі 1. У якості антитіл, що зв'язуються залежно від pH з рецептором IL-6 експресували та очищували H170/L82-IgG1 з Прикладу 3, що включає H170 (амінокислотна послідовність: SEQ ID NO: 4) та L82 (амінокислотна послідовність: SEQ ID NO: 7), та Fv4-IgG1 з Прикладу 10, що включає VH3-IgG1 (SEQ ID NO: 23) та VL3-CK (SEQ ID NO: 27), використовуючи спосіб, описаний у Прикладі 1.

Аналіз зв'язування антитіла кожного типу з розчинним рецептором IL-6

Аналіз кінетики реакцій антиген-антитіло при pH 7,4 та pH 5,8 здійснювали, використовуючи Biacore T100 (GE Healthcare), для чотирьох типів антитіл, які отримали: WT-IgG1, H54/L28-IgG1, H170/L82-IgG1 та Fv4-IgG1 (буфер: 10 mM MES (pH 7,4 або pH 5,8), 150 mM NaCl, 0,05 % сурфактант P20). Антитіла зв'язали з сенсорним чипом, на якому був іммобілізований рекомбінантний білок A/G (Pierce), шляхом амінного з'єднання, та SR344, доведений до відповідної концентрації, випорснули на чип як аналітичний зразок. Асоціацію з та відокремлення від SR344 антитіла кожного типу спостерігали у реальному часі. Усі вимірювання виконували при 37 °C. Константи швидкості асоціації k_a (1/Mc) та константи швидкості дисоціації k_d (1/c) розраховували, використовуючи програмне забезпечення Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare), а константи дисоціації KD (M) розраховували на основі цих значень (Таблиця 17).

Таблиця 17

Порівняння констант швидкостей асоціації (k_a), констант швидкостей дисоціації (k_d), та констант дисоціації кожного типу антитіла проти розчинного рецептора IL-6 (SR344)

Зразок	pH7.4			pH5.8			Залежність від pH	
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD(M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD(M)	k_d (pH5.8)/ k_d (pH7.4)	KD(pH5.8)/ KD(pH7.4)
WT-IgG1	4.9E+05	9.4E-04	1.9E-04	8.9E+05	2.7E-03	3.1E-09	2.9	1.6
H54/L28-IgG1	8.3E+05	1.4E-03	1.7E-09	2.4E+06	2.7E-03	1.1E-09	2.0	0.7
H170/L82-IgG1	6.7E+05	1.1E-03	1.6E-09	1.2E+05	1.3E-02	1.0E-07	11.4	61.9
Fv4-IgG1	9.8E+05	9.5E-04	9.7E-10	1.4E+06	3.7E-02	2.6E-08	38.8	27.3

Розраховували відношення афінності (KD) при pH 5,8 та pH 7,4 для кожного антитіла. Відношення KD, яке вказує на залежне від pH зв'язування з SR344, становило 1,6, 0,7, 61,9 та 27,3 для WT-IgG1, H54/L28-IgG1, H170/L82-IgG1 та Fv4-IgG1, відповідно. Крім того, розраховували відношення швидкості дисоціації (k_d) при pH 5,8 та pH 7,4 для кожного антитіла. Відношення k_d , яке вказує на швидкість залежного від pH відокремлення для SR344, становило 2,9, 2,0, 11,4 та 38,8 для WT-IgG1, H54/L28-IgG1, H170/L82-IgG1 та Fv4-IgG1, відповідно. Отже, підтвердили, що H170/L82-IgG1 та Fv4-IgG1 демонструють залежне від pH зв'язування, тоді як звичайні антитіла WT-IgG1 та H54/L28-IgG1 ледь демонструють цю здатність. Крім того, оскільки афінність (KD) цих антитіл при pH 7,4 була майже однаковою, то вважали, що їхня здатність зв'язуватися з SR344 у плазмі є еквівалентною.

Тестування фармакокінетики in vivo із використанням мишей

Фармакокінетику SR344 та антитіла проти рецептора IL-6 людини оцінювали після введення тільки SR344 (рецептор IL-6 людини, отриманий у Прикладі 1) або одночасного введення SR344 та антитіла проти рецептора IL-6 людини мишам, які не експресують рецептор IL-6 людини (C57BL/6J (антитіла проти рецептора IL-6 людини не зв'язуються з мишачим рецептором IL-6)). Розчин SR344 (5 мкг/мл) або розчин суміші, що містив SR344 та антитіло проти рецептора IL-6 людини (5 мкг/мл та 0,1 мг/мл, відповідно), ввели у хвостову вену єдиною дозою у 10 мл/кг. Оскільки антитіло проти рецептора IL-6 людини було присутнім в адекватному надлишку відносно SR344, то вважали, що майже усі молекули SR344 зв'язалися цим антитілом. Зразки крові брали на 15 хвилин, через 2 години, 8 годин, 1 день, 3 дні, 4 дні, 7 днів, 14 днів, 21 день та 28 днів після введення. Узяті зразки крові одразу центрифугували протягом 15 хвилин при 15000 обертах за хвилину та при 4 °C, внаслідок чого отримали плазму. Відокремлену плазму зберігали у морозильнику при -20 °C або нижче до часу вимірювання. Вищеописані WT-IgG1, H54/L28-IgG1, H170/L82-IgG1 та Fv4-IgG1 використовували як антитіла проти рецептора IL-6 людини.

Вимірювання концентрації в плазмі антитіла проти рецептора IL-6 людини шляхом ЕЛАЙЗА

Концентрацію антитіла рецептора IL-6 людини у плазмі вимірювали шляхом ЕЛАЙЗА. Фрагмент F(ab')₂ антитіла проти людського IgG (специфічний до γ-ланцюга) (Sigma) нанесли на імунопланшет Nunc-ImmunoPlate MaxiSorp (Nalge Nunc International) та залишили відстоюватися протягом ночі при 4 °C, внаслідок чого отримали планшети з іммобілізацією проти людського IgG. Приготували зразки для калібрувальної кривої, які мали концентрації у плазмі 0,8, 0,4, 0,2, 0,1, 0,05, 0,025 та 0,0125 мкг/мл, та зразки мишачої плазми, розведені у 100 разів або більше. 200 мкл 20 нг/мл SR344 додали до 100 мкл зразків для калібрувальної кривої та зразків плазми, а потім ці зразки залишили відстоюватися протягом 1 години при кімнатній температурі. Після цього ці зразки помістили у планшети з іммобілізацією проти людського IgG та залишили їх відстоюватися протягом 1 години при кімнатній температурі. Після цього додали біотинізоване антитіло проти людського IL-6R (R&D) для реакції протягом 1 години при кімнатній температурі. Після цього додали Streptavidin-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies) для реакції протягом 1 години при кімнатній температурі та здійснювали хромогенну реакцію із використанням TMB One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories) як субстрату. Після припинення реакції IN сірчаною кислотою (Showa Chemical) вимірювали поглинання при 450 нм за допомогою апарата для читання мікропланшетів. Концентрацію у мишачій плазмі розраховували з поглинання за калібрувальною кривою, використовуючи аналітичне програмне забезпечення SOFTmax PRO (Molecular Devices). Зміну за часом концентрації у плазмі після внутрішньовенного введення, яку вимірили за цим способом, наведено на Фіг. 28.

Вимірювання концентрації SR344 у плазмі за допомогою електрохемолюмінесценції. Концентрацію SR344 у мишачій плазмі вимірювали шляхом електрохемолюмінесценції. Приготували зразки SR344 для калібрувальної кривої, доведені до концентрації 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5 та 31,25 пг/мл, та зразки мишачої плазми, розведені у 50 разів або більше. Зразки змішали з розчином моноклонального антитіла проти людського IL-6R (R&D), міченого рутенієм за допомогою Sulfo-Tag NHS Ester (Meso Scale Discovery), біотинілованим антитілом проти людського IL-6R (R&D) та WT-IgG1, а потім залишили реагувати протягом ночі при 37 °C. Кінцева концентрація WT-IgG1 становила 333 мкг/мл, яка перебільшувала концентрацію антитіла проти людського рецептора IL-6, що містилося у зразках, з метою зв'язування майже з усіма молекулами SR344 у зразках з WT-IgG1. Після цього зразки помістили у планшет MA400 PR Streptavidin Plate (Meso Scale Discovery) та залишили реагувати протягом 1 години при кімнатній температурі, а потім виконали промивання. Одразу після того, як було розподілено буфер для читування Read Buffer T (x4) (Meso Scale Discovery), виконували вимірювання за допомогою читувача Sector PR 400 Reader (Meso Scale Discovery). Концентрацію SR344 розраховували на основі відповіді за калібрувальною кривою, використовуючи аналітичне програмне забезпечення SOFTmax PRO (Molecular Devices). Зміну за часом концентрації SR344 у плазмі після внутрішньовенного введення за цим способом наведено на Фіг. 29.

Ефекти залежного від pH зв'язування

Щодо зміни за часом концентрації антитіл WT-IgG1 та H54/L28-IgG1, які не демонструють залежне від pH зв'язування, та H170/L82-IgG1 та Fv4-IgG1, які демонструють залежне від pH зв'язування, то зміна концентрації за часом була приблизно однаковою для WT-IgG1, H54/L28-IgG1 та Fv4-IgG1, проте H170/L82-IgG1 вилучався незначно швидше. Дані стосовно зміни за часом концентрації у плазмі проаналізували за допомогою програмного забезпечення для аналізу фармакокінетики WinNonlin (Pharsight). Періоди піврозпаду у плазмі WT-IgG1, H54/L28-IgG1, Fv4-IgG1 та H170/L28-IgG1 становили 21,0, 28,8, 26,2 та 7,5 діб, відповідно.

Як описано у Прикладі 2, коли антиген - це розчинний антиген, то введенне антитіло зв'язується з антигеном у плазмі та утримується у плазмі у формі комплексу антиген-антитіло. Взагалі, на відміну від надзвичайно тривалого утримання у плазмі антитіла (швидкість елімінування є надзвичайно низькою) внаслідок функції FcRn, час утримання у плазмі антигену є коротким (швидкість елімінування є високою). Отже, антиген, що зв'язується з антитілом, має подовжений час утримання у плазмі порівняно з часом утримання у плазмі антитіла (швидкість елімінування є надзвичайно низькою). Подібно до цього, коли вводився тільки антиген гуманізованого антитіла проти рецептора IL-6, SR344 (розчинний рецептор IL-6 людини), тоді SR344 надзвичайно швидко вилучався (період піврозпаду у плазмі: 0,2 доби). Проте, у випадку введення SR344 разом зі звичайним антитілом WT-IgG1 або H54/L28-IgG1, які не демонструють залежне від pH зв'язування, швидкість елімінування SR344 була суттєво знижена, а час утримання у плазмі SR344 був подовженим (період піврозпаду у плазмі: 5,3 доби для WT-IgG1, 6,3 доби для H54/L28-IgG1). Це зумовлюється тим, що майже усі молекули SR344 зв'язалися антитілами, введенними разом, та, отже, зв'язаний з антитілом SR344 мав подовжений період утримання у плазмі подібно до періоду антитіла, що є наслідком дії FcRn, описаної вище.

У випадку введення SR344 разом з антитілами H170/L82-IgG1 або Fv4-IgG1, які демонструють залежне від pH введення, елімінування SR344 було суттєво швидшим (період піврозпаду у плазмі: 1,3 доби для H170/L82-IgG1, 0,6 доби для Fv4-IgG1), порівняно з випадком введення разом з WT-IgG1 або H54/L28-IgG1. Ця тенденція була особливо помітною для Fv4-IgG1. Оскільки афінність Fv4-IgG1 при pH 7,4 є такою ж самою або сильнішою, ніж афінність WT-IgG1 та H54/L28-IgG1, то вважають, що майже усі молекули SR344 зв'язалися з Fv4-IgG1. Навіть не зважаючи на те, що Fv4-IgG1 демонструє еквівалентне або несуттєво більш тривале утримання у плазмі та повільніше елімінування порівняно з WT-IgG1 та H54/L28-IgG1, елімінування SR344, зв'язаного з Fv4-IgG1, відбувалося надзвичайно швидко. Це можна пояснити концепцією цієї технології, зображеної на Фіг. 4. У випадку звичайних антитіл, які не демонструють залежного від pH зв'язування, комплекс антитіло-розчинний антиген захоплюється в ендосоми внаслідок піноцитозу у плазмі та зв'язується з FcRn, що експресується в ендосомах за внутрішньоендосомними кислотними умовами. Оскільки комплекс антитіло-розчинний антиген, зв'язаний з FcRn, переноситься до клітинної поверхні таким, яким він є, та знов повертається до плазми, то антиген, зв'язаний з антитілом, має подовжений час утримання у плазмі, подібний до часу утримання у плазмі антитіла (елімінування є надзвичайно повільним). З іншого боку, у випадку антитіл, що демонструють залежне від pH зв'язування, антиген відокремлюється від антитіла за внутрішньоендосомними кислотними умовами, та, отже, тільки антитіло зв'язується з FcRn та повертається знов до плазми. Оскільки антиген, відокремлений від антитіла, руйнується у лізосомах без повернення до плазми, то елімінування антигену відбувається надзвичайно швидко порівняно з випадком антитіл, які не демонструють залежне від pH зв'язування. Тобто, у випадку введення SR344 разом з антитілами WT-IgG1 або H54/L28-IgG1, які не демонструють залежне від pH зв'язування, елімінування SR344 відбувається так само повільно, як і елімінування антитіла, оскільки SR344 зв'язується з WT-IgG1 або H54/L28-IgG1 як у плазмі, так і в ендосомах. На відміну від цього, у випадку введення SR344 разом з антитілами H170/L82-IgG1 або Fv4-IgG1, які демонструють залежне від pH зв'язування, елімінування SR344 відбувається надзвичайно швидко, оскільки SR344 відокремлюється від антитіла у внутрішньоендосомному середовищі з низьким pH. Тобто, оскільки антитіла H170/L28-IgG1 та Fv4-IgG1, які демонструють залежне від pH зв'язування, відокремлюються від SR344 у внутрішньоендосомному середовищі з низьким pH, то вважають, що більша частина H170/L82-IgG1 або Fv4-IgG1, що повернулася знов до плазми за допомогою FcRn, не є зв'язаною з SR344. Отже, як показано на Фіг. 4, виявили, що внаслідок відокремлення від антигену у внутрішньоендосомному середовищі з низьким pH та повернення до плазми за допомогою FcRn без зв'язку з антигеном, антитіло, що демонструє залежне від pH зв'язування, може знов зв'язуватися з антигеном у плазмі. Також було показано, що повторюючи цей процес, антитіло, що демонструє залежне від pH зв'язування, може неодноразово зв'язуватися з численними антигенами. Це підтверджується даними, отриманими за допомогою Біасоре, які наведено у Прикладі 7, які демонструють, що залежні від pH антитіла можуть неодноразово зв'язуватися з антигенами. Отже, покращуючи залежне від pH зв'язування антитіла з антигеном, можна підвищити кількість разів неодноразового зв'язування з антигеном.

Коли антиген - це розчинний антиген, а антиген зв'язується з антитілом за нейтральними умовами плазми, але відокремлюється від антитіла в ендосомах, та це антитіло повертається до плазми за допомогою FcRn, тоді це антитіло може знов зв'язуватися з антигеном за нейтральними умовами плазми. Отже, антитіло, що має здатність відокремлюватися від антигену за внутрішньоендосомними кислотними умовами, може зв'язуватися з антигенами багато разів. Порівняно з тим, коли антиген, зв'язаний з антитілом, не відокремлюється від антитіла в ендосомах (а саме, антиген, зв'язаний з антитілом, повертається до плазми), якщо антиген, зв'язаний з антитілом, відокремлюється від антитіла в ендосомах, тоді швидкість елімінування антигену з плазми зростає, оскільки антиген переноситься до лізосом та руйнується. Отже, швидкість елімінування з плазми антигену можна використовувати як показник для визначення, чи може антитіло зв'язатися з антигеном багато разів. Визначення швидкості елімінування антигену з плазми можна здійснити, наприклад, шляхом введення антигену та антитіла *in vivo*, а потім шляхом вимірювання концентрації антигену у плазмі після введення, як показано у Прикладах.

Антитіло, яке демонструє залежне від pH зв'язування, може неодноразово зв'язуватися з багатьма антигенами на відміну від випадку зі звичайним антитілом, яке не демонструє залежне від pH зв'язування. Отже, кількість антитіла, що вводиться, можна суттєво знизити, та інтервали між введеннями можна значно подовжити.

Неодноразове зв'язування з численними антигенами за цим механізмом засновано на залежній від pH реакції антиген-антитіло. Отже, незважаючи на тип антигену, якщо можна

побудувати антитіло, яке демонструє залежне від pH зв'язування та яке зв'язується з антигеном при pH 7,4 плазми, але відокремлюється від антигену при внутрішньоендосомному кислотному pH, тоді таке антитіло може неодноразово зв'язуватися з багатьма антигенами. Отже, ця технологія є корисною тому, що її можна застосовувати не тільки до антитіл проти рецептора IL-6, IL-6 та рецептора IL-31, а і взагалі до будь-якого антигену, незалежно від типу антигену.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> ЧУГЕЙ СЕЙЯКУ КАБУСІКІ КАЙСЯ (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)

<120> СПОСІБ СКРИНІНГУ АНТИТІЛА (ВАРІАНТИ) ТА СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ АНТИТІЛА (ВАРІАНТИ)

<130> C1-A0801Y2P

<140> PCT/JP2009/057309

<141> 2009-04-10

<150> JP 2008-104147

<151> 2008-04-11

<150> JP 2008-247713

<151> 2008-09-26

<150> JP 2009-068744

<151> 2009-03-19

<160> 70

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 119

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 1

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

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

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

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 2

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

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Tyr Tyr Gly Ser Glu Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 3

<211> 119

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

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

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu

50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 4
<211> 119
<212> PRT
5 <213> Штучна
<220>
<223> Штучно синтезована пептидна послідовність
<400> 4

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His His
20 25 30

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

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr His Tyr Asn Pro His Leu
50 55 60

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

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

Ala Arg Val Leu Ala Arg Ile Thr Ala Met Asp His Trp Gly Glu Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

10 <210> 5
<211> 119
<212> PRT
15 <213> Штучна
<220>
<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 5

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

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

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

Ile Gly His Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro His Leu
50 55 60

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

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

Ala Arg Phe Leu Ala Arg Ile Thr Ala His Asp His Trp Gly Glu Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 6

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

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln His Ile Ser Ser His
20 25 30

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

Tyr Tyr Gly Ser His Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 7

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

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser His
20 25 30

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

Tyr Tyr Gly Ser His Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

10 <210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> Штучна

15 <220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 8

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

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser His
20 25 30

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

Tyr Tyr Gly Ser His Leu His His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 9

<211> 448

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 9

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

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

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

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

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

Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

5

10

115					120					125					
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
130					135					140					
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
145					150					155					160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
				165					170					175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
			180					185					190		
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
		195					200					205			
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
		210					215					220			
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro
225							230					235			240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
				245					250					255	
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
			260					265					270		
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
		275					280					285			
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
		290					295					300			
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu
305						310					315				320

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 10

<211> 214

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 10

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

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

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

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

5

10

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 11

<211> 119

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 11

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

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

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

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

5

10

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

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

Ala Arg Val Leu Ala Arg Ile Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

- 5
- <210> 12
 - <211> 107
 - <212> PRT
 - <213> Штучна
 - <220>
 - <223> Штучно синтезована пептидна послідовність
 - <400> 12

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

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Tyr Tyr Gly Ser Glu Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

- 10
- <210> 13
 - <211> 1404
 - <212> DNA
 - <213> Штучна
- 15
- <220>
 - <223> Штучно синтезована нуклеотидна послідовність
 - <400> 13

```

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactcccag      60
gtccaactgc aggagagcgg tccaggtctt gtgaaaccta gcgagaccct gagcctgacc      120
tgcgccgtgt ctggctactc aattagcgac gatcatgcct ggagctgggt tcgccagcca      180
cctggagaag gtcttgagtg gattggatac attagttata gtggaatcac aaactataat      240
ccatctctca aaggcagagt gacaatatcg agagacacca gcaagaacca gttcagcctg      300
aaactcagca gcgtgacagc cgcgcacacc gcggcttatt attgtgcaag atccctagct      360
cggactacgg ctatggacta ctggggtgaa ggcaccctcg tcacagtctc ctcagcctcc      420
accaagggcc catcgggtctt cccctggca cctctctcca agagcacctc tgggggcaca      480
gcgcccttgg gctgcctggg caaggactac ttccccgaac cggtgacggg gtcgtggaac      540
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc      600
tactccctca gcagcgtggg gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc      660
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagtga gcccaaactc      720
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca      780
gtcttctctt tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccgga cctgagggtc      840
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg      900
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg      960
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac     1020
aagtgaagg tctccaacaa agccctccca gcccctatcg agaaaaccat ctccaaagcc     1080
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc     1140
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctgggc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg     1200
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac     1260
tcgcagggct ccttcttcct ctacagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag     1320
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cagcagaag     1380
agcctctccc tgtctccggg taaa                                     1404

```

5

<210> 14

<211> 321

<212> DNA

<213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована нуклеотидна послідовність

10

<400> 14

		gacatccaga tgaccagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtgggtga cagcgtgacc	60
		atcacctgtc aagccagcca ggacatcagc agttacctga attggtacca gcagaagcca	120
		ggaaaggctc cagagctgct gatctactac ggctccgaac tgcactctgg tgtgccaagc	180
		agattcagcg gtagcggtag cggtagccgac ttcaccttca ccatcagcag cctcgaggca	240
		gaggacgcgc ctacctacta ctgcggggcag ggtaaccggc ttccatacac gttcggccaa	300
		gggaccaagg tggaaatcga a	321
5		<210> 15 <211> 15 <212> PRT <213> Штучна <220> <223> Штучно синтезована пептидна послідовність <400> 15	
		Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser	
10	1		5 10 15
		<210> 16 <211> 24 <212> DNA <213> Штучна	
15		<220> <223> Штучно синтезована послідовність праймера <400> 16	
		ttcccaccag cctgtccgcc totg	24
20		<210> 17 <211> 24 <212> DNA <213> Штучна <220> <223> Штучно синтезована послідовність праймера	
25		<400> 17 cgtgaagcca aaggccccac tccc	24
		<210> 18 <211> 32 <212> DNA <213> Штучна <220> <223> Штучно синтезована послідовність праймера <400> 18	
		tagaattcca ccatgctggc cgtcggctgc gc	32
35		<210> 19 <211> 57 <212> DNA <213> Штучна <220> <223> Штучно синтезована послідовність праймера <400> 19	
40		attgcggcgc cttatcagtg gtgatgatga tgatgtggta ccgaagaaga atcttgc	57
45		<210> 20 <211> 1131 <212> DNA <213> Штучна <220>	

<223> Штучно синтезована нуклеотидна послідовність

<400> 20

gaattccacc	atgctggccg	tcggctgcgc	gctgctgget	gccctgctgg	ccgcgccggg	60	
ggcggcgctg	gccccggggg	gctgccctgc	acaggaggtg	gcgagaggtg	tgctgaccag	120	
tctgccagga	gacagcgtga	ctctgacctg	cccaggggga	gagccggaag	acaatgccac	180	
tgttcactgg	gttctcagga	agccagctgt	aggtccccac	ctcagcagat	gggctggcgt	240	
gggaaggagg	ctgctgctga	ggtcgggtgca	gctccatgac	tctggaaact	attcatgcta	300	
ccggggccggc	cgcccggtg	gaactgtgca	cttgcctggtg	gatgttcccc	ccgaggagcc	360	
ccagctctcc	tgcttccgga	agagccccct	cagcaacgtt	gtttgtgagt	ggggtcctcg	420	
gagcacccca	tctccgacga	ccaaggctgt	gctggttggtg	aggaagtttc	agaacagtcc	480	
ggccgaagac	ttccaggagc	cgtgccagta	ttcccaggag	tcccagaagt	tctcctgcc	540	
gttggcagtc	ccggaggagg	acagctcttt	ctacatagt	tccatgtgcg	tcgccagtag	600	
tgtcggggagc	aagctcagca	aaactcagac	ctttcagggt	tgtggaatct	tcagacctga	660	
tccgcctgcc	aacatcacag	tcaactgccg	ggccagaaac	ccccgctggc	tcagtgtcac	720	
ctggcaagac	cccactcct	ggaactcatc	tttctacaga	ctacggtttg	agctcagata	780	
tcgagctgaa	cggtaaaga	cattcacaac	atggatggtc	aaggacctcc	agcatcactg	840	
tgatcatccac	gacgcctgga	gcggcctgag	gcacgtggtg	cagcttcgtg	cccaggagga	900	
gttcggggcaa	ggcgagtgga	gcgagtggag	cccggaggcc	atgggcacgc	cttggaacaga	960	
atccaggagt	cctccagctg	agaacgaggt	gtccaccccc	acgcaggcac	ctactactaa	1020	
taaagatgat	gataatattc	tctccagaga	ttctgcaa	at	gcgacaagcc	tcccagtgc	1080
agattcttct	tcggtaccac	atcatcatca	tcaccactga	taagcgcccg	c	1131	

<210> 21

<211> 449

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 21

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser His Asp
 20 25 30
 His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly His Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro His Leu
 50 55 60
 Gln Asp Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Phe Leu Ala Arg Ile Thr Ala His Asp His Trp Gly Glu Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

5 <210> 22
 <211> 449

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

5 <400> 22

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

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

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

Ile Gly His Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro His Leu
50 55 60

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

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

Ala Arg Phe Leu Ala Arg Ile Thr Ala His Asp His Trp Gly Glu Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

5 <210> 23
 <211> 449
 <212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 23

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

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

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

- 5 <210> 24
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Штучна
 <220>
 10 <223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 24

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	1	5	10	15
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	His	Ser	Ile	Ser	His	Asp	20	25	30	
His	Ala	Trp	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Glu	Gly	Leu	Glu	Trp	35	40	45	
Ile	Gly	Phe	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Thr	Leu	50	55	60	
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Ser	Leu	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Glu	Gly	100	105	110	
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	115	120	125	
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	130	135	140	
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	145	150	155	160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	165	170	175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	180	185	190	
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	195	200	205	
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	210	215	220	
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	225	230	235	240

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

Lys

- 5 <210> 25
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Штучна
 <220>
 10 <223> Штучно синтезована пептидна послідовність
 <400> 25

```

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

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

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

Tyr Tyr Gly Ser His Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50           55           60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg Thr Val Ala Ala
100          105          110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115          120          125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130          135          140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145          150          155          160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165          170          175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

```

- 5 <210> 26
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Штучна
 <220>
 10 <223> Штучно синтезована пептидна послідовність
 <400> 26

```

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

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

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

Tyr Tyr Gly Ser His Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50           55           60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg Thr Val Ala Ala
100          105          110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115          120          125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130          135          140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145          150          155          160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165          170          175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

```

5

<210> 27
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Штучна
 <220>

10

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність
 <400> 27

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Thr Asp Ile Ser Ser His
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Gly Ser His Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

5

<210> 28
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 28

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	1	5	10	15
Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	20	25	30	
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	35	40	45	
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	50	55	60	
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	65	70	75	80
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	85	90	95	
Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	100	105	110	
Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	115	120	125	
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	130	135	140	
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	145	150	155	160
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	165	170	175	
Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	180	185	190	
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	195	200	205	
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	210	215	220	
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	225	230	235	240
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	245	250	255	

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 29

<211> 324

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 29

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

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

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

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

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

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

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

5

10

```

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

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

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

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180                      185                      190

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro

```

- 5 <210> 30
 <211> 324
 <212> PRT
 <213> Штучна
 <220>
 10 <223> Штучно синтезована пептидна послідовність
 <400> 30

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	1	5	10	15
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	20	25	30	
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	35	40	45	
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	50	55	60	
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	65	70	75	80
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	85	90	95	
Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Ser	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	100	105	110	
Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	115	120	125	
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	130	135	140	
Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	145	150	155	160
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	165	170	175	
Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	180	185	190	
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	195	200	205	
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	210	215	220	
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	225	230	235	240
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	245	250	255	

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro

<210> 31

<211> 326

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 31

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

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

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

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

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

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

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

5

10

```

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

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

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

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180                               185                               190

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

```

<210> 32

<211> 324

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 32

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	1	5	10	15
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	20	25	30	
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	35	40	45	
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	50	55	60	
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	65	70	75	80
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	85	90	95	
Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Ser	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	100	105	110	
Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	115	120	125	
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	130	135	140	
Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	145	150	155	160
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	165	170	175	
Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	180	185	190	
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	195	200	205	
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	210	215	220	
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	225	230	235	240
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	245	250	255	

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro

<210> 33

<211> 443

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 33

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

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

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
100 105 110

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

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

5

10

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

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

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

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

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

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

<210> 34

<211> 443

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 34

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

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

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
100 105 110

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

5

10

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

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

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

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

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
195 200 205

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

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

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

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
260 265 270

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

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

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

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

<210> 35

<211> 443

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 35

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

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

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

5

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

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

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
195 200 205

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

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

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

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
260 265 270

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

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

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

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

<210> 36

<211> 445

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 36

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser His Asp
 20 25 30
 His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly His Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro His Leu
 50 55 60
 Gln Asp Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Phe Leu Ala Arg Ile Thr Ala His Asp His Trp Gly Glu Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

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

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

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

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

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

<210> 37
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> Штучна
 <220>
 <223> Штучно синтезована пептидна послідовність
 <400> 37

5

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	1	5	10	15
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Ser	His	Asp	20	25	30	
His	Ala	Trp	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Glu	Gly	Leu	Glu	Trp	35	40	45	
Ile	Gly	His	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	His	Leu	50	55	60	
Gln	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	65	70	75	80
Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Phe	Leu	Ala	Arg	Ile	Thr	Ala	His	Asp	His	Trp	Gly	Glu	Gly	100	105	110	
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	115	120	125	
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	130	135	140	
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	145	150	155	160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	165	170	175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	180	185	190	
Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	195	200	205	

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

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

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

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
260 265 270

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

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

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

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

<210> 38
<211> 445
<212> PRT
<213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 38

```

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
          20          25          30

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

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Thr Leu
50          55          60

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

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

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
          100          105          110

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

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

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

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

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

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
          195          200          205

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

```

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

<210> 39

<211> 443

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 39

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	1	5	10	15
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	His	Ser	Ile	Ser	His	Asp	20	25	30	
His	Ala	Trp	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Glu	Gly	Leu	Glu	Trp	35	40	45	
Ile	Gly	Phe	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Thr	Leu	50	55	60	
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Ser	Leu	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Glu	Gly	100	105	110	
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	115	120	125	
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	130	135	140	
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	145	150	155	160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

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

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

<210> 40
<211> 6
<212> PRT
5 <213> Штучна
<220>
<223> Штучно синтезована пептидна послідовність
<400> 40

His Asp His Ala Trp Ser
1 5

10 <210> 41
<211> 16
<212> PRT
<213> Штучна
<220>
15 <223> Штучно синтезована пептидна послідовність
<400> 41

His Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro His Leu Gln Asp
1 5 10 15

<210> 42
<211> 16
20 <212> PRT
<213> Штучна
<220>
<223> Штучно синтезована пептидна послідовність
<400> 42

Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Gln Gly
1 5 10 15

25 <210> 43
<211> 16
<212> PRT
<213> Штучна
30 <220>
<223> Штучно синтезована пептидна послідовність
<400> 43

Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Thr Leu Gln Gly
1 5 10 15

35 <210> 44
<211> 10
<212> PRT
<213> Штучна
<220>
<223> Штучно синтезована пептидна послідовність
40 <400> 44

Phe Leu Ala Arg Ile Thr Ala His Asp His
1 5 10

<210> 45
<211> 10
<212> PRT
45 <213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 45

Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

5 <210> 46

<211> 30

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

10 <223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 46

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

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

<210> 47

<211> 30

15 <212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 47

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser
20 25 30

20 <210> 48

<211> 14

<212> PRT

<213> Штучна

25 <220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 48

Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 49

30 <211> 32

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

35 <400> 49

Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15

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

<210> 50

<211> 32

<212> PRT

40 <213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 50

Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15

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

5 <210> 51

<211> 32

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

10 <223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 51

Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

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

<210> 52

15 <211> 11

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

20 <400> 52

Trp Gly Glu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 53

<211> 11

<212> PRT

25 <213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 53

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

<210> 54

<211> 11

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

35 <223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 54

Gln Ala Ser Thr Asp Ile Ser Ser His Leu Asn
1 5 10

<210> 55

<211> 7

40 <212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 55

Tyr Gly Ser His Leu Leu Ser
1 5

<210> 56
<211> 7
<212> PRT
5 <213> Штучна
<220>
<223> Штучно синтезована пептидна послідовність
<400> 56

Tyr Gly Ser His Leu Glu Ser
1 5

10 <210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> Штучна
<220>
15 <223> Штучно синтезована пептидна послідовність
<400> 57

Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr Thr
1 5

20 <210> 58
<211> 23
<212> PRT
<213> Штучна
<220>
<223> Штучно синтезована пептидна послідовність
<400> 58

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

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys
20

25 <210> 59
<211> 15
<212> PRT
<213> Штучна
30 <220>
<223> Штучно синтезована пептидна послідовність
<400> 59

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

35 <210> 60
<211> 32
<212> PRT
<213> Штучна
<220>
<223> Штучно синтезована пептидна послідовність
40 <400> 60

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 61
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна
 5 <220>
 <223> Штучно синтезована пептидна послідовність
 <400> 61

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu
 1 5 10

<210> 62
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Штучна
 10 <220>
 <223> Штучно синтезована пептидна послідовність
 15 <400> 62

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

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

Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Glu Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60

Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Leu Trp Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 63

<211> 213

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 63

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

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

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

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

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

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 64

<211> 449

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 64

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Lys Leu Leu Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Glu Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr His Pro His Thr Val
 50 55 60
 Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Glu Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Leu Trp Gly His Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 65

<211> 213

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 65

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

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

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

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Trp Ser Gly His Pro Tyr Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

5

10

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

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

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 66

<211> 213

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 66

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

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

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

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Trp Ser Gly His Pro Tyr Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

5

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

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

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 67

<211> 456

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 67

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Glu Asp Val Val Pro Ala Ala Met Ser Phe Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

5

10

Asp Val Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

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

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

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

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

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

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

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270

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

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

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
325 330 335

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

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

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400

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

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly
450 455

- 5
- <210> 68
 - <211> 214
 - <212> PRT
 - <213> Штучна
 - <220>
 - <223> Штучно синтезована пептидна послідовність
 - <400> 68

```

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Thr Val
20          25          30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Glu Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
35          40          45

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
65          70          75          80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Thr Asp His
85          90          95

Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
100          105          110

Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
115          120          125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
130          135          140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys Ala Gly
145          150          155          160

Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
165          170          175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
180          185          190

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

Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210

```

<210> 69

<211> 456

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 69

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Glu Asp Val Val Pro Ala Ala Met Ser Phe Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

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

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

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

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

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

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

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270

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

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

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
325 330 335

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

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

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400

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

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly
450 455

<210> 70

<211> 449

<212> PRT

5 <213> Штучна

<220>

<223> Штучно синтезована пептидна послідовність

<400> 70

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

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

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

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

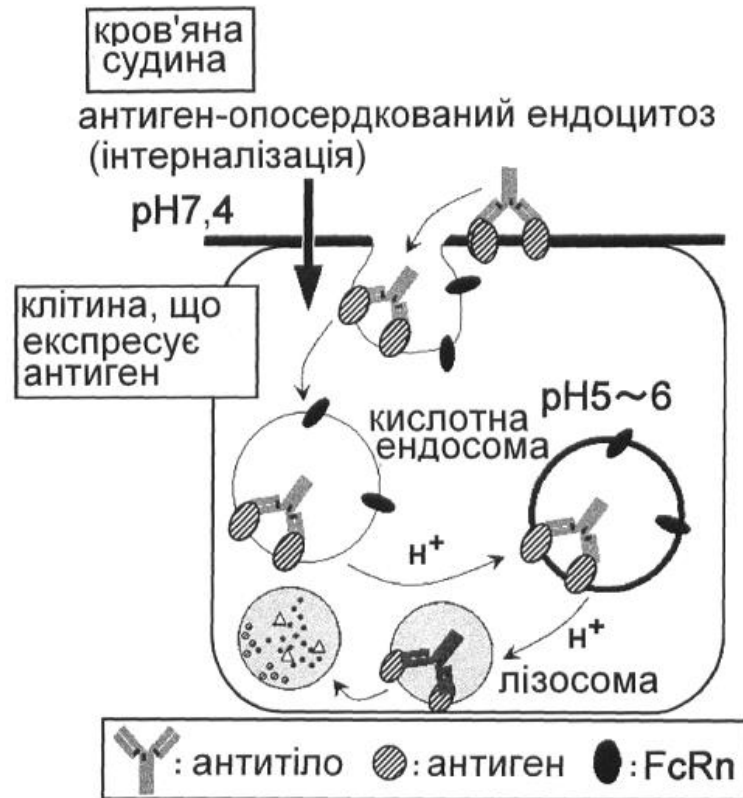
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

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

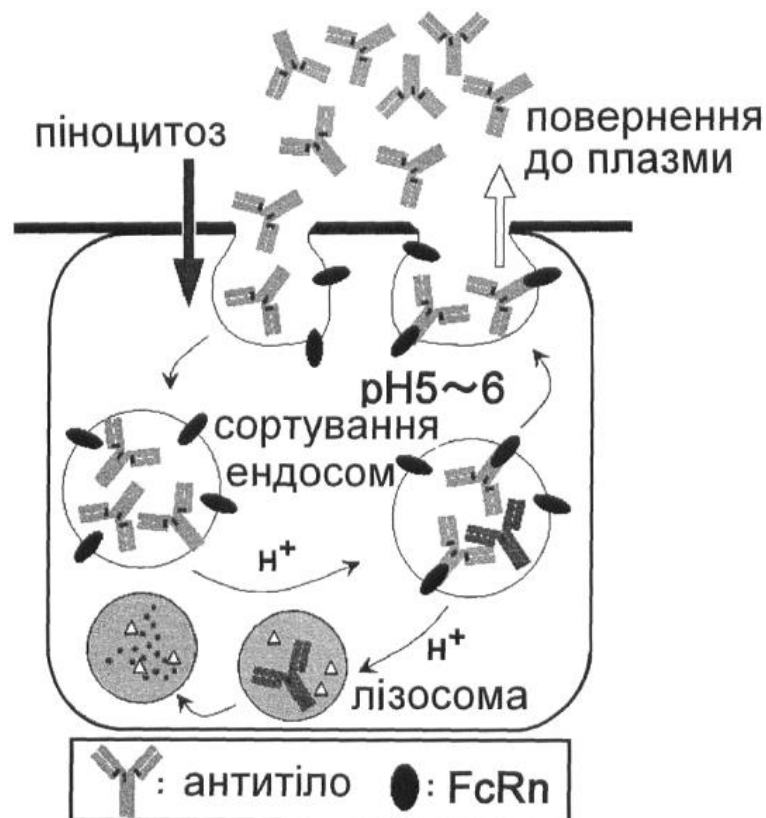
Lys

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Спосіб виготовлення фармацевтичної композиції, яка містить антитіло, який **відрізняється** тим, що він включає етапи, на яких:
 - (a) виготовляють антитіла класу IgG, які здатні зв'язуватися з характерним антигеном,
 - (b) визначають антигензв'язувальну активність згаданих антитіл при різних значеннях кислотних та нейтральних рН,
- 10 (c) вибирають антитіло, антигензв'язувальна активність якого є рН-залежною,
- (d) одержують ген, що кодує антитіло, вибране на етапі (c),
- (e) виготовляють антитіло із використанням гена, одержаного на етапі (d), та
- (f) виготовлене на етапі (e) антитіло змішують з принаймні одним фармацевтично прийнятним носієм з одержанням фармацевтичної композиції, при цьому на етапі (c) вибирають антитіло,
- 15 антигензв'язувальна активність якого при рН від 6,7 до 10,0 є більшою, ніж його антигензв'язувальна активність при рН від 4,0 до 6,5.
- 2 2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що на етапі (c) вибирають антитіло, антигензв'язувальна активність якого при рН від 6,7 до 10,0 удвічі або більше перевищує його антигензв'язувальну активність при рН від 4,0 до 6,5.
- 20 3. Спосіб за п. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що кожне з антитіл, виготовлених на етапі (a), має мутацію, здійснену шляхом або заміщення принаймні однієї амінокислоти гіперваріабельної ділянки (CDR) або амінокислотного залишку 27 у важкому ланцюзі антитіла (за нумерацією за Kabat) гістидином, або вставляння принаймні одного гістидину в CDR антитіла.



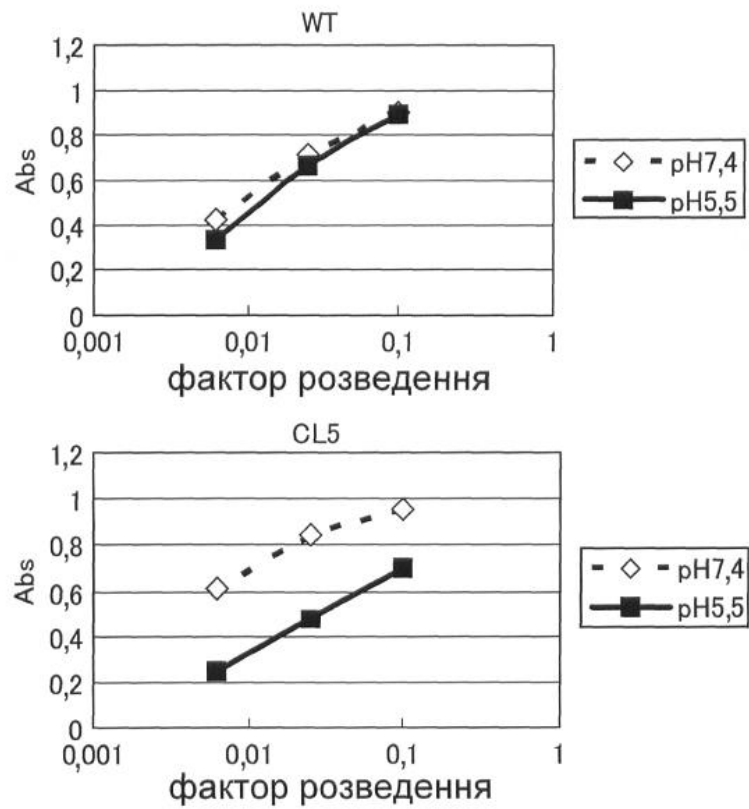
Фіг. 1



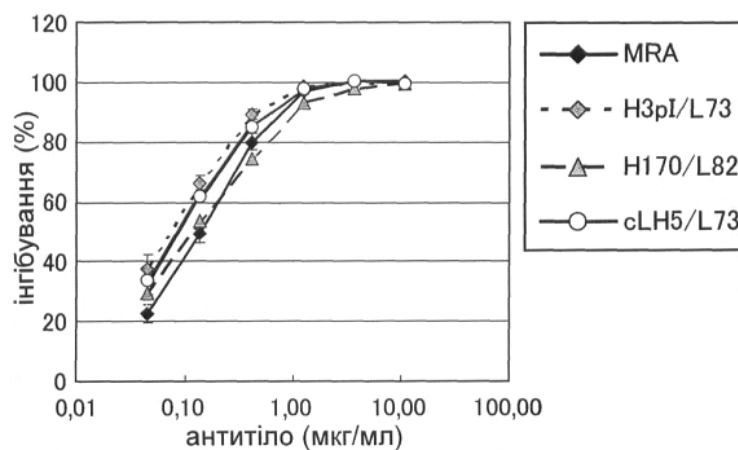
Фіг. 2



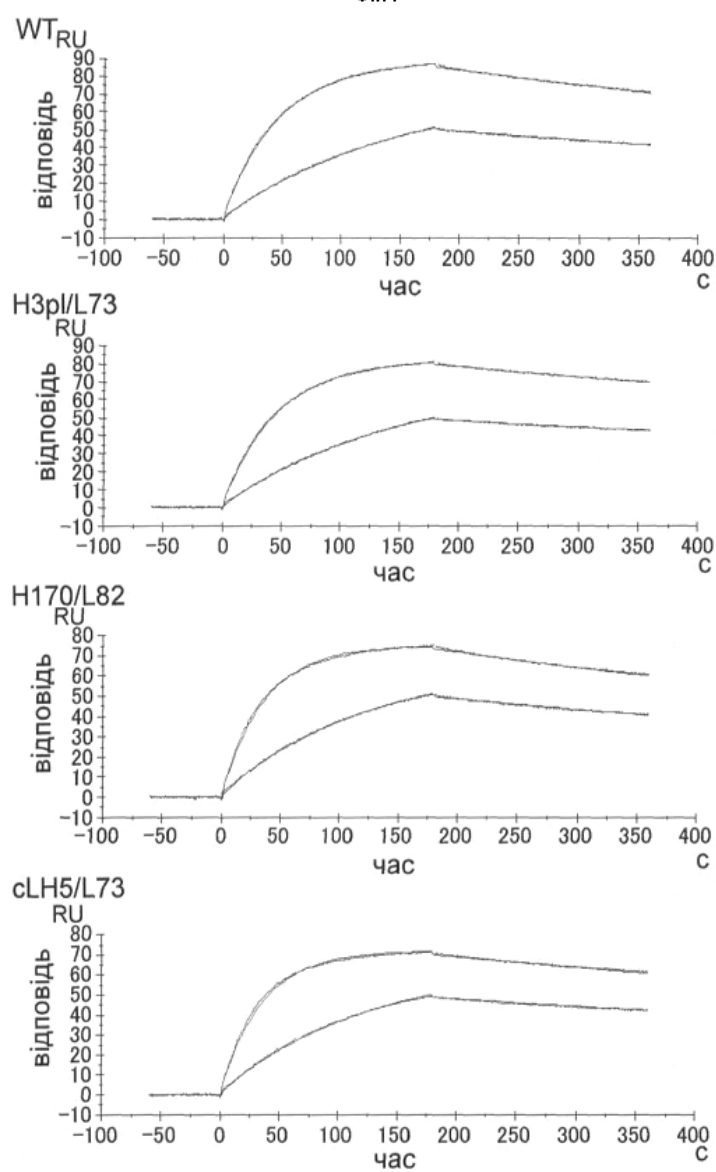
Фиг. 5



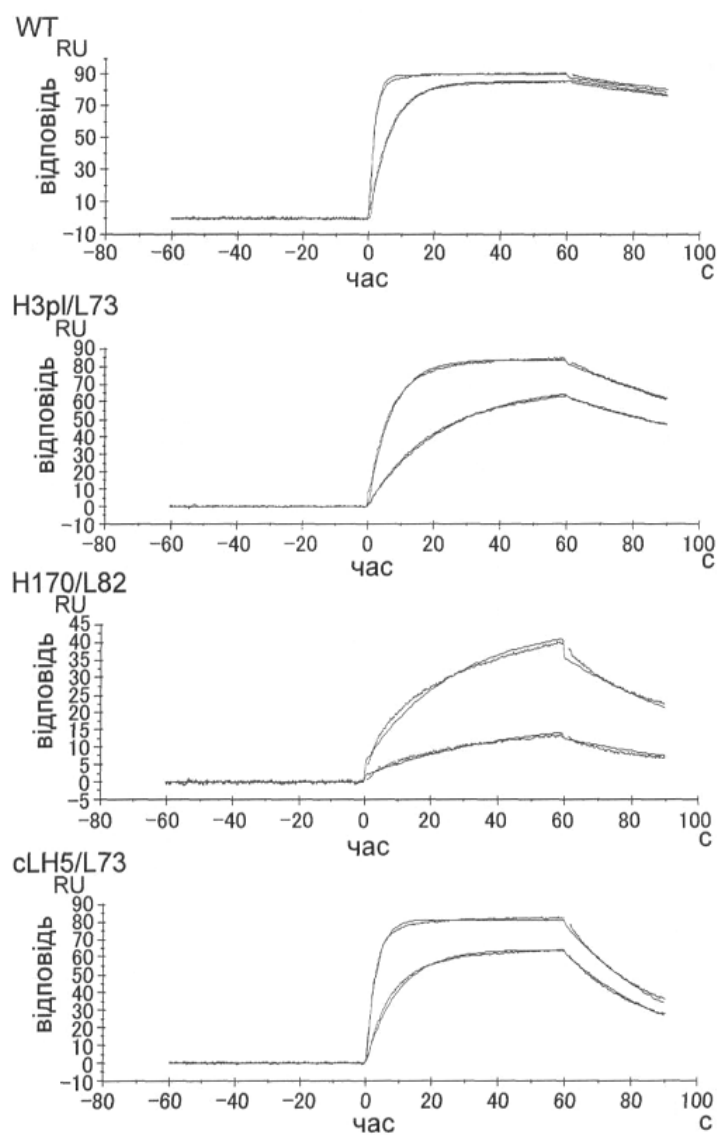
Фиг. 6



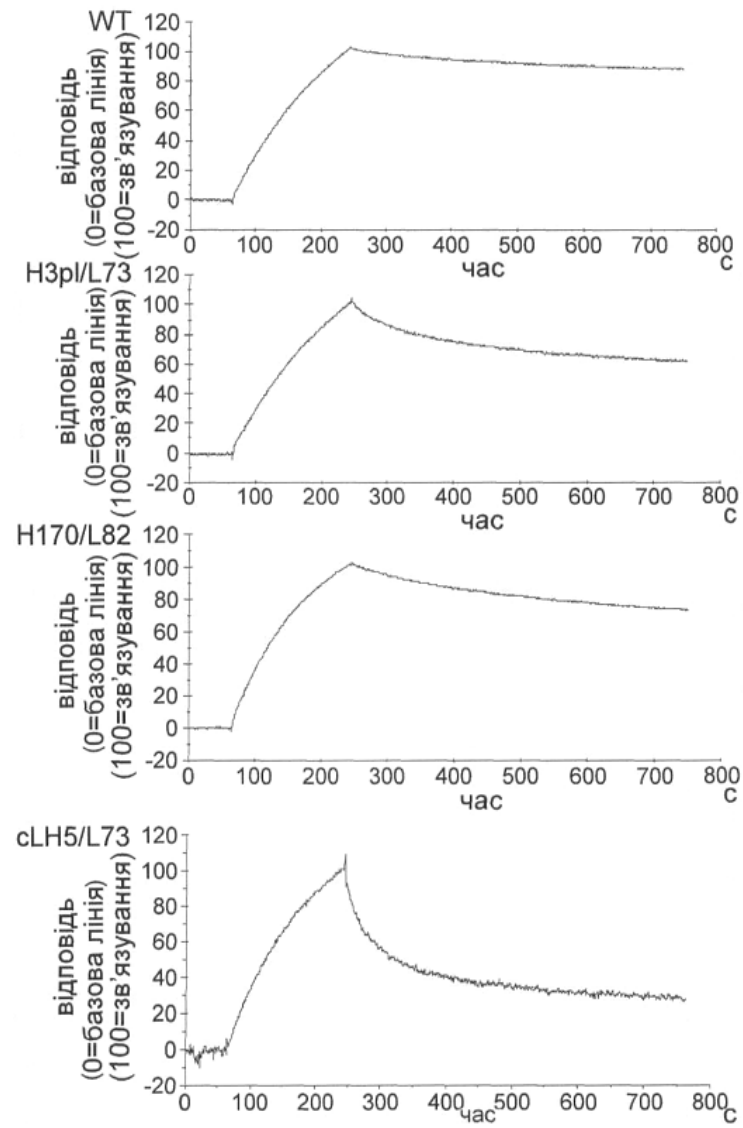
Фіг. 7



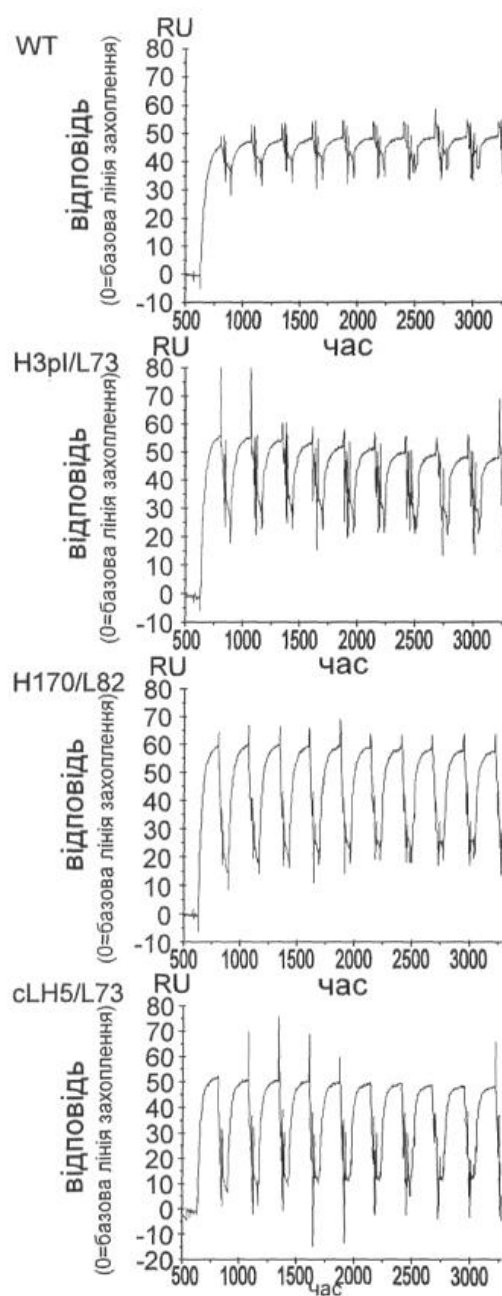
Фіг. 8



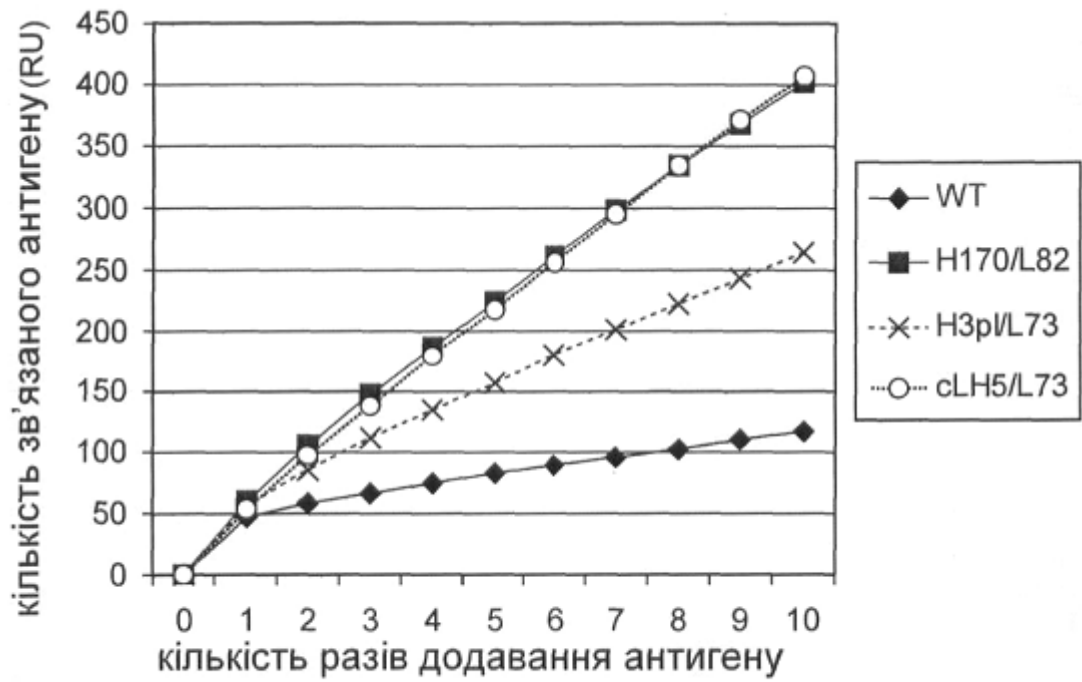
Фиг. 9



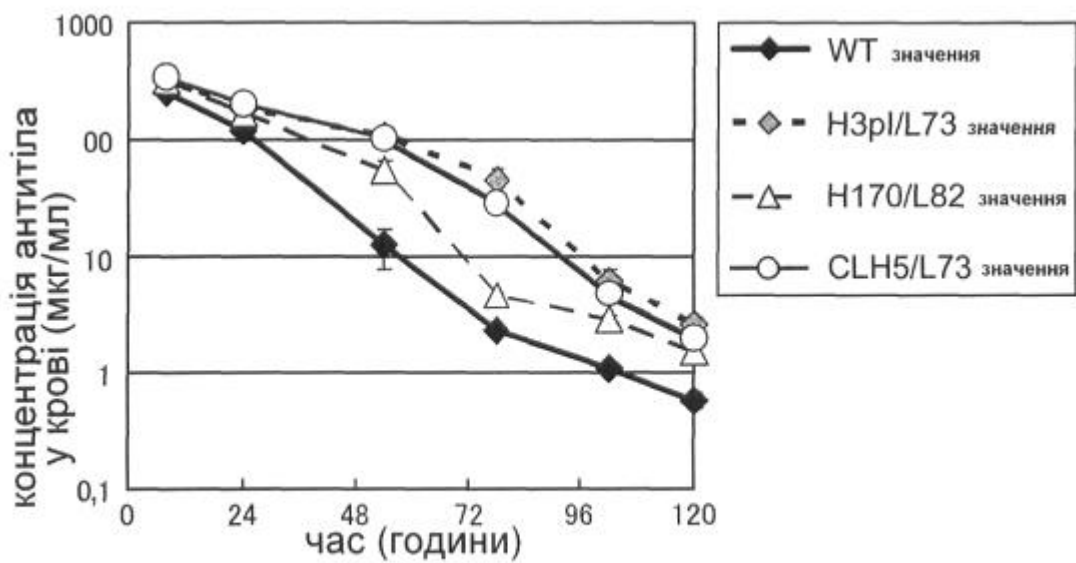
Фиг. 10



Фіг. 11



Фіг. 12



Фіг. 13

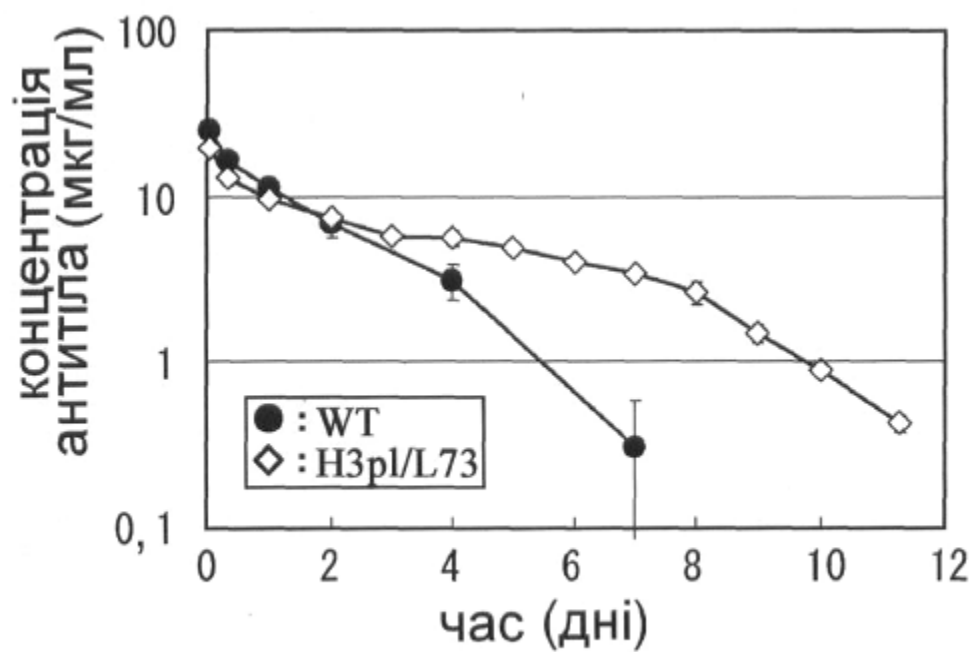


Fig. 14

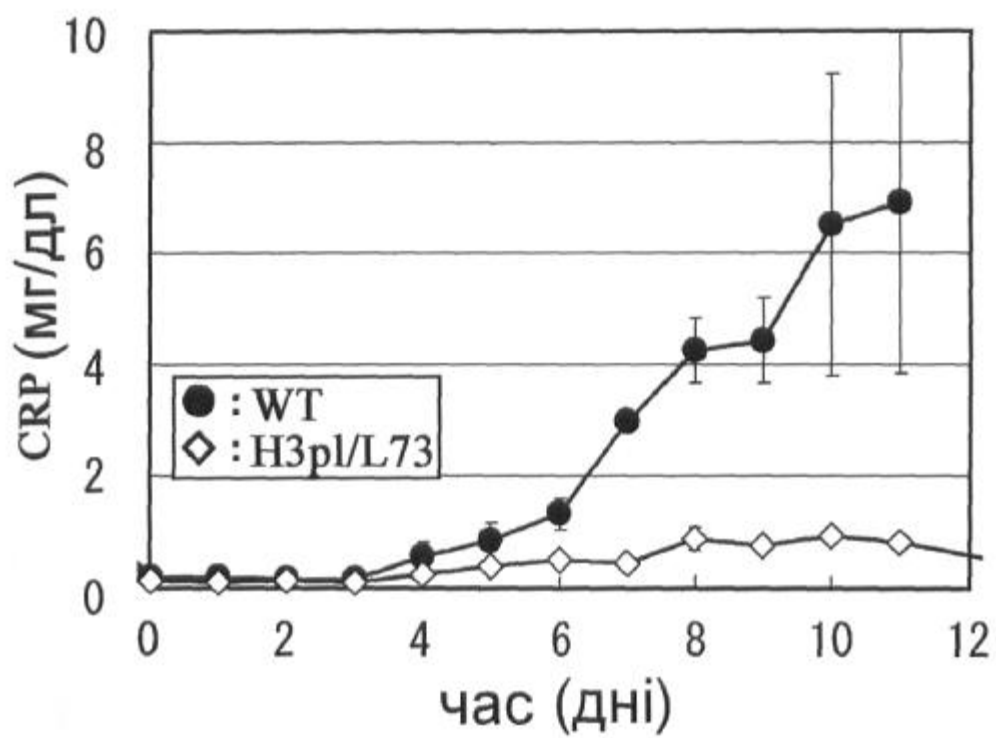


Fig. 15

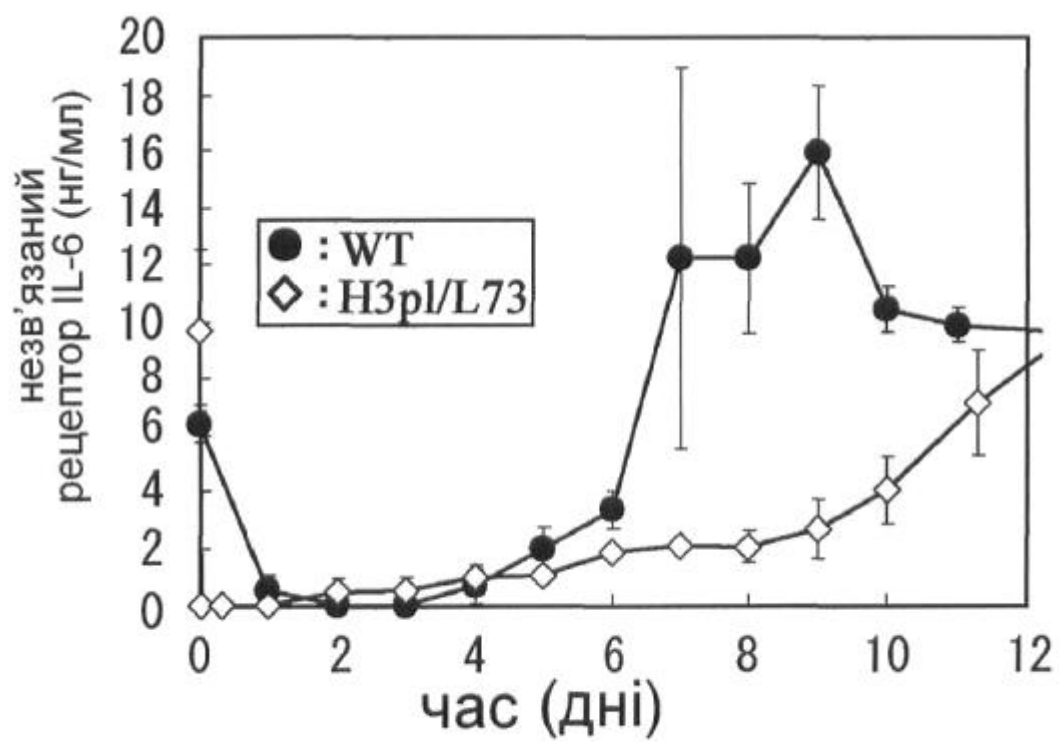
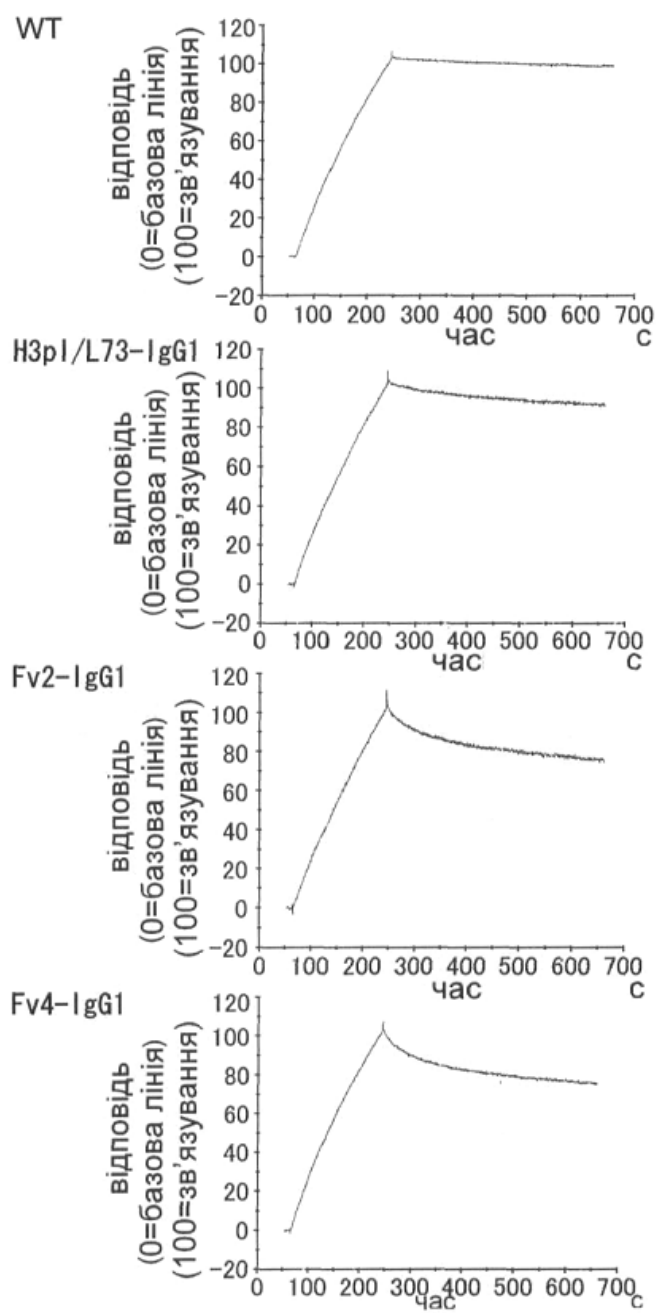


Fig. 16



Фіг. 17

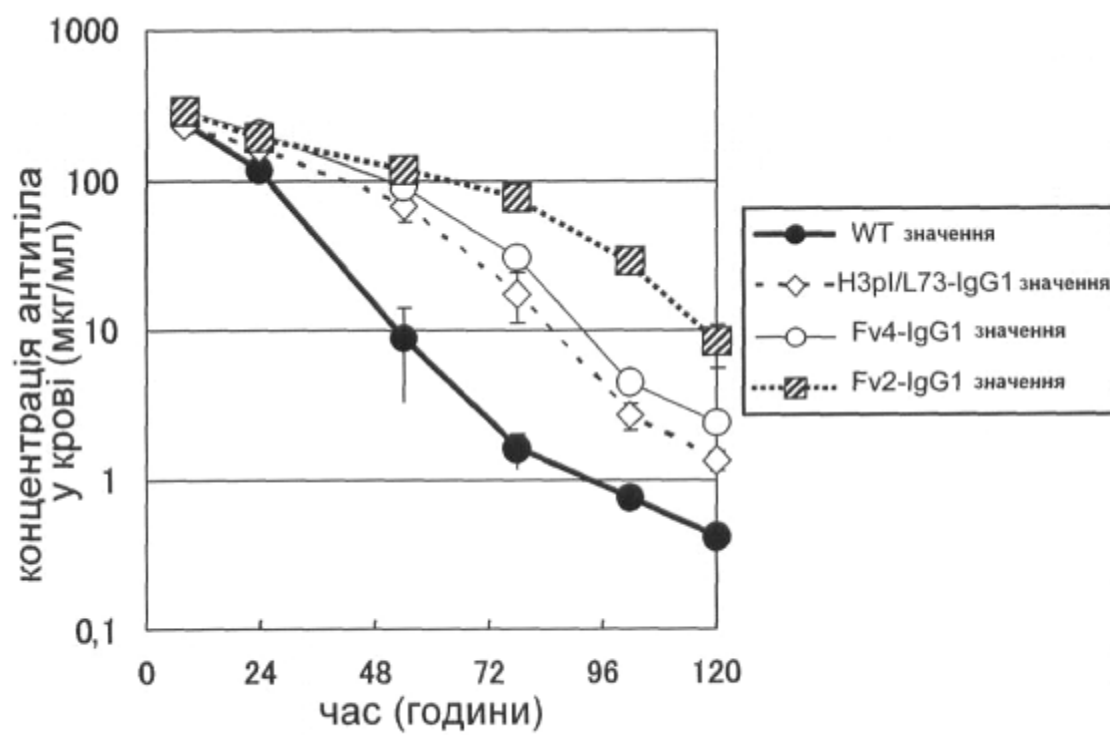
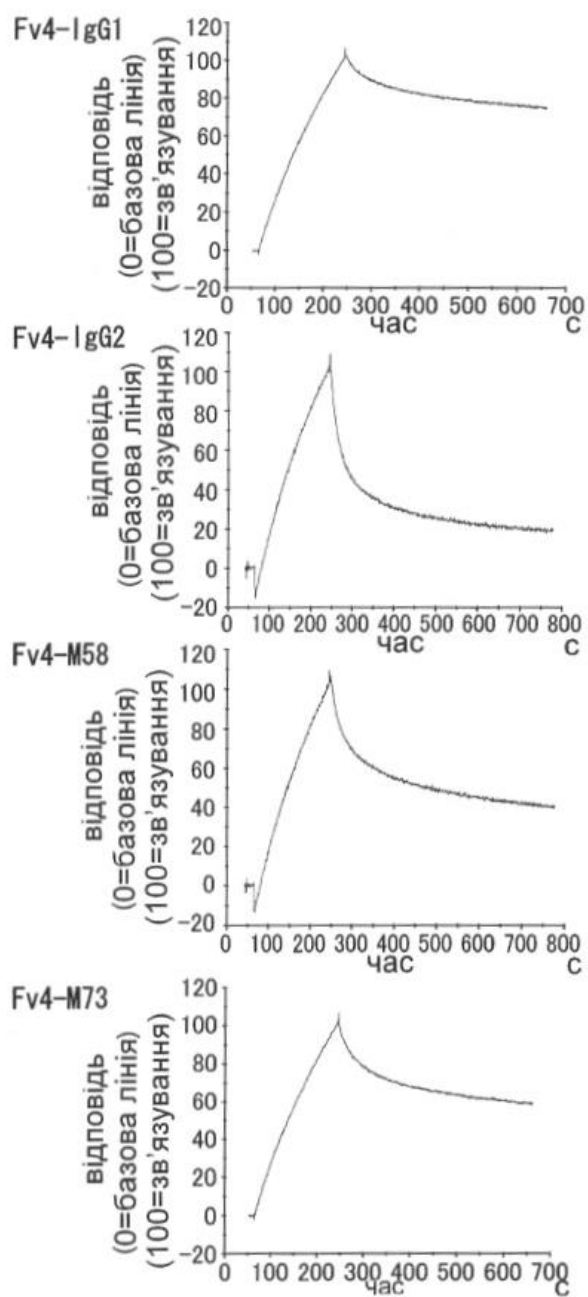


Fig. 18



Фіг. 19

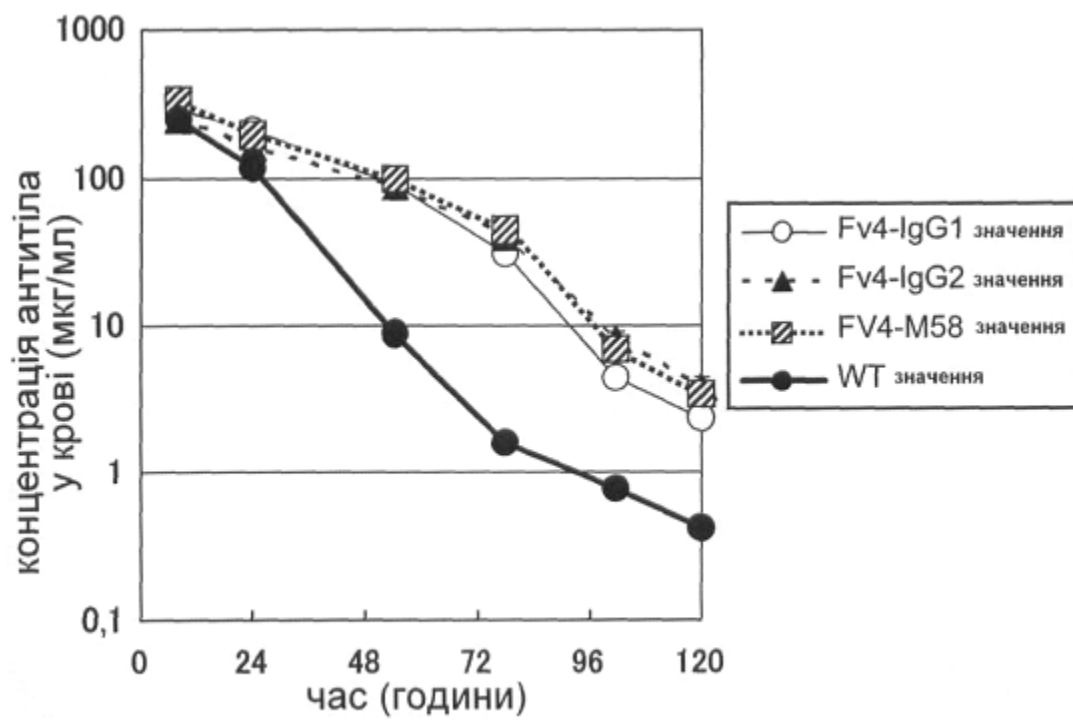
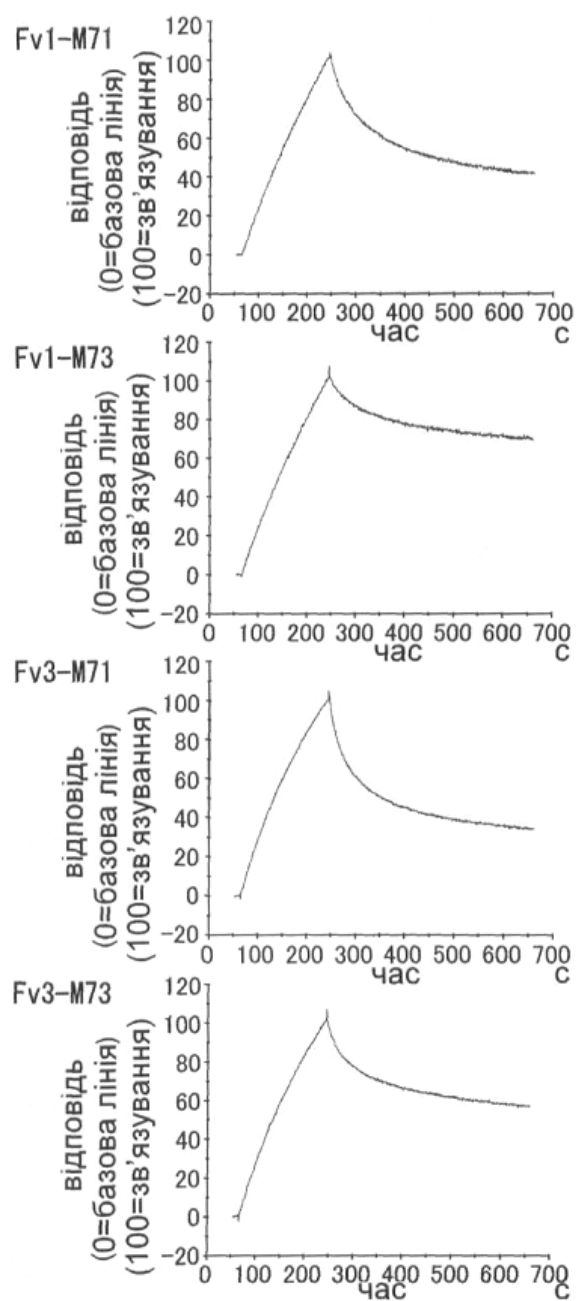
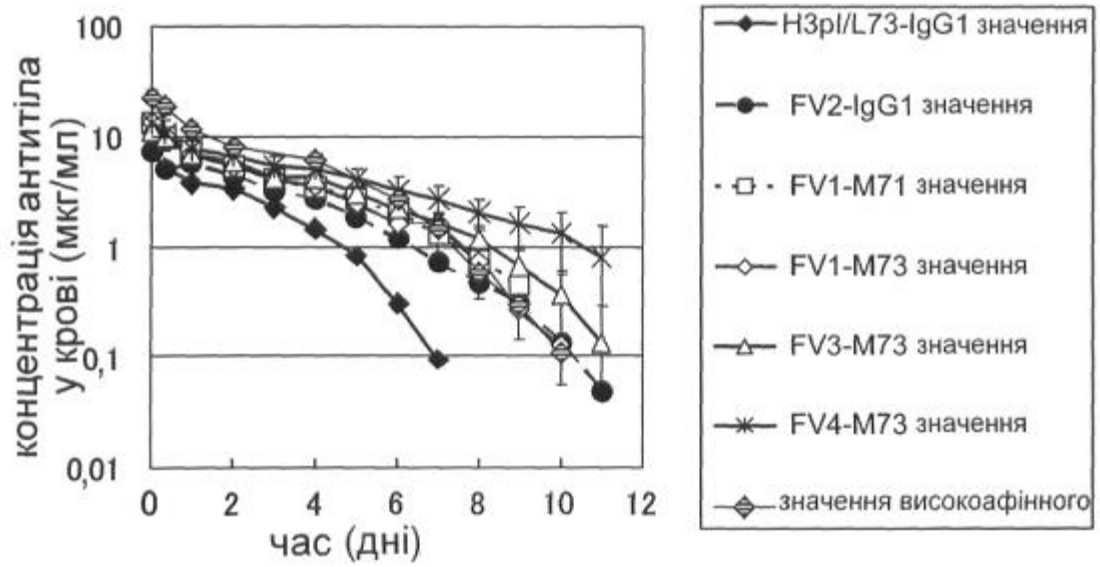


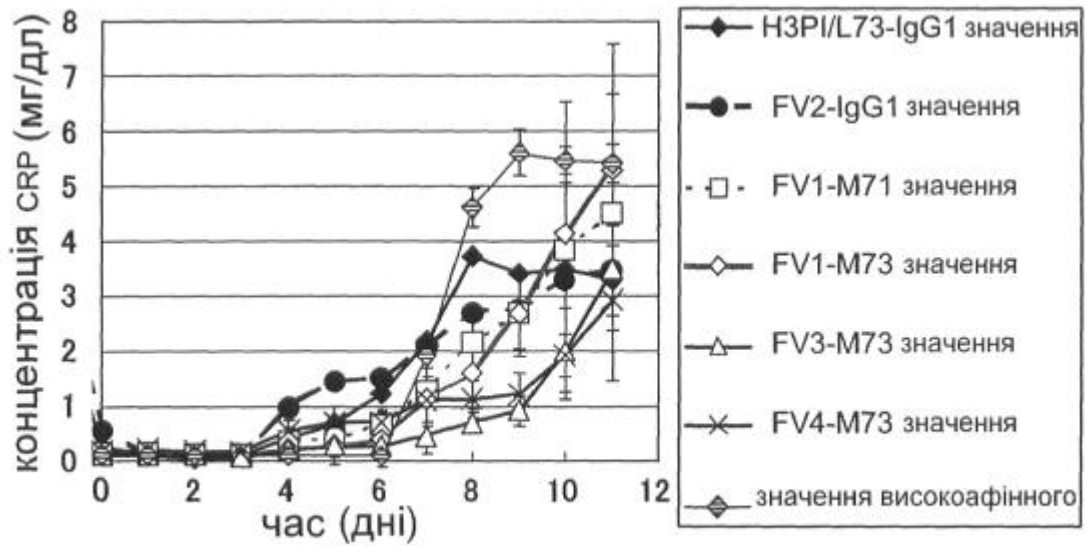
Fig. 20



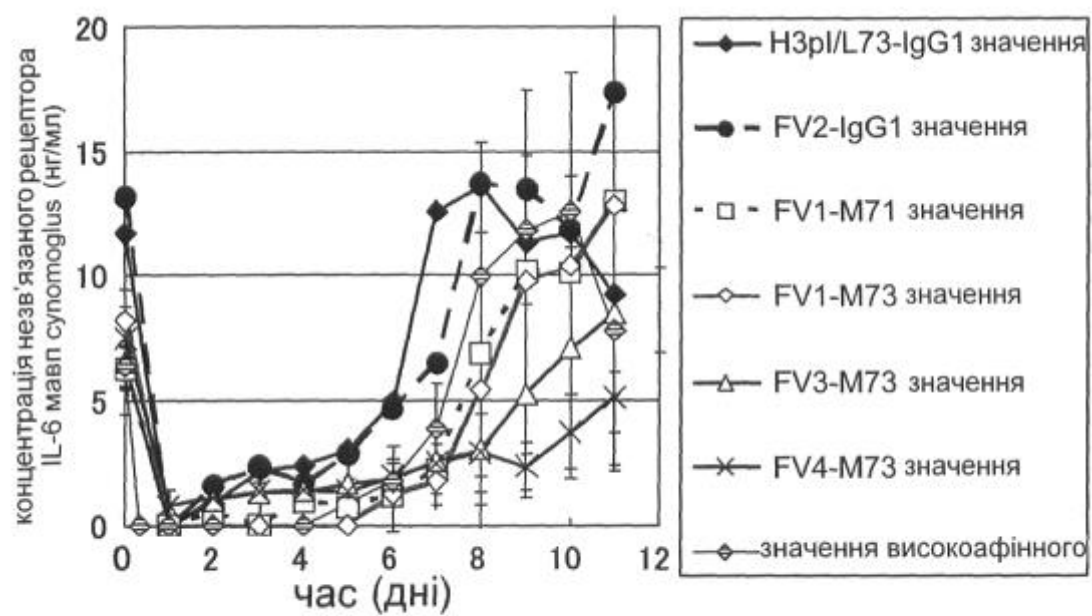
Фиг. 21



Фіг. 22



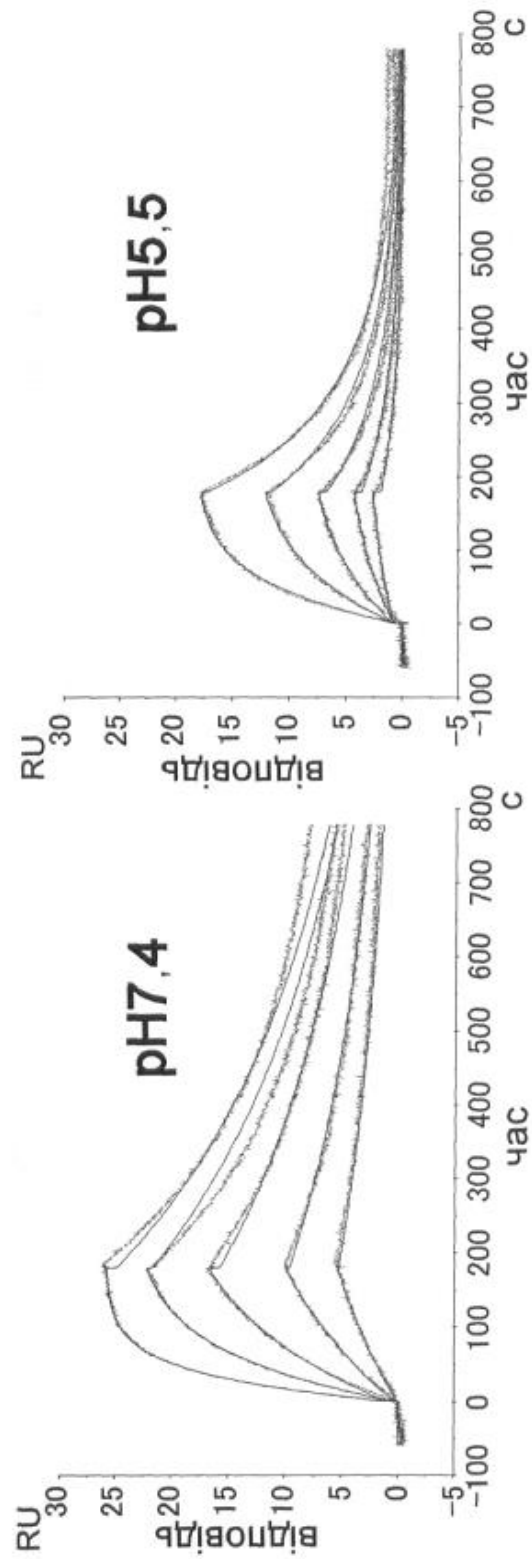
Фіг. 23



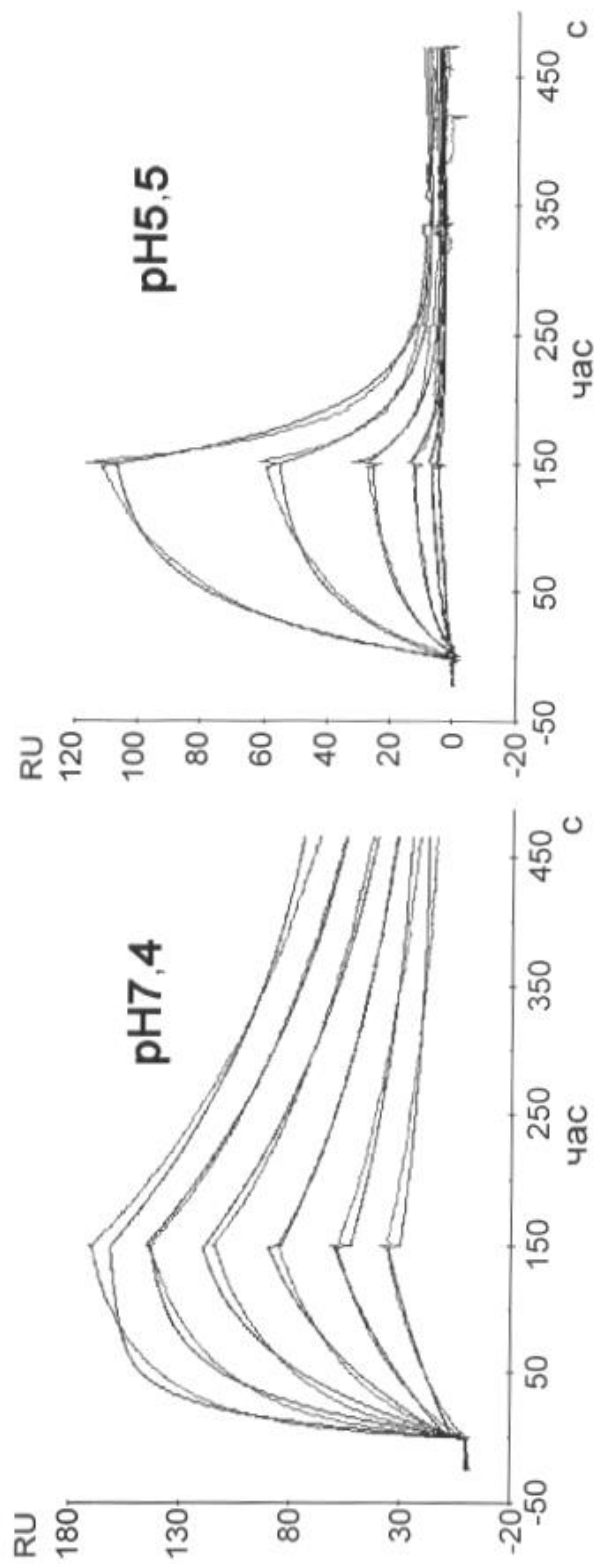
Фиг. 24

важкий ланцюг									
VH1 : QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSIS	HDHAW	WVRQPPGEGLEWIG	HI	SYSGITNYPHLQD					
VH2 : QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSIS	HDHAW	WVRQPPGEGLEWIG	HI	SYSGITNYPHLQD					
VH3 : QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGHSIS	HDHAW	WVRQPPGEGLEWIG	FI	SYSGITNYPNPSLQD					
VH4 : QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGHSIS	HDHAW	WVRQPPGEGLEWIG	FI	SYSGITNYPNPTLQD					
	*		*	*					
	FR1	CDR1	FR2	CDR2					
легкий ланцюг									
VH1 : RVTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAAYYCAR	FLARITAH	WGEGTLVTVSS							
VH2 : RVTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAAYYCAR	FLARITAH	WGEGTLVTVSS							
VH3 : RVTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAR	SLARTTAMDY	WGEGTLVTVSS							
VH4 : RVTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAR	SLARTTAMDY	WGEGTLVTVSS							
	*	***	***	*	*	*	*	*	*
		FR3			CDR3		FR4		
VL1 DIQMTQSPSSLSASVGDSTITC	QASRDISSHLN	WYQQKPGKAPELL IY	YGSHLLS	GVP	S	R	F	S	G
VL2 DIQMTQSPSSLSASVGDSTITC	QASRDISSHLN	WYQQKPGKAPELL IY	YGSHLES	GVP	S	R	F	S	G
VL3 DIQMTQSPSSLSASVGDSTITC	QASTDISHLN	WYQQKPGKAPELL IY	YGSHLLS	GVP	S	R	F	S	G
	*		*						
	FR1	CDR1	FR2	CDR2			FR3	CDR3	FR4

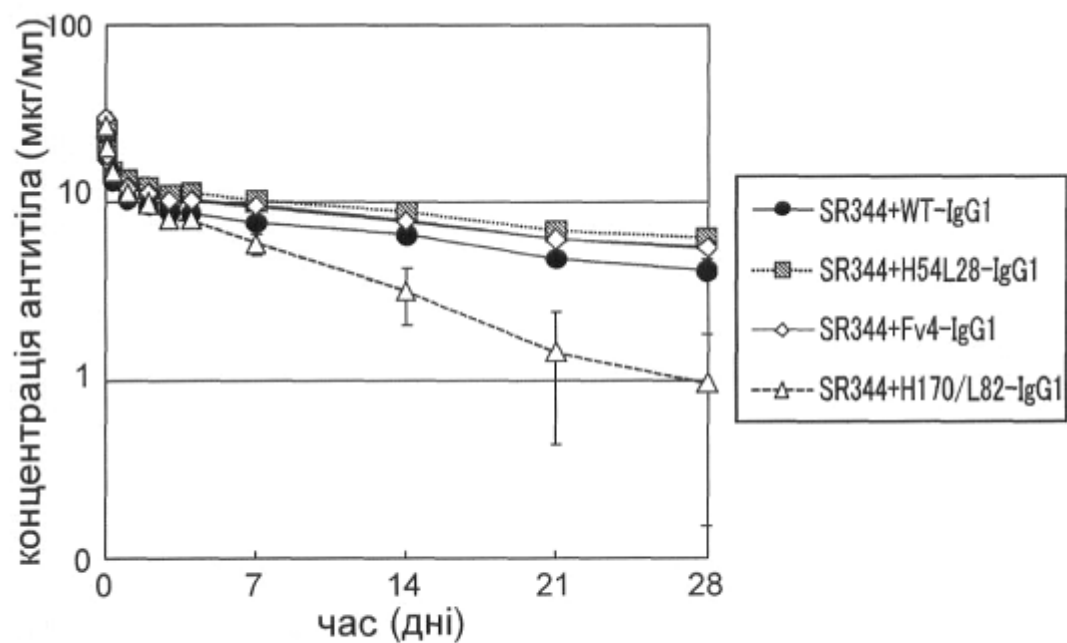
Фир. 25



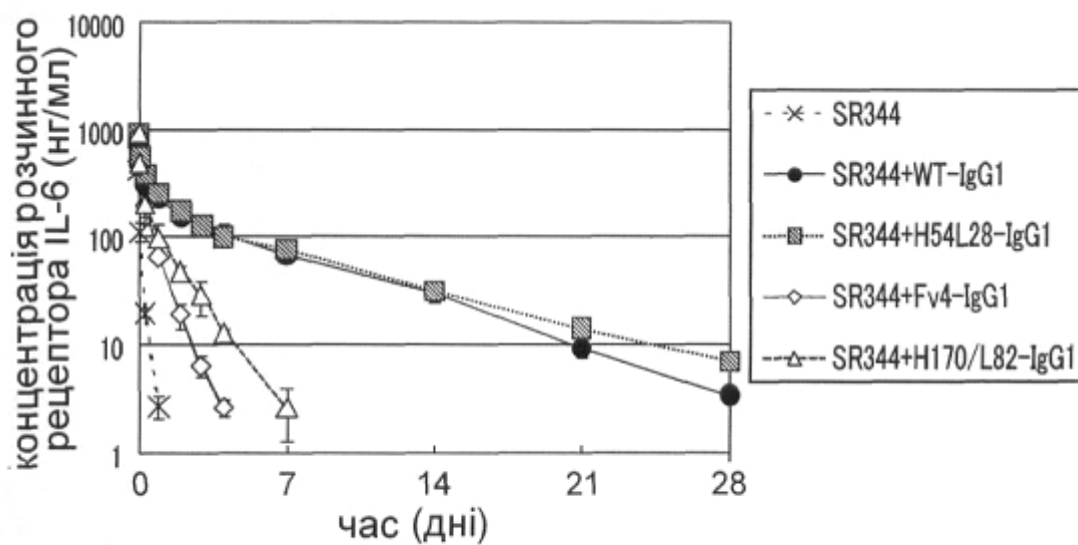
Фіг. 26



Фиг. 27



Фіг. 28



Фіг. 29

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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