



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118961** (13) **C2**

(51) МПК (2019.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 37/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2015 07060</p> <p>(22) Дата подання заявки: 23.12.2013</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.04.2019</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/748,201</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 02.01.2013</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 26.10.2015, Бюл.№ 20</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.04.2019, Бюл.№ 7</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: РСТ/EP2013/077898, 23.12.2013</p>	<p>(72) Винахідник(и): Аттінгер Антуан (CH), Бек Джонатан Альберт (CH), Блейн Станіслав (CH), Ліссіла Рамі (CH), Скегро Дарко (CH)</p> <p>(73) Власник(и): ГЛЕНМАРК ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ С.А., Chemin de la Combeta 5, CH-2300 La Chaux-de-Fonds, Switzerland (CH)</p> <p>(74) Представник: Ошарова Ірина Олександрівна, реєстр. №9</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2012064682 A1, 18.05.2012 WO 2012161756 A1, 29.11.2012 WO 2009064854 A2, 22.05.2009 WO 2008106451 A2, 04.09.2008 WO 2007027751 A2, 08.03.2007 HIDETOSHI TAKEDATSU et al. TL1A (TNFSF15) regulates the development of chronic colitis by modulating both T-helper 1 and T-helper 17 activation. Gastroenterology, Elsevier, PHILADELPHIA, PA, 2008, Vol. 135, no. 2, P. 552 – 567</p>
---	---

(54) АНТИТІЛО, ЯКЕ ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ З TL1A, ТА ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується антагоністичного антитіла або його фрагмента, що зв'язуються з TL1A, композиції, яка включає таке антитіло, способу лікування, опосередкованого TL1A порушення, та застосування такого антитіла.

UA 118961 C2

Галузь винаходу

Даний винахід стосується антитіл або їх фрагментів, які зв'язуються з TL1A. Більш конкретно даний винахід стосується антитіла або його фрагмента, що зв'язується з TL1A, який включає CDR1 важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51, та/або CDR2 важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 52, та/або CDR3 важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 53; і/або включає CDR1 легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 54, та/або CDR2 легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 55 та/або CDR3 легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 56.

Рівень техніки

TNF-подібний ліганд 1A (TL1A) належить до родини факторів некрозу пухлин (лігандів) під номером 15. TL1A також є відомим як TNFSF15 та VEGI і був розпізнаний у 1999 р. як інгібітор ангиогенезу, який пригнічує розвиток карциноми товстої кишки *in vivo* (Zhai Y et al. (1999) FASEB J, 13 (1): 181-9). Білок у великій кількості експресується в ендотеліальних клітинах та активованих клітинах росту кровотворення, включаючи моноцити, макрофаги, лімфоцити, мононуклеари власної пластинки, дендритні клітини та клітини плазми, але не експресується у В- або Т-клітинах (Tan KB et al. (1997) Gene, 204: 35-46; Prehn JL et al. (2007) J Immunol, 178: 4033-4038). Він також експресується у нирках, легенях, передміхуровій залозі та вилочковій залозі (Tan KB et al. (1997), вище). Він є лігандом для TNFRSF25/DR3 та рецептора-пастки TR6/DcR3, і його експресія індукується TNF та IL-1 α . TNFRSF25/DR3 є рецептором, який містить домени смерті і який піддається підвищувальній регуляції під час активації Т-клітин. TL1A індукуює активацію NF-каппа-B та апоптоз у TNFRSF25/DR3-експресуючих лініях клітин та Т-клітин, TL1A може діяти як коstimулятор, який підвищує чутливість до IL-2 та секрецію прозапальних цитокінів *in vitro* та *in vivo*. Взаємодія TL1A з DR3 може сприяти поширенню Т-клітин під час імунної реакції (Migone TS et al. (2002) Immunity, 16 (3): 479-92). Секретований рецептор-пастка (DcR3), надродина розчинних білків рецептора фактора некрозу пухлин (TNFR), блокує дію TL1A. (Kim S & Zhang L (2005) J Immunol Methods, 298: 1-8). TL1A є задіяним як потенційна терапевтична мішень при багатьох захворюваннях та порушеннях.

Головною причиною запалення легенів при алергії та астмі є Th2 поляризація Т-клітин CD4 з підвищеним рівнем IgE та продукування IL-13 NKT-клітинами. TL1A відіграє головну роль в алергічному запаленні легенів через коstimуляцію продукування IL-4 та IL-13 в NKT-клітинах. Блокування взаємодії TL1A та DR3 антитілом проти TL1A або домінантно-негативним мутантом TL1A усуває запалення легенів (Fang L et al., (2008) J Exp Med, 205 (5): 1037-48). DcR3, рецептор-пастка для TL1A, експресується у різних видах раку легенів та товстої кишки та у деяких нормальних тканинах, таким чином, вказуючи на роль TL1A у раку легенів та товстої кишки. Крім того, також повідомлялося, що TL1A має ангіостатичну дію і викликає експресію гена металопротеїнази та IL-8 (Su WB et al., (2006) Exp Cell Res, 312: 266-277; Kang YJ et al., (2005) Cytokine, 29: 229-235). TL1A та DR3 також можуть брати участь у патогенезі атеросклерозу шляхом збільшення продукування прозапальних цитокінів та хемокинів і зменшення стійкості бляшок шляхом індукції ферментів розщеплення позаклітинного матриксу (Kang YJ et al., (2005) вище). Також існує свідчення, що вказує на те, що TL1A/DR3 бере участь в етіології ревматоїдного артриту (Bossen C et al., (2006) J Biol Chem, 281 (20): 13964-13971).

Дослідники вивчали зв'язок між експресією TL1A та запальною хворобою кишечника (Prehn JL et al., (2004) Clin Immunol, 112: 66-77; Bamias G et al., (2003) J Immunol, 171: 4868-4874). Вважається, що джерелом хвороби Крона, яка є важким запальним порушенням кишечника, є провокуючі генетичні та екологічні чинники, які викликають дисбаланс ефекторних (прозапальних) та регулюючих Т-клітинних реакцій, в результаті чого виникає запалення слизової оболонки шлунково-кишкового тракту та хвороба. Було продемонстровано, що шлях TL1A/DR3 відіграє важливу роль у кишкових захворюваннях, таких, як хвороба Крона (Paradakis KA et al., (2005) J. Immunol, 174: 4985-4990; Bamias G et al., (2003) вище), а отже, блокада шляху TL1A/DR3 може відкривати терапевтичні можливості при цій хворобі.

Рецептори смерті та їхні ліганди відіграють ключову роль у підтриманні гомеостазу тканин та фізіологічній регуляції запрограмованої смерті клітин. Зв'язування ліганда смерті викликає олігомеризацію рецептора, рекрутинг адапторного білка через консервативний цитоплазматичний сигнальний елемент, який називається доменом смерті, активацію каспаз та викликання апоптозу (Young HA et al., (2006) Proc Natl Acad Sci USA, 103 (22): 8303-8304). Хоча рецептори смерті, такі, як Fas/Apo-1/CD95, TNF-R1, TRAIL-R1, TRAIL-R2 або DR3, початково були охарактеризовані як індуктори апоптозу, з'являється деталі більше свідчень того, що ці рецептори також мають неапоптозні функції, включаючи регуляцію адаптивної імунної реакції. У

публікації Bamias et al. повідомлялося, що TL1A експресується дендритними клітинами власної пластинки, і що він функціонує шляхом збільшення проліферації клітин пам'яті, але не інтактних CD4⁺T-клітин, і синергізується IL-12 та/або низькодозовою стимуляцією T-клітинного рецептора для значного посилення експресії IFN- γ гена (Bamias G et al., (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103: 8441-8446). Експресія IFN- γ у кишечнику вважається маркером запалення, і багато методик лікування хвороби Крона покладаються на широкі спроби пригнічення імунноактивованого стану. Однак ці підходи (лікування стероїдами та імуносупресивними медикаментами) не зосереджуються конкретно на кишечнику, а отже, мають власні ускладнення. Засоби спрямованої терапії на основі застосування антагоністів TNF- α успішно запроваджувалися у 1990-их роках, і результати свідчать, що терапія, специфічно спрямована проти TL1A або його рецептора, може забезпечувати альтернативну спрямовану терапію при цьому виснажливому порушенні.

До застосовуваних нині засобів лікування від хвороби Крона належать спрямовані проти TNF- α моноклональні антитіла Infliximab (Remicade®; Centocor) та Adalimumab (Humira®; Abbott), а також протизапальні засоби (наприклад, сульфасалазин), кортизон або стероїди (наприклад, преднізон), супресори імунної системи (наприклад, 6-меркептопурин) та антибіотики. Однак Infliximab є єдиним засобом лікування, що має високий ступінь специфічності порівняно з іншими доступними засобами лікування (Young HA et al., (2006) вище). Хоча Infliximab в цілому добре переноситься, він може викликати рецидиви інфекції туберкульозу, погіршення серцевої недостатності, демієлінізуюче захворювання та збільшення випадків лімфоми.

Таким чином, у галузі зберігається потреба у композиціях, які могли б застосовуватися для лікування та діагностики різних запальних та імунних захворювань та порушень.

Короткий опис винаходу

Даний винахід в цілому стосується антитіл або їх фрагментів, які зв'язуються з TL1A, способів їх одержання та застосування, включаючи способи лікування опосередкованих TL1A порушень. Антитіла або їх фрагменти згідно з даним винаходом, які зв'язуються з TL1A, демонструють багато бажаних властивостей і можуть застосовуватися для лікування різних захворювань, до яких, крім інших, належать запальні хвороби та/або аутоімунні хвороби, включаючи, крім інших, запальні хвороби кишечника (наприклад, виразковий коліт та хворобу Крона), ревматоїдний артрит, розсіяний склероз (MS), атеросклероз, відторгнення трансплантата, ураження центральної нервової системи, псоріаз, лейкоз або лімфому (наприклад, хронічний лімфоцитарний лейкоз (CLL)), атеросклероз і рак легенів та товстої кишки. Антитіла або їх фрагменти згідно з даним винаходом, які зв'язуються з TL1A, демонструють багато бажаних властивостей і можуть застосовуватися для лікування різних захворювань, до яких, крім інших, належать запальні хвороби та/або аутоімунні хвороби, включаючи, крім інших, запальні хвороби кишечника (наприклад, виразковий коліт та хворобу Крона), ревматоїдний артрит, розсіяний склероз (MS), атеросклероз, відторгнення трансплантата, ураження центральної нервової системи, псоріаз, лейкоз або лімфому (наприклад, хронічний лімфоцитарний лейкоз (CLL)), атеросклероз і рак легенів та товстої кишки, хронічне обструктивне захворювання легенів COPD, неврит зорового нерва, вікову дегенерацію жовтої плями, системний червоний вовчак (SLE), синдром Шегрена, склеродермію, системний склероз, хронічна хвороба нирок, фіброз печінки, туберкульоз, ідіопатичний легеневий фіброз, викликаний туберкульозом легеневий фіброз, ретроперитонеальний фіброз, легеневий фіброз, кістозний фіброз, ендоміокардіальний фіброз, передсердний фіброз, медіастинальний фіброз, мієлофіброз (кісткового мозку), ретроперитонеальний фіброз, масивний прогресивний фіброз, нефрогенний системний фіброз, артрофіброз.

В одному аспекті даний винахід забезпечує антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, який включає CDR1 важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51, та/або CDR2 важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 52, та/або CDR3 важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 53; і/або включає CDR1 легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 54, та/або CDR2 легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 55 та/або CDR3 легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 56.

У ще одному аспекті даний винахід забезпечує антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, який включає послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1. У ще одному аспекті даний винахід забезпечує антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, який включає варіабельну каркасну ділянку важкого ланцюга, яка є продуктом або похідною людського гена, вибраного з групи, до якої належать: IGHV1-2*02 (SEQ ID NO: 3), IGHV1-2*04 (SEQ ID NO: 4), IGHV1-2*05 (SEQ ID NO: 5), IGHV1-2*01 (SEQ ID NO: 6) та IGHV1-46*01 (SEQ ID NO: 7).

У ще одному аспекті даний винахід забезпечує антитіло або його фрагмент, що включає варіабельну каркасну ділянку важкого ланцюга, яка є продуктом або похідною людського гена IGHV1-2*02 (SEQ ID NO: 3), і варіабельна каркасна ділянка важкого ланцюга включає принаймні одну амінокислотну модифікацію з відповідної каркасної ділянки варіабельної ділянки легкого ланцюга відповідного мишачого антитіла.

У ще одному аспекті даний винахід забезпечує антитіло або його фрагмент, що включає послідовність важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 13, і варіабельна каркасна ділянка важкого ланцюга включає принаймні одну амінокислотну модифікацію з відповідної варіабельної каркасної ділянки важкого ланцюга відповідного мишачого антитіла.

У ще одному аспекті даний винахід забезпечує антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, який включає послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2. У ще одному аспекті даний винахід забезпечує антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, який включає варіабельну каркасну ділянку легкого ланцюга, яка є продуктом або похідною людського гена, вибраного з групи, до якої належать: IGKV1-33*01 (SEQ ID NO: 8), IGKV1D-33*01 (SEQ ID NO: 9), IGKV1D-12*02 (SEQ ID NO: 10), IGKV1D-12*01 (SEQ ID NO: 11) та IGKV1-12*02 (SEQ ID NO: 12).

У ще одному аспекті даний винахід забезпечує антитіло або його фрагмент, що включає варіабельну каркасну ділянку легкого ланцюга, яка є продуктом або похідною людського гена IGKV1-33*01 (SEQ ID NO: 8), і варіабельна каркасна ділянка легкого ланцюга включає принаймні одну амінокислотну модифікацію з відповідної каркасної ділянки варіабельної ділянки легкого ланцюга відповідного мишачого антитіла.

У ще одному аспекті даний винахід забезпечує антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, який включає послідовність важкого ланцюга, вибрану з групи, до якої належать SEQ ID NO: 16, 21, 22, 23 та 24. У ще одному аспекті даний винахід забезпечує антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, який включає послідовність легкого ланцюга, вибрану з групи, до якої належать SEQ ID NO: 17 та 25.

У ще одному аспекті даний винахід забезпечує антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, який включає:

(a) послідовність важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 22 або 24; та

(b) послідовність легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 17.

У ще одному аспекті даний винахід забезпечує антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, який включає варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність вибрану з групи, до якої належать SEQ ID NO: 13, 26, 27, 28 та 29. У ще одному аспекті даний винахід забезпечує антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, який включає варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність, вибрану з групи, до якої належать SEQ ID NO: 14 та 30.

У ще одному аспекті даний винахід забезпечує антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, який включає:

(a) варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 27 або 29; та

(b) варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 14.

У ще одному аспекті даний винахід забезпечує антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, причому антитіло включає Fc ділянку людського IgG4, причому антитіло не має Fc-опосередкованої цитотоксичної активності. У ще одному аспекті даний винахід забезпечує антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, причому антитіло включає Fc ділянку людського IGHG1, причому антитіло є компетентним щодо механізмів цитотоксичності, таких, як антитілозалежна клітинна цитотоксичність (ADCC). В оптимальному аспекті антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, має Fc ділянку нефукозилизованого IGHG1 і демонструє посилені Fc-опосередковані механізми цитотоксичності, такі, як ADCC.

В іншому аспекті даний винахід забезпечує перехресно реагуюче антитіло або його фрагмент, що зв'язується з людським TL1A, а також зв'язується з TL1A миші, щура та яванського макака. Під "перехресно реагуючим антитілом" слід розуміти антитіло, яке зв'язується з антигеном одного виду, наприклад, людини, а також зв'язується з відповідним антигеном в іншому виді, наприклад, у щура.

В іншому аспекті опис даного винаходу також стосується гуманізованих антитіл або їх фрагментів, які зв'язуються з подібною афінністю з TL1A як відповідне химерне антитіло, наприклад, зберігають принаймні 85 % афінності зв'язування з TL1A (K_D) відповідного

химерного антитіла або мають принаймні еквіваленту або вищу афінність зв'язування з TL1A (K_D) порівняно з відповідним химерним антитілом. В оптимальному аспекті гуманізоване антитіло або його фрагмент має приблизно утричі вищу афінність зв'язування з TL1A порівняно з відповідним химерним антитілом.

У ще одному аспекті даний винахід також стосується гуманізованих антитіл або їх фрагментів, які зв'язуються з hTL1A і інгібують взаємодію hTL1A з DR3 та DcR3.

Даний винахід також забезпечує виділені нуклеїнові кислоти, які кодує антитіла та їх фрагменти, які зв'язуються з TL1A, вектори та клітини-хазяї, які включають нуклеїнову кислоту або вектор. Також забезпечуються композиції, які включають антитіло проти TL1A або його фрагмент та фармацевтично прийнятний носій, та імунокон'югати, які включають антитіло або його фрагмент, що зв'язується з терапевтичним засобом.

Даний винахід також забезпечує способи лікування опосередкованих TL1A порушень. В одному аспекті в *in vitro* моделі TL1A-індукованої секреції IFN γ примованими CD4 T-клітинами антитіло проти TL1A або його фрагмент ефективно пригнічувало продукування IFN γ , викликане стимульованими імунним комплексом моноцитами. В іншому аспекті в *in vivo* моделі алергічної астми антитіло проти TL1A знижувало кількість еозинофілів у рідині бронхоальвеолярного лаважу астматичних мишей приблизно у 4 рази. У ще одному аспекті в *in vivo* моделі гострого коліту, викликаного у мишей декстрансульфатом натрію (DSS) і у щурів тринітробензолсульфоною кислотою (TNBS), антитіло проти TL1A було ефективним у зменшенні симптомів хвороби.

Даний винахід також забезпечує фармацевтичні композиції, які включають антитіло проти TL1A або його фрагменти та носій, такий, як розріджувач або формоутворювач.

Даний винахід також забезпечує комплекти та промислові вироби, які включають антитіла або їх фрагменти, композицію або імунокон'югат для лікування опосередкованого TL1A порушення.

Короткий опис фігур

Фігура 1: Ця фігура показує зв'язування гібридомних антитіл до людського TL1A-his (Фіг. 1A) або нерелевантного білка-his (Фіг. 1B), яке виявляли з застосуванням HRP-міченого вторинного антитіла IgG проти миші та субстрату TMB. Фіг. 1A показує оптичну густину при 450 нм ELISA-аналізу проти вкритого людського TL1A-his, а Фіг. 1B показує оптичну густину при 450 нм ELISA-аналізу проти нерелевантного білка-his.

Фігура 2: Ця фігура показує вплив очищених гібридомних антитіл проти TL1A у трьох різних концентраціях у блокуючому ELISA, в якому зв'язування людського TNFRSF25 з TL1A оцінювали у присутності антитіл, показаних на Фіг. 2. Оптичну густину зчитували при 450 нм. MlgG: IgG миші як ізотипічний контроль.

Фігура 3: Батьківське потенційне антитіло 5G6 блокує вплив розчинного та мембранозв'язаного TL1A, що продукується активованими моноцитами: Фіг. 3A: PBMC здорових донорів стимулювали імунними комплексами, а потім забарвлювали флуоресцентними антитілами. Моноцити пропускали через дискримінаційне вікно на основі параметрів великого прямого світлорозсіювання та високого бокового світлорозсіювання. Стовпчаста діаграма показує PE флуоресценцію популяції пропущених через дискримінаційне вікно моноцитів. Сіра заштрихована гістограма представляє ізотипічний контроль, а незаштрихована гістограма представляє забарвлення анти-TL1A. Фіг. 3B: супернатанти очищених людських моноцитів з PBMC здорового донора, стимульованих імунним комплексом, збирали й випробували шляхом ELISA на наявність білків sTL1A. Графік показує інтерпольовану концентрацію TL1A, виміряну у супернатантах у зазначених умовах. "IC stim" означає стимульований імунний комплекс. "NS" означає нестимульований. Фіг. 3C: інтактні CD4 T-клітини, очищені з PBMC здорового донора, інкубували з IL-12, IL-18 та IC-стимульованими аутологічними моноцитами. Батьківське химерне антитіло 5G6 додавали у концентраціях, вказаних у таблиці водночас з моноцитами. NA означає, що IL-12 та IL-18 не додавали. Супернатанти культур кількісно визначали шляхом ELISA. Графік показує інтерпольовану концентрацію IFN- γ для кожної з зазначених умов.

Фігура 4: Батьківське потенційне антитіло 5G6 зв'язується з TL1A миші, щура, яванського макака та людини: зв'язування 5G6 на позаклітинній частині білка TL1A, що відповідає послідовностям людини (*homo sapiens*), щура (*ratus norvegicus*), миші (*mus musculus*) та яванського макака (*macaca fascicularis*) визначали шляхом імунофлуоресценції. Графік показує оптичну густину при 450 нм згідно з логарифмом концентрації застосовуваного 5G6.

Фігура 5: Гуманізовані антитіла 5G6 блокують TL1A-індуковану секрецію IFN- γ примованими CD4 T-клітинами: інтактні CD4 T-клітини інкубували з IL-12, IL-18 та рекомбінантним розчинним людським TL1A і гуманізовані потенційні 5G6 (VH3/VL1, VH4/VL1, VH5/VL1 та VH2/VL2) додавали у концентраціях, вказаних у таблиці. NA означає, що IL-12 та IL-18 не додавали.

Супернатанти культур кількісно визначали шляхом ELISA на концентрацію IFN- γ . Графіки 5A-5D показують концентрацію IFN- γ для кожної з умов культивування. Кожен графік показує результат одного гуманізованого потенційного 5G6.

Фігура 6: Гуманізоване антитіло 5G6 зменшувало кількість клітин у рідині бронхоальвеолярного лаважу (BAL) у мишачій моделі алергічної астми. Мишей лікували гуманізованим потенційним 5G6 (VH5/VL1; формат IgG4 з шарнірною стабілізацією) у кількості 50 мг/кг або еквівалентній кількості контрольного людського IgG або дексаметазоном у кількості 5 мг/кг (позитивним контролем) на 28, 30 та 33 дні після викликання імунологічної реакції, яка викликала стимулюванням овальбуміном. Графік показує кількість еозинофілів у BAL-рідині для кожної миші, і розраховували середню кількість еозинофілів для кожної групи. Стандартне відхилення розраховували, застосовуючи однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA. * означає $p < 0,05$, ** означає $p < 0,01$.

Фігура 7: Лікування гуманізованим антитілом 5G6 зменшує скорочення товстої кишки у DSS-індукованій моделі гострого коліту. Мишей лікували тричі на тиждень 50 мг/кг гуманізованого антитіла 5G6 (VH5/VL1; формат IgG4 з шарнірною стабілізацією) або еквівалентною кількістю ізотипічного контролю або циклоспорином у кількості 5 мг/кг (позитивним контролем). Графік показує повну довжину товстої кишки для кожної миші та середню довжину по групі. Стандартне відхилення розраховували, застосовуючи однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA. * означає $p < 0,05$, ** означає $p < 0,01$, *** означає $p < 0,001$.

Фігура 8: Лікування гуманізованим антитілом 5G6 зменшує тяжкість хвороби у TNBS-індукованій моделі гострого коліту. Щурам внутрішньочеревинно вводили єдину дозу гуманізованого антитіла 5G6 (50 мг/кг) або таку саму кількість ізотипічного контролю, через дві години після введення TNBS. Преднізолон вводили як позитивний контроль. Тяжкість хвороби оцінювали, використовуючи показники товстої кишки, які стосувалися злипання, звуження, виразок та товщини стінок, і середній показник показано на гістограмах. Стандартне відхилення розраховували, застосовуючи критерій Ст'юдента, * означає $p < 0,05$.

Фігура 9: Зв'язування 5G6 з hTL1A блокується як hDcR3-Fc, так і hDR3-Fc. Мічений гістидином людський TL1A наносили у кількості 2 мкг/мл на ELISA-планшет і інкубували з 20 мкг/мл 5G6 у присутності 10 мкг/мл Fc злиття ектодоменів людського DcR3 (білий стовпчик), DR3 (чорний стовпчик) або нерелевантного рецептора (Ctrl-Fc, заштрихований стовпчик) з наступним виявленням кон'югованим з пероксидазою IgG проти людини (Fab-специфічним).

Детальний опис винаходу

Даний винахід стосується антитіл та їх фрагментів, які зв'язуються з TL1A.

Термін "TL1A" у контексті цього опису охоплює варіанти, ізоформи та видові гомологи TL1A. Відповідно, антитіла згідно з винаходом можуть зв'язуватися з людським TL1A і можуть перехресно реагувати з TL1A відмінних від людини видів, наприклад, миші, щура або яванського макака. У деяких варіантах втілення антитіла можуть бути повністю специфічними до одного або кількох білків людського TL1A і можуть не демонструвати видової або інших типів відмінності від людини перехресної реактивності. Повна амінокислотна послідовність типового людського TL1A має номер доступу Swiss-Prot O95150 (TNFSF15_HUMAN; SEQ ID NO:38). TL1A також є відомим як TNFSF15; TNF-подібний білок 1A; VEGI; TNF γ . Людський TL1A позначається як GeneID: 9966 згідно з Entrez Gene, і HGNC: 11931 згідно з HGNC. TL1A може кодуватися геном, позначеним як TNFSF15 /TL1A. Повна амінокислотна послідовність типового мишачого TL1A має номер доступу Swiss-Prot Q5UBV8 (TNFSF15_MOUSE; SEQ ID NO: 39). Мишачий TL1A позначається як GeneID: 326623 згідно з Entrez Gene. Повна амінокислотна послідовність типового TL1A щура має номер доступу Swiss-Prot Q8K3Y7 (TNFSF15_RAT; SEQ ID NO: 40). TL1A щура позначається як GeneID: 252878 згідно з Entrez Gene. Повна амінокислотна послідовність типового TL1A яванського макака (*Macaca fascicularis*) має SEQ ID NO: 41.

Термін "TL1A" у контексті цього опису охоплює всі нові або ще не виявлені алелі та поліморфні форми TL1A, в оптимальному варіанті - людського TL1A.

Термін "антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A" у контексті цього опису охоплює антитіла або їх фрагменти, які зв'язуються з TL1A, наприклад, людським TL1A у виділеній формі, з афінністю (K_D) 850 пМ або менше, в оптимальному варіанті - 700 нМ або менше, у ще кращому варіанті - 300 нМ або менше, у ще кращому варіанті - 260 нМ або менше, у ще кращому варіанті - 250 нМ або менше.

Термін "антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A" охоплює антитіла або їх антигензв'язувальні фрагменти.

Термін "антитіло" у контексті цього опису охоплює повні антитіла та будь-які антигензв'язувальні фрагменти або їх окремі ланцюги. "Антитіло" означає глікопротеїн, який

включає принаймні два важкі (H) ланцюги та два легкі (L) ланцюги, зв'язані між собою дисульфідними зв'язками, або його антигензв'язувальний фрагмент. Кожен важкий ланцюг складається з варіабельної ділянки важкого ланцюга (скорочено вказується як VH) та константної ділянки важкого ланцюга. Константна ділянка важкого ланцюга складається з трьох доменів, CH1, CH2 та CH3. Кожен легкий ланцюг складається з варіабельної ділянки легкого ланцюга (скорочено вказується як VL) та константної ділянки легкого ланцюга. Константна ділянка легкого ланцюга складається з одного домену, CL. VH та VL ділянки можуть додатково розділятися на гіперваріабельні ділянки, які називаються ділянками визначення комплементарності (CDR), які є гіперваріабельними у послідовності і/або є задіяними у розпізнаванні антигена і/або зазвичай утворюють структурно визначені петлі переміжно з ділянками, які є більш консервативними і називаються каркасними ділянками (FR або FW). Кожна VH та VL складається з трьох CDR та чотирьох FW, розташованих від аміно-кінця до карбокси-кінця у такому порядку: FW1, CDR1, FW2, CDR2, FW3, CDR3, FW4. Амінокислотні послідовності FW1, FW2, FW3 та FW4 разом складають "не-CDR ділянку" або "неповоджену CDR ділянку" VH або VL згідно з вжитими авторами визначеннями.

Термін "варіабельна каркасна ділянка важкого ланцюга" у контексті цього опису може охоплювати одну або кілька (наприклад, одну, дві, три та/або чотири) послідовностей каркасної ділянки важкого ланцюга (наприклад, каркас 1 (FW1), каркас 2 (FW2), каркас 3 (FW3) та/або каркас 4 (FW4)). В оптимальному варіанті каркасна варіабельна ділянка важкого ланцюга включає FW1, FW2 та/або FW3, у ще кращому варіанті - FW1, FW2 та FW3. Термін "варіабельна каркасна ділянка легкого ланцюга" у контексті цього опису може охоплювати одну або кілька (наприклад, одну, дві, три та/або чотири) послідовностей каркасної ділянки легкого ланцюга (наприклад, каркас 1 (FW1), каркас 2 (FW2), каркас 3 (FW3) та/або каркас 4 (FW4)). В оптимальному варіанті каркасна варіабельна ділянка легкого ланцюга включає FW1, FW2 та/або FW3, у ще кращому варіанті - FW1, FW2 та FW3.

Варіабельні ділянки важкого та легкого ланцюгів містять зв'язувальний домен, який взаємодіє з антигеном. Константні ділянки антитіл можуть опосередковувати зв'язування імуноглобуліну з хазяйськими тканинами або факторами, включаючи різні клітини імунної системи (наприклад, ефекторні клітини) та перший компонент (C1q) класичної системи комплемента.

Антитіла розділяються на класи, які також називаються ізотипами, які генетично визначають за константною ділянкою. Людські константні легкі ланцюги класифікуються як каппа (CK) та лямбда (CL) легкі ланцюги. Важкі ланцюги класифікуються як мію (μ), дельта (δ), гамма (γ), альфа (α) або епсилон (ε) і визначають ізотип антитіла як IgM, IgD, IgG, IgA та IgE, відповідно. Таким чином, "ізотип" у контексті цього опису означає будь-який з класів та/або підкласів імуноглобулінів, які визначають за хімічними та антигенними характеристиками їх константних ділянок. Відомими ізотипами людського імуноглобуліну є IgG1 (IGHG1), IgG2 (IGHG2), IgG3 (IGHG3), IgG4 (IGHG4), IgA1 (IGHA1), IgA2 (IGHA2), IgM (IGHM), IgD (IGHD) та IgE (IGHE). Так званий псевдо-гамма IGHGP ген людського імуноглобуліну представляє додатковий ген важкої константної ділянки людського імуноглобуліну, який було секвеновано, але який не кодує білок через змінену ділянку перемикання (Bensmana M et al., (1988) Nucleic Acids Res. 16 (7): 3108). Незважаючи на наявність зміненої ділянки перемикання, псевдо-гамма IGHGP ген людського імуноглобуліну має відкриті рамки зчитування для всіх важких константних доменів (CH1-CH3) та шарніра. Усі відкриті рамки зчитування для його важких константних доменів кодують білкові домени, які добре співставляються з усіма константними доменами людського імуноглобуліну з прогнозованими структурними особливостями. Цей додатковий псевдо-гамма ізотип вказується авторами як IgGP або IGHGP. Повідомлялося про інші псевдогени імуноглобуліну, такі, як епсилон P1 та P2 псевдогени важкого константного домену людського імуноглобуліну (IGHEP1 та IGHEP2). Клас IgG є найчастіше використовуваним для терапевтичних цілей. У людини цей клас включає підкласи IgG1, IgG2, IgG3 та IgG4. У мишей цей клас включає підкласи IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c та IgG3.

Термін "мишає антитіло" у контексті цього опису охоплює антитіла, в яких послідовності варіабельної ділянки та послідовності константної ділянки є взятими з миші.

Термін "химерне антитіло" у контексті цього опису охоплює антитіла, в яких послідовності варіабельної ділянки є взятими з одного виду, а послідовності константної ділянки є взятими з іншого виду, наприклад, антитіло, в якому послідовності варіабельної ділянки є взятими з антитіла миші, а послідовності константної ділянки є взятими з людського антитіла.

Термін "гуманізоване антитіло" або "гуманізоване антитіло проти TL1A" у контексті цього опису охоплює антитіла, в яких послідовності CDR, взяті з зародкової лінії іншого виду ссавців, такого, як миша, були прищеплені до людських каркасних послідовностей. Додаткові

модифікації каркасних ділянок можуть здійснюватись у межах людських каркасних ділянок, а також у межах послідовностей CDR, взятих із зародкової лінії іншого виду ссавців.

Термін "нейтралізуюче антитіло" охоплює антитіло, здатне інгібувати і/або нейтралізувати біологічну активність TL1A, наприклад, шляхом блокування зв'язування або суттєвого зниження зв'язування TL1A з його рецептором TNFRSF25/DR3 або рецептором-пасткою TNFRSF21/DR6 і, таким чином, інгібування або зменшення сигнального шляху, запущеного TL1A, та/або інгібування або зменшення опосередкованої TL1A реакції клітин, такої, як, наприклад, проліферація лімфоцитів, експресія цитокінів, або виживання лімфоцитів.

Терміни "антагоністичне антитіло" або "антитіло-антагоніст" вживаються авторами як рівноцінні і охоплюють антитіло, здатне інгібувати і/або нейтралізувати біологічну сигнальну активність TL1A, як описано вище для нейтралізуючого антитіла.

Терміни "агоністичне антитіло" або "антитіло-агоніст" вживаються авторами як рівноцінні і охоплюють антитіло, здатне активувати і/або посилювати біологічну сигнальну активність TL1A, наприклад, шляхом збільшення зв'язування TL1A з його рецептором TNFRSF25/DR3 або рецептором-пасткою TNFRSF21/DR6 і, таким чином, активувати або посилювати сигнальний шлях, запущений TL1A, і/або активувати або посилювати опосередковану TL1A реакцію клітин, таку, як, наприклад, проліферація лімфоцитів, експресія цитокінів або виживання лімфоцитів.

Термін "Fab" або "Fab ділянка" у контексті цього опису охоплює поліпептиди, які включають VH, CH1, VL та CL домени імуноглобуліну. Fab може стосуватися з цією ділянкою окремо або цією ділянкою у зв'язку з антитілом повної довжини або фрагментом антитіла.

Термін "Fc" або "Fc ділянка" у контексті цього опису охоплює поліпептид, який включає константну ділянку антитіла за винятком першої константної ділянки домену імуноглобуліну. Таким чином, Fc означає останні дві константні ділянки домену імуноглобуліну IgA, IgD та IgG та останні три константні ділянки домену імуноглобуліну IgE та IgM та гнучкий шарнір у напрямку N-кінця відносно цих доменів. Для IgA та IgM Fc може включати J-ланцюг. Для IgG Fc включає домени імуноглобуліну C гамма 2 та C гамма 3 (Cγ2 та Cγ3) та шарнір між C гамма 1 (Cγ1) та C гамма 2 (Cγ2). Хоча межі Fc ділянки можуть змінюватися, Fc ділянка важкого ланцюга людського IgG зазвичай визначається як така, що включає залишки C226 або P230 у напрямку карбокси-кінця, з нумерацією згідно з системою нумерації ЕС. Для людського IgG1 Fc ділянка визначається як така, що включає залишок P232 у напрямку карбокси-кінця, з нумерацією згідно з системою нумерації ЕС (Edelman GM et al., (1969) Proc Natl Acad Sci USA, 63(1): 78-85). Fc може означати цю ділянку окремо або цю ділянку у зв'язку з Fc поліпептидом, наприклад, антитілом.

Термін "шарнір" або "шарнірна ділянка" або "шарнірна ділянка антитіла" у контексті цього опису включає гнучкий поліпептид, який включає амінокислоти між першим та другим константними доменами антитіла. "Шарнірна ділянка" згідно з вжитими авторами визначеннями є ділянкою послідовності у 6-62 амінокислот завдовжки, присутньою лише у IgA, IgD та IgG, яка включає цистеїнові залишки, які з'єднують містком два важкі ланцюги. За структурою CH1 домен IgG закінчується у позиції 220 за системою ЕС, і CH2 домен IgG починається у позиції залишку 237 за системою ЕС. Таким чином для IgG антитіла шарнір згідно з цим описом визначається як такий, що включає позиції з 221 (D221 в IgG1) по 231 (A231 в IgG1), з нумерацією згідно з системою нумерації ЕС (Edelman GM et al., вище).

Термін "батьківське антитіло" або "батьківський імуноглобулін" у контексті цього опису охоплює немодифіковане антитіло, яке потім модифікують для утворення варіанта. Вищезгадане батьківське антитіло може бути природним антитілом або варіантом або підданою інженерії версією природного антитіла. Батьківське антитіло може означати саме антитіло, композиції, які включають батьківське антитіло, або амінокислотну послідовність, яка його кодує. Під "батьківським антитілом проти TL1A" у контексті цього опису слід розуміти антитіло або імуноглобулін, що зв'язується з TL1A і є модифікованим для утворення варіанта. Під "відповідним мишачим антитілом" у контексті цього опису слід розуміти мишаче антитіло або імуноглобулін, що зв'язується з TL1A і може бути модифікованим для утворення варіанта, зокрема мишаче антитіло 5G6, як описано авторами. Під "відповідним химерним антитілом" у контексті цього опису слід розуміти химерне антитіло або імуноглобулін, що зв'язується з TL1A і може бути модифікованим для утворення варіанта.

Термін "варіантне антитіло" або "варіант антитіла" у контексті цього опису охоплює послідовність антитіла, яка відрізняється від послідовності батьківського антитіла через принаймні одну амінокислотну модифікацію порівняно з батьківським антитілом. Послідовність варіантного антитіла у контексті цього опису в оптимальному варіанті має принаймні приблизно 80 %, у найкращому варіанті - принаймні приблизно 90 %, у ще кращому варіанті - принаймні приблизно 95 % ідентичності амінокислотної послідовності з послідовністю батьківського

антитіла. Варіант антитіла може означати саме антитіло, композиції, які включають варіант антитіла, або амінокислотну послідовність, яка його кодує.

Термін "ідентичність" або "суттєва ідентичність" або "по суті ідентичний" стосовно нуклеїнової кислоти або її фрагмента означає, що при оптимальному співставленні з відповідними нуклеотидними вставками або делеціями з іншою нуклеїновою кислотою (або її комплементарним ланцюгом) існує ідентичність нуклеотидної послідовності у принаймні приблизно 80 %, у ще кращому варіанті - принаймні приблизно 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % нуклеотидних основ, згідно з вимірюванням за загальновідомим алгоритмом ідентичності послідовностей, таким, як FASTA, BLAST або GAP, як обговорюється нижче.

Стосовно поліпептидів термін "суттєва подібність" або "по суті подібний" означає, що дві пептидні послідовності при оптимальному співставленні, наприклад, за допомогою програм GAP або BESTFIT з застосуванням штрафу за делецію за замовчуванням, мають принаймні 80 % ідентичності послідовностей, у ще кращому варіанті - принаймні 90 %, 95 %, 98 % або 99 % ідентичності послідовностей. В оптимальному варіанті позиції залишків, які не є ідентичними, відрізняються консервативними амінокислотними заміщеннями.

Термін "амінокислотна модифікація" у контексті цього опису охоплює амінокислотне заміщення, вставку та/або делецію у поліпептидній послідовності. Під "амінокислотним заміщенням" або "заміщенням" у контексті цього опису слід розуміти заміну амінокислоти у конкретній позиції у послідовності батьківського поліпептиду на іншу амінокислоту. Наприклад, заміщення R94K стосується варіантного поліпептиду, у даному разі - варіанта варіабельної каркасної ділянки важкого ланцюга, у якому аргінін у позиції 94 є заміненим на лізин. Для попереднього прикладу 94K означає заміщення позиції 94 на лізин. З точки зору цього опису множинні заміщення зазвичай відокремлюють дробовим знаком. Наприклад, R94K/L78V означає подвійний варіант, який включає заміщення R94K та L78V. Під "амінокислотою вставкою" або "вставкою" у контексті цього опису слід розуміти додавання амінокислоти у конкретній позиції у послідовності батьківського поліпептиду. Наприклад, вставка -94 означає вставку у позиції 94. Під "амінокислотою делецією" або "делецією" у контексті цього опису слід розуміти видалення амінокислоти у конкретній позиції у послідовності батьківського поліпептиду. Наприклад, R94- означає делецію аргініну у позиції 94.

У контексті цього опису термін "консервативні модифікації" або "консервативні модифікації послідовностей" означає амінокислотні модифікації, які не мають значного впливу або не змінюють зв'язувальні характеристики антитіла, яке містить амінокислотну послідовність. До таких консервативних модифікацій належать амінокислотні заміщення, вставки та делеції. Модифікації можуть здійснюватися в антитілі згідно з винаходом стандартними способами, відомими спеціалістам у даній галузі, такими, як сайт-специфічний мутагенез та ПЛР-опосередкований мутагенез.

Консервативними амінокислотними заміщеннями є ті, в яких амінокислотний залишок є заміненим на амінокислотний залишок, який має подібний боковий ланцюг. Спеціалістами у даній галузі було визначено родини амінокислотних залишків, які мають подібні бокові ланцюги. Ці родини включають амінокислоти з основними боковими ланцюгами (наприклад, лізином, аргініном, гістидином), кислотними боковими ланцюгами (наприклад, аспарагіноювою кислотою, глутаміноювою кислотою), незарядженими полярними боковими ланцюгами (наприклад, гліцином, аспарагіном, глутаміном, серином, треоніном, тирозином, цистеїном, триптофан), неполярними боковими ланцюгами (наприклад, аланіном, валіном, лейцином, ізолейцином, проліном, фенілаланіном, метіоніном), бета-розгалуженими боковими ланцюгами (наприклад, треоніном, валіном, ізолейцином) та ароматичними боковими ланцюгами (наприклад, тирозином, фенілаланіном, триптофаном, гістидином). Таким чином, один або кілька амінокислотних залишків у межах CDR-ділянок або у межах каркасних ділянок антитіла згідно з винаходом можуть бути замінені на інші амінокислотні залишки з однієї родини бокових ланцюгів і змінене антитіло (варіантне антитіло) може бути випробуване на збереження функції.

Термін "епітоп" стосується ділянки антигена, яка зв'язується антитілом. Епітоп може бути визначений як структурний або функціональний. Функціональні епітопи в цілому являють собою підгрупу структурних епітопів і мають залишки, які безпосередньо сприяють афінності взаємодії. Епітопи також можуть бути конформаційними, тобто, можуть складатися з нелінійних амінокислот. У деяких варіантах втілення епітопи можуть включати детермінанти, які є хімічно активними поверхневими групами молекул, такими, як амінокислоти, цукрові бокові ланцюги, фосфорильні групи або сульфонільні групи, і у деяких варіантах втілення можуть мати певні тривимірні структурні характеристики та/або певні характеристики заряду.

Для всіх константних доменів важкого ланцюга людського імунoglobulinу нумерація відповідає "системі нумерації EC" (Edelman GM et al., (1969) Proc Natl Acad Sci USA, 63 (1):

78-85).

Для константного домену каппа-легкого ланцюга людського імуноглобуліну (IGKC) нумерація відповідає "системі нумерації ЄС" (Edelman GM et al., вище).

Для константних доменів лямбда-легкого ланцюга людського імуноглобуліну (IGLC1, IGLC2, IGLC3, IGLC6 та IGLC7) нумерація відповідає "системі нумерації Кебата" (Kabat EA et al., (1991) Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition-US Department of Health and Human Services, NIH publication no 91-3242), як описано у публікаціях Dariavach P et al., (1987) Proc Natl Acad Sci USA, 84(24): 9074-8 та Frangione B et al., (1985) Proc Natl Acad Sci USA, 82 (10): 3415-9.

Термін "варіабельний домен" стосується домену, який опосередковує зв'язування з антигеном і визначає специфічність конкретного антитіла до конкретного антигена. У природних антитілах антигензв'язувальний центр складається з двох варіабельних доменів, які визначають специфічність: один розташовується у важкому ланцюгу (VH), а інший розташовується у легкому ланцюгу (VL). У деяких випадках специфічність може міститися виключно лише в одному з двох доменів, як в однодомених антитілах з важколанцюгових антитіл верблюдових. V-ділянки зазвичай мають довжину приблизно 110 амінокислот і складаються з відносно незмінних відрізків амінокислотної послідовності, які називаються каркасними ділянками (FR) з 15-30 амінокислот, відокремлених короткими надзвичайно варіабельними ділянками, які називаються "гіперваріабельними ділянками" у 9-12 амінокислот завдовжки. Варіабельні домени природних важких та легких ланцюгів включають чотири FR, які здебільшого набувають *beat-sheet*-конфігурації, з'єднані трьома гіперваріабельними ділянками, які утворюють петлі. Гіперваріабельні ділянки у кожному ланцюгу тримаються разом у безпосередній близькості FR-ділянками і з гіперваріабельними ділянками з іншого ланцюга утворюють антигензв'язувальний центр антитіла (див. Kabat EA et al., вище). Термін "гіперваріабельна ділянка" у контексті цього опису стосується амінокислотних залишків антитіла, які відповідають за зв'язування з антигеном. Гіперваріабельна ділянка зазвичай включає амінокислотні залишки з "ділянки визначення комплементарності" або "CDR", причому остання має найвищу варіабельність послідовності і/або бере участь у розпізнаванні антигена. Для всіх варіабельних доменів нумерація відповідає нумерації Кебата (Kabat EA et al., вище).

Застосовують багато способів визначення CDR, які охоплюються даним винаходом. Визначення за Кебатом ґрунтується на варіабельності послідовностей і є найбільш поширеним (Kabat EA et al., вище). Натомість система Чотіа визначає розташування структурних петель (Chothia C & Lesk AM (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917). Визначення AbM є компромісним варіантом між системами визначення Кебота та Чотіа, і його застосовують у програмі моделювання антитіл AbM від Oxford Molecular (Martin ACR et al., (1989) Proc. Natl Acad. Sci. USA, 86: 9268-72; Martin ACR et al., (1991) Methods Enzymol. 203: 121-153; Pedersen JT et al., (1992) Immunomethods, 1: 126-136; Rees AR et al., (1996) In Sternberg M.J.E. (ed.), Protein Structure Prediction. Oxford University Press, Oxford, 141-172). Останнім часом було запроваджено контактне визначення (MacCallum RM et al., (1996) J. Mol. Biol. 262: 732-745), яке ґрунтується на аналізі наявних комплексних структур з Банку даних білків. Визначення CDR за допомогою IMGT®, міжнародної інформаційної системи ImMunoGeneTics® (<http://www.imgt.org>) ґрунтується на IMGT-нумерації для всіх V-ділянок рецепторів імуноглобуліну та Т-клітин усіх видів (IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system®; Lefranc MP et al., (1991) Nucleic Acids Res. 27 (1): 209-12; Ruiz M et al., (2000) Nucleic Acids Res. 28 (1): 219-21; Lefranc MP (2001) Nucleic Acids Res. 29 (1): 207-9; Lefranc MP (2003) Nucleic Acids Res. 31 (1): 307-10; Lefranc MP et al., (2005) Dev. Comp. Immunol. 29 (3): 185-203; Kaas Q et al., (2007) Briefings in Functional Genomics & Proteomics, 6(4): 253-64).

Усі ділянки визначення комплементарності (CDR), які обговорюються згідно з даним винаходом, в оптимальному варіанті визначаються згідно з IMGT®. Залишки варіабельного домену для кожної з цих CDR є такими (нумерація згідно з Kabat EA, et al., вище): LCDR1: 27-32, LCDR2: 50-52, LCDR3: 89-97, HCDR1: 26-35, HCDR2: 51-57 та HCDR3: 93-102. "He-CDR ділянка" VL-ділянки у контексті цього опису включає амінокислотні послідовності: 1-26 (FR1), 33-49 (FR2), 53-88 (FR3) та 98- приблизно 107 (FR4). "He-CDR ділянка" VH-ділянки у контексті цього опису включає амінокислотні послідовності: 1-25 (FR1), 36-50 (FR2), 58-92 (FR3) та 103- приблизно 113 (FR4).

CDR згідно з даним винаходом можуть включати "подовжені CDR", які ґрунтуються на вищезгаданих визначеннях і мають такі залишки варіабельного домену: LCDR1: 24-36, LCDR2: 46-56, LCDR3: 89-97, HCDR1: 26-36, HCDR2: 47-65, HCDR3: 93-102. Ці подовжені CDR також нумеруються згідно з Kabat et al., вище. "Неподовжена CDR-ділянка" VL-ділянки у контексті цього опису включає амінокислотні послідовності: 1-23 (FR1), 37-45 (FR2), 57-88 (FR3) та 98- приблизно 107 (FR4). "Неподовжена CDR-ділянка" VH-ділянки у контексті цього опису включає

амінокислотні послідовності: 1-25 (FR1), 37-46 (FR2), 66-92 (FR3) та 103- приблизно 113 (FR4).

Термін "антитіло повної довжини" у контексті цього опису охоплює структуру, яка складає природну біологічну форму антитіла, включаючи варіабельні та константні ділянки. Наприклад, у більшості ссавців, включаючи людей та мишей, антитіло повної довжини класу IgG є тетрамером і складається з двох ідентичних пар двох ланцюгів імуноглобуліну, причому кожна пара має один легкий та один важкий ланцюг, причому кожен легкий ланцюг включає домени імуноглобуліну VL та CL, і кожен важкий ланцюг включає домени імуноглобуліну VH, CH1 (C γ 1), CH2 (C γ 2) та CH3 (C γ 3). У деяких ссавців, наприклад, у верблюдів та лам IgG-антитіла можуть складатися лише з двох важких ланцюгів, причому кожен важкий ланцюг включає варіабельний домен, приєднаний до Fc-ділянки.

Фрагменти антитіл включають, крім інших, (i) Fab фрагмент, який складається з VL, VH, CL та CH1 доменів, включаючи Fab' та Fab'-SH, (ii) Fd фрагмент, який складається з VH та CH1 доменів, (iii) Fv фрагмент, який складається з VL та VH доменів єдиного антитіла; (iv) dAb фрагмент (Ward ES et al., (1989) *Nature*, 341: 544-546), який складається з єдиного варіабельного домену, (v) F(ab')₂ фрагменти, двовалентний фрагмент, який включає два зв'язані Fab фрагменти, (vi) одноланцюгові Fv молекули (scFv), причому VH домен та VL домен з'єднуються пептидним лінкером, який забезпечує можливість асоціації двох доменів для утворення антигензв'язувального центра (Bird RE et al., (1988) *Science* 242: 423-426; Huston JS et al., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5879-83), (vii) біспецифічні одноланцюгові Fv-димери (PCT/US92/09965), (viii) "діатіла" або "триатіла", полівалентні або поліспецифічні фрагменти, побудовані шляхом злиття генів (Tomlinson I & Hollinger P (2000) *Methods Enzymol.* 326: 461-79; WO94/13804; Holliger P et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-48), та (ix) scFv, генетично злитий з тим самим або іншим антитілом (Coloma MJ & Morrison SL (1997) *Nature Biotechnology*, 15(2): 159-163).

Термін "ефекторна функція" у контексті цього опису охоплює біохімічну подію, яка в результаті веде до взаємодії Fc-ділянки антитіла з Fc-рецептором або лігандом. До ефекторних функцій належать Fc γ R-опосередковані ефекторні функції, такі, як ADCC (антитілозалежна клітинно-опосередкована цитотоксичність) та ADCP (антитілозалежний клітинно-опосередкований фагоцитоз) та опосередковані комплементом ефекторні функції, такі, як CDC (комплементазалежна цитотоксичність). Ефекторна функція антитіла може бути змінена шляхом зміни, тобто, посилення або зниження, в оптимальному варіанті - посилення, афінності антитіла до ефекторної молекули, такої, як Fc рецептор або комплементарний компонент. Ефекторна функція може визначатися з застосуванням одного або кількох клітинних або *in vivo* аналізів. Такі аналізи часто включають спостереження за реакцією клітин на антитіло, наприклад, виживанням клітин, загибеллю клітин, зміною клітинної морфології або транскрипційною активацією, такою, як клітинна експресія природного гена або гена-репортера. Наприклад, такі аналізи дозволяють вимірювати здатність антитіла до викликання ADCC, ADCP або CDC. Для деяких аналізів можуть вимагатися додаткові клітини або компоненти, тобто, додаткові до клітин-мішеней, наприклад сироватковий комплемент або ефекторні клітини, такі, як моноцити периферичної крові (PBMC), NK-клітини, макрофаги і т. ін. Посилена ефекторна функція може визначатися шляхом порівняння ефекторної функції зміненого антитіла з контрольним антитілом та виявлення, наприклад, збільшення ADCC, ADCP або CDC, яке вимірювали з застосуванням одного або кількох з вищезгаданих аналізів.

Афінність зв'язування зазвичай регулюють шляхом модифікації сайт зв'язування ефекторної молекули, і в цьому разі доцільним є розташування потрібного сайту та модифікація принаймні частини сайту у відповідний спосіб. Також передбачається, що зміна сайту зв'язування на антитілі для ефекторної молекули не обов'язково суттєво змінює загальну афінність зв'язування, але може змінювати геометрію взаємодії, що робить ефекторний механізм неефективним, як у непродуктивному зв'язуванні. Також передбачається, що ефекторна функція також може бути змінена шляхом модифікації сайту, який не бере безпосередньої участі у зв'язуванні ефекторної молекули, але іншим чином є задіяним у виконанні ефекторної функції. Зміна ефекторної функції антитіла дозволяє контролювати різні аспекти імунної реакції, наприклад, посилення або пригнічення різних реакцій імунної системи з можливістю сприятливого ефекту при діагностиці та терапії.

У контексті цього опису термін "опосередковане TL1A порушення" охоплює такі стани, як запальні хвороби та/або аутоімунні хвороби, включаючи, крім інших, запальні хвороби кишечника (наприклад, виразковий коліт та хворобу Крона), ревматоїдний артрит, розсіяний склероз (MS), атеросклероз, відторгнення трансплантата, ураження центральної нервової системи, псоріаз, лейкоз або лімфому (наприклад, хронічний лімфоцитарний лейкоз (CLL)), атеросклероз і рак легенів та товстої кишки, хронічне обструктивне захворювання легенів

COPD, неврит зорового нерва, вікову дегенерацію жовтої плями, системний червоний вовчак (SLE), синдром Шегрена, склеродермія, системний склероз, хронічна хвороба нирок, фіброз печінки, туберкульоз, ідіопатичний легеневи фібоз, викликаний туберкульозом легеневи фібоз, ретроперитонеальний фібоз, легеневи фібоз, кістозний фібоз, ендоміокардіальний фібоз, передсердний фібоз, медіастинальний фібоз, мієлофібоз (кісткового мозку), ретроперитонеальний фібоз, масивний прогресивний фібоз, нефрогенний системний фібоз, артрофібоз.

У контексті цього опису термін "суб'єкт" охоплює будь-яку людину або відмінну від людини тварину. Термін "відмінна від людини тварина" охоплює всіх хребетних, наприклад, ссавців та нессавців, таких, як нелюдиноподібні примати, вівці, собаки, коти, коні, корови, кури, земноводні, плазуни і т. ін. В оптимальному варіанті суб'єктом є людина.

Антитіла проти TL1A

У першому аспекті даний винахід забезпечує антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, який включає CDR1 важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51, та/або CDR2 важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 52, та/або CDR3 важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 53; і/або включає CDR1 легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 54, та/або CDR2 легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 55 та/або CDR3 легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 56.

У деяких варіантах втілення антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A включає подовжену CDR1 важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 57, та/або подовжену CDR2 важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 58, та/або подовжену CDR3 важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 59; і/або включає подовжену CDR1 легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 60, та/або подовжену CDR2 легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 61, та/або подовжену CDR3 легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 62.

В оптимальному варіанті антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A і включає CDR1 важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51, CDR2 важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 52, та CDR3 важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 53, та/або CDR1 легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 54, CDR2 легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 55, та CDR3 легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 56. У ще кращому варіанті антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, включає CDR1 важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51, CDR2 важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 52, та CDR3 важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 53, та CDR1 легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 54, CDR2 легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 55, та CDR3 легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 56. В оптимальному варіанті антитіло або його фрагмент зв'язується з людським TL1A і вступає у перехресну реакцію з TL1A миші, щура та яванського макака.

Спеціалістам у даній галузі добре відомо, що CDR3 домен, незалежно від CDR1 та/або CDR2 домену(ів), може окремо визначати специфічність зв'язування антитіла з розпізнаним антигеном, і що може бути прогнозовано вироблено багато антитіл, які мають однакову специфічність зв'язування на основі спільної послідовності CDR3. Див., наприклад, Klimka A et al., (2000) Br. J. Cancer, 83(2): 252-260 (з описом одержання гуманізованого антитіла проти CD30 з застосування лише варіабельного домену CDR3 важкого ланцюга мишачого антитіла проти CD30 Ki-4); Weiboer SH et al., (2000) J. Mol. Biol. 296: 833-849 (з описом антитіл до рекомбінантного епітеліального глікопротеїну-2 (EGP-2) з застосуванням лише послідовності CDR3 важкого ланцюга батьківського мишачого антитіла проти EGP-2 MOC-31); Rader C et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci USA, 95: 8910-8915 (з описом панелі гуманізованих $\alpha\beta 3$ антитіл проти інтегрину з використанням варіабельного CDR3 домену важкого та легкого ланцюга мишачого $\alpha\beta 3$ антитіла проти інтегрину LM609, причому кожне включене до неї антитіло включає власну відмінну від інших послідовність за межами CDR3 домену, здатну зв'язуватися з таким самим епітопом, що й батьківське мишаче антитіло, з такою самою або вищою афінністю, ніж у батьківського мишачого антитіла); Barbas C et al., (1994) J. Am. Chem. Soc. 116: 2161-62 (де розкривається, що CDR3 домен відіграє найбільшу роль у зв'язуванні з антигеном).

Відповідно, даний винахід забезпечує антитіла та їх фрагменти, які зв'язуються з TL1A, які включають один або кілька CDR3 доменів важкого та/або легкого ланцюга, зокрема, включають

CDR3 важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 53, та/або CDR3 легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 56, причому антитіло є здатним до зв'язування з TL1A. У деяких варіантах втілення такі антитіла згідно з винаходом, які включають один або кілька CDR3 доменів важкого та/або легкого ланцюга з відмінного від людського антитіла (а), можуть конкурувати за зв'язування; (b) зберігають функціональні характеристики; (с) зв'язуються з тим самим епітопом; і/або (d) мають афінність зв'язування, подібну до тієї, яку має відповідне батьківське відмінне від людського, наприклад, мишаче антитіло.

В іншому аспекті антитіло або його фрагмент включає послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1. В іншому аспекті антитіло або його фрагмент включає не-CDR ділянку послідовності варіабельної ділянки важкого ланцюга, яка є принаймні на 80 % ідентичною не-CDR ділянці послідовності варіабельної ділянки важкого ланцюга SEQ ID NO: 1.

У ще одному аспекті даний винахід забезпечує антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, який включає послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність, вибрану з-поміж SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 та SEQ ID NO: 29.

У ще одному аспекті даний винахід забезпечує антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, який включає послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 29. В іншому аспекті даний винахід забезпечує антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, який включає послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 14. У деяких варіантах втілення антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A включає послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 29 та послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 14. В оптимальному варіанті антитіло або його фрагмент зв'язується з людським TL1A і вступає у перехресну реакцію з TL1A миші, щура та яванського макака.

В іншому аспекті даний винахід забезпечує варіанти антитіла або його фрагмента, що зв'язується з TL1A. Таким чином даний винахід забезпечує антитіла або їх фрагменти, які мають амінокислотну послідовність не-CDR ділянок послідовності варіабельної ділянки важкого та/або легкого ланцюга, яка є принаймні на 80 % ідентичною (має принаймні 80 % ідентичності амінокислотної послідовності) з амінокислотною послідовністю не-CDR ділянок послідовності варіабельної ділянки важкого та/або легкого ланцюга батьківського антитіла важкого або легкого ланцюга, наприклад, послідовностей варіабельної ділянки важкого або легкого ланцюга, як у SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 або SEQ ID NO: 14, відповідно. Даний винахід також забезпечує антитіла або їх фрагменти, які мають амінокислотну послідовність неподовжених CDR-ділянок послідовності варіабельної ділянки важкого та/або легкого ланцюга, яка є принаймні на 80 % ідентичною амінокислотній послідовності неподовжених CDR-ділянок послідовності варіабельної ділянки важкого та/або легкого ланцюга батьківського антитіла важкого або легкого ланцюга. В оптимальному варіанті ідентичність амінокислотної послідовності не-CDR ділянок або неподовжених CDR-ділянок послідовності варіабельної ділянки важкого та/або легкого ланцюга становить принаймні 85 %, у ще кращому варіанті - принаймні 90 %, у найкращому варіанті - принаймні 95 %, зокрема, 96 %, ще краще - 97 %, ще краще - 98 %, найкраще - 99 %, включаючи, наприклад, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % та 100 %. Ідентичність або гомологія стосовно амінокислотної послідовності визначають як відсоток амінокислотних залишків у придатній послідовності, які є ідентичними антитілу або його фрагментові, що зв'язується з TL1A, після вирівнювання послідовностей та вставлення пробілів у разі необхідності для досягнення максимального відсотка ідентичності послідовностей. Таким чином, ідентичність послідовностей може визначатися стандартними способами, які зазвичай застосовують для порівняння подібності позиції амінокислот двох поліпептидів. Застосовуючи комп'ютерну програму, таку, як BLAST або FASTA, два поліпептиди співставляють для оптимальної відповідності їх відповідних амінокислот (по всій довжині однієї або обох послідовностей або уздовж попередньо визначеної частини однієї або обох послідовностей). Програми передбачають штраф за відкриття за замовчуванням та штраф за делецію за замовчуванням, і матриця замін, така, як PAM250 (стандартна матриця замін; див. Dayhoff MO et al., (1978), Atlas of Protein Sequence and Structure, vol 5, supp. 3) може застосовуватись у зв'язку з комп'ютерною програмою. Наприклад, відсоток ідентичності може розраховуватись як: загальна кількість ідентичних збігів, помножена на 100, а потім ділена на суму довжини довшої послідовності на відрізок, що збігається, та кількості пробілів, включених у довші послідовності з

метою співставлення двох послідовностей.

У деяких варіантах втілення даний винахід, таким чином, забезпечує антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, причому антитіло або його фрагмент включає послідовність варіабельної каркасної ділянки важкого ланцюга, яка є принаймні на 65 % ідентичною послідовності каркасної ділянки SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6 або 7, та/або послідовність варіабельної каркасної ділянки легкого ланцюга, яка є принаймні на 75 % ідентичною послідовності каркасної ділянки SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11 та 12. У деяких варіантах втілення даний винахід забезпечує антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, причому антитіло або його фрагмент включає послідовність варіабельної каркасної ділянки важкого ланцюга, яка є принаймні на 69 % ідентичною послідовності каркасної ділянки SEQ ID NO: 3, та/або послідовність варіабельної каркасної ділянки легкого ланцюга, яка є принаймні на 80 % ідентичною послідовності каркасної ділянки SEQ ID NO: 8.

В іншому аспекті даний винахід забезпечує антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, який включає CDR важкого та/або легкого ланцюга, як описано вище, а також включає варіабельну каркасну ділянку важкого ланцюга, яка є продуктом або похідною людського гена, вибраного з групи, до якої належать IGHV1-2*02 (SEQ ID NO: 3), IGHV1-2*04 (SEQ ID NO: 4), IGHV1-2*05 (SEQ ID NO: 5), IGHV1-2*01 (SEQ ID NO: 6) та IGHV1-46*01 (SEQ ID NO: 7), в оптимальному варіанті - варіабельну каркасну ділянку важкого ланцюга, яка є продуктом або похідною людського гена IGHV1-2*01 (SEQ ID NO: 3). Варіабельна каркасна ділянка важкого ланцюга може включати одну або кілька (наприклад, одну, дві, три та/або чотири) послідовностей каркасної ділянки важкого ланцюга (наприклад, каркас 1 (FW1), каркас 2 (FW2), каркас 3 (FW3) та/або каркас 4 (FW4)), які є присутніми у продуктах цих людських генів або є їхніми похідними. В оптимальному варіанті каркас варіабельної ділянки важкого ланцюга включає FW1, FW2 та/або FW3, у ще кращому варіанті FW1, FW2 та FW3, які є присутніми у продукті людського гена або є його похідними гена, вибраного з групи, до якої належать IGHV1-2*02 (SEQ ID NO: 3), IGHV1-2*04 (SEQ ID NO: 4), IGHV1-2*05 (SEQ ID NO: 5), IGHV1-2*01 (SEQ ID NO: 6) та IGHV1-46*01 (SEQ ID NO: 7). Послідовності каркасної ділянки важкого ланцюга у контексті цього опису включають FW1 (з позиції 1 по позицію 25), FW2 (з позиції 36 по позицію 49), FW3 (з позиції 66 по позицію 94) та FW 4 (з позиції 103 по позицію 113), причому позиція амінокислоти вказується з застосуванням системи нумерації за Кебатом.

У деяких варіантах втілення даний винахід забезпечує антитіло або його фрагмент, причому антитіло або його фрагмент включає варіабельну каркасну ділянку важкого ланцюга, яка є продуктом або похідною людського гена IGHV1-2*01 (SEQ ID NO: 3), і варіабельна каркасна ділянка важкого ланцюга включає принаймні одну амінокислотну модифікацію з відповідної варіабельної каркасної ділянки важкого ланцюга відповідного мишачого антитіла.

У деяких варіантах втілення даний винахід забезпечує антитіло або його фрагмент, що включає послідовність важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 16, і варіабельна каркасна ділянка важкого ланцюга включає принаймні одну амінокислотну модифікацію з відповідної варіабельної каркасної ділянки важкого ланцюга відповідного мишачого антитіла.

В оптимальному варіанті амінокислотна модифікація включає амінокислотне заміщення в амінокислотній позиції, вибраній з групи, до якої належать 37, 48, 50, 67, 69, 71 та 75, у ще кращому варіанті - в амінокислотних позиціях, вибраних з групи, до якої належать 37, 48, 50, 67 та 71, у найкращому варіанті - в амінокислотній позиції 37, причому амінокислотна позиція кожного представника групи вказується з застосуванням системи нумерації за Кебатом. Зокрема, амінокислотна модифікація включає амінокислотне заміщення, вибране з групи, до якої належать 37A, 48I, 50E, 67A, 69L, 71V та 75S, в оптимальному варіанті - амінокислотне заміщення, вибране з групи, до якої належать V37A, M48I, W50E, V67A, M69L, R71V та I75S, причому V37A є амінокислотним заміщенням, якому віддають найбільшу перевагу, причому амінокислотна позиція кожного представника групи вказується з застосуванням системи нумерації за Кебатом.

В іншому аспекті даний винахід забезпечує антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, який включає варіабельну каркасну ділянку легкого ланцюга, яка є продуктом або похідною людського гена, вибраного з групи, до якої належать IGKV1-33*01 (SEQ ID NO: 8), IGKV1D-33*01 (SEQ ID NO: 9), IGKV1D-12*02 (SEQ ID NO: 10), IGKV1D-12*01 (SEQ ID NO: 11) та IGKV1-12*02 (SEQ ID NO: 12), в оптимальному варіанті - варіабельну каркасну ділянку легкого ланцюга, яка є продуктом або похідною людського гена IGKV1-33*01 (SEQ ID NO: 8). Каркасна ділянка варіабельної ділянки легкого ланцюга може включати одну або кілька (наприклад, одну, дві, три та/або чотири) послідовностей каркасної ділянки легкого ланцюга (наприклад, каркас 1 (FW1), каркас 2 (FW2), каркас 3 (FW3) та/або каркас 4 (FW4)), які є присутніми у продуктах цих

людських генів або є їхніми похідними. В оптимальному варіанті каркас варіабельної ділянки легкого ланцюга включає FW1, FW2 та/або FW3, у ще кращому варіанті - FW1, FW2 та FW3, які є присутніми у продукті людського гена або є його похідними гена, вибраного з групи, до якої належать IGKV1-33*01 (SEQ ID NO: 8), IGKV1D-33*01 (SEQ ID NO: 9), IGKV1D-12*02 (SEQ ID NO: 10), IGKV1D-12*01 (SEQ ID NO: 11) та IGKV1-12*02 (SEQ ID NO: 12). Послідовності каркасної ділянки легкого ланцюга у контексті цього опису включають FW1 (з позиції 1 по позицію 23), FW2 (з позиції 35 по позицію 49), FW3 (з позиції 57 по позицію 88) та FW 4 (з позиції 98 по позицію 108), причому позиція амінокислоти вказується з застосуванням системи нумерації за Кебатом.

У деяких варіантах втілення даний винахід забезпечує антитіло або його фрагмент, що включає варіабельну каркасну ділянку легкого ланцюга, яка є продуктом або похідною людського гена IGKV1-33*01 (SEQ ID NO: 8), і варіабельна каркасна ділянка легкого ланцюга включає принаймні одну амінокислотну модифікацію з відповідної каркасної ділянки варіабельної ділянки легкого ланцюга відповідного мишачого антитіла.

В іншому аспекті антитіло або його фрагмент включає послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2. В іншому аспекті антитіло або його фрагмент включає не-CDR ділянку послідовності варіабельної ділянки легкого ланцюга, яка є принаймні на 80 % ідентичною не-CDR ділянці послідовності варіабельної ділянки важкого ланцюга SEQ ID NO: 2.

У деяких варіантах втілення даний винахід забезпечує антитіло або його фрагмент, що включає послідовність легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність, вибрану з-поміж SEQ ID NO: 17 та SEQ ID NO: 25.

У деяких варіантах втілення даний винахід забезпечує антитіло або його фрагмент, що включає послідовність легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 17. В альтернативному варіанті варіабельна каркасна ділянка легкого ланцюга послідовності легкого ланцюга включає принаймні одну амінокислотну модифікацію з відповідної варіабельної каркасної ділянки легкого ланцюга відповідного мишачого антитіла.

Амінокислотна модифікація може включати амінокислотне заміщення в амінокислотній позиції, вибраній з групи, до якої належать 5 та 34, причому амінокислотна позиція кожного представника групи вказується з застосуванням системи нумерації за Кебатом. Зокрема, амінокислотна модифікація включає амінокислотне заміщення, вибране з групи, до якої належать 5N та 34S, в оптимальному варіанті - T5N та N34S, причому амінокислотна позиція кожного представника групи вказується з застосуванням системи нумерації за Кебатом. Особливу перевагу віддають послідовності легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 17, без будь-яких амінокислотних модифікацій.

У деяких варіантах втілення антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, включає варіабельну каркасну ділянку важкого ланцюга, яка є продуктом або похідною людського гена, вибраного з групи, до якої належать IGHV1-2*02 (SEQ ID NO: 3), IGHV1-2*04 (SEQ ID NO: 4), IGHV1-2*05 (SEQ ID NO: 5), IGHV1-2*01 (SEQ ID NO: 6) та IGHV1-46*01 (SEQ ID NO: 7), та варіабельну каркасну ділянку легкого ланцюга, яка є продуктом або похідною людського гена, вибраного з групи, до якої належать IGKV1-33*01 (SEQ ID NO: 8), IGKV1D-33*01 (SEQ ID NO: 9), IGKV1D-12*02 (SEQ ID NO: 10), IGKV1D-12*01 (SEQ ID NO: 11) та IGKV1-12*02 (SEQ ID NO: 12), в оптимальному варіанті - варіабельну каркасну ділянку важкого ланцюга, яка є продуктом або похідною людського гена IGHV1-2*02 (SEQ ID NO: 3), та варіабельну каркасну ділянку легкого ланцюга, яка є продуктом або похідною людського гена IGKV1-33*01 (SEQ ID NO: 8). Даний винахід також охоплює комбінації варіабельних каркасних ділянок важкого ланцюга, які є присутніми у продукті інших вищезгаданих людських генів або походять від них, та/або каркасних ділянок варіабельних ділянок легкого ланцюга, які є присутніми у продукті інших вищезгаданих людських генів або походять від них.

Послідовності ДНК зародкової лінії для людських генів варіабельної ділянки важкого та легкого ланцюга містяться у базі даних послідовностей людської зародкової лінії "VBase" (представлений в Інтернет на сайті www.mrccpe.cam.ac.uk/vbase), а також у публікаціях Kabat EA et al., вище; Tomlinson IM et al., (1992) J. Mol. Biol. 227: 776-798 та Cox JPL et al., (1994) Eur. J. Immunol. 24: 827-836. Як ще один приклад, послідовності ДНК зародкової лінії для людських генів варіабельної ділянки важкого та легкого ланцюга містяться у базі даних Genbank.

В іншому аспекті даний винахід також забезпечує антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, причому принаймні одна з CDR важкого ланцюга та/або принаймні одна з CDR легкого ланцюга включає принаймні одну амінокислотну модифікацію. Сайт-специфічний мутагенез або ПЛР-опосередкований мутагенез виконують для включення модифікації(й), і вплив на зв'язування антитіла або іншу потрібну функціональну властивість оцінюють в *in vitro*

або *in vivo* аналізах. В оптимальному варіанті включають консервативні модифікації. Модифікації можуть бути амінокислотними заміщеннями, додаваннями або делеціями, але в оптимальному варіанті вони є заміщеннями. Як правило, у межах CDR-ділянки виконують не більше п'ять, в оптимальному варіанті - не більше за чотири, у ще кращому варіанті - не більше за три, у ще кращому варіанті - не більше за дві, у найкращому варіанті - не більше за одну амінокислотну модифікацію.

У деяких варіантах втілення застосовують каркасні послідовності для інженерії варіабельних ділянок з метою одержання варіантних антитіл. До варіантних антитіл згідно з винаходом належать ті, в яких було здійснено модифікації у каркасних залишках у межах VH та/або VK, наприклад, для поліпшення властивостей антитіла. Як правило, такі каркасні модифікації здійснюють для зниження імуногенності антитіла. Наприклад, один підхід полягає у "зворотній мутації" одного або кількох каркасних залишків до відповідної мишачої послідовності або "зворотній мутації" одного або кількох каркасних залишків до відповідної послідовності зародкової лінії.

Таким чином, у ще одному аспекті даний винахід забезпечує антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, у якому принаймні одна з послідовностей каркасної ділянки варіабельної ділянки важкого ланцюга антитіла або його фрагмента включає принаймні одну амінокислотну модифікацію з відповідної каркасної ділянки варіабельної ділянки важкого ланцюга відповідного мишачого антитіла. В оптимальному варіанті амінокислотна модифікація є амінокислотним заміщенням. Зазвичай у межах каркасної ділянки виконують не більше за сім, в оптимальному варіанті - не більше за шість, в оптимальному варіанті - не більше за п'ять, в оптимальному варіанті - не більше за чотири, у ще кращому варіанті - не більше за три, у ще кращому варіанті - не більше за дві, у найкращому варіанті - не більше за одну амінокислотну модифікацію. У деяких варіантах втілення даний винахід забезпечує антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, причому амінокислотна модифікація каркасних ділянок варіабельної ділянки важкого ланцюга включає амінокислотне заміщення в амінокислотній позиції, вибраній з групи, до якої належать 37, 48, 50, 67, 69, 71 та 75, і амінокислотна позиція кожного представника групи вказується з застосуванням системи нумерації за Кебатом. Оптимальним амінокислотним заміщенням каркасних ділянок варіабельної ділянки важкого ланцюга є здійснене в амінокислотних позиціях, вибраних з групи, до якої належать 37, 48, 50, 67 та 71. Більшу перевагу віддають амінокислотним заміщенням каркасних ділянок варіабельної ділянки важкого ланцюга, вибраним з групи, до якої належать V37A, M48I, W50E, V67A, M69L, R71V та I75S, причому V37A є амінокислотним заміщенням, якому віддають найбільшу перевагу з каркасних ділянок варіабельної ділянки важкого ланцюга.

Даний винахід також забезпечує антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, причому принаймні одна з послідовностей каркасної ділянки варіабельної ділянки легкого ланцюга антитіла або його фрагмента може включати принаймні одну амінокислотну модифікацію з відповідної каркасної ділянки варіабельної ділянки легкого ланцюга відповідного мишачого антитіла. В оптимальному варіанті амінокислотна модифікація є амінокислотним заміщенням. Зазвичай у межах каркасної ділянки виконують не більше за дві, у ще кращому варіанті - не більше за одну, і у найкращому варіанті - не виконують амінокислотних модифікацій. У деяких варіантах втілення даний винахід забезпечує антитіло або його фрагмент, причому амінокислотна модифікація каркасних ділянок послідовності варіабельної ділянки легкого ланцюга включає амінокислотне заміщення в амінокислотній позиції, вибраній з групи, до якої належать 5 та 34. Амінокислотні модифікації каркасних ділянок послідовності варіабельної ділянки легкого ланцюга включають заміщення, вибране з групи, до якої належать 5N та 34S, в оптимальному варіанті - T5N та N34S, і в якому амінокислотна позиція кожного представника групи вказується з застосуванням системи нумерації за Кебатом. У деяких варіантах втілення антитіло або його фрагмент згідно з даним винаходом може включати амінокислотні модифікації каркасних ділянок послідовності варіабельної ділянки важкого ланцюга, як викладено вище, та амінокислотні модифікації каркасних ділянок послідовності варіабельної ділянки легкого ланцюга, як викладено вище.

Даний винахід також забезпечує антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, який включає варіабельну ділянку важкого ланцюга, вибрану з групи, до якої належать SEQ ID NO: 13, 26, 27, 28 та 29, в оптимальному варіанті - вибрану з групи, до якої належать SEQ ID NO: 26, 27, 28 та 29, у ще кращому варіанті - з групи, до якої належать SEQ ID NO: 27, 28 та 29, і у ще кращому варіанті - з групи, до якої належать SEQ ID NO: 27 та 29. Даний винахід також забезпечує антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, який включає варіабельну ділянку легкого ланцюга вибрану з групи, до якої належать SEQ ID NO: 14 та 30, у ще кращому варіанті - SEQ ID NO: 14. У деяких варіантах втілення антитіло або його фрагмент, що

зв'язується з TL1A, включає варіабельну ділянку важкого ланцюга вибрану з групи, до якої належать SEQ ID NO: 26, 27, 28 та 29, та варіабельну ділянку легкого ланцюга, вибрану з групи, до якої належать SEQ ID NO: 14 та 30. З огляду на те, що кожна з цих послідовностей варіабельної ділянки важкого та легкого ланцюга може зв'язуватися з TL1A, послідовності варіабельної ділянки важкого та легкого ланцюга можуть бути "поєднані й скомбіновані" для створення зв'язувальних молекул проти TL1A згідно з винаходом. Зв'язування з TL1A таких "поєднаних і скомбінованих" антитіл може бути випробуване з застосуванням аналізів зв'язування, описаних, наприклад, у Прикладах.

У деяких варіантах втілення антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, включає варіабельну ділянку важкого ланцюга вибрану з групи, до якої належать SEQ ID NO: 27 та 29, та варіабельну ділянку легкого ланцюга, вибрану з групи, до якої належать SEQ ID NO: 14 та 30. У варіантах, яким віддають більшу перевагу, антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, включає варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 27, та варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 14, або варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 29, та варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 14. Найбільшу перевагу віддають антитілу або його фрагментові, що зв'язується з TL1A і включає варіабельну ділянку важкого ланцюга, вибрану з групи, до якої належать SEQ ID NO: 27 та 29, та варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 14.

Даний винахід також забезпечує антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, який включає послідовність важкого ланцюга, вибрану з групи, до якої належать SEQ ID NO: 16, 21, 22, 23 та 24, в оптимальному варіанті - вибрану з групи, до якої належать SEQ ID NO: 22, 23 та 24, у ще кращому варіанті - з групи, до якої належать SEQ ID NO: 22 та 24. Даний винахід також забезпечує антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, який включає послідовність легкого ланцюга, вибрану з групи, до якої належать SEQ ID NO: 17 та 25, у ще кращому варіанті - SEQ ID NO: 17. У деяких варіантах втілення антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A включає послідовність важкого ланцюга, вибрану з групи, до якої належать SEQ ID NO: 21, 22, 23 та 24, та послідовність легкого ланцюга, вибрану з групи, до якої належать SEQ ID NO: 17 та 25. З огляду на те, що кожна з цих послідовностей варіабельної ділянки важкого та легкого ланцюга може зв'язуватися з TL1A, послідовності варіабельної ділянки важкого та легкого ланцюга можуть бути "поєднані й скомбіновані" для створення зв'язувальних молекул проти TL1A згідно з винаходом. Зв'язування з TL1A таких "поєднаних і скомбінованих" антитіл може бути випробуване з застосуванням аналізів зв'язування, описаних, наприклад, у Прикладах.

У деяких варіантах втілення антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, включає послідовність важкого ланцюга, вибрану з групи, до якої належать SEQ ID NO: 22 та 24, та послідовність легкого ланцюга, вибрану з групи, до якої належать SEQ ID NO: 17 та 25. У варіантах, яким віддають більшу перевагу, антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, включає послідовність важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 22, та послідовність легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 17, або послідовність важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 24, та послідовність легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 17. Найбільшу перевагу віддають антитілу або його фрагментові, що зв'язується з TL1A і включає послідовність важкого ланцюга, вибрану з групи, до якої належать SEQ ID NO: 22 та 24, та послідовність легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 17.

В одному варіанті втілення даного винаходу антитіло або його фрагмент є гуманізованим антитілом. В оптимальному варіанті антитіло або його фрагмент є гуманізованим моноклональним антитілом.

Даний винахід також забезпечує моновалентне антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, тобто, антитіло, яке складається з відрізка зв'язування з антигеном. Даний винахід також забезпечує фрагмент антитіла, що зв'язується з TL1A, який є вибраним з групи, до якої належать Fab, Fab', Fab'-SH, Fd, Fv, dAb, F(ab')₂, scFv, біспецифічні одноланцюгові Fv-димери, діатіла, триатіла та scFv, генетично злиті з тим самим або іншим антитілом. Оптимальними фрагментами є scFv, біспецифічні одноланцюгові Fv-димери та діатіла. Даний винахід також забезпечує антитіло повної довжини, яке зв'язується з TL1A.

Даний винахід також забезпечує антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, який також включає важку та/або легку константну ділянку, зокрема, людську важку та/або людську легку константну ділянку. Людські важкі константні ділянки можуть бути вибрані з групи людських імуноглобулінів, яка складається з IgG1 (IGHG1), IgG2 (IGHG2), IgG3 (IGHG3), IgG4 (IGHG4), IgA1 (IGHA1), IgA2 (IGHA2), IgM (IGHM), IgD (IGHD) або IgE (IGHE), хоча перевагу

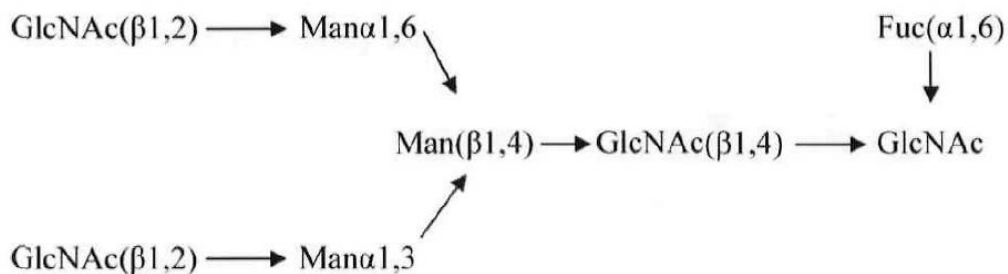
віддають людській важкій константній ділянці IgG, зокрема, IgG1 (IGHG1). Людська легка константна ділянка може бути вибрана з групи людських імуноглобулінів, до якої належать каппа або лямбда константні ділянки, причому перевагу віддають каппа константній ділянці. В оптимальному варіанті втілення антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, включає важкий константний домен людського IgG1 (IGHG1) та людський легкий каппа константний домен.

Як додаток або альтернатива до модифікацій, які здійснюють у межах каркасних ділянок або CDR-ділянок, антитіла згідно з винаходом можуть бути піддані інженерії таким чином, щоб включати модифікації в Fc ділянці, як правило, для зміни однієї або кількох функціональних властивостей антитіла, таких, як період напіввиведення з сироватки, фіксація комплемента, зв'язування Fc-рецептора та/або антигензалежна клітинна цитотоксичність. Крім того, антитіло згідно з винаходом може бути хімічно модифіковане (наприклад, до антитіла можуть бути приєднані один або кілька хімічних компонентів) або модифіковане для зміни його глікозилювання. Кожен з цих варіантів втілення більш детально описується нижче. Модифікації у межах Fc ділянки, як вказано нижче, здійснюють згідно з нумерацією ЄС для залишків в Fc ділянці. В одному варіанті втілення шарнірна ділянка CH1 є модифікованою таким чином, щоб кількість цистеїнових залишків у шарнірній ділянці змінювалася, наприклад, збільшувалася або зменшувалася. Цей підхід докладніше описується у Патенті США № 5,677,425, виданому Bodmer et al. Кількість цистеїнових залишків у шарнірній ділянці CH1 змінюють, наприклад, для сприяння складанню легкого та важкого ланцюгів або для збільшення або зменшення стійкості антитіла. В іншому варіанті втілення Fc шарнірну ділянку антитіла піддають мутації для скорочення біологічного періоду напіввиведення антитіла. Більш конкретно, одну або кілька амінокислотних мутацій включають у межу ділянку CH2-CH3 доменів фрагмента Fc-шарніра, таким чином, щоб антитіло мало порушене зв'язування стафілококового білка A (SpA) відносно природного зв'язування SpA Fc-шарнірного домену. Цей підхід детальніше описується у Патенті США № 6,165,745, виданому Ward et al. В іншому варіанті втілення антитіло модифікують таким чином, що подовжити його біологічний період напіввиведення. Можливими є різні підходи. Наприклад, можуть бути включені одна або кілька таких мутацій: T252L, T254S, T256F, як описано у Патенті США № 6,277,375, виданому Ward. В альтернативному варіанті для подовження біологічного періоду напіввиведення антитіло може бути змінене у межах CH1 або CL ділянки таким чином, щоб містити епітоп зв'язування рецептора реутилізації, взятий з двох петель CH2 домену Fc ділянки IgG, як описується у патентах США №№ 5,869,046 та 6,121,022, виданих Presta et al. У ще одному варіанті втілення Fc ділянку змінюють шляхом заміни принаймні одного амінокислотного залишку на інший амінокислотний залишок для зміни ефекторної(их) функції(й) антитіла. Наприклад, одна або кілька амінокислот, вибраних з-поміж амінокислотних залишків 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 та 322, можуть бути замінені на інший амінокислотний залишок, таким чином, щоб антитіло мало змінену афінність до ефекторного ліганду, але зберігало антигензв'язувальну здатність батьківського антитіла. Ефекторний ліганд, афінність до якого змінюється, може бути, наприклад, Fc рецептором або C1 компонентом комплемента. Цей підхід детальніше описується у патентах США №№ 5,624,821 та 5,648,260, виданих Winter et al. В іншому прикладі одна або кілька амінокислот, вибраних з-поміж амінокислотних залишків 329, 331 та 322, можуть бути замінені на інший амінокислотний залишок, таким чином, щоб антитіло мало змінене C1q зв'язування та/або знижену або усунуту комплементзалежну цитотоксичність (CDC). Цей підхід детальніше описується у патентах США №№ 6,194,551, виданих Idusogie et al. В іншому прикладі один або кілька амінокислотних залишків у межах амінокислотних позицій з 231 по 238 у напрямку N-кінцевої ділянки CH2 домену є зміненими, таким чином, щоб змінювалася здатність антитіла до фіксації комплемента. Цей підхід детальніше описується у Публікації PCT WO94/29351 авторами Bodmer et al. У ще одному прикладі Fc ділянку модифікують таким чином, щоб збільшити здатність антитіла до опосередковування антитілозалежної клітинної цитотоксичності (ADCC) та/або збільшити афінність антитіла до Fc γ рецептора шляхом модифікації однієї або кількох амінокислот у таких позиціях: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 або 439. Цей підхід детальніше описується у Публікації PCT WO00/42072 автором Presta.

Даний винахід також забезпечує антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, який включає людські важкі та/або легкі константні ділянки, причому людська важка константна ділянка включає ізотипічний варіант, який включає CH1 ділянку, шарнірну ділянку, CH2 ділянку та CH3 ділянку з людського IgG4 (IGHG4), і шарнірна ділянка включає заміщення серину у

позиції 228 проліном. В оптимальному варіанті антитіло, яке включає ізотипічний варіант, є антитілом повної довжини. Особливу перевагу віддають антитілу або його фрагментові, що зв'язується з TL1A, який включає ізотипічний варіант, який включає CH1 з людського IgG4 (IGHG4), шарнір з людського IgG4 (IGHG4), який має S228P заміщення, і CH2 та CH3 з людського IgG4 (IGHG4). Було виявлено, що ізотипічний варіант не демонструє Fc-опосередкованих механізмів цитотоксичності, таких, як ADCC, порівняно з антитілом або його фрагментом, що зв'язується з TL1A, який включає людську важку константну ділянку з людського IgG1 (IGHG1) (який зазвичай є природним людським IgG1), тобто, порівняно з антитілом або його фрагментом, що зв'язується з TL1A, який відрізняється від ізотипічного варіанта лише модифікованою важкою константною ділянкою.

Даний винахід також забезпечує антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, який включає Fc ділянку людського IgG, причому зріла корова вуглеводна структура, приєднана до Fc ділянки людського IgG, не має фукози (в альтернативному варіанті вказується як "нефукозилована"). Термін "зріла корова вуглеводна структура" у контексті цього опису охоплює оброблену корову вуглеводну структуру, приєднану до Fc ділянки, яка зазвичай складається з вуглеводної структури GlcNAc(Фукоза)-GlcNAc-Man-(Man-GlcNAc)₂, типової для двоантенних олігосахаридів, схематично представлених нижче:



Цей термін, зокрема, охоплює G-1 форми корової зрілої вуглеводної структури, в якій є відсутнім залишок β1,2 GlcNAc. Однак в оптимальному варіанті корова вуглеводна структура включає обидва залишки β1,2 GlcNAc. Ця зріла корова вуглеводна структура зазвичай не є гіперманозилованою. Зріла корова вуглеводна структура приєднується до Fc ділянки глікопротеїну, як правило, через N-зв'язок до Asn297 CH2 домену Fc ділянки.

В оптимальному варіанті антитіло включає Fc ділянку людського IgG1 (IGHG1), в якій зріла корова вуглеводна структура, приєднана до Fc ділянки людського IgG1 (IGHG1), не має фукози. Більшу перевагу віддають антитілу повної довжини, яке включає Fc ділянку людського IgG1 (IGHG1), в якій зріла корова вуглеводна структура, приєднана до Fc ділянки людського IgG1 (IGHG1), не має фукози. З WO03/035835 відомо, що відсутність фукози у зрілій коровій вуглеводній структурі, приєднаній до Fc ділянки людського IgG, може посилювати ADCC. Таким чином, у ще одному варіанті втілення антитіло або його фрагмент згідно з даним винаходом включає Fc ділянку людського IgG1 (IGHG1), в якій зріла корова вуглеводна структура, приєднана до Fc ділянки людського IgG1 (IGHG1), не має фукози, оскільки антитіло, яке не має фукози, демонструє посилення ADCC порівняно з батьківським антитілом або його фрагментом, у якому фукоза не є відсутньою. Способи вироблення антитіл, які не мають фукози, включають, наприклад, (a) застосування підданої інженерії або мутантної клітини-хазяїна з дефіцитом метаболізму фукози, таким чином, щоб вона мала знижену здатність (або не мала здатності) до фукозилювання білків, які в ній експресуються; (b) культивування клітин в умовах, які перешкоджають фукозилюванню або зменшують його; (c) посттрансляційне видалення фукози (наприклад, ферментом фукозидазою); (d) посттрансляційне додавання потрібного вуглеводу, наприклад, після рекомбінантної експресії неглікозилизованого глікопротеїну; або (e) очищення глікопротеїну для відбирання продукту, який не є фукозилованим. В оптимальному варіанті застосовують способи, описані у Прикладі 14 WO10/095031, наприклад, способи, описані у публікаціях Longmore et al., (1982) Carbohydr. Res. 365-92 або Imai-Nishiya et al., (2007), BMC Biotechnol. 7: 84.

Також даний винахід забезпечує антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A і зв'язується з тим самим епітопом, що й антитіло, яке включає варіабельну послідовність важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO. 27 або 29, та варіабельну послідовність легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO. 14. Також даний винахід забезпечує специфічну ділянку або епітоп TL1A, що зв'язується антитілом, яке забезпечується даним винаходом, зокрема, антитілом, яке включає варіабельну

послідовність важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO. 27 або SEQ ID NO 29, та варіабельну послідовність легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO. 14. Ця специфічна ділянка або епітоп поліпептиду TL1A може розпізнаватися будь-яким прийнятним способом картування епітопу, відомим спеціалістам у даній галузі, у комбінації з будь-яким з антитіл, які забезпечуються даним винаходом. Прикладами таких способів можуть бути відбір пептидів різної довжини, які походять від TL1A, для зв'язування з антитілом згідно з даним винаходом з найменшим фрагментом, який може специфічно зв'язуватися з антитілом, яке містить послідовність епітопу, що розпізнається антитілом. Пептиди TL1A можуть вироблятися синтетично або шляхом протеолітичного розщеплення поліпептиду TL1A. Пептиди, які зв'язуються з антитілом, можуть розпізнаватися, наприклад, шляхом мас-спектрометричного аналізу. В іншому прикладі можуть застосовуватися ЯМР-спектроскопія або Рентгенівська кристалографія для розпізнавання епітопу, зв'язаного антитілом згідно з даним винаходом. Відразу після розпізнавання епітопний фрагмент, який зв'язується з антитілом згідно з даним винаходом, може застосовуватись у разі необхідності як імуноген для одержання додаткових антитіл, які зв'язуються з одним епітопом.

Властивості антитіла проти TL1A

Спеціалістам у даній галузі є відомими стандартні аналізи для оцінки зв'язувальної здатності антитіл, наприклад, стосовно TL1A, включаючи, наприклад, ELISA, BIAcore[®], вестерн-блотинг, радіоімуноаналізи та протокову цитометрію. Прийнятні аналізи детально описуються у Прикладах. Кінетика зв'язування (наприклад, афінність зв'язування, така, як K_D) антитіл також може визначатися за допомогою стандартних аналізів, відомих спеціалістам у даній галузі, таких, як системний аналіз Scatchard або BIAcore[®]. Відносна афінність зв'язування K_i може бути визначена за допомогою стандартних конкретних аналізів, відомих спеціалістам у даній галузі.

У ще одному аспекті даний винахід забезпечує антитіла або їх фрагменти, які зв'язуються з TL1A людини, миші, щура та яванського макака, як візуалізується з застосуванням способів ELISA або BIAcore[®]. ELISA-аналіз зв'язування може здійснюватися й вимірюватися згідно з Прикладом 3.

У ще одному аспекті даний винахід забезпечує антитіла або їх фрагменти, які зв'язуються з виробленим рекомбінантним або природним шляхом людським TL1A, і запобігають активації та секреції цитокінів Т-лімфоцитами CD4. Наприклад, антитіла або їх фрагменти згідно з винаходом можуть пригнічувати продукування INF γ , викликане стимульованими імунним комплексом моноцитами. Аналіз для визначення такої опосередкованої TL1A секреції цитокінів Т-лімфоцитами CD4 може здійснюватися й вимірюватися згідно з Прикладами 3 та 6.

У ще одному аспекті даний винахід забезпечує антитіла або їх фрагменти, які зв'язуються з TL1A, зокрема, TL1A у виділеній формі, з афінністю (K_D) 850 pM або менше, в оптимальному варіанті - 700 nM або менше, у ще кращому варіанті - 300 nM або менше, у ще кращому варіанті - 260 nM або менше, у ще кращому варіанті - 250 nM або менше, вимірюваною, наприклад, з застосуванням поверхневого плазмонного резонансу (SPR) на пристрої BIAcore[®] (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Швейцарія) шляхом захоплення антитіла на зв'язаному з білком А прийнятному для досліджень сенсорному чіпі CM5 (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Швейцарія; BR-1000-14) з людським розчинним поліпептидом TL1A (кодованим SEQ ID NO: 116), який застосовували як аналіт, як детально описується у Прикладі 5. В оптимальному аспекті даний винахід забезпечує гуманізоване антитіло або його фрагмент, який зберігає принаймні 85 % афінності зв'язування з TL1A (K_D) відповідного химерного антитіла. В оптимальному варіанті гуманізоване антитіло або його фрагмент зберігає принаймні 90 % афінності зв'язування з TL1A (K_D) відповідного химерного антитіла, у ще кращому варіанті - принаймні 95 % афінності зв'язування (K_D) відповідного химерного антитіла. В оптимальному варіанті гуманізоване антитіло або його фрагмент зв'язується з людським TL1A з афінністю, еквівалентною афінності відповідного химерного антитіла. Під "еквівалентною афінністю" слід розуміти значення афінності у межах ± 10 % афінності зв'язування з TL1A відповідного химерного антитіла. У ще кращому варіанті даний винахід забезпечує гуманізоване антитіло або його фрагмент, що зв'язується з людським TL1A з афінністю, вищою за афінність відповідного химерного антитіла. В оптимальному варіанті гуманізоване антитіло або його фрагмент зв'язується з людським TL1A з удвічі вищою афінністю порівняно з відповідним химерним антитілом, у ще кращому варіанті - з утричі вищою афінністю порівняно з відповідним химерним антитілом. В оптимальному аспекті даного винаходу забезпечуються гуманізовані антитіла або їх фрагменти, які зв'язуються з людським TL1A і мають афінність зв'язування (K_D) 900 pM або менше, 700 pM або менше, в оптимальному варіанті - 500 pM або менше, у ще кращому варіанті - 300 nM або менше, у ще кращому варіанті - 260 pM або менше, у ще кращому варіанті - 250 pM або менше, вимірюваною, наприклад, з застосуванням поверхневого

плазмонного резонансу (SPR) на пристрої BIAcore® (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Швейцарія) шляхом захоплення антитіла на з'єднаному з білком А прийнятному для досліджень сенсорному чіпі CM5 (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Швейцарія; BR-1000-14) з людським розчинним поліпептидом TL1A (кодованим SEQ ID NO: 116) який застосовували як аналіт, як детально описується у Прикладі 5.

Ще один аспект даного винаходу забезпечує антитіла або їх фрагменти, які зв'язуються з TL1A і мають добру термостійкість. В оптимальному варіанті втілення антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, має температуру термостійкості FAV фрагмента, більшу за 70 °C, в оптимальному варіанті - більшу за 75 °C, у ще кращому варіанті - більшу за 80 °C. Для аналізу термостійкості FAV фрагмента застосовують вимірювання шляхом диференціальної скануючої калориметрії з визначенням медіанної температури плавлення FAV фрагмента у межах IgG повної довжини. Цей тип калориметричних вимірювань є відомим спеціалістам у даній галузі і може здійснюватися, наприклад, згідно з публікацією Garber E & Demarest SJ (2007) *Biochem Biophys Res Commun*, 355: 751-7, як більш докладно описується у Прикладі 5.

Нуклеїнові кислоти, вектори та клітини-хазяї

Даний винахід також забезпечує виділені нуклеїнові кислоти, які кодують антитіла та їх фрагменти, які зв'язуються з TL1A, вектори та клітини-хазяї, які включають нуклеїнову кислоту або вектор. Нуклеїнові кислоти можуть бути присутніми у цілих клітинах, у лізаті клітин або у частково очищеній або практично чистій формі. Нуклеїнова кислота вважається "виділеною" або "практично чистою", якщо вона є очищеною від інших клітинних компонентів або інших домішок, наприклад, інших клітинних нуклеїнових кислот або білків, стандартними способами, включаючи лужну/SDS обробку, CsCl-бендинг, колонкову хроматографію, електрофорез в агарозному гелі та інші, добре відомі спеціалістам у даній галузі. Див., наприклад, F. Ausubel, et al., ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Нуклеїною кислотою згідно з винаходом може бути, наприклад, ДНК або РНК, і вона може містити або не містити інтронні послідовності. В оптимальному варіанті втілення нуклеїнова кислота є молекулою кДНК.

Нуклеїнові кислоти згідно з винаходом одержують, застосовуючи стандартні технології молекулярної біології, наприклад, кДНК, які кодують легкі та важкі ланцюги антитіла, або кодуючі VH та VL сегменти можуть бути одержані шляхом стандартної ПЛР-ампліфікації або клонування кДНК. Для антитіл, одержаних з бібліотеки генів імуноглобуліну (наприклад, з застосуванням фаг-дисплейних технологій), з бібліотеки можуть видобуватися одна або кілька нуклеїнових кислот, які кодують антитіло. Способи включення екзогенної нуклеїнової кислоти у клітини-хазяї, є добре відомими спеціалістам у даній галузі і можуть змінюватися залежно від використовуваних клітин-хазяїв. До таких технологій, крім інших, належать опосередкована декстраном трансфекція, осадження фосфату кальцію, обробка хлоридом кальцію, опосередкована поліетиленіміном трансфекція, опосередкована полібренном трансфекція, злиття протопластів, електропорація, вірусна або фагова інфекція, інкапсуляція полінуклеотиду(ів) у ліпосомах та пряма мікроін'єкція ДНК у ядро. У разі клітин ссавців трансфекція може бути тимчасовою або стійкою.

Оптимальними молекулами нуклеїнових кислот згідно з винаходом є ті, які кодують послідовність важкого ланцюга, вибрану з групи, до якої належать SEQ ID NO: 42, 43, 44, 45 та 46, та/або послідовність легкого ланцюга, вибрану з групи, до якої належать SEQ ID NO: 47 та 48. Оптимальними молекулами нуклеїнових кислот згідно з винаходом є ті, які кодують варіабельну ділянку важкого ланцюга, вибрану з групи, до якої належать SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34 та 35, та/або варіабельну ділянку легкого ланцюга, вибрану з групи, до якої належать SEQ ID NO: 36 та 37.

Оптимальними молекулами нуклеїнових кислот згідно з винаходом є ті, які кодують варіабельну ділянку важкого ланцюга SEQ ID NO: 1 та/або варіабельну ділянку легкого ланцюга SEQ ID NO: 2, наприклад, ДНК, яка кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка включає нуклеїновокислотну послідовність SEQ ID NO: 63, та/або ДНК, яка кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка включає нуклеїновокислотну послідовність SEQ ID NO: 64. Більшу перевагу віддають молекулам нуклеїнових кислот згідно з винаходом, які кодують варіабельну ділянку важкого ланцюга SEQ ID NO: 27 або 29, та/або варіабельну ділянку легкого ланцюга SEQ ID NO: 14, наприклад, ДНК, яка кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка включає нуклеїновокислотну послідовність SEQ ID NO: 33 або 35, та/або ДНК, яка кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка включає нуклеїновокислотну послідовність SEQ ID NO: 36, яким віддають найбільшу перевагу.

Відразу після одержання фрагментів ДНК, які кодують VH та VL сегменти ці фрагменти ДНК можуть піддаватися подальшим маніпуляціям з застосуванням стандартних технологій

рекомбінантних ДНК, наприклад, для перетворення генів варіабельних ділянок на гени антитіл повної довжини ланцюга або на фрагменти генів, які відповідають фрагментам, описаним вище, таким, як гени Fab фрагмента або scFv ген. У цих маніпуляціях кодуючий VL або VH фрагмент ДНК є функціонально зв'язаним з іншим фрагментом ДНК, який кодує інший білок, такий, як константна ділянка антитіла або гнучкий лінкер. Термін "функціонально зв'язаний" у контексті цього опису означає, що два фрагменти ДНК є зв'язаними таким чином, щоб амінокислотні послідовності, які кодуються двома фрагментами ДНК, залишалися у межах рамки. Виділена ДНК, яка кодує VH ділянку, може бути перетворена на ген важкого ланцюга повної довжини шляхом функціонального зв'язування кодуючої VH ДНК з іншою молекулою ДНК, яка кодує константні ділянки важкого ланцюга (CH1, CH2 та CH3). Послідовності людських генів константної ділянки важкого ланцюга є відомими спеціалістам у даній галузі (див., наприклад, Kabat EA et al., вище), і фрагменти ДНК, які включають ці ділянки, можуть бути одержані шляхом стандартної ПЛР-ампліфікації. Константна ділянка важкого ланцюга може бути константною ділянкою IgG1 (IGHG1), IgG2 (IGHG2), IgG3 (IGHG3), IgG4 (IGHG4), IgA1 (IGHA1), IgA2 (IGHA2), IgM (IGHM), IgD (IGHD) або IgE (IGHE), але у найкращому варіанті вона є константною ділянкою IgG1 (IGHG1). Для гена важкого ланцюга Fab фрагмента кодуюча VH ДНК може бути функціонально зв'язана з іншою молекулою ДНК, яка кодує лише константну ділянку CH1 важкого ланцюга. Виділена ДНК, яка кодує VL ділянку, може бути перетворена на ген легкого ланцюга повної довжини (а також ген легкого ланцюга Fab) шляхом функціонального зв'язування кодуючої VL ДНК з іншою молекулою ДНК, яка кодує константну ділянку легкого ланцюга, CL. Послідовності людських генів константної ділянки легкого ланцюга є відомими спеціалістам у даній галузі (див., наприклад, Kabat EA et al., вище), і фрагменти ДНК, які включають ці ділянки, можуть бути одержані шляхом стандартної ПЛР-ампліфікації. В оптимальних варіантах втілення константна ділянка легкого ланцюга може бути каппа або лямбда константною ділянкою, причому перевагу віддають каппа константній ділянці. Для створення scFv гена кодуючі VH та VL фрагменти ДНК функціонально зв'язують з іншим фрагментом, який кодує гнучкий лінкер, наприклад, кодує амінокислотну послідовність (Gly4-Ser)3, таким чином, щоб послідовності VH та VL могли бути експресовані як суміжний одноланцюговий білок з VL та VH ділянками, з'єднаними гнучким лінкером (див., наприклад, Bird RE et al., (1988) *Science*, 242: 423-426; Huston JS et al., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5879-83; McCafferty J et al., (1990) *Nature*, 348: 552-554). Було розроблено різні технології одержання фрагментів антитіл. Традиційно ці фрагменти одержували шляхом протеолітичного розщеплення інтактних антитіл (див., наприклад, Morimoto K et al., (1992) *J. Biochem. & Biophysical Methods*, 24: 107-117 та Brennan M et al., (1985) *Science*, 229: 81-3). Однак ці фрагменти нині можуть продукуватися безпосередньо рекомбінантними клітинами-хазяями. Наприклад, фрагменти антитіл можуть бути виділені з бібліотек фагів антитіл, які обговорювалися вище. В альтернативному варіанті Fab'-SH фрагменти можуть бути взяті безпосередньо з організму *E. coli* і хімічно з'єднані для утворення F(ab')₂ фрагментів (Carter P et al., (1992) *Bio/Technology*, 10: 163-167). Згідно з іншим підходом, F(ab')₂ фрагменти можуть бути виділені безпосередньо з культури рекомбінантних клітин. Інші способи одержання фрагментів антитіл стануть зрозумілими спеціалістам-практикам. В інших варіантах втілення вибраним антитілом є одноланцюговий Fv фрагмент (scFv), див., наприклад, документ WO 1993/16185; Патент США № 5,571,894 та Патент США № 5,587,458. Фрагмент антитіла також може бути "лінійним антитілом", наприклад, як описано у Патенті США № 5,641,870.

Нуклеїнові кислоти, які кодують антитіла згідно з даним винаходом, можуть бути включені у вектор, в оптимальному варіанті - вектор експресії, з метою експресії білка. Для експресії білка можуть застосовуватися різні вектори експресії. До векторів експресії можуть належати самореplikовані позахромосомні вектори або вектори, які включаються у хазяйський геном. Вектори експресії будуть таким чином, щоб вони були сумісними з типом клітини-хазяїна. Таким чином, до векторів, в оптимальному варіанті - векторів експресії, які застосовуються згідно з даним винаходом, крім інших, належать ті, які забезпечують можливість експресії білків у клітинах ссавців, бактеріях, клітинах комах, дріжджах та в *in vitro* системах. Як відомо спеціалістам у даній галузі, існують різні вектори експресії, які можуть бути отримані з комерційних джерел або іншим чином і можуть застосовуватися згідно з даним винаходом для експресії антитіл.

Вектори експресії зазвичай включають білок, функціонально зв'язаний з контрольними або регуляторними послідовностями, селектованими маркерами, будь-якими партнерами зі злиття та/або додатковими елементами. Під "функціонально зв'язаними" у контексті цього опису слід розуміти, що нуклеїнову кислоту приводять у функціональний зв'язок з іншою нуклеїновокислотою послідовністю. Термін "регуляторна послідовність" охоплює промотори,

енхансери та інші елементи контролю експресії (наприклад, сигнали поліаденілування), які регулюють транскрипцію або трансляцію генів ланцюгів антитіла. Такі регуляторні послідовності описуються, наприклад, у публікації Goeddel (Gene Expression Technology, Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Як правило, ці вектори експресії включають транскрипційну та трансляційну регуляторну нуклеїнову кислоту, функціонально зв'язану з нуклеїною кислотою, яка кодує антитіло, і зазвичай є прийнятними для клітини-хазяїна, яку застосовують для експресії білка. Як правило, транскрипційні та трансляційні регуляторні послідовності можуть включати промоторні послідовності, рибосомні сайти зв'язування, транскрипційні старт- та стоп-послідовності, трансляційні старт- та стоп-послідовності та енансери або активаторні послідовності. Як також відомо спеціалістам у даній галузі, вектори експресії зазвичай містять селекційний ген або маркер для забезпечення можливості відбору трансформованих клітин-хазяїв, які містять вектор експресії. Селекційні гени є добре відомими спеціалістам у даній галузі і можуть бути різними залежно від застосовуваних клітин-хазяїв. Наприклад, зазвичай селектований маркерний ген забезпечує резистентність до ліків, таких, як G418, гігromіцин або метотрексат, для клітини-хазяїна, у яку було включено вектор. До оптимальних селектованих маркерних генів належать ген дигідрофолатредуктази (DHFR) (для застосування у dhfr-клітинах-хазяях з відбором/ампліфікацією метотрексату) та нео-ген (для відбору G418).

Прийнятними клітинами-хазяями для клонування або експресії ДНК у векторах згідно з винаходом є прокаріоти, дріжджі або вищі еукаріотні клітини. Прийнятними прокаріотами з точки зору винаходу є еубактерії, включаючи грам-негативні або грам-позитивні організми, наприклад, Enterobacteriaceae, такі, як Escherichia, наприклад, E. coli, Enterobacter, Klebsiella, Proteus, Salmonella, наприклад, Salmonella typhimurium, Serratia, наприклад, Serratia marcescans, та Shigella, а також Bacilli, такі, як B. subtilis та B. licheniformis, Pseudomonas, такі, як P. aeruginosa, та Streptomyces. Прийнятними хазяями для клонування серед E. coli є E. coli 294 (ATCC 31,446), E. coli B, E. coli X1776 (ATCC 31,537) та E. coli W3110 (ATCC 27,325). Крім прокаріотів, прийнятними як хазяї для клонування або експресії є еукаріотні мікроби, такі, як нитчасті гриби або дріжджі. Saccharomyces cerevisiae або звичайні пекарські дріжджі найчастіше застосовують серед нижчих еукаріотних мікроорганізмів-хазяїв. Однак загальнодоступними і придатними для застосування також є багато інших родів, видів та штамів, такі, як Schizosaccharomyces pombe; хазяї Kluyveromyces, включаючи K. lactis, K. fragilis (ATCC 12,424), K. bulgaricus (ATCC 16,045), K. wickerhamii (ATCC 24,178), K. Walth (AJCC 56,500), K. drosopmarum (ATCC 36,906), K. thermotolerans або K. marxianus yarrowia (EP402226); Pichia pastoris (EP183070); Candida; Trichoderma reesia (EP244234); Neurospora crassa; Schwanniomycetes, такі, як Schwanniomycetes occidentalis; та нитчасті гриби, включаючи Neurospora, Penicillium, Tolypocladium, або хазяї Aspergillus, такі, як A. nidulans або A. niger.

Прийнятні клітини-хазяї для експресії антитіл згідно з винаходом є взятими з багатоклітинних організмів. Прикладами клітин безхребетних можуть бути клітини рослин та комах. Було розпізнано багато бакуловірусних штамів та варіантів та відповідних прийятних клітини-хазяїв комах з таких хазяїв, як Spodoptera frugiperda (гусінь), Aedes aegypti (москіт), Aedes albopictus (москіт), Drosophila melanogaster (плодова муха) та Bombyx mori. Загальнодоступними є різні вірусні штами для трансфекції, наприклад, L-1 варіант Autographa californica NPV та штам Bm-5 Bombyx mori NPV, і такі віруси можуть застосовуватися, зокрема, для трансфекції клітин Spodoptera frugiperda. Як хазяї також можуть застосовуватися клітинні культури таких рослин, як бавовна, кукурудза, картопля, соя, петунія, томати та тютюн.

Клітинами-хазяями для експресії рекомбінантних антитіл згідно з винаходом в оптимальному варіанті є клітини-хазяї ссавців, до яких належать клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO) (включаючи клітини dhfr⁻CHO, описані у публікації Urlaub G & Chasin LA (1980) Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 77: 4216-4220, які застосовують з селектованими маркером DHFR, наприклад, як описано у публікації Kaufman RJ & Sharp PA (1982) J. Mol. Biol, 159: 601-621), клітини мієломи NSO, клітини COS та клітини SP2. Зокрема, для застосування з клітинами мієломи NSO ще однією оптимальною експресійною системою є система експресії GS гена, описана у патентах WO 87/04462 (виданому Wilson), WO 89/01036 (виданому Bebbington) та EP338841 (виданому Bebbington). Коли гени рекомбінантних антитіл включають у клітини-хазяї ссавців, антитіла виробляються шляхом культивування клітин-хазяїв протягом періоду часу, достатнього для забезпечення можливості експресії антитіла у клітинах-хазяях або, у ще кращому варіанті, для секреції антитіла у культуральне середовище, в якому вирощують клітини-хазяї. Клітини-хазяї, придатні для вироблення антитіл, які зв'язуються з TL1A, можуть культивуватись у різних середовищах. Для культивування клітин-хазяїв прийнятними є середовища промислового виробництва, такі, як середовище Хема F10 (Sigma-Aldrich Chemie

GmbH, Buchs, Швейцарія), мінімальне живильне середовище (MEM; Sigma-Aldrich Chemie GmbH), RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Basel, Швейцарія) та Модифіковане способом Дульбекко середовище Ігла ((DMEM; Sigma-Aldrich Chemie GmbH). Антитіла можуть бути видобуті з культурального середовища з застосуванням стандартних способів очищення білків.

Антитіла можуть бути функціонально зв'язані з партнером зі злиття для забезпечення можливості спрямування на експресований білок, очищення, відбору, візуалізації і т. ін. Партнери зі злиття можуть бути зв'язані з послідовністю антитіла через лінкерні послідовності. Лінкерна послідовність зазвичай включає малу кількість амінокислот, зазвичай меншу за десять, хоча можуть застосовуватися й довші лінкери. Як правило, вибирають гнучкі й стійкі до розпаду лінкерні послідовності. Як стане зрозуміло спеціалістам у даній галузі, як лінкери можуть застосовуватися будь-які з великої кількості різних послідовностей. Наприклад, звичайна лінкерна послідовність включає амінокислотну послідовність GGGS. Партнер зі злиття може бути спрямовуючою або сигнальною послідовністю, яка спрямовує антитіло та будь-які пов'язані з ним партнери зі злиття на потрібне місце клітини або на позаклітинне середовище. Як відомо спеціалістам у даній галузі, певні сигнальні послідовності можуть спрямовувати білок для секреції у середовище для вирощування або у периплазматичний простір, розташований між внутрішньою та зовнішньою мембраною клітини. Партнер зі злиття також може бути послідовністю, яка кодує пептид або білок, який забезпечує можливість очищення та/або відбору. До таких партнерів зі злиття, крім інших, належать полігістидинові мітки (His-мітки) (наприклад H6 та H10 або інші мітки для застосування з системами афінної хроматографії на іммобілізованих іонах металів (IMAC) (наприклад, на Ni^{+2} колонках для афінної хроматографії)), GST-злиття, МП. Н.-злиття, Strep-мітка, послідовність-мішень біотинілування BSP бактеріального ферменту BirA та епітопні мітки, які спрямовуються антитілами (наприклад с-тус-мітки, flag-мітки і т. ін.). Як стане зрозуміло спеціалістам у даній галузі, такі мітки можуть застосовуватися для очищення, для відбору, або для обох цілей.

Побудова та утворення антитіл

Антитіла, вироблені проти поліпептиду TL1A, можуть бути одержані шляхом імунізації тварини, тобто, шляхом введення поліпептидів тварині, в оптимальному варіанті - відмінній від людини тварині, з застосуванням загальновідомих і звичних протоколів. Див., наприклад, Handbook of Experimental Immunology (Weir DM (ed.), Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986). Імунізації можуть піддаватися багато теплокровних тварин, таких, як кролі, миші, щури, вівці, корови, верблуди або свині. Однак найбільш прийнятними зазвичай вважають мишей, кролів, свиней та щурів. Антитіла також можуть бути одержані з застосуванням технологій рекомбінантних ДНК, відомих спеціалістам у даній галузі. Крім того, антитіла можуть бути одержані шляхом ферментного або хімічного розщеплення природних антитіл. Гуманізовані антитіла згідно з даним винаходом можуть бути побудовані шляхом перенесення однієї або кількох CDR або їх частин з VH та/або VL ділянок відмінної від людини тварини (наприклад, миші) до однієї або кількох каркасних ділянок з людських VH та/або VL ділянок. Необов'язково людські каркасні залишки, таким чином, присутні у VH та/або VL ділянках, можуть бути замінені на відповідні нелюдські (наприклад, мишачі) залишки, якщо це є необхідним або бажаним для зниження імуногенності антитіла та/або підтримання афінності зв'язування. Необов'язково нелюдські амінокислотні залишки, присутні у CDR, можуть бути замінені на людські залишки. Химерні або гуманізовані антитіла згідно з даним винаходом можуть бути одержані на основі послідовності нелюдського моноклонального антитіла, одержаного, як описано вище. ДНК, яка кодує важкий та легкий ланцюги імуноглобулінів, може бути одержана з потрібної гібридою нелюдського походження і піддана інженерії таким чином, щоб містити немишачі (наприклад, людські) послідовності імуноглобуліну, з застосуванням стандартних технологій молекулярної біології. Наприклад, для створення химерного антитіла мишачі варіабельні ділянки можуть з'єднуватися з людськими константними ділянками з застосуванням способів, відомих спеціалістам у даній галузі (див., наприклад, Патент США № 4,816,567, виданий Cabilly et al.). Для створення гуманізованого антитіла мишачі CDR-ділянки можуть бути вставлені у людський каркас з застосуванням способів, відомих спеціалістам у даній галузі (див., наприклад, Патент США № 5,225,539, виданий Winter, та Патенти США №№ 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 та 6,180,370, видані Queen et al.).

Можуть бути побудовані гуманізовані антитіла згідно з даним винаходом, у яких людську акцепторну молекулу для варіабельної ділянки важкого ланцюга вибирають на основі гомології між варіабельними ділянками потенційної акцепторної молекули та варіабельною ділянкою важкого ланцюга мишачого антитіла. Для зниження потенційної імуногенності перевагу віддають придатним людським акцепторним молекулам зародкової лінії. Бази даних зародкових ліній складаються з послідовностей антитіл, які прочитуються через кінець FW3 ділянки важкого

ланцюга і частково у послідовність CDR3. Для відбору FW4 ділянки здійснюють пошук у базах даних зрілих послідовностей антитіл, взятих з вибраної молекули зародкової лінії, або застосовують послідовності антитіл, які було взято з вибраної молекули зародкової лінії людського донора. Людські акцепторні молекули в оптимальному варіанті вибирають з того самого класу важких ланцюгів, що й мишачу донорну молекулу, і з того самого канонічного структурного класу варіабельних ділянок мишачої донорної молекули. Вторинним чинником для відбору людської акцепторної молекули для варіабельної ділянки важкого ланцюга є уникнення гомології у довжині CDR між мишачою донорною молекулою та людською акцепторною молекулою. Молекули людського акцепторного антитіла в оптимальному варіанті вибирають шляхом пошуку гомології у базі даних V-BASE, хоча можуть застосовуватися й інші бази даних, такі, як Kabat та загальнодоступні бази даних NCBI.

Можуть бути побудовані гуманізовані антитіла згідно з даним винаходом, у яких людську акцепторну молекулу для варіабельної ділянки легкого ланцюга вибирають з врахуванням гомології між варіабельними ділянками потенційної акцепторної молекули та варіабельною ділянкою легкого ланцюга мишачого антитіла. Для зниження потенційної імуногенності перевагу віддають придатним людським акцепторним молекулам зародкової лінії. Бази даних зародкових ліній складаються з послідовностей антитіл, які прочитуються через кінець FW3 ділянки важкого ланцюга і частково у послідовність CDR3. Для відбору FW4 ділянки здійснюють пошук у базах даних зрілих послідовностей антитіл, взятих з вибраної молекули зародкової лінії, або застосовують послідовності антитіл, які було взято з вибраної молекули зародкової лінії людського донора. Людські акцепторні молекули в оптимальному варіанті вибирають з того самого класу легких ланцюгів, що й мишачу донорну молекулу, і з того самого канонічного структурного класу варіабельних ділянок мишачої донорної молекули. Вторинним чинником для відбору людської акцепторної молекули для варіабельної ділянки важкого ланцюга є уникнення гомології у довжині CDR між мишачою донорною молекулою та людською акцепторною молекулою. Молекули людського акцепторного антитіла в оптимальному варіанті вибирають шляхом пошуку гомології у базі даних V-BASE, хоча можуть застосовуватися й інші бази даних, такі, як Kabat та загальнодоступні бази даних NCBI. Авторами описуються способи гуманізації нелюдського антитіла, включаються представлений нижче Приклад 5.

Даний винахід забезпечує спосіб вироблення антитіла або його фрагмента, що зв'язується з TL1A, який включає культивування клітини-хазяїна, яка включає виділену нуклеїнову кислоту, яка кодує антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, або вектор, який включає виділену нуклеїнову кислоту, яка кодує антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, таким чином, щоб експресувалася нуклеїнова кислота і вироблялося антитіло. В оптимальному варіанті антитіло є виділеним. Для клітин-хазяїв, нуклеїнових кислот та векторів застосовують ті, які було описано вище. Експресія нуклеїнові кислоти може досягатися, наприклад, шляхом комбінації технологій рекомбінантних ДНК та способів трансфекції генів, які є добре відомими спеціалістам у даній галузі (див., наприклад, Morrison S (1985) Science 229: 1202) і докладніше описувалися вище. Наприклад, для експресії антитіл або їх фрагментів ДНК, які кодують легкі та важкі ланцюги часткової або повної довжини, можуть бути одержані з застосуванням стандартних технологій молекулярної біології (наприклад, ПЛР-ампліфікації або клонування кДНК з застосуванням гібридоми, яка експресує потрібне антитіло), і ДНК можуть бути вставлені у вектори, такі, як вектори експресії. Вектор експресії та послідовності контролю експресії вибирають таким чином, щоб вони були сумісними з клітиною-хазяїном, яку використовують для експресії. Ген легкого ланцюга антитіла та ген важкого ланцюга антитіла можуть бути вставлені в окремий вектор або, у більш типовому варіанті, обидва гени вставляють в один вектор експресії. Гени антитіл вставляють у вектор експресії стандартними способами (наприклад, шляхом лігування комплементарних сайтів рестрикції з фрагментом та вектором гена антитіла або лігування тупого кінця за відсутності сайтів рестрикції). Описані авторами варіабельні ділянки легкого та важкого ланцюга антитіл можуть застосовуватися для створення генів антитіл повної довжини будь-якого ізотипу антитіла шляхом їх вставлення у вектори експресії, які вже кодують константну ділянку важкого ланцюга та константну ділянку легкого ланцюга потрібного ізотипу, таким чином, що VH сегмент є функціонально зв'язаним з CH1 сегментом(ами) у межах вектора, і VK сегмент є функціонально зв'язаним з CK сегментом у межах вектора.

Характеризація та очищення антитіл проти TL1A

Відбір антитіл здійснюють, застосовуючи аналізи для вимірювання зв'язування з TL1A та/або аналізи для вимірювання здатності до блокування зв'язування TL1A з його рецептором TNFRSF25. Прикладом аналізу зв'язування може бути ELISA, зокрема, з застосуванням, злитого білка TL1A та людського Fc, який іммобілізували на планшетах, і з використанням кон'югованого

вторинного антитіла для виявлення антитіла проти TL1A, зв'язаного зі злитим білком. Прикладом аналізу блокування є аналіз на основі протокової цитометрії з вимірюванням блокування зв'язування злитого білка TL1A з TNFRSF25 на людських CD4 клітинах. Застосовують флуоресцентно мічене вторинне антитіло для визначення кількості злитого білка TL1A, зв'язаного з клітиною. Цей аналіз виявляє зниження сигналу, коли антитіло у супернатанті блокує зв'язування злитого білка ліганду з TNFRSF25. Ще одним прикладом аналізу блокування є аналіз, у якому блокування костимуляції інтактних людських Т-клітин, опосередковане злитим білком TL1A, нанесеним на планшет, вимірюють шляхом вимірювання включення тимідину. Як аналіз для оцінки функціональної активності антитіл проти TL1A, наприклад, може бути застосоване зниження секреції цитокіну CD4 Т-лімфоцитами, як описано у Прикладах 3 та 6.

Антитіла згідно з даним винаходом можуть бути виділені або очищені різними способами, відомими спеціалістам у даній галузі. До стандартних способів очищення належать хроматографічні способи, включаючи іонообмінну хроматографію, хроматографію гідрофобної взаємодії, афінну хроматографію, молекулярні сита або гель-фільтрацію та хроматографію з оберненням фаз, які здійснюють при атмосферному тиску або при високому тиску з застосуванням таких систем, як FPLC та HPLC. Способи очищення також включають електрофоретичний, імунологічний, осадження, діаліз та хроматофокусування. Також можуть застосовуватися способи ультрафільтрації та діалізації у зв'язку з концентрацією білка. Для очищення антитіл проти TL1A вибрані клітини-хазяї вирощують, наприклад, в обертальних колбах для очищення моноклонального антитіла. Супернатанти фільтрують і концентрують перед афінною хроматографією з білком А - сефарозою (Pharmacia, Piscataway, NJ). Елюйовані антитіла перевіряють, застосовуючи гель-електрофорез та високоефективну рідинну хроматографію для забезпечення очищення. Таким чином, оптимальне антитіло згідно з даним винаходом є виділеним і/або очищеним антитілом, яке зв'язується з TL1A.

Імунокон'югати

В іншому аспекті даний винахід забезпечує антитіло проти TL1A або його фрагмент, що зв'язується з TL1A і з'єднується з терапевтичним агентом, таким, як цитотоксин, медикамент (наприклад, імунодепресант) або радіотоксин. Такі кон'югати вказуються авторами як "імунокон'югати". Імунокон'югат, які включають один або кілька цитотоксинів, називаються "імунотоксинами". Цитотоксином або цитотоксичним агентом може бути будь-який агент, який є згубним для клітин (наприклад, знищує їх). Прикладами можуть бути таксол, цитохалазин В, граміцидин D, бромід етидію, еметин, мітоміцин, етопозид, тенопозид, вінкрисдин, вінбластин, колхіцин, доксорубіцин, даунорубіцин, дигідроксіантрацидин, мітоксантрон, мітраміцин, актиноміцин D, 1-дегідротестостерон, глюкокортикоїди, прокаїн, тетракаїн, лідокаїн, пропранолол та пуроміцин та їх аналоги або гомологи. До терапевтичних агентів також належать, наприклад, антиметаболіти (наприклад, метотрексат, 6-меркептопурин, 6-тіогuanін, цитарабін, 5-фторурацил, дакарбазин), алкілюючі агенти (наприклад, мехлоретамін, твотеп, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) та ломустин (CCNU), циклофосфамід, бусульфан, дібромоманіт, стрептозотин, мітоміцин С та цис-дихлородіамінплатина (II) (DDP) цисплатин), антрацикліни (наприклад, даунорубіцин (раніше відомий як дауноміцин) та доксорубіцин), антибіотики (наприклад, дактиноміцин (раніше відомий як актиноміцин), блеоміцин, мітраміцин та антраміцин (AMC)) та антимиіотичні агенти (наприклад, вінкрисдин та вінбластин). Іншими прикладами терапевтичних цитотоксинів, які можуть бути з'єднані з антитілом згідно з винаходом, можуть бути дуокарміцини, каліхеаміцини, майтанзини та ауристатини, а також їх похідні. Типовий кон'югат каліхеаміцину з антитілом можна отримати з комерційних джерел (Mylotarg(R); American Home Products). Цитотоксини можуть з'єднуватися з антитілами згідно з винаходом з застосуванням лінкерної технології, доступної для спеціалістів у даній галузі. Прикладами типів лінкерів, які застосовують для кон'югації цитотоксину з антитілом, крім інших, є гідразони, тіоетери, естери, дисульфіди та пептидовмісні лінкери. Може бути вибраний лінкер, який, наприклад, є сприйнятливим до розщеплення низьким рівнем рН у межах лізосомального компартменту або сприйнятливим до розщеплення протеазами, такими, як протеази, які преференційно експресуються у пухлинній тканині, такі, як катепсини (наприклад, катепсини В, С, D). Докладніше обговорення типів цитотоксинів, лінкерів та способів кон'югації терапевтичних агентів з антитілами також представлено у публікаціях Saito G et al., (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55: 199-215; Trail PA et al., (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52: 328-337; Payne G (2003) Cancer Cell, 3: 207-212; Allen TM (2002) Nat. Rev. Cancer, 2: 750-763; Pastan I & Kreitman RJ (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs, 3: 1089-1091; Senter PD & Springer CJ, (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53: 247-264. Антитіла згідно з даним винаходом також можуть бути з'єднані з радіоактивним ізотопом для утворення цитотоксичних радіофармацевтичних засобів, які також називаються радіоімунокон'югатами. Прикладами радіоактивних ізотопів, які можуть бути

кон'юговані з антитілами для діагностичного або терапевтичного застосування, крім інших, можуть бути йод¹³¹, індій¹¹¹, ітрій⁹⁰ та лютецій¹⁷⁷. Способи одержання радіоімунокон'югатів є звичними для спеціалістів у даній галузі. Типові радіоімунокон'югати можна отримати з комерційних джерел, наприклад, Zevalin® (EDEC Pharmaceuticals) та Bexxar® (Corixa Pharmaceuticals), і подібні способи можуть застосовуватися для одержання радіоімунокон'югатів з використанням антитіл згідно з винаходом. Імунокон'югати антитіл згідно з винаходом застосовують для зміни даної біологічної реакції, і лікарський компонент не слід розглядати як такий, що обмежується класичними хімічними терапевтичними засобами. Наприклад, лікарський компонент може бути білком або поліпептидом, який має потрібну біологічну активність. До таких білків можуть належати, наприклад, ферментно активний токсин або його активний фрагмент, наприклад, абрин, рицин А, екзотоксин синегнійної палички або токсин дифтерії; білок, такий, як фактор некрозу пухлин або інтерферон-γ; або модифікатори біологічної реакції, такі як, наприклад, лімфокіни, інтерлейкін-1 (IL-1), інтерлейкін-2 (IL-2), інтерлейкін-6 (IL-6), гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор (GM-CSF), гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор (G-CSF) або інші фактори росту.

Способи з'єднання таких терапевтичних агентів з антитілами є загальновідомими. Див., наприклад, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al., (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al., (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al., (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, Baldwin et al., (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985) та Thorpe PE & Ross WC (1982) *Immunol. Rev.* 62: 119-58.

В іншому аспекті даний винахід забезпечує антитіло проти TL1A або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, для введення разом з терапевтичним агентом, таким, як цитотоксин, медикамент (наприклад, імунодепресант) або радіотоксин.

Фармацевтичні композиції

В іншому аспекті даний винахід забезпечує композицію, наприклад, фармацевтичну композицію, яка включає антитіло або його фрагмент згідно з даним винаходом та фармацевтично прийнятний носій. Такі композиції можуть включати одна антитіло або комбінацію (наприклад, з двох або більшої кількості різних) антитіл та/або імунокон'югатів згідно з винаходом та/або терапевтичний агент, такий, як цитотоксин, медикамент (наприклад, імунодепресант) або радіотоксин, як описано вище. Наприклад, фармацевтична композиція згідно з винаходом може включати комбінацію антитіл (або імунокон'югатів), які зв'язуються з різними епітопами на антигені-мішені, або мають комплементарну активність. Фармацевтичні композиції згідно з винаходом також можуть вводитись у рамках комбінованої терапії, тобто, у комбінації з іншими агентами. Наприклад, комбінована терапія може включати антитіло проти TL1A згідно з даним винаходом у комбінації з принаймні одним протизапальним агентом або імунодепресантом.

У контексті цього опису термін "фармацевтично прийнятний носій" охоплює будь-які й усі розчинники, дисперсійні середовища, покриття, антибактеріальні та протигрибкові агенти, ізотонічні та уповільнюючі абсорбцію агенти і т. ін., які є фізіологічно сумісними. В оптимальному варіанті носій є прийнятним для внутрішньовенного, внутрішньом'язового, підшкірного, парентерального, спінального або епідермального введення (наприклад, шляхом ін'єкції або інфузії). Залежно від шляху введення, активна сполука, тобто, антитіло або імунокон'югат, може мати покриття з матеріалу, який захищає сполуку від дії кислот та інших природних умов, які можуть інактивувати сполуку. До фармацевтично прийнятних носіїв належать стерильні водні розчини або дисперсії та стерильні порошки для екстемпорального приготування стерильних ін'єкційних розчинів або дисперсій. Застосування таких середовищ або агентів для фармацевтично активних речовин є відомим спеціалістам у даній галузі. У фармацевтичних композиціях згідно з винаходом передбачається застосування будь-яких традиційних середовищ або агентів, за винятком випадків, коли вони є несумісними з активною сполукою. До композицій також можуть включатися додаткові активні сполуки.

В іншому аспекті даний винахід забезпечує композицію, яка включає імунокон'югат, який включає антитіло або його фрагмент, що зв'язується з TL1A, з'єднаний з терапевтичним агентом, та фармацевтично прийнятний носій. Імунокон'югати та терапевтичні агенти, які можуть застосовуватися, описуються вище.

В іншому аспекті даний винахід забезпечує композицію, яка включає антитіло або його

фрагмент згідно з даним винаходом, що також включає інший фармацевтично активний агент. В оптимальному варіанті іншим фармацевтично активним агентом є один або кілька з-поміж: а) іншого антагоніста TL1A, b) протизапального агента, c) імунодепресивного агента, наприклад, антагоніста TNF α , кортизону або стероїдів і т. ін., та/або d) протиалергічного агента.

Фармацевтична композиція згідно з винаходом також може включати фармацевтично прийнятний антиоксидант. Прикладами фармацевтично прийнятних антиоксидантів можуть бути: (1) водорозчинні антиоксиданти, такі, як аскорбінова кислота, гідрохлорид цистеїну, бісульфат натрію, метабісульфіт натрію, сульфід натрію і т. ін.; (2) розчинні в олії антиоксиданти, такі, як аскорбілпальмітат, бутилований гідроксіанізол (BHA), бутилований гідрокситолуол (BHT), лецитин, пропілгалат, альфа-токоферол і т. ін.; та (3) металохелатні агенти, такі, як лимонна кислота, етилендіамінтетраоцтова кислота (EDTA), сорбіт, винна кислота, фосфорна кислота і т. ін. Прикладами прийнятних водних та неводних носіїв, які можуть застосовуватись у фармацевтичних композиціях згідно з винаходом, є вода, етанол, поліолі (такі, як гліцерин, поліпропіленгліколь, поліетиленгліколь і т. ін.) та їх прийнятні суміші, рослинні олії, такі, як оливкова олія, та придатні для ін'єкцій органічні естери, такі, як етилолеат. Належна текучість може підтримуватися, наприклад, шляхом застосування матеріалів покриття, таких, як лецитин, шляхом підтримання потрібного розміру частинок у разі дисперсій та шляхом застосування поверхнево-активних речовин. Ці композиції також можуть містити ад'юванти, такі, як консерванти, зволожувальні агенти, емульгатори та диспергатори. Запобігання присутності мікроорганізмів може забезпечуватися шляхом застосування вищеписаних процедур стерилізації та шляхом включення різних антибактеріальних та протигрибкових агентів, наприклад, парабену, хлоробутанолу, фенолсорбінової кислоти і т. ін. Також може бути бажаним включення до композицій ізотонічних агентів, таких, як цукри, хлорид натрію і т. ін. Крім того, подовжена абсорбція придатної для ін'єкцій фармацевтичної форми може бути викликана включенням агентів, які затримують абсорбцію, таких, як моностеарат алюмінію та желатин.

Терапевтичне та інше застосування

Антитіла згідно з даним винаходом передбачають численні способи *in vitro* та *in vivo* діагностичного та терапевтичного застосування, які включають діагностику та лікування опосередкованих TL1A порушень. Наприклад, ці молекули можуть вводитись у клітини у культурі, *in vitro* або *ex vivo*, або людині, наприклад, *in vivo*, для лікування, профілактики та діагностики різних опосередкованих TL1A порушень. Оптимальними суб'єктами є люди, включаючи пацієнтів, які мають порушення, опосередковані активністю TL1A (опосередковані TL1A порушення). Нейтралізуючі антитіла згідно з даним винаходом можуть бути ефективними для лікування пацієнтів незалежно від їх TL1A-костимулюючого статусу. Більшу перевагу віддають людям з високим рівнем експресії TL1A.

Термін "пацієнт" з точки зору даного винаходу охоплює як людину, так і інших тварин, в оптимальному варіанті - ссавців, у найкращому варіанті - людей. Таким чином, антитіла згідно з даним винаходом можуть застосовуватися як у терапії для лікування людей, так і у ветеринарії. Термін "лікування" у контексті даного винаходу слід розуміти як такий, що включає терапевтичне лікування, а також профілактичні або супресивні заходи стосовно хвороби або порушення. Таким чином, наприклад, успішне введення антитіла до початку хвороби в результаті забезпечує виліковування від хвороби. Як ще один приклад, успішне введення антитіла після клінічного прояву хвороби для боротьби з симптомами хвороби включає лікування від хвороби. Термін "лікування" також охоплює введення антитіла після виникнення хвороби з метою усунення хвороби. Успішне введення антитіла після початку та після розвитку клінічних симптомів, з можливим ослабленням клінічних симптомів та можливим усуненням хвороби, включає лікування від хвороби. До "тих, хто потребує лікування", належать ссавці, які вже мають хворобу або порушення, а також ті, хто є схильним до виникнення хвороби або порушення, включаючи тих, хто потребує профілактики хвороби або порушення.

У конкретному варіанті втілення антитіла застосовують *in vivo* для лікування, профілактики або діагностики різних опосередкованих TL1A порушень. Таким чином винахід забезпечує спосіб лікування опосередкованого TL1A порушення у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові терапевтично ефективної кількості антитіла або його фрагмента. Прикладами опосередкованих TL1A порушень, крім інших, можуть бути запальні хвороби та/або аутоімунні хвороби, наприклад, запальна хвороба кишечника (IBD), включаючи виразковий коліт та хворобу Крона, ревматоїдний артрит, розсіяний склероз, діабет 1-го та 2-го типів, псоріаз, псоріатичний артрит, анкілозуючий спондиліт, atopічний дерматит; алергічні реакції або стани, включаючи, наприклад, астму та алергічне запалення легенів; рак, атеросклероз, інфекції, нейродегенеративні захворювання, відторгнення трансплантатів, реакції "трансплантат проти хазяїна" (GVHD) та серцево-судинні порушення/хвороби. Винахід також забезпечує спосіб

лікування опосередкованого TL1A порушення у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові терапевтично ефективної кількості антитіла або його фрагмента. До типових опосередкованих TL1A порушень, крім інших, належать, запальні хвороби та/або аутоімунні хвороби, наприклад, запальна хвороба кишечника (IBD), включаючи виразковий коліт та хворобу Крона, ревматоїдний артрит, розсіяний склероз, діабет 1-го та 2-го типів, псоріаз, псоріатичний артрит, анкілозуючий спондиліт, атопічний дерматит; алергічні реакції або стани, включаючи, наприклад, астму та алергічне запалення легенів; рак, атеросклероз, інфекції, нейродегенеративні захворювання, відторгнення трансплантатів, реакції "трансплантат проти хазяїна" (GVHD) та серцево-судинні порушення/хвороби, хронічне обструктивне захворювання легенів COPD, неврит зорового нерва, вікову дегенерацію жовтої плями, системний червоний вовчак (SLE), синдром Шегрена, склеродермію, системний склероз, хронічну хворобу нирок, фіброз печінки, туберкульоз, ідіопатичний легеневий фіброз, викликаний туберкульозом легеневого фіброзу, ретроперитонеальний фіброз, легеневого фіброзу, кістозний фіброз, ендоміокардіальний фіброз, передсердний фіброз, медіастинальний фіброз, мієлофіброз (кісткового мозку), ретроперитонеальний фіброз, масивний прогресивний фіброз, нефрогенний системний фіброз, артрофіброз. В оптимальному варіанті опосередковані TL1A порушення включають запальні хвороби та/або аутоімунні хвороби, включаючи, крім інших, запальні хвороби кишечника (наприклад, виразковий коліт та хворобу Крона), ревматоїдний артрит, розсіяний склероз та атеросклероз.

В оптимальному варіанті опосередковані TL1A порушення, які піддаються лікуванню антитілом згідно з винаходом, є вибраними з групи, до якої належать запальна хвороба кишечника, розсіяний склероз, ревматоїдний артрит та астма. У варіанті, якому віддають особливу перевагу, опосередковане TL1A порушення, яке піддається лікуванню антитілом згідно з винаходом, є запальна хвороба кишечника.

Тваринні моделі для оцінки функціональної активності антитіл проти TL1A при опосередкованих TL1A порушеннях описуються у Прикладі 7 для астми та у Прикладах 8 та 9 для IBD.

В одному варіанті втілення антитіла згідно з винаходом застосовують для визначення рівня TL1A або рівня клітин, які містять TL1A на поверхні їх мембран, і ці показники рівня потім можуть бути пов'язані з симптомами певної хвороби. В альтернативному варіанті антитіла застосовують для інгібування блокування функції TL1A, яка, у свою чергу, може бути пов'язана з профілактикою або послабленням певних симптомів хвороби, і, таким чином, TL1A розглядається як медіатор хвороби. Це може досягатися шляхом контактування зразка та контрольного зразка з антитілом проти TL1A в умовах, які дозволяють утворювати комплекс між антитілом та TL1A. Будь-які комплекси, утворені між антитілом та TL1A, виявляють і порівнюють у зразку та контрольному зразку. З врахуванням специфічного зв'язування антитіл згідно з винаходом з TL1A антитіла згідно з винаходом можуть застосовуватися для специфічного виявлення експресії TL1A на поверхні клітин, наприклад, можуть застосовуватися для виявлення пацієнта, який має низький або високий рівень експресії TL1A. Антитіла згідно з винаходом також можуть застосовуватися для очищення TL1A через імуноафінне очищення.

В іншому варіанті втілення антитіла згідно з винаходом можуть піддаватися початковому випробуванню на активність зв'язування у зв'язку з терапевтичним або діагностичним застосуванням *in vitro*. Наприклад, композиції згідно з винаходом можуть випробуватися з застосуванням протокових цитометричних аналізів.

Даний винахід передбачає застосування антитіла або його фрагмента як медикаменту і застосування антитіла або його фрагмента у приготуванні медикаменту для лікування опосередкованого TL1A порушення. У ще одному варіанті втілення даний винахід забезпечує антитіло або його фрагмент для застосування як медикаменту. Даний винахід також забезпечує антитіло або його фрагмент для застосування згідно зі способом лікування опосередкованого TL1A порушення. Опосередкованими TL1A порушеннями є ті, які було описано вище. Антитіло або його фрагмент згідно з даним винаходом можуть бути особливо бажаними для лікування опосередкованих TL1A порушень незалежно від DR3-костимулюючого статусу пацієнта. В оптимальному варіанті втілення антитіло або його фрагмент можуть застосовуватися для лікування опосередкованого TL1A порушення, при якому у пацієнта спостерігається високий рівень експресії TL1A.

Як було описано вище, антитіла проти TL1A згідно з винаходом можуть вводитися спільно з одним або кількома терапевтичними агентами, наприклад, цитотоксичним агентом, радіотоксичним агентом або імунодепресивним агентом. Антитіло може бути з'єднане з агентом (як імунокон'югат, як описано вище) або може вводитися окремо від агента. В останньому разі (окреме введення) антитіло може вводитися до, після або одночасно з агентом або може

вводиться з іншими відомими терапевтичними засобами, наприклад, протираковою терапією, наприклад, опроміненням.

Для введення антитіла доза може становити від приблизно 0,0001 до 100 мг/кг, частіше - від 0,01 до 10 мг/кг маси тіла хазяїна. Типовий режим лікування передбачає введення раз на тиждень, раз на два тижні, раз на три тижні, раз на чотири тижні, раз на місяць, раз на три місяці або раз та три-шість місяців. Антитіло зазвичай вводять неодноразово. Інтервали між окремими дозами можуть становити, наприклад, тиждень, місяць, три місяці або рік. Інтервали також можуть бути нерегулярними, згідно з вимірюваними показниками рівня антитіла до заданого антигена у крові пацієнта. Згідно з деякими способами, дозу регулюють для досягнення концентрації антитіла у плазмі приблизно 1-1000 мкг/мл, у деяких способах - приблизно 25-300 мкг/мл. В альтернативному варіанті антитіло вводять як композицію уповільненого вивільнення, і в таких випадках вимагається менш часте введення. Дозування та частота можуть змінюватися залежно від періоду напіввиведення антитіла з організму пацієнта. Дозування та частота введення можуть змінюватися залежно від того, чи є лікування профілактичним чи терапевтичним. При профілактичному лікуванні вводять відносно низьку дозу з відносно нечастими інтервалами протягом тривалого періоду часу. Деякі пацієнти продовжують отримувати лікування протягом решти їхнього життя. При терапевтичному лікуванні іноді вимагається введення відносно високої дози з відносно короткими інтервалами до зниження або припинення прогресування хвороби.

Фактичні рівні доз активних інгредієнтів, тобто, антитіла, у фармацевтичних композиціях згідно з даним винаходом можуть змінюватися для забезпечення кількості активного інгредієнта, яка є ефективною для досягнення потрібної терапевтичної реакції для конкретного пацієнта, композиції та режиму введення і при цьому не є токсичною для пацієнта. Вибраний рівень дози залежить від різних фармакокінетичних чинників, включаючи активність конкретних застосовуваних композицій згідно з даним винаходом, шлях введення, час введення, швидкість екскреції конкретного застосовуваного антитіла, тривалість лікування, інші медикаменти, сполуки та/або матеріали, які застосовують у комбінації з конкретними застосовуваними композиціями, вік, стать, масу тіла, стан, загальний стан здоров'я та анамнез пацієнта, який підлягає лікуванню, та інші подібні чинники, добре відомі спеціалістам у галузі медицини.

"Терапевтично ефективна кількість" антитіла проти TL1A згідно з винаходом в оптимальному варіанті в результаті забезпечує зменшення тяжкості симптомів хвороби, збільшення частоти та тривалості безсимптомних періодів та/або запобігання ураженню або інвалідності через хворобу. Здатність сполуки до лікування опосередкованого TL1A порушення може оцінюватися у системі тваринної моделі, яка дозволяє прогнозувати ефективність для людини. В альтернативному варіанті ця властивість композиції може оцінюватися шляхом дослідження здатності сполуки до інгібування росту клітин, причому таке інгібування може вимірюватися *in vitro* шляхом аналізів, відомих спеціалістам-практикам. Звичайний спеціаліст у даній галузі зможе визначити таку кількість на основі таких чинників, як розмір суб'єкта, тяжкість симптомів у суб'єкта, та конкретна композиція або вибраний шлях введення.

Антитіло або композицію згідно з даним винаходом вводять одним або кількома шляхами введення з застосуванням одного або кількох різних способів, відомих спеціалістам у даній галузі. Як стане зрозуміло спеціалістам у даній галузі, шлях та/або режим введення може змінюватися залежно від потрібних результатів. Оптимальними шляхами введення є внутрішньовенний, внутрішньом'язовий, внутрішньошкірний, внутрішньочеревинний, підшкірний, спінальний або інші парентеральні шляхи введення, наприклад, шляхом ін'єкції або інфузії. Більшу перевагу серед шляхів введення віддають внутрішньовенному або підшкірному. Фраза "парентеральне введення" у контексті цього опису означає режими введення, відмінні від ентерального та місцевого введення, як правило, шляхом ін'єкції, і охоплює, крім інших, внутрішньовенну, внутрішньом'язову, внутрішньоартеріальну, інтратекальну, інтракапсулярну, інтраорбітальну, внутрішньосерцеву, внутрішньошкірну, внутрішньочеревинну, транстрахеальну, підшкірну, внутрішньошкірну, внутрішньосуглобну, субкапсулярну, субарахноїдальну, інтраспінальну, епідуральну та інтратермальну ін'єкцію та інфузію. В альтернативному варіанті антитіло згідно з винаходом вводять непарентеральним шляхом, таким, як місцевий, епідермальний або мукозальний шлях введення, наприклад, інтраназальний, пероральний, вагінальний, ректальний, сублінгвальний або місцевий.

Промисловий виріб та комплект

В іншому варіанті втілення винаходу забезпечується промисловий виріб, який включає антитіло або його фрагмент, композицію імунокон'югату згідно з винаходом для лікування опосередкованого TL1A порушення. Промисловий виріб може включати вмістище та ярлик або вкладку, нанесені на вмістище або пов'язані з ним. До прийнятних вмістищ належать,

наприклад, пляшки, флакони або шприци. Вмістища можуть бути виконані з різних матеріалів, таких, як скло або пластик. У вмістищі тримають композицію, яка може бути ефективною для лікування стану і може мати стерильний отвір для доступу (наприклад, вмістище може бути пакетом для розчину, призначеного для внутрішньовенного введення або шприцом, який має пробку, яка має проколюватися голкою для підшкірних ін'єкцій). Принаймні один активний агент у композиції може бути описаним авторами антитілом. Ярлик або вкладка можуть вказувати, що композиція може застосовуватися для лікування вибраного стану, такого, як рак. В одному варіанті втілення ярлик або вкладка можуть вказувати, що композиція, яка включає антитіло, може бути застосована для лікування опосередкованого TL1A порушення.

Крім того, промисловий виріб може включати (а) перше вмістище з композицією, яка в ньому міститься, причому композиція включає антитіло, та (b) друге вмістище з композицією, яка в ньому міститься, причому композиція включає терапевтичний засіб, відмінний від антитіла. Промисловий виріб у цьому варіанті втілення винаходу також може включати вкладку, яка вказує, що перша та друга композиції можуть застосовуватись у комбінації для лікування опосередкованого TL1A хвороби або порушення. Таким терапевтичним засобом може бути будь-який із засобів допоміжної терапії, описаних у попередньому розділі (наприклад, тромболітичний засіб, антитромбоцитарний засіб, хімотерапевтичний засіб, антиангіогенний засіб, антигормональна сполука, кардіопротектор та/або регулятор імунної функції ссавця, включаючи цитокін). В альтернативному або додатковому варіанті промисловий виріб також може включати друге (або третє) вмістище, яке включає фармацевтично прийнятний буфер, такий, як бактеріостатична вода для ін'єкцій (BWF1), фосфатно-буферний розчин, розчин Рингера та розчин декстрази. Він також може включати інші матеріали, бажані з комерційної та споживчої точки зору, включаючи інші буфери, розріджувачі, фільтри, голки та шприци.

Також обсяг даного винаходу охоплює комплекти, які включають антитіло, композиції або імунокон'югати згідно з винаходом та інструкції з застосування. Комплект також може містити один або кілька додаткових реагентів, таких, як імунодепресивний реагент, цитотоксичний агент або радіотоксичний агент, або одне або кілька додаткових антитіл згідно з винаходом (наприклад, антитіло, яке має комплементарну активність і зв'язується з епітопом в антигені TL1A, відмінне від першого антитіла).

Вважається, що спеціаліст у даній галузі без додаткового опису, використовуючи представлений вище опис та представлені нижче пояснювальні приклади, зможе одержати й застосувати засоби згідно з даним винаходом і практично втілити заявлені способи. Представлені нижче робочі приклади мають на меті полегшення практичного втілення даного винаходу і не повинні розглядатись як такі, що якимось чином обмежують решту винаходу.

Приклади

Приклад 1:

Вироблення та відбір мишачих антитіл проти людського TL1A

Для одержання рекомбінантного людського білка TL1A-Fc кДНК для людського гена TL1A придбали у Source BioScience (Nottingham, Великобританія; номер клону: IRATp970G02115D). Цю кДНК використовували як шаблон для ампліфікації кодуючої ділянки обробленого секретованого варіанта людського TL1A (SEQ ID NO: 116) з застосуванням ПЛР. ПЛР виконували, застосовуючи праймери GlnPr994 та GlnPr995 (SEQ ID NO: 119 та 120, відповідно). Праймер GlnPr994 додає сайт рестрикції BamHI у напрямку 5' від позаклітинної ділянки і розщеплює природний сигнальний пептид. Праймер GlnPr995 додає сайт рестрикції HindIII у напрямку 3' від позаклітинної ділянки. Амплікон вирізали за допомогою бокових сайтів рестрикції BamHI та HindIII і клонували у модифікований вектор експресії ссавців на основі пкДНК3.1(-) плазміди від Invitrogen (Invitrogen AG, Basel, Швейцарія), яка експресує Fc- зливу послідовність. Вектор експресії містить людський CMV промотор з донорно-акцепторним фрагментом Ig (першим інтроном), описаним у Патенті США 5,924,939, послідовність OriP (Koons MD et al., (2001) J Virol. 75(22): 10582-92), SV40 енхансер та SV40 polyA, злитий з гастриновим термінатором, як описано у публікації Kim D, et al., (2003) Biotechnol. Prog. 19 (5): 1620-2. Експресійна касета містить ділянку Козака перед відкритою рамкою читування Fc- злитого білка з наступним сигнальним пептидом, який закінчується сайтом рестрикції BamHI для зручності клонування. Fc ділянка злитого білка починається з сайту рестрикції HindIII для зручності клонування з наступним малим гліцино-сериновим лінкером. Для вивільнення попередньої послідовності перед Fc ділянкою вектор вирізали з застосуванням BamHI (NEB, Ipswich, MA, США) та HindIII (NEB, Ipswich, MA, США), обробляли з застосуванням CIP (NEB, Ipswich, MA, США) і очищали гелем. Вставку, яка кодує позаклітинну ділянку людського TL1A, лігували в остов і трансформували у Top 10 клітинах E.coli (Life Technologies, Carlsbad, CA, США), що забезпечувало експресійну послідовність Fc- злиття (SEQ ID NO: 117). Перші 20

амінокислот SEQ ID NO: 117 відповідають сигнальній послідовності, яка не була присутньою у кінцевій експресійній послідовності Fc-злиття.

Ця рекомбінантна плазміда забезпечувала можливість експресії людського злитого білка TL1A-Fc у клітинах ссавців з секрецією у культуральне середовище для клітин під дією сигнального пептиду. Для одержання рекомбінантного білка вищезгаданий рекомбінантний вектор трансфікували у суспензійно-адаптовані клітини HEK 293 EBNA (Life Technologies, Carlsbad, CA, США) з застосуванням трансфекційного реагента jetPEI™ (Polyplus-transfection S.A., Strasbourg, Франція; Дистриб'ютор: Brunswig, Basel, Швейцарія). Супернатант культури клітин збирали через п'ять днів і піддавали подальшому очищенню з застосуванням колонки для афінного очищення з білком А (колонка HiTrap з білком А - сефарозою; GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Швейцарія), які працювали на системі ÄKTA FPLC (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Швейцарія).

Для одержання секретованого рекомбінантного людського білка TL1A з гістидиновою міткою, послідовність ДНК, яка кодує оброблений варіант секретованого людського TL1A, було ампліфіковано шляхом ПЛР з застосуванням праймерів GlnPr1542 та GlnPr1543 (SEQ ID NO: 121 та 122, відповідно) з додаванням 6xHis лінкера у напрямку N-кінця. У другому циклі ПЛР з застосуванням праймерів GlnPr1544 (SEQ ID NO: 123) та GlnPr1543 додають сигнальний пептид та зручні бокові сайти рестрикції для клонування (5': NheI; 3': XhoI). Продукт ПЛР вирізали, застосовуючи NheI та XhoI (NEB, Ipswich, MA, США), а потім клонували у вищеописану модифіковану плазмиду pCDNK3.1(-), вирізали з застосуванням таких самих ферментів і обробляли CIP. Цей фрагмент рестрикції вивільнює відкриту рамку зчитування повного Fc-злитого білка, попередньо присутнього у векторі експресії. Після лігування та трансформації у Top 10 клітинах E. coli кінцеву плазмиду вибирали на основі фрагмента рестрикції та секвенування експресійної послідовності на наявність секретованого TL1A з N-кінцевою гістидиновою міткою (SEQ ID NO: 118). Перші 20 амінокислот SEQ ID NO: 118 відповідають сигнальній послідовності, яка не була присутньою в остаточній N-кінцевій експресійній послідовності з гістидиновою міткою.

Ця рекомбінантна плазміда забезпечувала можливість експресії людського білка TL1A-his у клітинах ссавців з секрецією у культуральних середовищах для клітин. Для вироблення білка рекомбінантний вектор трансфікували у суспензійно-адаптовані клітини HEK 293 EBNA (Life Technologies, Carlsbad, CA, США) з застосуванням трансфекційного реагента jetPEI™ (Polyplus-transfection S.A., Strasbourg, Франція; дистриб'ютор: Brunswig, Basel, Швейцарія). Супернатант культури клітин збирали через п'ять днів після трансфекції і очищали з застосуванням Ni²⁺-NTA колонки для афінного очищення (колонка HiTrap з Ni²⁺-NTA-сефарозою; GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Швейцарія), які працювали на системі ÄKTA FPLC (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Швейцарія). Буфер рекомбінантного людського TL1A-Fc та TL1A-his білків замінювали на фосфатно-буферний розчин (PBS). Рекомбінантний людський білок TL1A-Fc, розчинений у PBS, змішували з таким самим об'ємом ад'юванта Stimune (Prionics, Швейцарія) і приготували емульсію. Емульсію переносили у 0,5 мл інсулінові шприци (BD Pharmingen, Allschwil, Швейцарія) і тварин BALB/c (Harlan, Нідерланди) підшкірно імунізували у подушечки задніх лап, основу хвоста та шию шляхом введення 50 мкг емульгованого білка. Імунізацію повторювали через два тижні з такою самою кількістю антигена та таким самим шляхом ін'єкції.

Присутність циркулюючих антитіл проти людського TL1A в сироватці імунізованих мишей оцінювали шляхом прямого ELISA-аналізу з застосуванням планшетів, вкритих рекомбінантним людським білком TL1A-his. У планшети додавали послідовно розведені (від 1:10⁰ до 1:10⁹) різні зразки мишачої сироватки і зв'язані антитіла виявляли з застосуванням повномолекулярного H+L HRP-міченого антитіла кози проти миші (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Швейцарія). Кінцеву підшкірну бустерну ін'єкцію з введенням 50 мг антигена без ад'юванта здійснювали тваринам, які демонстрували найкращий титр у сироватці IgG проти людського TL1A за три дні до умертвіння.

Тварин умертвляли і збирали пахові, пахові, плечові, підколінні та сідничні лімфатичні вузли для приготування суспензії окремих клітин шляхом розподілу архітектури лімфатичних вузлів двома голками 25G у розчині ДНКаз (Roche Diagnostics (Schweiz) AG, Rotkreuz, Швейцарія) та колагенази (Roche Diagnostics (Schweiz) AG, Rotkreuz, Швейцарія). Суспензії окремих клітин зливали з лінією клітин мієломи X63AG8.653 (лінія клітин мієломи миші BALB/c; номер доступу в ATCC: CRL 1580; Kearney JF et al., (1979) J. Immunol. 123(4): 1548-1550) у співвідношенні 7:1 (партнер зі злиття - зібрані клітини лімфатичних вузлів) з поліетиленгліколем 1500 (Roche Diagnostics (Schweiz) AG, Rotkreuz, Швейцарія). Злиті клітини поміщали у 96-лункові планшети з плоским дном, які містили мишачі макрофаги у середовищі DMEM-10 (Invitrogen AG, Basel, Швейцарія), доповненому 10 % ембріональної бичачої сироватки (FBS,

PAA Laboratories, Pasching, Австрія), 2 мМ L-глутаміну, 100 У/мл (Biochrom AG, Німеччина) пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину (Biochrom AG, Німеччина), 10 мМ HEPES (Invitrogen AG, Basel, Швейцарія), 50 мМ β -меркаптоетанолу (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Швейцарія), NAT (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Швейцарія) та 1 % фактора росту (Hybridokine, Interchim/Uptima, Montluçon, Франція).

Приблизно 800 лунок після злиття відбирали шляхом ELISA-аналізу на наявність мишачого IgG, який розпізнавав людський TL1A і блокував зв'язування людського TL1A з його рецептором. Позитивні лунки розширювали й піддавали двом циклам субклонування. Клітини збирали і важкі та легкі ланцюги клонували й секвенували.

Приклад 2:

Клонування та секвенування VH та VL ланцюгів антитіл проти TL1A з клітин гібридоми

Для кожної позитивно відібраної гібридоми приготувляли тотальну РНК, піддавали зворотній транскрипції у кДНК і VH та VL гени відповідно ампліфікували шляхом ПЛР. Ці продукти ПЛР лігували у rescue-вектор (pDrive вектор; QIAGEN AG, Hombrechtikon, Швейцарія), що забезпечувало можливість секвенування ДНК окремих продуктів ПЛР та визначення моно- або поліклональності відібраних гібридом. Цей вектор дозволяв здійснювати "синьо-білий" відбір на LB-агарових планшетах, які містили IPTG та X-gal (колонії без вставки були синіми через розпад X-gal під дією LacZ α -пептиду). Рекombінантні плазмиди з позитивних (білих) бактеріальних клонів приготувляли й секвенували, застосовуючи стандартні праймери секвенування ДНК, специфічні до основа вектора (M13rev, M13fwd, T7 або SP6). Послідовності ДНК остаточно субклонували у вектор експресії для рекombінантної експресії потрібного антитіла у клітинах ссавців.

Виділення РНК

Тотальну РНК виділяли з клітин $2 \cdot 10^6$ з застосуванням міні-комплекту Rneasy від QIAGEN (QIAGEN AG, Hombrechtikon, Швейцарія) згідно з протоколом виробника; зразки підраховували, застосовуючи спектрофотометр NanoDrop ND-1000 (WITEC AG, Littau, Швейцарія).

Одноетапна ПЛР зі зворотною транскриптазою

Описані вище препарати тотальної РНК далі піддавали зворотній транскрипції у кДНК і VH та VL фрагменти ампліфікували шляхом ПЛР з застосуванням двох різних сумішей вироджених праймерів, кожен з яких дозволяв видобувати всі різні підродина варіабельних фрагментів важкого ланцюга мишачого імуноглобуліну та варіабельних з'єднувальних ділянок важкого ланцюга або видобувати всі каппа варіабельні фрагменти легкого ланцюга мишачого імуноглобуліну та каппа варіабельні з'єднувальні ділянки легкого ланцюга. Праймери, які застосовують для зворотної транскрипції та ампліфікації, синтезували за допомогою Microsynth (Balgach, Швейцарія) і очищали шляхом HPLC (Таблиці 1-4). Зворотну транскрипцію та ПЛР-ампліфікацію здійснювали одночасно, застосовуючи комплект для одноетапної ПЛР зі зворотною транскриптазою від QIAGEN (QIAGEN AG, Hombrechtikon, Швейцарія). Оскільки для цієї технології застосовували специфічні праймери, кожен зразок мРНК обробляли у двох примірниках, що дозволяло здійснювати окрему зворотну транскрипцію та ампліфікацію VH або VL фрагментів. 2 мкг тотальної РНК, розчиненої у воді без РНКаз до кінцевого об'єму 30 мкл, змішували з: 10 мкл 5х вихідного розчину буфера для одноетапної ПЛР зі зворотною транскриптазою від QIAGEN, 2 мкл суміші дНТФ у концентрації 10 мМ, 3 мкл суміші праймера у концентрації 10 мМ та 2 мкл ферментної суміші для одноетапної ПЛР зі зворотною транскриптазою від QIAGEN. Кінцеву суміш після цього поміщали у пробірку для ПЛР і циклували у ПЛР-термоциклері (BioRad iCycler version 4.006, Bio-Rad Laboratories AG, Reinach, Швейцарія) використовуючи такі установки:

30 хв. при 50 °C

15 хв. при 95 °C

40 циклів: 30 сек. при 94 °C

30 сек. при 55 °C

1 хв. при 72 °C

10 хв. при 72 °C

Утримання при 4 °C

Клонування pDrive

Продукти ПЛР проганяли на 2 % агарозних гелях. Після електрофорезу ДНК потрібні фрагменти (~450 п. н.) відокремлювали від агарозних гелів і піддавали подальшій екстракції з застосуванням комплекту Macherey-Nagel NucleoSpin Extract II kit 250 (Macherey-Nagel, Oensingen, Швейцарія). Для секвенування ДНК екстраговані продукти ПЛР клонували у вищеописаний rescue-вектор (вектор pDrive, QIAGEN AG, Hombrechtikon, Швейцарія) і

трансформували у штам E. coli TOP10 (Invitrogen AG, Basel, Швейцарія).

Екстракція мініпрепаратів

Позитивні колонії культивували протягом доби при 37 °C (зі збовтуванням при 250 об./хв.) в 1,5 мл середовища Luria Bertani (LB), доповненого 100 мкг/мл ампіциліну, висівали у блокувальні планшети з квадратними лунками Macherey-Nagel (Macherey-Nagel, Oensingen, Швейцарія). Наступного дня виконували екстракцію мініпрепаратів ДНК, застосовуючи плазмідний комплект NucleoSpin Multi-8 (Macherey-Nagel, Oensingen, Швейцарія).

Секвенування та аналіз послідовності

Зразки надсилали для секвенування ДНК до компанії Fasteris, яка надає послуги з секвенування ДНК (Plan-les-Ouates, Швейцарія). Застосовували стандартні праймери: M13rev, M13fwd, T7, SP6 (Таблиця 5). Для аналізу послідовностей ДНК застосовували програми Clone Manager 9 Professional Edition (Scientific & Educational Software, NC, США) та BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall TA (1999) Nucl Acids Symp Ser 41: 95-98).

Клонування вектора експресії для рекомбінантної експресії химерного антитіла

Для рекомбінантної експресії у клітинах ссавців виділені мишачі VH та VL фрагменти формували як химерні імуноглобуліни, застосовуючи способи ПЛР на основі складання. Ці химерні антитіла складаються з важкого ланцюга, в якому мишачий варіабельний домен важкого ланцюга є злитим з константними доменами важкого ланцюга людського IgG1 (γ1, шарнір, γ2 та γ3 ділянки), та легкого ланцюга, в якому мишачий варіабельний домен легкого ланцюга є злитим з людським каппа константним доменом (Ск). Складені шляхом ПЛР мишача варіабельна та людська константна частини потім клонували у модифікований вектор експресії ссавця на основі модифікованого пкДНК3.1(-) вектора від Invitrogen, який було згадано у Прикладі 1, з тією різницею, що при цьому застосовували каппа лідерний пептид легкого ланцюга людського імуноглобуліну для викликання секреції білка. Для одержання білків придатних імуноглобулінів однакову кількість векторної ДНК важкого та легкого ланцюга котрансфікували у суспензійно-адаптовані НЕК-293 (номер ATCC: CRL-1573). Супернатант культури клітин збирали через п'ять днів і очищали з застосуванням колонки для афінного очищення з білком А (колонка HiTrap з білком А - сефарозою), які працювали на системі ÄKTA FPLC (обидві від компанії GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Швейцарія).

Таблиця 1: суміш праймерів VH - зворотна

1	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC GAK GTR MAG CTT CAG GAG TC	SEQ ID NO: 65
2	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTB CAG CTB CAG CAG TC	SEQ ID NO: 66
3	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTG CAG CTG AAG SAR TC	SEQ ID NO: 67
4	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTC CAR CTG CAA CAR TC	SEQ ID NO: 68
5	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTY CAG CTB CAG CAR TC	SEQ ID NO: 69
6	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTY CAR CTG CAG CAR TC	SEQ ID NO: 70
7	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTC CAC GTG AAG CAR TC	SEQ ID NO: 71
8	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG AAS STG GTG GAR TC	SEQ ID NO: 72
9	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC GAV GTG AWG STG GTG GAG TC	SEQ ID NO: 73
10	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG CAG STG GTG GAR TC	SEQ ID NO: 74
11	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC GAK GTG CAM CTG GTG GAR TC	SEQ ID NO: 75
12	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG AAG CTG ATG GAR TC	SEQ ID NO: 76
13	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG CAR CTT GTT GAR TC	SEQ ID NO: 77
14	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC GAR GTR AAG CTT CTC GAR TC	SEQ ID NO: 78
15	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC GAA GTG AAR STT GAG GAR TC	SEQ ID NO: 79
16	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTT ACT CTR AAA SAR TC	SEQ ID NO: 80
17	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTC CAA CTV CAG CAR CC	SEQ ID NO: 81
18	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC GAT GTG AAC TTG GAA SAR TC	SEQ ID NO: 82
19	GTG ATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG AAG GTC ATC GAR TC	SEQ ID NO: 83

Таблиця 2: суміш праймерів VH - пряма

1	CCTCCACCACTCGAGCC CGA GGA AAC GGT GAC CGT GGT	SEQ ID NO: 84
2	CCTCCACCACTCGAGCC CGA GGA GAC TGT GAG AGT GGT	SEQ ID NO: 85
3	CCTCCACCACTCGAGCC CGC AGA GAC AGT GAC CAG AGT	SEQ ID NO: 86
4	CCTCCACCACTCGAGCC CGA GGA GAC GGT GAC TGA GGT	SEQ ID NO: 87

Таблиця 3: суміш праймерів VL - зворотна

1	GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATC CAG CTG ACT CAG CC	SEQ ID NO: 88
2	GGCGGTGGC GCT AGC CAA ATT GTT CTC ACC CAG TC	SEQ ID NO: 89
3	GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT GTG MTM ACT CAG TC	SEQ ID NO: 90
4	GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG YTR ACA CAG TC	SEQ ID NO: 91
5	GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTR ATG ACM CAG TC	SEQ ID NO: 92
6	GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT MAG ATR AMC CAG TC	SEQ ID NO: 93
7	GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT CAG ATG AYD CAG TC	SEQ ID NO: 94
8	GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATY CAG ATG ACA CAG AC	SEQ ID NO: 95
9	GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTT CTC AWC CAG TC	SEQ ID NO: 96
10	GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT GWG CTS ACC CAA TC	SEQ ID NO: 97
11	GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT STR ATG ACC CAR TC	SEQ ID NO: 98
12	GGCGGTGGC GCT AGC GAY RTT KTG ATG ACC CAR AC	SEQ ID NO: 99
13	GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT GTG ATG ACB CAG KC	SEQ ID NO: 100
14	GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG ATA ACY CAG GA	SEQ ID NO: 101
15	GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG ATG ACC CAG WT	SEQ ID NO: 102
16	GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG ATG ACA CAA CC	SEQ ID NO: 103
17	GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT TTG CTG ACT CAG TC	SEQ ID NO: 104
18	GGCGGTGGC GCT AGC GAA ACA ACT GTG ACC CAG TC	SEQ ID NO: 105
19	GGCGGTGGCGCT AGC GAA AAT GTK CTS ACC CAG TC	SEQ ID NO: 106
20	GGCGGTGGCGCT AGC CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TC	SEQ ID NO: 107

Таблиця 4: суміш праймерів VL - пряма

1	ATGCTGAC GC GGC CGC ACG TTT KAT TTC CAG CTT GG	SEQ ID NO: 108
2	ATGCTGAC GC GGC CGC ACG TTT TAT TTC CAA CTT TG	SEQ ID NO: 109
3	ATGCTGAC GC GGC CGC ACG TTT CAG CTC CAG CTT GG	SEQ ID NO: 110
4	ATGCTGAC GC GGC CGC ACC TAG GAC AGT CAG TTT GG	SEQ ID NO: 111

Таблиця 5: секвенуючі праймери

M13-Fwd	GTAAAACGACGGCCAGT	SEQ ID NO: 112
M13-Rev	AACAGCTATGACCATG	SEQ ID NO: 113
T7	TAATACGACTCACTATAGG	SEQ ID NO: 114
SP6	GATTTAGGTGACACTATAG	SEQ ID NO: 115

Приклад 3:

Біологічна характеристика антитіл TL1A проти людини

Виявлення TL1A-специфічного антитіла шляхом ELISA

Титри антитіл, їх специфічність та продукування гібридомами та потенційними рекомбінантними антитілами визначали шляхом прямого ELISA-аналізу. У загальних рисах, 96-

лункові мікротитрувальні планшети (Costar, США, дистриб'ютор VWR AG, Nyon, Швейцарія) вкривали 100 мкл рекомбінантного людського TL1A-his у кількості 2 мкг/мл у PBS (див. Приклад 1 з описом вироблення білка TL1A-his). Планшети інкубували протягом доби при 4 °C, а потім знову блокували PBS 2 % BSA (альбумін сироватки великої рогатої худоби, PAA Laboratories, Pasching, Австрія) при кімнатній температурі (RT) протягом однієї години. Блокувальний розчин видаляли і додавали супернатанти гібридами або очищені антитіла. Планшети інкубували при кімнатній температурі протягом 30 хвилин, потім дев'ять разів промивали PBS 0,01 % Tween-20 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Швейцарія) і додавали мічене пероксидазою хрону (HRP) Антитіло кози проти миші для виявлення H+L (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Швейцарія) у розведенні 1:1000. Для виявлення рекомбінантних химерних антитіл (див. Приклад 2), які мають Fc людини, використовували HRP-мічене антитіло кроля проти людського IgG (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Швейцарія) у розведенні 1:1000 як антитіло для виявлення. Планшети інкубували протягом 30 хвилин при кімнатній температурі (RT), дев'ять разів промивали PBS 0,01 % Tween-20, у планшети додавали TMB субстрат (Bio-rad Laboratories AG, Reinach, Швейцарія) і реакцію зупиняли через дві-шість хвилин шляхом додавання H₂SO₄. Потім зчитували оптичну густину при 450 нм за допомогою зчитувального пристрою для мікропланшетів (Biotek, США; дистриб'ютор: WITTEC AG, Littau, Швейцарія). Фігура 1 показує, що супернатанти батьківської гібридами різних клонів розпізнають людський TL1A-his вкритий білок, а не нерелевантний his-мічений білок.

Блокування TNFRSF25 з застосуванням ELISA

Рекомбінантний людський рецепторний білок TNFRSF25 (TNFRSF25) утворювали таким чином: кДНК для людського TNFRSF25 (назва клону: IRCMp5012F0812D) придбавали у Source Biosystems (Nottingham, Великобританія) і позаклітинну частину (амінокислоти 25-199) людського TNFRSF25 (нумерація згідно з Uniprot, послідовність Q93038) ампліфікували боковими сайтами рестрикції. Одержаний в результаті продукт ПЛР, який включав N-кінцеву послідовність мітки 8-His, потім клонували у модифікований варіант вектора пкДНК3.1 від Invitrogen (Invitrogen AG, Basel, Швейцарія), який містив CMV промотор, поліаденілування гормону росту великої рогатої худоби та мишачий лідерний пептид VJ2C для викликання секреції рекомбінантного білка. Для вироблення рекомбінантного білка, рекомбінантний вектор трансфікували у суспензійно-адаптовані клітини HEK 293 (номер ATCC CRL 1573) з застосуванням трансфекційного реагента jetPEI™ (Polyplus-transfection S.A., Strasbourg, Франція; дистриб'ютор: Brunschwig, Basel, Швейцарія). Супернатант культури клітин збирали через п'ять днів і очищали з застосуванням колонки для афінного очищення з білком А (колонка HiTrap з білком А - сефарозою; GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Швейцарія), які працювали на системі ÄKTA FPLC (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Швейцарія).

Для того, щоб визначити, чи можуть вироблені антитіла проти TL1A блокувати зв'язування TL1A з рецептором TNFRSF25, було розроблено блокувальний ELISA-аналіз. 96-лункові мікротитрувальні планшети (Costar, США; дистриб'ютор VWR AG, Nyon, Швейцарія) вкривали 100 мкл рекомбінантного людського TL1A-Fc (див. Приклад 1) у кількості 2 мкг/мл у PBS або рекомбінантного неміченого TL1A (R&D Systems, Minneapolis, США). Планшети інкубували протягом доби при 4 °C, а потім блокували PBS 2 % BSA при кімнатній температурі протягом однієї години. Блокувальний розчин видаляли і у планшет додавали супернатанти гібридами або очищені антитіла. Через п'ять хвилин у кожен лунку додавали 50 мкл рекомбінантного людського TNFRSF25-Fc-his (R&D Systems) у кількості 4 мкг/мл. Планшети інкубували при кімнатній температурі протягом 60 хвилин, потім дев'ять разів промивали PBS 0,01 % Tween-20 і додавали мишаче антитіло проти поліістидину-HRP (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Швейцарія) у розведенні 1:2000. Планшети інкубували протягом 30 хвилин при кімнатній температурі, дев'ять разів промивали PBS 0,01 % Tween-20, у планшети додавали TMB субстрат (Bio-rad Laboratories AG, Reinach, Швейцарія) і реакцію зупиняли через 6 хвилин шляхом додавання H₂SO₄. Потім зчитували оптичну густину при 450 нм за допомогою зчитувального пристрою для мікропланшетів (Biotek, США; дистриб'ютор: WITTEC AG, Littau, Швейцарія). Фігура 2 показує, що очищені антитіла здатні блокувати взаємодію між TL1A та TNFRSF25 залежно від дози.

Інгібування TL1A-індукованої секреції IFN-γ примованими CD4 Т-клітинами

CD4 Т-клітини, примовані цитокінами IL-12 та IL-18 поляризуються у напрямку фенотипу TH1 і секретиють IFN-γ. Було виявлено, що TL1A посилює вироблення IFN-γ примованими CD4 Т-клітинами. Таким чином, авторами було випробувано, чи може химерне антитіло 5G6 блокувати це TL1A-залежне збільшення вироблення IFN-γ.

Для очищення людських CD4 Т-клітин від мононуклеарів периферичної крові (PMBC) брали фільтри, які містили людські лейкоцити, з Центра зразків крові Blood Collection Centre у La

Chaux-de-Fonds, Швейцарія (Centre de Transfusion Sanguine et Laboratoire de Sérologie, rue Sophie-Mairet 29, CH-2300). Клітини видаляли з фільтрів шляхом зворотного промивання 60 мл PBS, який містив 10 У/мл ліквеміну (Drossapharm AG, Lucern, Швейцарія). Потім PBMC очищали з застосуванням 50 мл фільтрувальних трубок Blood-Sep-Filter Tubes (дистриб'ютор: Brunschwig, Basel, Швейцарія) з дотриманням інструкцій виробника. Клітини тричі промивали фосфатно-буферним розчином (PBS), а потім застосовували для очищення CD4 з використанням комплексу для очищення інтактних CD4 Т-клітин від Miltenyi (Gladbach, Німеччина) згідно з інструкціями виробника.

Антитіло 5G6 випробували для того, щоб визначити, чи може воно інгібувати вплив виробленого природним шляхом TL1A. Примовані IL-12 та IL-18 CD4 Т-клітини інкубували з моноцитами, які були попередньо активовані імунними комплексами (IC), і вимірювали вироблення IFN- γ . Моноцити виділяли з PBMC (див. вище) з застосуванням комплексу II для виділення моноцитів від Miltenyi (Gladbach, Німеччина) згідно з інструкціями виробника. IC-стимуляцію моноцитів виконували таким чином: chrmpure людський IgG (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Newmarket, Великобританія) наносили на 12-лунковий планшет для культивування клітин (TPP, Trasadingen, Швейцарія) у кількості 50 мкг/мл протягом 2 год. при кімнатній температурі у PBS. Потім планшет промивали PBS і інкубували з мишачим IgG проти людини (Jackson ImmunoResearch) протягом 1 год. при кімнатній температурі. Вкритий планшет один раз промивали PBS перед нанесенням очищених моноцитів. IC-стимульовані моноцити збирали після 48-72 год. інкубації при 37 °C в інкубаторі з 5 % CO₂.

Для аналізу шляхом протокової цитометрії IC-стимульовані моноцити забарвлювали антитілом проти TL1A-PE (GeneTex, дистриб'ютор Lucerna Chem. AG, Lucerna, Швейцарія) або кролячим ізотипічним контролем (BD Pharmingen, Allschwil, Швейцарія) у кількості 10 мкг/мл у 96-лунковому мікротитрувальному планшеті з V-подібним дном (TPP, Trasadingen, Швейцарія) при 4 °C протягом 30 хв. Розріджувальний буфер (FACS-буфер) являв собою PBS, доповнений 2 % ембріональної бичачої сироватки (FCS, Amimed, дистриб'ютор Bioconcept, Allschwil, Швейцарія) та 10 % Versene (Gibco Life Technologies). Після інкубації у кожен лунку додавали 100 мкл FACS-буфера і планшет центрифугували при 300 g протягом 3 хв. Супернатант видаляли і зразки ресуспендували у 100 мкл розчину вторинного антитіла PE проти кроля у кількості 0,2 мкг/мл у FACS-буфері. Зразки інкубували при 4 °C протягом 20 хв. Планшет промивали, як описано вище, і зразки ресуспендували у 300 мкл FACS-буфера і відразу виявляли на протоковому цитометрі (Beckman Coulter International S.A., Nyon, Швейцарія). Для визначення кількості розчинного TL1A супернатант з культури IC-стимульованих моноцитів збирали у різні моменти часу (через 20, 48 та 72 год.) і кількість sTL1A визначали, застосовуючи ELISA-комплект для виявлення людського TL1A (Peprotech) згідно з рекомендаціями виробника.

Для спільного культивування моноцитів-Т-клітин IC-стимульовані моноцити (10⁴) та очищені CD4 Т-клітини (10⁵) висівали у 96-лункові планшети з плоским дном (TPP) з IL-12 (Peprotech) у кількості 8 нг/мл та IL-18 (MBL International, дистриб'ютор LabForce AG, Nunningen, Швейцарія) у кількості 200 нг/мл в інкубаторі з CO₂ при 37 °C. Супернатанти культури збирали через 72 год. і кількість IFN- γ визначали, як описано вище.

IC-стимульовані моноцити експресували TL1A на їх мембранах (mTL1A) (Фігура 3А), але більш суттєво, ніж розчинний фактор (sTL1A) (Фігура 3В) і викликали інтенсивне вироблення IFN- γ спільно культивованими CD4 Т-клітинами (Фігура 3С). Антитіло 5G6 повністю пригнічувало вироблення IFN- γ , індуковане IC-стимульованими моноцитами, демонструючи потужне блокування опосередкованого mTL1A та sTL1A ефекту.

Приклад 4:

Батьківське потенційне антитіло 5G6 зв'язується з TL1A миші, щура, яванського макака та людини

Реакційну здатність батьківського антитіла 5G6 (виробленого як химерне антитіло з людським Fc) на позаклітинній частині TL1A з різних видів випробували шляхом ELISA-аналізу. Позаклітинну частину білка TL1A, яка відповідала послідовностям людини (*homo sapiens*), щура (*ratus norvegicus*), миші (*mus musculus*) та яванського макака (*macaca fascicularis*) (SEQ ID NO: 38, 39, 40 та 41, відповідно) іммобілізували на високозв'язувальних 96-лункових планшетах (Costar, США; дистриб'ютор VWR AG, Nyon, Швейцарія) протягом доби у концентрації 2 мкг/мл при 4 °C у PBS. Планшети блокували 2 % BSA альбуміном (BSA, Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Швейцарія) при кімнатній температурі протягом однієї години. Блокувальний розчин видаляли і для планшетів застосовували розведення дози антитіла 5G6. Планшети інкубували при кімнатній температурі протягом 60 хвилин, шість разів промивали PBS 0,01 % Tween-20 і у планшети додавали ТМВ субстрат (Bio-rad Laboratories AG, Reinach, Швейцарія). Реакцію припиняли через 6 хвилин шляхом додавання H₂SO₄ і зв'язування 5G6 на різних білках TL1A

виявляли з застосуванням HRP-міченого вторинного антитіла після людського IgG (Sigma-Aldrich Chemie, Buchs, Швейцарія), яке додавали у розведенні 1:1000. Планшети зчитували на оптичну густину при 450 нм за допомогою зчитувального пристрою для мікропланшетів (Biotek, США; дистриб'ютор: WITTEC AG, Littau, Швейцарія). Фігура 4 показує, що 5G6 розпізнає, залежно від дози, білок TL1A з усіх випробуваних видів.

Приклад 5:

Гуманізація мишачого моноклонального антитіла 5G6

Описується гуманізація мишачого антитіла 5G6 проти людського TL1A, включаючи відбір людських акцепторних каркасів, зворотні мутації та мутації, які суттєвою мірою зберігають і/або поліпшують зв'язувальні властивості людських прищеплених до CDR акцепторних каркасів.

Побудова реконструйованих варіабельних ділянок

Застосовували гомологічне підбирання для вибору людських акцепторних каркасів для прищеплення 5G6 CDR. Можуть застосовуватися бази даних, наприклад, база даних варіабельних генів зародкової лінії з імуноглобулінових локусів людини та миші (база даних IMGT, вище) або VBASE2 (Retter I et al., (2005) *Nucleic Acids Res.* 33, Database issue D671-D674) або база даних Кебата (Johnson G et al., (2000) *Nucleic Acids Res.* 28: 214-218) або публікації (наприклад, Kabat EA et al., вище) для розпізнавання людських підродин, до яких належать мишачі V ділянки важкого та легкого ланцюга (SEQ ID NO: 1 та 2, відповідно), та визначення найбільш відповідного каркаса зародкової лінії людини для застосування як акцепторної молекули. Відбір варіабельних послідовностей важкого та легкого ланцюгів (VH та VL) у межах цих підродин, які мають застосовуватись як акцептор, може ґрунтуватися на гомології послідовностей та/або відповідності структури ділянок CDR1 та CDR2 для сприяння збереженню відповідної відносної презентації шести CDR після прищеплення.

Наприклад, застосування бази даних IMGT вказує на високу гомологію між варіабельним доменом важкого ланцюга каркаса 5G6 та представниками підродини 1 людського варіабельного домену важкого ланцюга. Найвищі показники гомології та ідентичності CDR та каркасних послідовностей спостерігалися для послідовностей зародкової лінії:IGHV1-2*02 (SEQ ID NO: 3), IGHV1-2*04 (SEQ ID NO: 4), IGHV1-2*05 (SEQ ID NO: 5), IGHV1-2*01 (SEQ ID NO: 6) та IGHV1-46*01 (SEQ ID NO: 7), які мали ідентичність послідовностей понад 67 % для всієї послідовності до CDR3. IGHV1-2*02 та IGHV1-2*04 демонстрували 69,4 % ідентичність послідовностей, тоді як IGHV1-2*01 та IGHV1-46*01 демонстрували ідентичність послідовностей 68,4 та 67,3 %, відповідно.

При застосуванні такого самого підходу послідовність варіабельного домену легкого ланцюга 5G6 демонструвала високу гомологію з представниками каппа підродини 1 варіабельного домену легкого ланцюга людини. Найвищі показники гомології та ідентичності CDR та каркасних послідовностей спостерігалися для послідовностей зародкової лінії: IGKV1-33*01 (SEQ ID NO: 8) та IGKV1D-33*01 (SEQ ID NO: 9) демонстрували найвищу ідентичність (обидва мали 80,0 % ідентичності), і їм з невеликою різницею поступалася ще одна група, яка складалася з IGKV1D-12*02 (SEQ ID NO: 10), IGKV1D-12*01 (SEQ ID NO: 11) та IGKV1-12*02 (SEQ ID NO: 12), які демонстрували однаковий ступінь ідентичності послідовностей (75,8 %).

Як початкову точку процесу гуманізації вибирали людські варіабельні домени IGHV1-2*01 (SEQ ID NO: 3) та IGKV1-33*01 (SEQ ID NO: 8) як акцептори для 5G6 CDR. Одержували перше гуманізоване антитіло людського ізотипу гамма-1 (див. нижче). Антитіло охоплювало людський-мишачий гібридний варіабельний домен важкого ланцюга та людський-мишачий гібридний варіабельний домен легкого ланцюга. Гібридний варіабельний домен важкого ланцюга ґрунтувався на людському варіабельному домені важкого ланцюга IGHV1-2*01, причому CDR1 та 2 зародкової лінії були відповідно замінені на CDR1 та 2 важкого ланцюга 5G6. Найбільш придатну послідовність JH сегмента до людського акцепторного каркаса розпізнавали шляхом пошуків у базі даних IMGT, як згадано вище. Утворену в результаті людсько-мишачу гібридну варіабельну послідовність легкого ланцюга, яка має людські каркасні ділянки IGHV1-2*01, 5G6 мишачі CDR та найбільш придатний JH до людського акцепторного каркаса, називають варіабельним доменом важкого ланцюга VH1 з SEQ ID NO: 13. Подібним чином людський-мишачий гібридний варіабельний домен легкого ланцюга, який застосовують для цього першого потенційного гуманізованого антитіла, мав каркасні ділянки IGKV1-33*01, 5G6 CDR миші та найбільш придатний JK до людського акцепторного каркаса і називається варіабельним доменом легкого ланцюга VL1 з SEQ ID NO: 14. Перше гуманізоване антитіло, яке охоплює VH1 та VL1 скорочено вказується як VH1/VL1 антитіло.

Одержання прототипу першого гуманізованого антитіла

Кодуючі послідовності ДНК (кДНК) для VH1 та VL1 було синтезовано у форматі scFv компанією GENEART AG (Regensburg, Німеччина), що дозволяє єдиній послідовності кДНК

включати обидва варіабельні домени (SEQ ID NO: 15). Окремі варіабельні домени кДНК видобували з цієї послідовності scFv шляхом ПЛР і піддавали подальшому складанню перед послідовністю (послідовностями) кДНК їх відповідного константного домену, застосовуючи ПЛР-технології складання. І нарешті, повні кДНК важкого та легкого ланцюга лігували у незалежних векторах, побудованих на основі модифікованого вектора пкДНК3.1 (Invitrogen, CA, США), який містить CMV промотор та сигнал поліаденілування гормону росту великої рогатої худоби. Специфічний вектор легкого ланцюга забезпечував можливість експресії легких ланцюгів людського каппа ізотипу шляхом лігування потрібної кДНК варіабельного домену легкого ланцюга перед кДНК каппа константного домену легкого ланцюга з використанням BamHI та BsiWI сайтів рестрикційного ферменту; водночас специфічний вектор важкого ланцюга було піддано інженерії таким чином, щоб забезпечувалася можливість лігування потрібної кДНК варіабельного домену важкого ланцюга перед послідовністю кДНК, яка кодує людськийIGHG1 CH1, шарнірну ділянкуIGHG1, константні домениIGHG1 CH2 таIGHG1 CH3 з застосуванням сайтів рестрикційного ферменту BamHI та Sall. У векторах експресії важкого та легкого ланцюга секреція викликала лідерним пептидом VJ2C миші, який містить сайт BamHI. Сайт BsiWI рестрикційного ферменту розташовується у каппа константному домені; водночас сайт Sall рестрикційного ферменту розташовується у доменіIGHG1 CH1.

VH1/VL1 антитіло (яке має важкий ланцюг SEQ ID NO: 16 та легкий ланцюг SEQ ID NO: 17) тимчасово вироблялося шляхом котрансфекції однакової кількості векторів важкого та легкого ланцюга у суспензійно-адаптовані клітини HEK293-EBNA1 (номер у каталогі ATCC®: CRL-10852) з застосуванням поліетиленіміну (PEI, Sigma, Buchs, Швейцарія). Зазвичай 100 мл клітин у суспензії при густині 0,8-1,2 млн. клітин на мл трансфікують сумішшю DNA-PEI, яка містить 50 мкг вектора експресії, який кодує важкий ланцюг, та 50 мкг вектора експресії, який кодує легкий ланцюг. Коли рекомбінантні вектори експресії, які кодують гени антитіл, вводять у клітини-хазяї, антитіла виробляються шляхом подальшого культивування клітин протягом періоду від 4 до 5 днів для забезпечення можливості секреції у культуральне середовище (EX-CELL 293, HEK293-безсироваткове середовище; Sigma, Buchs, Швейцарія), доповнене 0,1 % плуороніловою кислотою, 4 мМ глутаміну та 0,25 мкг/мл генетицину).

VH1/VL1 антитіло очищали від безклітинного супернатанту, застосовуючи потокове середовище рекомбінантного білка А (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Швейцарія) і піддавали буферному обмінові, поміщуючи у фосфатно-буферний розчин перед аналізами.

Кінетичні константи афінності зв'язування шляхом поверхневого плазмонного резонансу (SPR)

Кінетичні константи афінності зв'язування (KD) вимірювали на зв'язаному білком А антитілі з застосуванням міченого рекомбінантним гістидином TL1A як аналіту. Вимірювання здійснювали на BIAcore 2000 (GE Healthcare-BIAcore, GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Швейцарія) при кімнатній температурі і аналізували з застосуванням програми BiaEvaluation (BIAcore; v4.1, GE Healthcare Europe GmbH).

Прийнятний для досліджень сенсорний чіп CM5 (GE Healthcare Europe GmbH; ref. BR-1000-14) активували шляхом ін'єкції 35 мкл 1:1 розчину гідрохлориду N-гідрокисульфосукциніміду (NHS)/ 1-етил-3-[3-диметилапінопропіл]карбодііміду (EDC) (об'єм/об'єм; швидкість потоку 5 мкл/хв.; по напрямках потоку 1 та 2). Білок А (ref. P7837; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Швейцарія) розводили до кінцевої концентрації 50 мкг/мл в ацетатному буфері, pH 4,5 (GE Healthcare Europe GmbH, BR-1003-50; на одну одиницю pH нижче за pI), а потім іммобілізували на попередньо активованому сенсорному чіпі CM5 шляхом ін'єкції 35 мкл по напрямках потоку 1 та 2 (5 мкл/хв.); це відповідало приблизно 1500 одиницям відповіді (RU). Сенсорний чіп білок-А-CM5 після цього дезактивували шляхом ін'єкції 35 мкл розчину етаноламіну (5 мкл/хв). І нарешті, здійснювали дві ін'єкції по 10 мкл розчину гліцину (GE Healthcare Europe GmbH, ref. BR-1003-54; 10 мМ; pH 1,5) для вивільнення молекул незшитого білка А.

Для вимірювань афінності химерне та гуманізоване антитіло, яке зберігали в 1 x PBS, розводили у HBS-EP буфері (GE Healthcare Europe GmbH, ref. BR-1001-88; 0,01 M HEPES, 0,15 M NaCl, EDTA 3 мМ, 0,005 % поверхнево-активної речовини P20, pH 7,4), а потім вводили шляхом ін'єкції по напрямку потоку 2 чіпа білок-А-CM5 (30 мкл/хв.) для досягнення приблизно 180 RU. Після цього етапу захоплення мічений рекомбінантним гістидином людський TL1A вводили шляхом ін'єкції у різних концентраціях (від 1,25 до 125 нМ) по напрямках потоку 1 та 2 (напрямок потоку 1 використовують як контроль) при швидкості потоку 30 мкл/хв. Після кожного зв'язування поверхню відновлювали гліциновим буфером, pH 1,5, який вводили шляхом ін'єкції протягом 20 сек (30 мкл/хв).

Вимірювання (сенсограма: fc2-fc1) найкращим чином суміщувалися з моделлю 1:1 аналіта без масопередачі. Для врахування експериментальних коливань у захопленому білком А

антитілі на початку кожного вимірювання значення R_{max} щоразу встановлювали на місцеве. Час дисоціації становив принаймні 300-600 секунд. Вимірювання виконували у двох примірниках і для контролю включали зразки з нульовою концентрацією. Значення Chi^2 представляє суму квадратів різниці між експериментальними даними та контрольними даними у кожній точці; водночас графіки залишків показують різницю між експериментальними та контрольними даними для кожної точки суміщення. Значення Chi^2 та залишків використовували для оцінки якості відповідності між експериментальними даними та окремими моделями зв'язування.

Зворотні мутації прищеплених людських каркасів

Оскільки в результаті прямого прищеплення CDR з мишачого антитіла 5G6 потенційне антитіло не мало зв'язування з людським TL1A (Таблиця 6), започатковували мутагенез, у якому людські залишки є заміщеними мишачими залишками. Цей процес називається зворотною мутацією і є найбільш непередбачуваною процедурою при гуманізації моноклональних антитіл. Він вимагає розпізнавання та відбору ключових каркасних залишків з мишачого антитіла, які мають зберігатися з метою збереження афінності з одночасною мінімізацією потенційної імуногенності в гуманізованому антитілі.

Для розпізнавання залишків, які можуть найбільше впливати на конформацію CDR та/або пакування між варіабельними доменами, розраховували 3D модель для VH1-VL1 пари варіабельних доменів, застосовуючи сервер для моделювання гомології структур SWISS-MODEL (Arnold K et al., (2006) *Bioinformatics*, 22(2): 195-201; <http://swissmodel.expasy.org>), встановлений на автоматичний режим. Аналіз моделі дозволяв вибрати підгрупу позицій на основі їх імовірного впливу на CDR-ділянки та/або пакування варіабельних доменів важкого ланцюга - легкого ланцюга. Ця підгрупа позицій складалася з позицій варіабельного важкого ланцюга: 37, 48, 50, 67, 69, 71 та 75, а також позицій варіабельного легкого ланцюга: 5 та 34 (Нумерація за Кебатом).

Інші потенційні гуманізовані антитіла, які мали зворотні мутації у вибраних позиціях, як згадано вище, одержували, застосовуючи генний синтез та стандартні способи мутагенезу. Єдину послідовність кДНК, яка включає варіабельні домени VH2 та VL2 (SEQ ID NO: 18), синтезували й застосовували як початкову точку для подальшого мутагенезу. Експресію та очищення антитіло здійснювали згідно з вищеописаними способами. Потенційні гуманізовані антитіла оцінювали на їх афінність зв'язування шляхом SPR, як було описано вище.

Зв'язувальні властивості (KD) вибраних гуманізованих антитіл на основі єдиного заміщення або комбінації заміщень показано у Таблиці 6. Серед гуманізованих варіантів VH3/VL1 антитіло мало найвищу афінність до антигена TL1A, демонструючи нижчий показник KD порівняно з химерним антитілом 5G6.

Термостійкість вибраних гуманізованих антитіл проти TL1A, визначена шляхом диференціальної скануючої калориметрії

Термостійкість гуманізованих антитіл вимірювали, застосовуючи диференціальну скануючу калориметрію (DSC). Криві плавлення моноклональних антитіл характеризують їх ізотипи (Garber E & Demarest SJ (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355: 751-7), однак медіанна температура плавлення FAB фрагмента може бути легко визначена навіть у межах IgG повної довжини. Таку медіанну температуру плавлення FAB частини використовували для спостереження моноклональної стійкості потенційних гуманізованих антитіл.

Калориметричні вимірювання здійснювали на диференціальному скануючому мікрокалориметрі VP-DSC (GE Healthcare Europe GmbH). Об'єм клітин становив 0,128 мл, швидкість нагрівання становила 200 °C/год., і надлишковий тиск підтримували на рівні 65 p.s.i. Усі антитіла застосовували у концентрації 1 мг/мл у PBS (pH 7,4). Молярну теплоємність антитіла визначали шляхом порівняння з подвійними зразками, які містили ідентичний буфер, з якого було видалено антитіло. Парціальну молярну теплоємність та криві плавлення аналізували, застосовуючи стандартні процедури. Термограми коректували за базовою лінією і концентрацію нормалізували перед подальшим аналізом з застосуванням моделі Non-Two State у програмі Origin v7.0.

Гуманізований варіантний VH5/VL1 FAB фрагмент демонстрував єдиний перехід при 83,8 °C з формою та амплітудою, які відповідали спільному розгортанню, яке зазвичай спостерігалось для компактно складених FAB фрагментів, вказуючи на те, що процес інженерії для збереження стійкості FAB був успішним. В цілому гуманізований варіант демонстрував добру термостійкість.

Таблиця 6: гуманізовані антитіла проти людського TL1A

Варіант антитіла (IGHG1)	SEQ ID NO	Зворотні мутації VH/VL	K _D (pM)
Chimera	19, 20	N.A./N.A.	728
VH1/VL1	16, 17	N.A./N.A.	без зв'язування
VH2/VL2	21, 25	VH: V37A-M48I-W50E-V67A-M69L-R71V-I75S VL: N34S-T5N	857
VH3/VL1	22, 17	VH: V37A-M48I-W50E-V67A-R71V	249
VH4/VL1	23, 17	VH: V37A-M48I-W50E-R71V	681
VH5/VL1	24, 17	VH: V37A-W50E-R71V	259

Приклад 6:

Потенційні гуманізовані антитіла 5G6 можуть блокувати TL1A-індуковану секрецію IFN- γ примованими CD4 Т-клітинами

Потенційні гуманізовані варіанти антитіла 5G6 випробували для того, щоб визначити, чи можуть вони інгібувати TL1A-залежне збільшення вироблення IFN- γ .

Людські CD4 Т-клітини очищали від мононуклеарів периферичної крові (PMBC), як описано вище у Прикладі 3. Культивування всіх клітин виконували у середовищі, розробленому Інститутом Розвелла Парка (RPMI-1640, PAA Laboratories, Pasching, Австрія), доповненому 10 % інактивованої нагріванням ембріональної бичачої сироватки (FCS, Amimed, дистриб'ютор Bioconcept, Allschwil, Швейцарія), замінними амінокислотами (PAA, дистриб'ютор Chemie Brunschwig AG, Basel, Швейцарія), ультраглютаміном (Lonza, Basel, Швейцарія), піруватом натрію (PAA) та сумішшю пеніциліну/стрептоміцину (Gibco Life technologies). Очищені CD4 Т-клітини (10^5 клітин/лунку) інкубували з IL-12 (Peprotech, Hamburg, Німеччина) у кількості 8 нг/мл, IL-18 (MBL International, дистриб'ютор LabForce AG, Nunningen, Швейцарія) у кількості 200 нг/мл (примуючий фактор) та людським розчинним TL1A з N-кінцевою гістидиновою міткою (кодується SEQ ID NO: 118), протягом 72 год. у присутності блокуючих потенційних гуманізованих антитіл 5G6 (VH3/VL1– SEQ ID NO: 22 та 17, VH4/VL1– SEQ ID NO: 23 та 17, VH5/VL1– SEQ ID NO: 24 та 17 і VH2/VL2– SEQ ID NO: 21 та 25), які водночас додавали у концентрації 100, 10, 1 та 0,1 мкг/мл (див. Таблиці на Фігурі 5). Ізотипічний контроль додавали у кількості 100 мкг/мл у 96-лунковий планшет з плоским дном для культивування клітин (TPP AG, Trasadingen, Швейцарія). Супернатанти збирали через 72 год. і IFN- γ підраховували шляхом ELISA з застосуванням комплексу OptEIA (BD Pharmingen, Allschwil, Швейцарія) згідно з інструкціями виробника. Фігура 5 показує, що гуманізовані антитіла проти TL1A здатні суттєвою мірою інгібувати вироблення IFN- γ .

Приклад 7:

Гуманізоване антитіло 5G6 є ефективним у мишачій моделі алергічної астми

Астма у мишей спонтанно не розвивається, тому для дослідження цієї хвороби у мишей у дихальних шляхах має бути викликана подібна до астматичної реакція. Було розроблено різні моделі гострої алергізації, і в цьому прикладі використовували мишей BALB/c, оскільки в них добре розвивалася імунологічна реакція, зміщена у бік Т-хелперних клітин 2 (Th2) (Boyse JA & Austin KF (2005) J Exp Med, 201: 1869-73). Овальбумін, взятий з курячих яєць, є алергеном, який викликає стійке алергічне запалення легенів у мишей, і тому його часто застосовують у мишачих моделях алергічної астми (Kumar RK et al., (2008) Curr Drug Targets, 9: 485-94).

У цьому прикладі застосовували представлений нижче протокол імунізації для викликання алергічної астми: мишей BALB/c сенсibiliзували шляхом внутрішньочеревинної ін'єкції 100 мкг овальбуміну (альбуміну з білка курячого яйця, Grade V, Sigma Aldrich, Швейцарія), адсорбованого на 1 мг суспензії гідроксиду алюмінію та гідроксиду магнію (Imject Alum, Thermo Scientific, Швейцарія), на 0-й день та 14-й день. На 28, 30 та 33-й дні мишей лікували внутрішньочеревинною ін'єкцією 50 мг/кг гуманізованого антитіла 5G6 (VH5/VL1; формат IgG4 з шарнірною стабілізацією; SEQ ID NO: 124 та 17) або еквівалентної кількості контрольного людського IgG. Як позитивний контроль застосовували дексаметазон (Sigma, Швейцарія) у кількості 5 мг/кг. Через чотири години після лікування мишей анестезували 30 мг/кг ксилазину та 150 мг/кг кетаміну (Xylazol та Ketazol від Graeub Veterinary products, Швейцарія) і здійснювали

інтраназальну ін'єкцію 10 мкг овальбуміну. Через три дні мишей умертвляли і після катетеризації їх трахей здійснювали бронхоальвеолярний лаваж (BAL) шляхом ін'єкції 2 мл холодного PBS у легені. Клітини у рідині BAL підраховували і виявляли еозинофіли шляхом протокової цитометрії з застосуванням маркерів поверхні клітин CD11c та Siglec F.

Результати показано на Фігурі 6, на якій можна спостерігати, що лікування гуманізованим антитілом 5G6 в результаті забезпечує приблизно 4-разове зменшення кількості еозинофілів у BAL-рідині астматичних мишей.

Приклад 8:

Гуманізоване антитіло 5G6 є ефективним при лікуванні DSS-індукованого гострого коліту у мишей

Було розроблено багато різних тваринних моделей запальної хвороби кишечника (IBD), і вони є цінними засобами дослідження участі різних чинників у патогенезі IBD та оцінки можливих терапевтичних засобів. Модель викликаного декстрансульфатом натрію (DSS) коліту широко застосовують як модель запальної хвороби кишечника завдяки її простоті, і вона має багато подібних ознак з людською IBD, зокрема, виразковим колітом (Perše M & Cerar A (2012) J Biomed Biotechnol, 2012; 718617; Wirtz S et al., (2007) Nat. Protoc, 2: 541-6).

Для оцінки потенційного впливу гуманізованого антитіла 5G6 (VH5/VL1; формат IgG4 з шарнірною стабілізацією; SEQ ID NO: 124 та 17) при IBD у мишей C57Bl/6 викликають стан гострого коліту шляхом введення 2 % DSS (MW 36-50kDa; MP Biomedicals) у питну воду випробуваної групи протягом 5 днів. Контрольна група отримувала необроблену водопровідну воду. Після піддавання дії DSS випробуваній групі мишей давали водопровідну воду протягом 7 днів. Мишей лікували шляхом внутрішньочеревинного введення тричі на тиждень 50 мг/кг гуманізованого антитіла 5G6 або такої самої кількості ізотипічного контролю. Як позитивний контроль застосовували циклоспорин (Sandimmune, Novartis Pharma, Switzerland) у кількості 5 мг/кг. Мишей спостерігали щодня на втрату ваги та консистенцію випорожнень. На 12-й день мишей умертвляли і вимірювали повну довжину їх товстої. Як показано на Фігурі 7, можна спостерігати, що лікування мишей гуманізованим антитілом 5G6 в результаті зменшувало скорочення товстої кишки, викликане DSS.

Приклад 9:

Гуманізоване антитіло 5G6 є ефективним при лікуванні TNBS коліту у щурів

Кишкове запалення у щурів може бути викликане ректальним введенням тринітробензолсульфонові кислоти (TNBS). Вважається, що виникає в результаті локалізоване утворення виразок та запалення є пов'язаним з опосередкованою Т-клітинами реакцією проти модифікованих гаптенів аутологічних білків або люмінальних антигенів (Wirtz S et al., вище). Симптоми включають діарею, приховану кров та втрату ваги.

Для оцінки потенційного впливу гуманізованого антитіла 5G6 (VH5/VL1; формат IgG4 з шарнірною стабілізацією; SEQ ID NO: 124 та 17) при IBD викликали стан коліту у щурів Sprague-Dawley шляхом ректального введення розчину TNBS (50 % TNBS: 50 % етанолу міцності 200; 16 мг/мл TNBS (Sigma, Cat# 92822) у кількості 64 мг/кг (4 мл/кг) у товсту кишку анестезованих щурів в експериментальних групах. Контрольна група не отримувала розчин TNBS. Через дві години після введення TNBS щурам внутрішньочеревинно вводили єдину дозу гуманізованого антитіла 5G6 (50мг/кг) або таку саму кількість ізотипічного контролю. Як позитивний контроль перорально вводили преднізолон (Sigma) у дозі 10 мг/кг через дві години після введення TNBS і щодня протягом наступних 5 днів. Щурів умертвляли на 7-й день і тяжкість хвороби оцінювали за показниками товстої кишки, застосовуючи таку систему оцінки:

- 1) Злипання: немає = 0, мінімальна = 1, включає кілька кишкових петель = 2
- 2) Звуження: немає = 0, легке = 2, важке, проксимальна дилатація = 3
- 3) Виразки: немає = 0, лінійне утворення виразок < 1 см = 1, дві лінійні виразки < 1 см = 2, більша кількість місць утворення виразок або одна велика виразка = 3
- 4) Товщина стінок: менше за 1 мм = 0, 1-3 мм = 1, > 3 мм = 2

Як показано на Фігурі 8, можна спостерігати, що лікування щурів гуманізованим антитілом 5G6 в результаті забезпечувало зниження параметрів хвороби, викликані TNBS.

Приклад 10:

Зв'язування гуманізованого антитіла 5G6 з hTL1A блокується hDcR3-Fc та hDR3-Fc

Як обговорювалося вище, TL1A є лігандом для TNFRSF25/DR3 та рецептором-пасткою DcR3. DR3 є рецептором, який містить домени смерті і зазнає підвищувальної регуляції під час активації Т-клітин, і взаємодія TL1A з DR3 може сприяти розширенню Т-клітин під час імунної реакції (Migone TS et al., вище). Секретований рецептор-пастка (DcR3), розчинний білок надроддини рецепторів фактора некрозу пухлин (TNFR), блокує дію TL1A. (Kim S & Zhang L вище).

Для того, щоб визначити, чи може гуманізоване антитіло 5G6 перешкоджати взаємодії hTL1A з рецептором DR3 та/або з рецептором-пасткою DcR3, мічений гістидином людський TL1A наносили у кількості 2 мкг/мл на ELISA-планшет і інкубували з 20 мкг/мл гуманізованого антитіла 5G6 (VH5/VL1; формат IgG4 з шарнірною стабілізацією; SEQ ID NO: 124 та 17) у присутності 10 мкг/мл Fc злиття ектодоменів людських DcR3, DR3 (обидва від компанії R&D systems) або нерелевантного рецептора (Ctrl-Fc) з наступним виявленням за допомогою кон'югованого з пероксидазою IgG проти людини (Fab-специфічного). Як можна спостерігати на Фігурі 9, зв'язування гуманізованого антитіла 5G6 з hTL1A блокується hDcR3-Fc та hDR3-Fc. Це5 підтверджує, що гуманізоване антитіло 5G6, яке зв'язується з hTL1A, інгібує взаємодію hTL1A з DR3 та DcR3.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

```

<110> Glenmark Pharmaceuticals S.A.

<120> Антитіла, які зв'язуються з TL1A, та їх застосування
<130> Заявка PCT
<150> US 61/748,201
<151> 2013-01-02
<160> 124
<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 119
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 1
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Val Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser
20 25 30
Trp Met His Trp Ala Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile His Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Val Asp
65 70 75 80
Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
85 90 95
Gly Asp Tyr Tyr Gly Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 2
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 2
Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Leu
20 25 30
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Gly 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 Gln Ser Tyr Pro Tyr
      85                      90                      95

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

<210> 3
<211> 114
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 3
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 Asn Trp Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
      100                      105                      110

Ser Ser

<210> 4
<211> 114
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 4
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 Trp 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 Asn Trp Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
      100                      105                      110

```

Ser Ser

```

<210> 5
<211> 114
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 5
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 Arg 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 Val Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Arg Asn Trp Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100         105         110

```

Ser Ser

```

<210> 6
<211> 114
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 6
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 Arg Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50          55          60
Gln Gly Arg Val Thr Ser 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 Val Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Arg Asn Trp Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100         105         110

```

Ser Ser

```

<210> 7
<211> 114
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 7
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 Arg Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50          55          60

Gln Gly Arg Val Thr Ser 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 Val Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95

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

Ser Ser

<210> 8
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 8
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 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
          20          25          30

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr 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 Gln Pro
65          70          75          80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Tyr
          85          90          95

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

<210> 9
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 9

```

```

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 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20     25     30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35     40     45
Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr 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 Gln Pro
65     70     75     80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Tyr
85     90     95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100    105

<210> 10
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 10
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1      5      10      15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20     25     30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35     40     45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50     55     60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65     70     75     80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Tyr
85     90     95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100    105

<210> 11
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 11
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1      5      10      15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20     25     30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35     40     45

```



```

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

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

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

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

<210> 12
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 12
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1          5          10          15

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

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

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

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

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

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

<210> 13
<211> 121
<212> PRT
<213> Штучна
<220>
<223> змінюваний домен важкого ланцюга VH1
<400> 13
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1          5          10          15

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

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

Gly Trp Ile His 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 Gly Asp Tyr Tyr Gly Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14

<211> 107

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> варіабельний домен легкого ланцюга VL1

<400> 14

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 Gln Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Leu
20 25 30

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

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr 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 Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 15

<211> 729

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> scFv Geneart VH1-VL1

<400> 15

caggtgcagc	tggtgcagtc	tggtgcagtc	gtgaagaaac	caggcgccag	cgtgaagggtg	60
tcttgcagg	ccagcggcta	cacctttacc	agcagctgga	tgcactgggt	gcgccaggct	120
ccaggacagg	gcctggaatg	gatgggctgg	atccacccta	atagcggcgg	caccaactac	180
gcccagaaat	tccagggcag	agtgaacctg	acccgggaca	ccagcatcag	caccgcctac	240
atggaactga	gccggctgag	aagcgacgac	accgccgtgt	actactgcgc	cagaggcgac	300
tactacggct	atgtgtcttg	gtttgcctac	tgggggccagg	gcaccctcgt	gacagtgtct	360
agcggaggcg	gaggatctgg	cggcgaggga	agtggcggag	ggggatccga	tatccagatg	420
acccagagcc	ccagcagcct	gtctgccagc	gtggggcaga	gagtgcacat	cacctgtcag	480
gccagccaga	acatcaacgt	gctgctgaac	tggtatcagc	agaagcccgg	caaggccccc	540
aagctgctga	tctacaaggc	ctccaacctg	cacaccggcg	tgcccagcag	attttctggc	600
agcggctccg	gcaccgactt	caccttcacc	atcagctccc	tcagagccga	ggatatcgcc	660
acctactact	gccagcaggg	ccagagctac	cctacacat	tcggccaggg	gaccaagctg	720
gaaatcaag						729

<210> 16

<211> 451

```

<212>  PRT
<213>  Штучна
<220>
<223>  важкий ланцюг з варіабельним доменом VH1
<400>  16
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15

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

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

Gly Trp Ile His 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 Gly Asp Tyr Tyr Gly Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
      100      105      110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
      115      120      125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

```

```

290                295                300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305                310                315                320

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

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

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

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

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

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
                420                425                430

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

Pro Gly Lys
450

<210> 17
<211> 214
<212> PRT
<213> Штучна
<220>
<223> легкий ланцюг з варіабельним доменом VL1
<400> 17
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 Gln Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Leu
                20                25                30

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

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr 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 Gln Pro
65                70                75                80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100                105                110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

```

```

115              120              125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130              135              140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145              150              155              160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165              170              175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180              185              190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195              200              205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 18
<211> 729
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> scFv Geneart VH2-VL2
<400> 18
caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaagggtg      60
tcctgcaagg ccagcggcta cacctttacc agcagctgga tgcaactgggc cagacagggtt      120
ccaggccagg gactggaatg gatcggcgag atccacccca atagcggcgg caccaactac      180
gccagaagt tccagggcag agccaccctg accgtggaca cctctagcag caccgcctac      240
atggaactga gccggctgag aagcgacgac accgcccgtgt actactgcgc cagaggcgac      300
tactacggct atgtgtcttg gtttgacctac tggggccagg gcaccctcgt gacagtgtct      360
agcggaggcg gaggatctgg cggcgaggga agtggcggag ggggatctga catccagatg      420
aaccagagcc ccagcagcct gagcgccctc gtgggagaca gagtgacctat cacctgtcag      480
gccagccaga acatcaacgt gctgctgagc tggatcagc agaagcccg caaggccccc      540
aagctgctga tctacaaggc ctccaacctg cacaccggcg tgcccagcag attttctggc      600
agcggctccg gcaccgactt caccctcacc atcagctccc tgcagcccga ggatatcgcc      660
acctactact gccagcaggg ccagagctac ccctacacat tcggccaggg gaccaagctg      720
gaaatcaag                                     729

<210> 19
<211> 451
<212> PRT
<213> Штучна
<220>
<223> важкий ланцюг химерного 5G6
<400> 19
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Val Leu Val Arg Pro Gly Ala
1              5              10              15

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

Trp Met His Trp Ala Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35              40              45

Gly Glu Ile His Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50              55              60

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

```

65		70		75		80
Val Asp Leu Ser	Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys					
	85		90		95	
Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly						
	100		105		110	
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser						
	115		120		125	
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala						
	130		135		140	
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val						
	145		150		155	160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala						
	165		170		175	
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val						
	180		185		190	
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His						
	195		200		205	
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys						
	210		215		220	
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly						
	225		230		235	240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met						
	245		250		255	
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His						
	260		265		270	
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val						
	275		280		285	
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr						
	290		295		300	
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly						
	305		310		315	320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile						
	325		330		335	
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val						
	340		345		350	
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser						
	355		360		365	
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu						
	370		375		380	
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro						
	385		390		395	400

```

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
      420                        425                        430

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

Pro Gly Lys
      450

<210> 20
<211> 214
<212> PRT
<213> Штучна
<220>
<223> легкий ланцюг химерного 5G6
<400> 20
Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1      5      10      15

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Gly 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 Gln Ser Tyr Pro Tyr
      85      90      95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
      100      105      110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
      115      120      125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
      130      135      140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145      150      155      160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
      165      170      175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
      180      185      190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
      195      200      205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

```

210

```

<210> 21
<211> 451
<212> PRT
<213> Штучна
<220>
<223> важкий ланцюг з варіабельним доменом VH2
<400> 21
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser
20 25 30
Trp Met His Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile His Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser 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 Gly Asp Tyr Tyr Gly Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

```


Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Lys
 450
 <210> 22
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Штучна
 <220>
 <223> важкий ланцюг з варіабельним доменом VH3
 <400> 22
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser
 20 25 30
 Trp Met His Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile His Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Ala Thr Met Thr Val 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 Gly Asp Tyr Tyr Gly Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
      420                      425                      430

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

Pro Gly Lys
      450

<210> 23
<211> 451
<212> PRT
<213> Штучна
<220>
<223> важкий ланцюг з варіабельним доменом VH4
<400> 23
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15

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

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

Gly Glu Ile His Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
      50      55      60

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
      115      120      125

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

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

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

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

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

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

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

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

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

Pro Gly Lys
450

<210> 24
<211> 451
<212> PRT
<213> Штучна
<220>
<223> важкий ланцюг з варіабельним доменом VH5
<400> 24

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

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

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

Gly Glu Ile His Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Val 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 Gly Asp Tyr Tyr Gly Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

```

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

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
                      420                      425                      430

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

Pro Gly Lys
450

<210> 25
<211> 214
<212> PRT
<213> Штучна
<220>
<223> легкий ланцюг з варіабельним доменом VL2
<400> 25
Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1                      5                      10                      15

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

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

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr 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 Gln Pro
65                      70                      75                      80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100                      105                      110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115                      120                      125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130                      135                      140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                      150                      155                      160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165                      170                      175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180                      185                      190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195                      200                      205

```

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 26

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> варіабельний домен важкого ланцюга VH2

<400> 26

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

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

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

Gly Glu Ile His Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 27

<211> 121

<212> PRT

<213> Штучна

<220>

<223> варіабельний домен важкого ланцюга VH3

<400> 27

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

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

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

Gly Glu Ile His Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

```

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115                120

<210>  28
<211> 121
<212> PRT
<213> Штучна
<220>
<223>  варіабельний домен важкого ланцюга VH4
<400>  28
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1          5          10          15

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

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

Gly Glu Ile His Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
      50          55          60

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115                120

<210>  29
<211> 121
<212> PRT
<213> Штучна
<220>
<223>  варіабельний домен важкого ланцюга VH5
<400>  29
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1          5          10          15

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

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

Gly Glu Ile His Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
      50          55          60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Val 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 Gly Asp Tyr Tyr Gly Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly

```



```

100          105          110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115          120

<210> 30
<211> 107
<212> PRT
<213> Штучна
<220>
<223> варіабельний домен легкого ланцюга VL2
<400> 30
Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1          5          10          15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Leu
20          25          30
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35          40          45
Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr 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 Gln Pro
65          70          75          80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr
85          90          95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100          105

<210> 31
<211> 363
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> варіабельний домен важкого ланцюга VH1
<400> 31
cagggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaagggtg      60
tcctgcaagg ccagcggcta cacctttacc agcagctgga tgcactgggt gcgccaggct      120
ccaggacagg gcctggaatg gatgggctgg atccacccta atagcggcgg caccaactac      180
gccagaaat tccagggcag agtgaccatg acccgggaca ccagcatcag caccgcctac      240
atggaactga gccggctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagagggcag      300
tactacggct atgtgtcttg gtttgcctac tggggccagg gcaccctcgt gacagtgtct      360
agc

<210> 32
<211> 363
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> варіабельний домен важкого ланцюга VH2
<400> 32
cagggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaagggtg      60
tcctgcaagg ccagcggcta cacctttacc agcagctgga tgcactgggc cagacaggct      120
ccaggccagg gactggaatg gatcggcgag atccaccca atagcggcgg caccaactac      180
gccagaaat tccagggcag agccaccctg accgtggaca cctctagcag caccgcctac      240
atggaactga gccggctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagagggcag      300
tactacggct atgtgtcttg gtttgcctac tggggccagg gcaccctcgt gacagtgtct      360

```

```

agc 363

<210> 33
<211> 363
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> варіабельний домен важкого ланцюга VH3
<400> 33
caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac cagggcgccag cgtgaagggtg 60
tcctgcaagg ccagcgggcta cacctttacc agcagctgga tgcactgggc cagacaggct 120
ccaggccagg gactggaatg gatcgggcgag atccacccca atagcggcg gacccaactac 180
gccagaagt tccagggcag agccaccatg accgtggaca cctctatcag caccgcctac 240
atggaactga gccggctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagaggcgac 300
tactacggct atgtgtcttg gtttgccctac tggggccagg gcaccctcgt gacagtgtct 360
agc 363

<210> 34
<211> 363
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> варіабельний домен важкого ланцюга VH4
<400> 34
caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac cagggcgccag cgtgaagggtg 60
tcctgcaagg ccagcgggcta cacctttacc agcagctgga tgcactgggc cagacaggct 120
ccaggccagg gactggaatg gatcgggcgag atccacccca atagcggcg gacccaactac 180
gccagaagt tccagggcag agtgaccatg accgtggaca cctctatcag caccgcctac 240
atggaactga gccggctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagaggcgac 300
tactacggct atgtgtcttg gtttgccctac tggggccagg gcaccctcgt gacagtgtct 360
agc 363

<210> 35
<211> 363
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> варіабельний домен важкого ланцюга VH5
<400> 35
caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac cagggcgccag cgtgaagggtg 60
tcctgcaagg ccagcgggcta cacctttacc agcagctgga tgcactgggc cagacaggct 120
ccaggccagg gactggaatg gatggggcgag atccacccca atagcggcg gacccaactac 180
gccagaagt tccagggcag agtgaccatg accgtggaca cctctatcag caccgcctac 240
atggaactga gccggctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagaggcgac 300
tactacggct atgtgtcttg gtttgccctac tggggccagg gcaccctcgt gacagtgtct 360
agc 363

<210> 36
<211> 321
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> варіабельний домен легкого ланцюга VL1
<400> 36
gatatccaga tgaccagag ccccgagcag ctgtctgccg gctggggcga cagagtgaca 60
atcacctgtc aggccagcca gaacatcaac gtgctgctga actgggtatca gcagaagccc 120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacaag gcctccaacc tgcacaccgg cgtgcccagc 180
agattttctg gcagcggctc cggcaccgac ttacacttca ccatcagctc cctgcagccc 240
gaggatatcg ccacctacta ctgccagcag ggccagagct acccctacac attcggccag 300
gggaccaagc tggaaatcaa g 321

```

```

<210> 37
<211> 321
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> варіабельний домен легкого ланцюга VL2
<400> 37
gacatccaga tgaaccagag cccagcagc ctgagcgcct ccgtgggaga cagagtgacc 60
atcacctgtc aggcagacca gaacatcaac gtgctgctga gctggtatca gcagaagccc 120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacaag gcctccaacc tgcacaccgg cgtgcccagc 180
agattttctg gcagcggctc cggcacccgac ttacacctta ccatcagctc cctgcagccc 240
gaggatatcg ccacctacta ctgccagcag ggccagagct acccctacac attcggccag 300
gggaccaagc tggaaatcaa g 321

<210> 38
<211> 251
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 38
Met Ala Glu Asp Leu Gly Leu Ser Phe Gly Glu Thr Ala Ser Val Glu
1 5 10 15
Met Leu Pro Glu His Gly Ser Cys Arg Pro Lys Ala Arg Ser Ser Ser
20 25 30
Ala Arg Trp Ala Leu Thr Cys Cys Leu Val Leu Leu Pro Phe Leu Ala
35 40 45
Gly Leu Thr Thr Tyr Leu Leu Val Ser Gln Leu Arg Ala Gln Gly Glu
50 55 60
Ala Cys Val Gln Phe Gln Ala Leu Lys Gly Gln Glu Phe Ala Pro Ser
65 70 75 80

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

```

```

210                215                220
Lys Leu Met Val Asn Val Ser Asp Ile Ser Leu Val Asp Tyr Thr Lys
225                230                235                240

Glu Asp Lys Thr Phe Phe Gly Ala Phe Leu Leu
                245                250

<210> 39
<211> 251
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 39
Met Ala Glu Asp Leu Gly Leu Ser Phe Gly Glu Thr Ala Ser Val Glu
1          5          10          15

Met Leu Pro Glu His Gly Ser Cys Arg Pro Lys Ala Arg Ser Ser Ser
          20          25          30

Ala Arg Trp Ala Leu Thr Cys Cys Leu Val Leu Leu Pro Phe Leu Ala
35          40          45

Gly Leu Thr Thr Tyr Leu Leu Val Ser Gln Leu Arg Ala Gln Gly Glu
50          55          60

Ala Cys Val Gln Phe Gln Ala Leu Lys Gly Gln Glu Phe Ala Pro Ser
65          70          75          80

His Gln Gln Val Tyr Ala Pro Leu Arg Ala Asp Gly Asp Lys Pro Arg
          85          90          95

Ala His Leu Thr Val Val Arg Gln Thr Pro Thr Gln His Phe Lys Asn
          100          105          110

Gln Phe Pro Ala Leu His Trp Glu His Glu Leu Gly Leu Ala Phe Thr
          115          120          125

Lys Asn Arg Met Asn Tyr Thr Asn Lys Phe Leu Leu Ile Pro Glu Ser
          130          135          140

Gly Asp Tyr Phe Ile Tyr Ser Gln Val Thr Phe Arg Gly Met Thr Ser
          145          150          155          160

Glu Cys Ser Glu Ile Arg Gln Ala Gly Arg Pro Asn Lys Pro Asp Ser
          165          170          175

Ile Thr Val Val Ile Thr Lys Val Thr Asp Ser Tyr Pro Glu Pro Thr
          180          185          190

Gln Leu Leu Met Gly Thr Lys Ser Val Cys Glu Val Gly Ser Asn Trp
          195          200          205

Phe Gln Pro Ile Tyr Leu Gly Ala Met Phe Ser Leu Gln Glu Gly Asp
          210          215          220

Lys Leu Met Val Asn Val Ser Asp Ile Ser Leu Val Asp Tyr Thr Lys
225                230                235                240

Glu Asp Lys Thr Phe Phe Gly Ala Phe Leu Leu
          245          250

```

```

<210> 40
<211> 252
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus
<400> 40
Met Ala Glu Glu Leu Gly Leu Gly Phe Gly Glu Ala Val Pro Val Glu
1          5          10          15

Met Leu Pro Glu Gly Cys Arg His Arg Arg Glu Ala Arg Thr Gly Leu
          20          25          30

Ala Ala Arg Ser Lys Ala Cys Leu Ala Leu Thr Cys Cys Leu Leu Ser
          35          40          45

Phe Pro Ile Leu Ala Gly Leu Ser Thr Leu Leu Met Thr Gly Gln Leu
50          55          60

Arg Ile Pro Gly Lys Asp Cys Met Phe Pro Thr Val Thr Glu Glu Arg
65          70          75          80

Ser Ala Pro Ser Ala Gln Pro Val Tyr Thr Pro Ser Arg Asp Lys Pro
          85          90          95

Lys Ala His Leu Thr Ile Met Arg Gln Thr Pro Val Pro His Leu Lys
          100          105          110

Asn Glu Leu Ala Ala Leu His Trp Glu Asn Asn Leu Gly Met Ala Phe
          115          120          125

Thr Lys Asn Arg Met Asn Tyr Thr Asn Lys Phe Leu Val Ile Pro Glu
130          135          140

Ser Gly Asp Tyr Phe Ile Tyr Ser Gln Ile Thr Phe Arg Gly Thr Thr
145          150          155          160

Ser Glu Cys Gly Asp Ile Ser Arg Val Arg Arg Pro Lys Lys Pro Asp
          165          170          175

Ser Ile Thr Val Val Ile Thr Lys Val Ala Asp Ser Tyr Pro Glu Pro
          180          185          190

Ala His Leu Leu Thr Gly Thr Lys Ser Val Cys Glu Ile Ser Ser Asn
          195          200          205

Trp Phe Gln Pro Ile Tyr Leu Gly Ala Met Phe Ser Leu Glu Glu Gly
210          215          220

Asp Arg Leu Met Val Asn Val Ser Asp Ile Ser Leu Val Asp Tyr Thr
225          230          235          240

Lys Glu Asp Lys Thr Phe Phe Gly Ala Phe Leu Ile
          245          250

<210> 41
<211> 251
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis
<400> 41
Met Ala Glu Asp Leu Gly Leu Ser Phe Gly Glu Thr Ala Ser Val Glu
1          5          10          15

```

Met Leu Pro Glu His Gly Ser Cys Arg Pro Lys Ala Arg Ser Ser Ser
 20 25 30

Ala Cys Trp Ala Leu Thr Cys Cys Leu Val Leu Leu Pro Phe Leu Ala
 35 40 45

Gly Leu Thr Thr Tyr Leu Leu Val Ser Gln Leu Arg Ala Gln Gly Glu
 50 55 60

Ala Cys Val Gln Leu Gln Asp Leu Lys Gly Gln Glu Phe Ala Pro Ser
 65 70 75 80

His Gln Gln Val Tyr Ala Pro Leu Arg Ala Asp Gly Asp Lys Pro Arg
 85 90 95

Ala His Leu Thr Val Val Arg Gln Thr Pro Thr Gln His Leu Lys Asn
 100 105 110

Gln Phe Pro Ala Leu His Trp Glu His Glu Leu Gly Leu Ala Phe Thr
 115 120 125

Lys Asn Arg Met Asn Tyr Thr Asn Lys Phe Leu Leu Ile Pro Glu Ser
 130 135 140

Gly Asp Tyr Phe Val Tyr Ser Gln Val Thr Phe Arg Gly Met Thr Ser
 145 150 155 160

Glu Cys Ser Glu Ile Arg Gln Ala Gly Arg Pro Asn Lys Pro Asp Ser
 165 170 175

Ile Thr Val Val Ile Thr Lys Val Thr Asp Ser Tyr Pro Glu Pro Thr
 180 185 190

Gln Leu Leu Met Gly Thr Lys Ser Val Cys Glu Val Gly Ser Asn Trp
 195 200 205

Phe Gln Pro Ile Tyr Leu Gly Ala Met Phe Ser Leu Gln Glu Gly Asp
 210 215 220

Lys Leu Met Val Asn Val Ser Asp Ile Ser Leu Val Asp Tyr Thr Lys
 225 230 235 240

Glu Asp Lys Thr Phe Phe Gly Ala Phe Leu Leu
 245 250

<210> 42

<211> 1353

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> важкий ланцюг з варіабельним доменом VN1

<400> 42

cagggtgcagc	tggtgcagtc	tggcgccgaa	gtgaagaaac	caggcgccag	cgtgaagggtg	60
tcctgcaagg	ccagcggcta	cacctttacc	agcagctgga	tgcaactgggt	gcgccaggct	120
ccaggacagg	gcctggaatg	gatgggctgg	atccacccta	atagcggcgg	caccaactac	180
gcccagaaat	tccagggcag	agtgaccatg	accggggaca	ccagcatcag	caccgcctac	240
atggaactga	gccggctgag	aagcgacgac	accgccgtgt	actactgcgc	cagaggcgac	300
tactacggct	atgtgtcttg	gtttgcctac	tggggccagg	gcaccctcgt	gacagtgtct	360
agcgcgtcga	ccaagggccc	cagcgtgttc	ccgctagccc	ccagcagcaa	gagcaccagc	420
ggcggcacag	ccgccctggg	ctgcctgggtg	aaggactact	tccccgagcc	cgtgaccgtg	480
tcctggaact	ctggagccct	gacctccggc	gtgcacacct	tccccgccgt	gctccagagc	540


```

agcgccctgt acagcctgag cagcgtggtg acagtgccca gcagcagcct gggaacccag 600
acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660
cccaagagct gcgacaagac ccacacctgc ccccccctgcc ctgccctga gctgctgggc 720
ggaccctccg tgttctgtt ccccccaag cccaaggaca cctgatgat cagccggacc 780
cccgagggtga cctgcgtggt ggtggacgtg agccacgagg acctgaggt gaagttcaat 840
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcacaac gccaaagacca agccccggga ggaacagtac 900
aacagcacct accgggtggt gtccgtgctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc 960
aaggaataca agtgcaaggt ctccaacaag gccctgcctg ccccatcga aaagaccatc 1020
agcaaggcca agggccagcc caggagagccc caggtgtaca cctgcccc ctcgccggac 1080
gagctgacca agaaccaggt gtccctgacc tgtctggtga agggcttcta cccagcgac 1140
atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cccgagaaca actacaagac cccccccct 1200
gtgctggaca gcgacggcag cttcttctg tacagcaagc tgaccgtgga caagagccg 1260
tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgctcc gtgatgcacg aggcctgca caaccactac 1320
accagaaga gcctgagcct gtccccggc aag 1353

```

```

<210> 43
<211> 1353
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> важкий ланцюг з варіабельним доменом VN2
<400> 43

```

```

caggtgcagc tgggtcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaagggtg 60
tcttgcaagg ccagcggcta caccctttacc agcagctgga tgcactgggc cagacaggct 120
ccaggccagg gactggaatg gatcggcgag atccacccca atagcggcgg caccaactac 180
gccagaagt tccagggcag agccacctg accgtggaca cctctagcag caccgcctac 240
atggaactga gccggctgag aagcgacgac accgcctgt actactgcgc cagaggcgac 300
tactacggct atgtgtcttg gtttgcttac tggggccagg gcacctcgt gacagtgtct 360
agcgctcga ccaagggccc cagcgtgttc ccgctagccc ccagcagcaa gagcaccagc 420
ggcgccacag ccgccctggg ctgcctggtg aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480
tcttggaact ctggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctccagagc 540
agcgccctgt acagcctgag cagcgtggtg acagtgccca gcagcagcct gggaacccag 600
acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660
cccaagagct gcgacaagac ccacacctgc ccccccctgcc ctgccctga gctgctgggc 720
ggaccctccg tgttctgtt ccccccaag cccaaggaca cctgatgat cagccggacc 780
cccgagggtga cctgcgtggt ggtggacgtg agccacgagg acctgaggt gaagttcaat 840
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcacaac gccaaagacca agccccggga ggaacagtac 900
aacagcacct accgggtggt gtccgtgctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc 960
aaggaataca agtgcaaggt ctccaacaag gccctgcctg ccccatcga aaagaccatc 1020
agcaaggcca agggccagcc caggagagccc caggtgtaca cctgcccc ctcgccggac 1080
gagctgacca agaaccaggt gtccctgacc tgtctggtga agggcttcta cccagcgac 1140
atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cccgagaaca actacaagac cccccccct 1200
gtgctggaca gcgacggcag cttcttctg tacagcaagc tgaccgtgga caagagccg 1260
tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgctcc gtgatgcacg aggcctgca caaccactac 1320
accagaaga gcctgagcct gtccccggc aag 1353

```

```

<210> 44
<211> 1353
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> важкий ланцюг з варіабельним доменом VN3
<400> 44

```

```

caggtgcagc tgggtcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaagggtg 60
tcttgcaagg ccagcggcta caccctttacc agcagctgga tgcactgggc cagacaggct 120
ccaggccagg gactggaatg gatcggcgag atccacccca atagcggcgg caccaactac 180
gccagaagt tccagggcag agccacctg accgtggaca cctctatcag caccgcctac 240
atggaactga gccggctgag aagcgacgac accgcctgt actactgcgc cagaggcgac 300
tactacggct atgtgtcttg gtttgcttac tggggccagg gcacctcgt gacagtgtct 360
agcgctcga ccaagggccc cagcgtgttc ccgctagccc ccagcagcaa gagcaccagc 420
ggcgccacag ccgccctggg ctgcctggtg aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480

```

```

tcttggaact ctggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgcctg gctccagagc 540
agcggcctgt acagcctgag cagcgtggtg acagtgccca gcagcagcct gggaacccag 600
acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660
cccaagagct gcgacaagac ccacacctgc cccccctgcc ctgccctga gctgctgggc 720
ggaccctccg tgttctgtt ccccccaag cccaaggaca cctgatgat cagccggacc 780
cccgaggtga cctgcgtggt ggtggacgtg agccacgagg accctgaggt gaagttcaat 840
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcacaac gccaaagacca agccccggga ggaacagtac 900
aacagcacct accgggtggt gtccgtgctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc 960
aaggaataca agtgcaagggt ctccaacaag gccctgcctg ccccatcga aaagaccatc 1020
agcaaggcca agggccagcc cagggagccc caggtgtaca cctgcccc ctccgggac 1080
gagctgacca agaaccaggt gtccctgacc tgtctggtga agggcttcta cccagcgac 1140
atcgccgtgg agtgggagag caacggccag ccgagaaca actacaagac cccccccct 1200
gtgctggaca gcgacggcag ctcttctctg tacagcaagc tgaccgtgga caagagccgg 1260
tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgctcc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac 1320
accagaaga gcctgagcct gtcccccggc aag 1353

```

```

<210> 45
<211> 1353
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> важкий ланцюг з варіабельним доменом VH4
<400> 45

```

```

caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac cagggccag cgtgaagggtg 60
tcttgcaagg ccagcggcta cacccttacc agcagctgga tgactgggc cagacaggct 120
ccagggcagg gactggaatg gatcggcgag atccaccca atagcggcgg caccaactac 180
gcccagaagt tccagggcag agtgaccatg accgtggaca cctctatcag caccgcctac 240
atggaactga gccggctgag aagcgacgac accgcccgtg actactgcgc cagagggcag 300
tactacggct atgtgtcttg gtttgectac tggggccagg gcacctcgt gacagtgtct 360
agcgcgtcga ccaagggccc cagcgtgttc ccgctagccc ccagcagcaa gagcaccagc 420
ggcggcacag ccgcccctggg ctgcctggtg aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480
tcttggaact ctggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgcctg gctccagagc 540
agcggcctgt acagcctgag cagcgtggtg acagtgccca gcagcagcct gggaacccag 600
acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660
cccaagagct gcgacaagac ccacacctgc cccccctgcc ctgccctga gctgctgggc 720
ggaccctccg tgttctgtt ccccccaag cccaaggaca cctgatgat cagccggacc 780
cccgaggtga cctgcgtggt ggtggacgtg agccacgagg accctgaggt gaagttcaat 840
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcacaac gccaaagacca agccccggga ggaacagtac 900
aacagcacct accgggtggt gtccgtgctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc 960
aaggaataca agtgcaagggt ctccaacaag gccctgcctg ccccatcga aaagaccatc 1020
agcaaggcca agggccagcc cagggagccc caggtgtaca cctgcccc ctccgggac 1080
gagctgacca agaaccaggt gtccctgacc tgtctggtga agggcttcta cccagcgac 1140
atcgccgtgg agtgggagag caacggccag ccgagaaca actacaagac cccccccct 1200
gtgctggaca gcgacggcag ctcttctctg tacagcaagc tgaccgtgga caagagccgg 1260
tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgctcc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac 1320
accagaaga gcctgagcct gtcccccggc aag 1353

```

```

<210> 46
<211> 1353
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> важкий ланцюг з варіабельним доменом VH5
<400> 46

```

```

caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac cagggccag cgtgaagggtg 60
tcttgcaagg ccagcggcta cacccttacc agcagctgga tgactgggc cagacaggct 120
ccagggcagg gactggaatg gatgggcgag atccaccca atagcggcgg caccaactac 180
gcccagaagt tccagggcag agtgaccatg accgtggaca cctctatcag caccgcctac 240
atggaactga gccggctgag aagcgacgac accgcccgtg actactgcgc cagagggcag 300
tactacggct atgtgtcttg gtttgectac tggggccagg gcacctcgt gacagtgtct 360
agcgcgtcga ccaagggccc cagcgtgttc ccgctagccc ccagcagcaa gagcaccagc 420

```



```

ggcggcacag cgcgcctggg ctgcctggtg aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480
tcctggaact ctggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctccagagc 540
agcggcctgt acagcctgag cagcgtggtg acagtgccca gcagcagcct gggaaacccag 600
acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660
cccaagagct ggcacaagac ccacacctgc cccccctgcc ctgcccctga gctgctgggc 720
ggaccctccg tggtcctggt ccccccaag cccaaggaca cctgatgat cagccggacc 780
cccgaggtga cctgctggtg ggtggacgtg agccacgagg accctgaggt gaagttcaat 840
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcacaac gccaaagacca agccccggga ggaacagtac 900
aacagcacct accgggtggt gtccgtgctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc 960
aaggaataca agtgcaaggc ctccaacaag gccctgcctg ccccatcga aaagaccatc 1020
agcaaggcca agggccagcc caggagagcc caggtgtaca ccctgcccc ctcccgggac 1080
gagctgacca agaaccaggt gtccctgacc tgtctggtga agggcttcta cccagcgac 1140
atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cccgagaaca actacaagac cccccccct 1200
tgtctggaca gcgacggcag cttcttcctg tacagcaagc tgaccgtgga caagagccgg 1260
tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgctcc gtgatgcag aggccttga caaccactac 1320
accagaaga gcctgagcct gtccccggc aag 1353

```

<210> 47

<211> 642

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> легкий ланцюг з варіабельним доменом VL1

<400> 47

```

gatattccaga tgaccsagag cccsagcagc ctgtctgccca gcgtggggcga cagagtgcaca 60
atcacctgtc agggcagcca gaacatcaac gtgctgctga actggtatca gcagaagccc 120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacaag gcctccaacc tgcacaccgg cgtgcccagc 180
agattttctg gcagcggctc cggcacccgac ttcaccttca ccacagctc cctgcagccc 240
gaggatatcg ccacctacta ctgccagcag ggccagagct acccctacac attcggccag 300
gggaccaagc tggaaatcaa gcgtacggtg gccgtcccca gcgtgttcac cttccccccc 360
agcgacgagc agctgaagag cggcacccgc tccgtggtgt gcctgctgaa caacttctac 420
ccccgggagg ccaaggtgca gtggaagggt gacaacgccc tccagagcgg caacagccag 480
gaaagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gctgagcag caccctgacc 540
ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc 600
ctgtccagcc ccgtgaccsa gagcttcaac cggggcgagt gc 642

```

<210> 48

<211> 642

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> легкий ланцюг з варіабельним доменом VL2

<400> 48

```

gacattccaga tgaaccsagag cccsagcagc ctgagcgcct ccgtgggaga cagagtgcacc 60
atcacctgtc agggcagcca gaacatcaac gtgctgctga gctggtatca gcagaagccc 120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacaag gcctccaacc tgcacaccgg cgtgcccagc 180
agattttctg gcagcggctc cggcacccgac ttcaccttca ccacagctc cctgcagccc 240
gaggatatcg ccacctacta ctgccagcag ggccagagct acccctacac attcggccag 300
gggaccaagc tggaaatcaa gcgtacggtg gccgtcccca gcgtgttcac cttccccccc 360
agcgacgagc agctgaagag cggcacccgc tccgtggtgt gcctgctgaa caacttctac 420
ccccgggagg ccaaggtgca gtggaagggt gacaacgccc tccagagcgg caacagccag 480
gaaagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gctgagcag caccctgacc 540
ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc 600
ctgtccagcc ccgtgaccsa gagcttcaac cggggcgagt gc 642

```

<210> 49

<211> 1356

<212> ДНК

<213> Штучна

<220>

<223> важкий ланцюг 5G6 з варіабельним доменом

```

<400> 49
cagggtccagc tccagcaacc tgggtctgtg ctgggtgagge ctggagcttc agtgaaggtg      60
tcttgcaagg cttctggcta caccttcacc agttcctgga tgcactgggc gaagcagagg      120
cctggacaag gccttgagtg gattggagag attcacccta atagtgggtg tactaactac      180
aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgtagaca catcctccag cacagcctac      240
gtggatctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaggggat      300
tactacggct acgtctcctg gtttgcttac tggggccaag ggactctggt cactgtctcc      360
tcagcctcca ccaaggggccc cagcgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gtctaccagc      420
ggcggcacag cagccctggg atgcctgggt aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg      480
agctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagc      540
agcggcctgt acagcctgag cagcgtgggt accgtgccc aagcagcct gggcaccag      600
acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag      660
cccaagagct gcgacaagac ccacacctgc cctccctgtc ctgctcctga gctgctcgge      720
ggacctctcg tgttctctgt cccccccaag cccaaggaca cctgatgat cagcaggacc      780
cccgagggtg cctgcgtggt ggtggacgtg agccacgagg acccagaggt gaagttcaac      840
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcacaac gccaaagacca agcccagaga ggaacagtag      900
aacagcacct acaggggtgt gtccgtgctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc      960
aaagagtaca agtgcaaggt ctccaacaag gccctgccag ccccatcga gaaaaccatc     1020
aacaaggcca agggccagcc acgggagccc caggtgtaca cctgcctccc ctcccgcgag     1080
gagatgacca agaaccaggt gtccctgaca tgtctggtga aaggcttcta cccagcgac      1140
atgcgcgtgg agtgggagag caacggccag cccgagaaca actacaagac cccccccca      1200
gtgctggaca gcgacggcag cttcttctct tacagcaagc tgaccgtgga caagagcagg      1260
tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc gtgatgcacg aggcctgca caaccactac      1320
accagaaga gcttgagcct gtcccccgcc aagtga

```

```

<210> 50
<211> 645
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> легкий ланцюг 5G6 з варіабельним доменом

```

```

<400> 50
gacatccaga tgaaccagtc tccatccagt ctgtctgcat cccttgagga cacaattacc      60
atcaacttgc atgccagtca gaacattaat gttttgttaa gctggtacca gcagaaacca      120
ggaaatattc ctaaaactctt gatctataag gcttccaact tgcacacagg cgtcccatca      180
agggttagtg gcagtggatc tggaaacaggt ttcacattta ccatcagcag cctgcagcct      240
gaagacatcg ccacttacta ctgtcaaacag ggtcaaaagt atccgtacac gttcggaggg      300
gggaccaagc tggaaataaa acggaccgtg gccgtctcca gegtgttcat cttccccccc      360
agcgacgagc agctgaagag cggcaaccgc tccgtggtgt gcctgctgaa caacttctac      420
ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcaagcgg caacagccag      480
gaaagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc      540
ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccaggga      600
ctgtccagcc ccgtgacca gaacttcaac aggggcgagt gctga

```

```

<210> 51
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 51
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser Trp Met His
1 5 10

```

```

<210> 52
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 52
Ile His Pro Asn Ser Gly Gly Thr
1 5

```

```

<210> 53

```

```

<211> 14
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 53
Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
1             5             10

<210> 54
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 54
Gln Asn Ile Asn Val Leu
1             5

<210> 55
<211> 3
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 55
Lys Ala Ser
1

<210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 56
Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr Thr
1             5

<210> 57
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна
<220>
<223> подовжена CDR1 важкого ланцюга VH5
<400> 57
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser Trp Met His Trp
1             5             10

<210> 58
<211> 20
<212> PRT
<213> Штучна
<220>
<223> подовжена CDR2 важкого ланцюга VH5
<400> 58
Trp Met Gly Glu Ile His Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln
1             5             10             15

Lys Phe Gln Gly
                20

<210> 59
<211> 14
<212> PRT
<213> Штучна
<220>
<223> подовжена CDR3 важкого ланцюга VH5

```

```

<400> 59
Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
1           5           10

<210> 60
<211> 13
<212> PRT
<213> Штучна
<220>
<223> подовжена CDR1 легкого ланцюга VL1
<400> 60
Gln Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Leu Leu Asn Trp Tyr
1           5           10

<210> 61
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна
<220>
<223> подовжена CDR2 легкого ланцюга VL1
<400> 61
Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr
1           5           10

<210> 62
<211> 9
<212> PRT
<213> Штучна
<220>
<223> легкий ланцюг extended CDR3 VL1
<400> 62
Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr Thr
1           5

<210> 63
<211> 363
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> варіабельний домен важкого ланцюга 5G6
<400> 63
cagggtccagc tccagcaacc tgggtctgtg ctggtgaggc ctggagcttc agtgaagggtg      60
tcctgcaagg cttctggcta caccctcacc agttcctgga tgcactgggc gaagcagagg      120
cctggacaag gccttgagtg gattggagag attcctccta atagtgggtg tactaactac      180
aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgtagaca catcctccag cacagcctac      240
gtggatctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaggggat      300
tactacggct acgtctcctg gtttgcttac tggggccaag ggactctggt cactgtctcc      360
tca

<210> 64
<211> 321
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> варіабельний домен легкого ланцюга 5G6
<400> 64
gacatccaga tgaaccagtc tccatccagt ctgtctgcat cccttggaga cacaattacc      60
atcacttgcc atgccagtc gaacattaat gttttgttaa gctggtacca gcagaaacca      120
ggaaatattc ctaaaactctt gatctataag gcttccaact tgcacacagg cgtcccatca      180
aggtttagtg gcagtggatc tggaacaggt ttcacattta ccatcagcag cctgcagcct      240
gaagacatcg ccacttacta ctgtcaacag ggtcaaagtt atccgtacac gttcggaggg      300

```

```

gggaccaagc tggaataaaa a 321

<210> 65
<211> 41
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Суміш праймерів VH - зворотна 1
<400> 65
gtgatcgcca tggcgtcgac cgakgtrmag cttcaggagt c 41

<210> 66
<211> 41
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Суміш праймерів VH - зворотна 2
<400> 66
gtgatcgcca tggcgtcgac cgaggtbcag ctbcagcagt c 41

<210> 67
<211> 41
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Суміш праймерів VH - зворотна 3
<400> 67
gtgatcgcca tggcgtcgac ccaggtgcag ctgaagsart c 41

<210> 68
<211> 41
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Суміш праймерів VH - зворотна 4
<400> 68
gtgatcgcca tggcgtcgac cgaggtccar ctgcaacart c 41

<210> 69
<211> 41
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Суміш праймерів VH - зворотна 5
<400> 69
gtgatcgcca tggcgtcgac ccaggtycag ctbcagcart c 41

<210> 70
<211> 41
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Суміш праймерів VH - зворотна 6
<400> 70
gtgatcgcca tggcgtcgac ccaggtycar ctgcagcart c 41

<210> 71
<211> 41
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>

```

```

<223> Суміш праймерів VH - зворотна 7
<400> 71
gtgatcgcca tggcgtcgac ccaggtccac gtgaagcart c 41

<210> 72
<211> 41
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Суміш праймерів VH - зворотна 8
<400> 72
gtgatcgcca tggcgtcgac cgaggtgaas stggtggart c 41

<210> 73
<211> 41
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Суміш праймерів VH - зворотна 9
<400> 73
gtgatcgcca tggcgtcgac cgavgtgawg stggtggagt c 41

<210> 74
<211> 41
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Суміш праймерів VH - зворотна 10
<400> 74
gtgatcgcca tggcgtcgac cgaggtgcag stggtggart c 41

<210> 75
<211> 41
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Суміш праймерів VH - зворотна 11
<400> 75
gtgatcgcca tggcgtcgac cgakgtgcam ctggtggart c 41

<210> 76
<211> 41
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Суміш праймерів VH - зворотна 12
<400> 76
gtgatcgcca tggcgtcgac cgaggtgaag ctgatggart c 41

<210> 77
<211> 41
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Суміш праймерів VH - зворотна 13
<400> 77
gtgatcgcca tggcgtcgac cgaggtgcar cttgttgart c 41

<210> 78

```

```

<211> 41
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Суміш праймерів VH - зворотна 14
<400> 78
gtgatcgcca tggcgtcgac cgargtraag cttctcgart c 41

<210> 79
<211> 41
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Суміш праймерів VH - зворотна 15
<400> 79
gtgatcgcca tggcgtcgac cgaagtgaar sttgaggart c 41

<210> 80
<211> 41
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Суміш праймерів VH - зворотна 16
<400> 80
gtgatcgcca tggcgtcgac ccaggttact ctraaasart c 41

<210> 81
<211> 41
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Суміш праймерів VH - зворотна 17
<400> 81
gtgatcgcca tggcgtcgac ccaggtccaa ctvcagcarg c 41

<210> 82
<211> 41
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Суміш праймерів VH - зворотна 18
<400> 82
gtgatcgcca tggcgtcgac cgatgtgaac ttggaasart c 41

<210> 83
<211> 41
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Суміш праймерів VH - зворотна 19
<400> 83
gtgatcgcca tggcgtcgac cgaggtgaag gtcacgact c 41

<210> 84
<211> 38
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Суміш праймерів VH - пряма 1
<400> 84
cctccaccac tcgagcccgga ggaaacgggtg accgtggt 38

```

<210> 85
 <211> 38
 <212> ДНК
 <213> Штучна
 <220>
 <223> Суміш праймерів VH - пряма 2
 <400> 85
 cctccaccac tcgagcccgga ggagactgtg agagtgggt 38

<210> 86
 <211> 38
 <212> ДНК
 <213> Штучна
 <220>
 <223> Суміш праймерів VH - пряма 3
 <400> 86
 cctccaccac tcgagcccggc agagacagtg accagagt 38

<210> 87
 <211> 38
 <212> ДНК
 <213> Штучна
 <220>
 <223> Суміш праймерів VH - пряма 4
 <400> 87
 cctccaccac tcgagcccgga ggagacgggtg actgaggt 38

<210> 88
 <211> 35
 <212> ДНК
 <213> Штучна
 <220>
 <223> Суміш праймерів VL - зворотна 1
 <400> 88
 ggccggtggcg ctacgcgagat ccagctgact cagcc 35

<210> 89
 <211> 35
 <212> ДНК
 <213> Штучна
 <220>
 <223> Суміш праймерів VL - зворотна 2
 <400> 89
 ggccggtggcg ctaccgaaat tgttctcacc cagtc 35

<210> 90
 <211> 35
 <212> ДНК
 <213> Штучна
 <220>
 <223> Суміш праймерів VL - зворотна 3
 <400> 90
 ggccggtggcg ctacgcgagat tgtggtmact cagtc 35

<210> 91
 <211> 35
 <212> ДНК
 <213> Штучна
 <220>

<223> Суміш праймерів VL - зворотна 4
 <400> 91
 ggcggtggcg ctacgdayat tgtgytraca cagtc 35

<210> 92
 <211> 35
 <212> ДНК
 <213> Штучна
 <220>
 <223> Суміш праймерів VL - зворотна 5
 <400> 92
 ggcggtggcg ctacgdayat tgtratgacm cagtc 35

<210> 93
 <211> 35
 <212> ДНК
 <213> Штучна
 <220>
 <223> Суміш праймерів VL - зворотна 6
 <400> 93
 ggcggtggcg ctacgdayat tmagatramc cagtc 35

<210> 94
 <211> 35
 <212> ДНК
 <213> Штучна
 <220>
 <223> Суміш праймерів VL - зворотна 7
 <400> 94
 ggcggtggcg ctacgdayat tcagatgayd cagtc 35

<210> 95
 <211> 35
 <212> ДНК
 <213> Штучна
 <220>
 <223> Суміш праймерів VL - зворотна 8
 <400> 95
 ggcggtggcg ctacgdayat ycagatgaca cagac 35

<210> 96
 <211> 35
 <212> ДНК
 <213> Штучна
 <220>
 <223> Суміш праймерів VL - зворотна 9
 <400> 96
 ggcggtggcg ctacgdayat tgttctcawc cagtc 35

<210> 97
 <211> 35
 <212> ДНК
 <213> Штучна
 <220>
 <223> Суміш праймерів VL - зворотна 10
 <400> 97
 ggcggtggcg ctacgdayat tgwgctsaac caatc 35

<210> 98
 <211> 35
 <212> ДНК

```

<213> Штучна
<220>
<223> Суміш праймерів VL - зворотна 11
<400> 98
ggcgggtggcg ctagcgaayat tstratgacc cartc 35

<210> 99
<211> 35
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Суміш праймерів VL - зворотна 12

<400> 99
ggcgggtggcg ctagcgaayrt tktgatgacc sarac 35

<210> 100
<211> 35
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Суміш праймерів VL - зворотна 13
<400> 100
ggcgggtggcg ctagcgaayat tgtgatgacb sagkc 35

<210> 101
<211> 35
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Суміш праймерів VL - зворотна 14
<400> 101
ggcgggtggcg ctagcgaayat tgtgataacy sagga 35

<210> 102
<211> 35
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Суміш праймерів VL - зворотна 15
<400> 102
ggcgggtggcg ctagcgaayat tgtgatgacc sagwt 35

<210> 103
<211> 35
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Суміш праймерів VL - зворотна 16
<400> 103
ggcgggtggcg ctagcgaayat tgtgatgaca саасс 35

<210> 104
<211> 35
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Суміш праймерів VL - зворотна 17
<400> 104
ggcgggtggcg ctagcgaayat ttgtgtgact sagtc 35

```

```

<210> 105
<211> 35
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Суміш праймерів VL - зворотна 18
<400> 105
ggcgggtggcg ctagcgaaac aactgtgacc sagtc 35

<210> 106
<211> 35
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Суміш праймерів VL - зворотна 19
<400> 106
ggcgggtggcg ctagcgaaaa tgtktsacc sagtc 35

<210> 107
<211> 38
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Суміш праймерів VL - зворотна 20
<400> 107
ggcgggtggcg ctagccaggc tgttgtgact saggaatc 38

<210> 108
<211> 36
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Суміш праймерів VL - пряма 1
<400> 108
atgctgacgc ggcgcacgt ttkatttcca gcttgg 36

<210> 109
<211> 36
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Суміш праймерів VL - пряма 2
<400> 109
atgctgacgc ggcgcacgt tttatttcca actttg 36

<210> 110
<211> 36
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Суміш праймерів VL - пряма 3
<400> 110
atgctgacgc ggcgcacgt ttcagctcca gcttgg 36

<210> 111
<211> 36
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Суміш праймерів VL - пряма 4
<400> 111

```

```

atgctgacgc gccgcacct aggacagtca gtttgg 36

<210> 112
<211> 17
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> праймер M13-прям.
<400> 112
gtaaaacgac gccsagt 17

<210> 113
<211> 16
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> праймер M13-звор.
<400> 113
aacagctatg accatg 16

<210> 114
<211> 19
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> праймер T7
<400> 114
taatacgact cactatagg 19

<210> 115
<211> 19
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> праймер SP6
<400> 115
gatttaggtg aactatag 19

<210> 116
<211> 540
<212> ДНК
<213> homo sapiens
<400> 116
ctaaaaggac aggagtttgc accttcacat cagcaagttt atgcacctct tagagcagac 60
ggagataagc caagggcaca cctgacagtt gtgagacaaa ctcccacaca gcactttaa 120
aatcagttcc cagctctgca ctgggaacat gaactaggcc tggccttcac caagaaccga 180
atgaactata ccaacaaatt cctgctgac ccagagtcgg gagactactt catttactcc 240
caggtcacat tccgtgggat gacctctgag tgcagtgaat tcagacaagc aggccgacca 300
aacaagccag actccatcac tgtggtcatc accaaggtaa cagacagcta ccctgagcca 360

accagctcc tcatggggac caagtctgta tgcgaagtag gtagcaactg gttccagccc 420
atctacctcg gagccatgtt ctccttgcaa gaaggggaca agctaagtgt gaacgtcagt 480
gacatctctt tggtaggatta caaaaagaa gataaaacct tctttggagc cttcttacta 540

<210> 117
<211> 1293
<212> ДНК
<213> штучна
<220>
<223> TL1A Fc злита експресійна послідовність

```

```

<400> 117
atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg atccaccggc 60
ctaaaaggac aggagtttgc accttcacat cagcaagttt atgcacctct tagagcagac 120
ggagataagc caagggcaca cctgacagtt gtgagacaaa ctcccacaca gcactttaaa 180
aatcagttcc cagctctgca ctgggaacat gaactaggcc tggccttcac caagaaccga 240
atgaactata ccaacaaatt cctgctgac ccagagtcgg gagactactt catttactcc 300
caggtcacat tccgtgggat gacctctgag tgcagtgaat tcagacaagc aggcggacca 360
aacaagccag actccatcac tgtggtcacc accaaggtaa cagacagcta ccttgagcca 420
accagctcc tcatggggac caagtctgta tgcgaagtag gtagcaactg gttccagccc 480
atctacctcg gagccatgtt ctcttgcaa gaaggggaca agctaattgt gaacgtcagt 540
gacatctctt tgggtgatta cacaaaagaa gataaaacct tctttggagc cttcttacta 600
caagcttctg gtgtaccca cactgcccc cctgccccg cccctgagct gctgggcgga 660
cccagcgtgt tctgttccc ccccaagccc aaggacaccc tgatgatcag ccggaccccc 720
gaggtgacct gcgtggtggt ggacgtgagc cagcaggacc ctgaggtgaa gttcaattgg 780
tacgtggagc gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ccggggagga gcagtacaac 840
tccacctacc ggggtggtgc cgtgctgacc gtgctgcacc aggaactggct gaacggcaag 900
gaatacaagt gcaaggtgtc caacaaggcc ctgctgccc ccctcgaaaa gaccatcagc 960
aaggccaagg gccagcccag ggagcccag gtgtacaccc tgcacccag ccgggaggag 1020
atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgc ctggtgaagg gcttctaccc cagcgacatc 1080
gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaaat acaagaccac cccctctgtg 1140
ctggacagcg accgcagctt cttctgtac agcaagctga ccgtggacaa gaggaggtgg 1200
cagcagggca acgtgttcag ctgcagcgtg atgcacgagg cctgcacaa ccactacacc 1260
cagaagagcc tgagcctgtc ccccggaag tga 1293

<210> 118
<211> 618
<212> ДНК
<213> штучна
<220>
<223> секретований TL1A з N-кінцевою гістидиновою міткою
<400> 118
atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg atccaccggc 60
catcaccatc atcaccatct aaaaaggacag gagtttgac cttcacatca gcaagtttat 120
gcacctctta gagcagacgg agataagcca agggcacacc tgacagtgtg gagacaaact 180
ccscacacagc actttaaaaa tcagttccca gctctgcact gggaaacatga actaggcctg 240
gccttcacca agaaccgaat gaactatacc aacaaattcc tgcctgaccc agagtcggga 300
gactacttca ttactccca ggtcacattc cgtgggatga cctctgagtg cagtgaatc 360
agacaagcag gccgaccaa caagccagac tccatcactg tggtcacac caaggttaaca 420
gacagctacc ctgagccaac ccagctctc atggggacca agtctgtatg cgaagtaggt 480
agcaactggt tccagcccat ctacctcgga gccatgttct ccttgcaaga aggggacaag 540
ctaattggtga acgtcagtgat catctctttg gtggattaca caaaagaaga taaaaccttc 600
tttgagacct tcttacta 618

<210> 119
<211> 38
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Праймер GlnPr994
<400> 119
gttccaggat ccaccggcct aaaaggacag gagtttgc 38

<210> 120
<211> 33
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Праймер GlnPr995
<400> 120
caccagaagc ttgtagtaag aaggctccaa aga 33

```

```

<210> 121
<211> 70
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Праймер GlnPr1542
<400> 121
ctgctgctct gggttccagg atccaccggc caccatcatc atcaccatct aaaaggacag      60
gagtttgac                                     70

<210> 122
<211> 36
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Праймер GlnPr1543
<400> 122
gatcctcgag ctattatagt aagaaggctc caaaga                                     36

<210> 123
<211> 70
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Праймер GlnPr1544
<400> 123
gacgcctagc caccatggag acagacacac tcctgctatg ggtactgctg ctctgggttc      60
caggatccac                                     70

<210> 124
<211> 448
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> важкий ланцюг з варіабельним доменом VH5 IgG4 з шарнірною
стабілізацією
<400> 124
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1          5          10          15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser
20          25          30
Trp Met His Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35          40          45
Gly Glu Ile His Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50          55          60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Val 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 Gly Asp Tyr Tyr Gly Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
100         105         110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115         120         125

```

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
130 135 140

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

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

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

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

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

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

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

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

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

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
325 330 335

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

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

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

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

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

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

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

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Антагоністичне антитіло або його фрагмент, що зв'язуються з TL1A, які включають CDR1 важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51, CDR2 важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 52, та CDR3 важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 53, та включає CDR1 легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 54, CDR2 легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 55, та CDR3 легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 56.
- 10 2. Антитіло або його фрагмент за п. 1, де антитіло або його фрагмент є мишачим антитілом, химерним антитілом або гуманізованим антитілом.
- 15 3. Антитіло або його фрагмент за п. 1, де антитіло або його фрагмент включає не-CDR ділянку послідовності варіабельної ділянки важкого ланцюга, яка є принаймні на 80 % ідентичною не-CDR ділянці послідовності варіабельної ділянки важкого ланцюга SEQ ID NO: 1, 26, 27, 28 або 29.
- 20 4. Антитіло або його фрагмент за п. 1, де антитіло або його фрагмент включає послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 1, 26, 27, 28 та 29.
- 25 5. Антитіло або його фрагмент за п. 1, де антитіло або його фрагмент включає не-CDR ділянку послідовності варіабельної ділянки важкого ланцюга, яка є принаймні на 80 % ідентичною не-CDR ділянці послідовності важкого ланцюга, вибраної з групи, що складається з SEQ ID NO: 21, 22, 23 та 24.
- 30 6. Антитіло або його фрагмент за п. 1, де антитіло або його фрагмент включає послідовність важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 21, 22, 23 та 24.
- 35 7. Антитіло або його фрагмент за п. 1, де антитіло або його фрагмент включає варіабельну каркасну ділянку важкого ланцюга, яка є продуктом або похідною людського гена, вибраного з групи, до якої належить IGHV1-2*02 (SEQ ID NO: 3), IGHV1-2*04 (SEQ ID NO: 4), IGHV1-2*05 (SEQ ID NO: 5), IGHV1-2*01 (SEQ ID NO: 6) та IGHV1-46*01 (SEQ ID NO: 7).
- 40 8. Антитіло або його фрагмент за п. 1, де антитіло або його фрагмент включає послідовність важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 16, де варіабельна каркасна ділянка важкого ланцюга включає принаймні одну амінокислотну модифікацію з відповідної варіабельної каркасної ділянки важкого ланцюга відповідного мишачого антитіла.
- 45 9. Антитіло або його фрагмент за п. 8, де амінокислотна модифікація включає амінокислотне заміщення в амінокислотній позиції, вибраній з групи, до якої належать 37, 48, 50, 67, 69, 71 та 75, причому амінокислотна позиція кожного представника групи вказується відповідно до системи нумерації за Кебатом.
- 50 10. Антитіло або його фрагмент за п. 1, де антитіло або його фрагмент включає не-CDR ділянку послідовності варіабельної ділянки легкого ланцюга, яка є принаймні на 80 % ідентичною не-CDR ділянці послідовності варіабельної ділянки легкого ланцюга, вибраної з групи, що складається з SEQ ID NO: 2, 14 та 30.
- 55 11. Антитіло або його фрагмент за п. 1, де антитіло або його фрагмент включає послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 2, 14 та 30.
12. Антитіло або його фрагмент за п. 1, де антитіло або його фрагмент включає не-CDR ділянку, яка є принаймні на 80 % ідентичною не-CDR ділянці послідовності варіабельної ділянки легкого ланцюга послідовності легкого ланцюга, вибраної з групи, що складається з SEQ ID NO: 17 або 25.
13. Антитіло або його фрагмент за п. 1, де антитіло або його фрагмент включає послідовність легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 17 та 25.
14. Антитіло або його фрагмент за п. 1, де антитіло або його фрагмент включає варіабельну каркасну ділянку легкого ланцюга, яка є продуктом або похідною людського гена, вибраного з групи, до якої належать IGKV1-33*01 (SEQ ID NO: 8), IGKV1D-33*01 (SEQ ID NO: 9), IGKV1D-12*02 (SEQ ID NO: 10), IGKV1D-12*01 (SEQ ID NO: 11) та IGKV1-12*02 (SEQ ID NO: 12).
15. Антитіло або його фрагмент за п. 1, де антитіло або його фрагмент включає послідовність легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 17, і де варіабельна

каркаса ділянка легкого ланцюга включає принаймні одну амінокислотну модифікацію з відповідної варіабельної каркасної ділянки легкого ланцюга відповідного мишачого антитіла.

16. Антитіло або його фрагмент за п. 15, де амінокислотна модифікація включає амінокислотне заміщення в амінокислотній позиції, вибраній з групи, до якої належать 5 та 34, причому амінокислотна позиція кожного представника групи вказується відповідно до системи нумерації за Кебатом.

17. Антитіло або його фрагмент за п. 1, де антитіло або його фрагмент включає:

(a) послідовність важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 22 або SEQ ID NO: 24; та

(b) послідовність легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 17; або (c) послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 27 або SEQ ID NO: 29; та

(d) послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 14.

18. Антитіло або його фрагмент за будь-яким з пп. з 1 по 17, де важка константна ділянка людини є вибраною з групи людських імуноглобулінів, до якої належать IGHG1, нефукозилований IGHG1 та IGHG4.

19. Антитіло або його фрагмент за будь-яким з пп. з 1 по 17, де антитіло має Fc ділянку нефукозиловального IGHG1.

20. Антитіло або його фрагмент за будь-яким з пп. з 1 по 17, де антитіло включає ізотиповий варіант, який включає CH1 з людського IgG4 (IGHG4), шарнір з людського IgG4 (IGHG4), який має S228P заміщення, і CH2 та CH3 з людського IgG4 (IGHG4).

21. Антитіло або його фрагмент за будь-яким з пп. з 1 по 20, де антитіло або його фрагмент зв'язуються з людським TL1A і вступають у перехресну реакцію з TL1A миші, щура та яванського макака.

22. Антитіло або його фрагмент за будь-яким з пп. з 1 по 20, де антитіло є фрагментом антитіла, вибраним з групи, до якої належать Fab, Fab', Fab'-SH, Fd, Fv, dAb, F(ab')₂, scFv, біспецифічні одноланцюгові Fv-димери, діатіла, триатіла та scFv, генетично злиті з тим самим або іншим антитілом.

23. Антитіло або його фрагмент за будь-яким з пп. з 1 по 22, де антитіло або його фрагмент зв'язуються з людським TL1A з афінністю (K_D) 700 pM або менше.

24. Антитіло або його фрагмент за будь-яким з пп. з 1 по 23, де антитіло або його фрагмент зберігають принаймні 85 % афінності зв'язування (K_D) з TL1A відповідного химерного антитіла.

25. Антитіло або його фрагмент за будь-яким з пп. з 1 по 24, де антитіло має температуру термостійкості F_{AB} фрагмента більшу за 80 °C.

26. Виділена нуклеїнова кислота, яка кодує антитіло або його фрагмент за будь-яким з пп. з 1 по 25, що включає ДНК, яка кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка включає нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 33 або 35, та/або ДНК, яка кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка включає нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 36.

27. Композиція, яка включає антитіло або його фрагмент за будь-яким з пп. з 1 по 25 та фармацевтично прийнятний носій.

28. Спосіб лікування опосередкованого TL1A порушення у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові терапевтично ефективною кількістю антитіла або його фрагмента за будь-яким з пп. з 1 по 25.

29. Спосіб за п. 28, де опосередковане TL1A порушення є вибраним з групи, до якої належать запальна хвороба кишечника (IBD), включаючи виразковий коліт та хворобу Крона, ревматоїдний артрит, розсіяний склероз, діабет 1-го та 2-го типів, псоріаз, псоріатичний артрит, анкілозуючий спондиліт, атонічний дерматит; алергічні реакції або стани, включаючи, наприклад, астму та алергічне запалення легень; рак, атеросклероз, інфекції, нейродегенеративні захворювання, відторгнення трансплантату, реакції "трансплантат проти хазяїна" (GVHD) та серцево-судинні порушення/хвороби, рак легень та товстої кишки, хронічне обструктивне захворювання легень (COPD), неврит зорового нерву, вікову дегенерацію жовтої плями, системний червоний вовчак (SLE), синдром Шегрена, склеродермія, системний склероз, хронічна хвороба нирок, фіброз печінки, туберкульоз, ідіопатичний легеневий фіброз, викликаний туберкульозом легеневого фіброзу, ретроперитонеальний фіброз, легеневого фіброзу, кістозний фіброз, ендоміокардіальний фіброз, передсердний фіброз, медіастинальний фіброз, мієлофіброз (кісткового мозку), ретроперитонеальний фіброз, масивний прогресивний фіброз, нефрогенний системний фіброз, артрофіброз.

30. Застосування антитіла або його фрагмента за будь-яким з пп. з 1 по 25 як медикаменту.

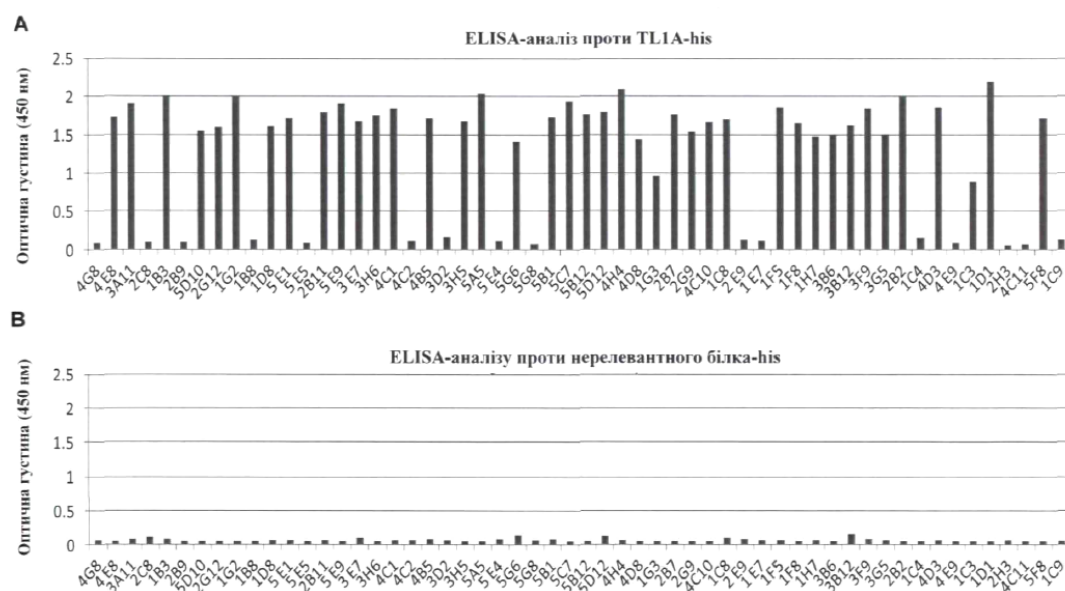
31. Застосування антитіла або його фрагмента за будь-яким з пп. з 1 по 25 при виготовленні медикаменту для лікування опосередкованого TL1A порушення.

32. Застосування за п. 30 або 31, яке **відрізняється** тим, що вищезгадане опосередковане TL1A порушення вибране з групи, до якої належать запальна хвороба кишечника (IBD), включаючи виразковий коліт та хворобу Крона, ревматоїдний артрит, розсіяний склероз, діабет 1-го та 2-го типів, псоріаз, псоріатичний артрит, анкілозуючий спондиліт, атопічний дерматит; алергічні реакції або стани, включаючи, наприклад, астму та алергічне запалення легень; рак, атеросклероз, інфекції, нейродегенеративні захворювання, відторгнення трансплантату, реакції "трансплантат проти хазяїна" (GVHD) та серцево-судинні порушення/хвороби, рак легень та товстої кишки, хронічне обструктивне захворювання легень (COPD), неврит зорового нерва, вікову дегенерацію жовтої плями, системний червоний вовчак (SLE), синдром Шегрена, склеродермія, системний склероз, хронічна хвороба нирок, фіброз печінки, туберкульоз, ідіопатичний легеневий фіброз, викликаний туберкульозом легеневий фіброз, ретроперитонеальний фіброз, легеневий фіброз, кістозний фіброз, ендоміокардіальний фіброз, передсердний фіброз, медіастинальний фіброз, міелофіброз (кісткового мозку), ретроперитонеальний фіброз, масивний прогресивний фіброз, нефрогенний системний фіброз, артрофіброз.

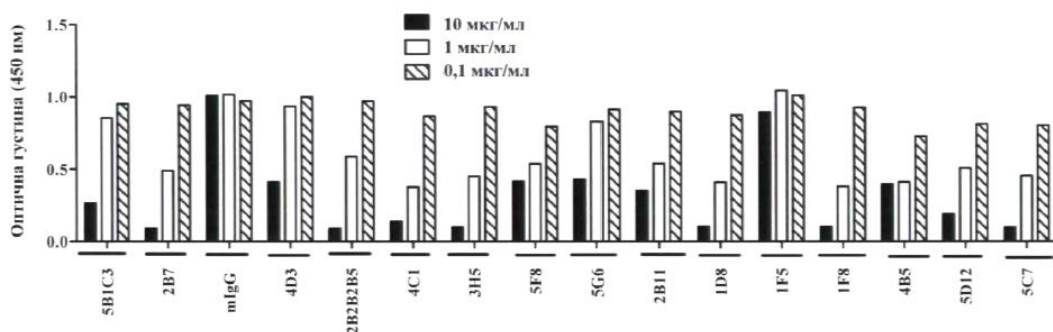
33. Антитіло або його фрагмент за будь-яким з пп. з 1 по 25 для застосування як медикаменту.

34. Антитіло або його фрагмент за будь-яким з пп. з 1 по 25 для застосування у способі лікування опосередкованого TL1A порушення.

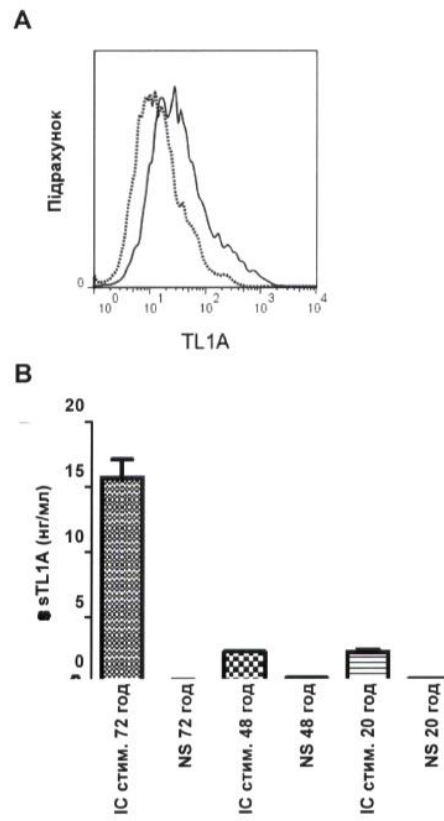
35. Промисловий виріб, який включає антитіло або його фрагмент за будь-яким з пп. з 1 по 25, або композицію за п. 27 для лікування опосередкованого TL1A порушення.



Фіг. 1

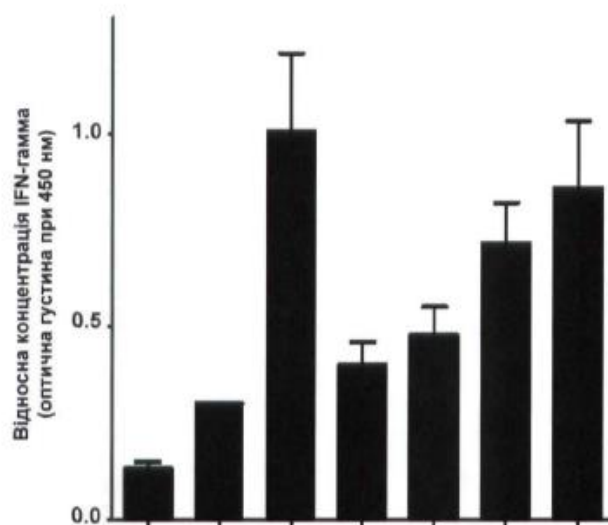


Фіг. 2



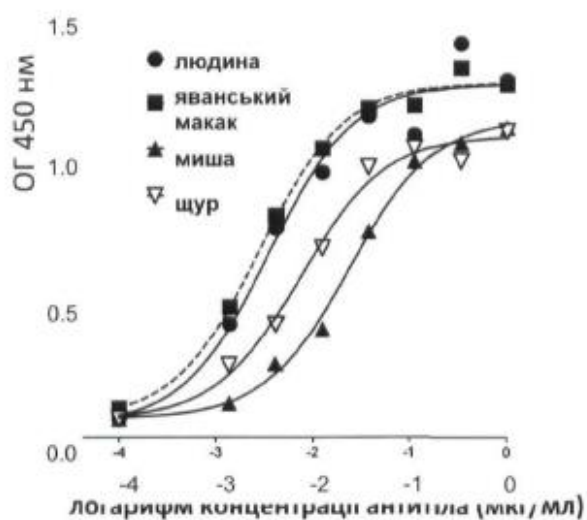
Фіг. 3

С

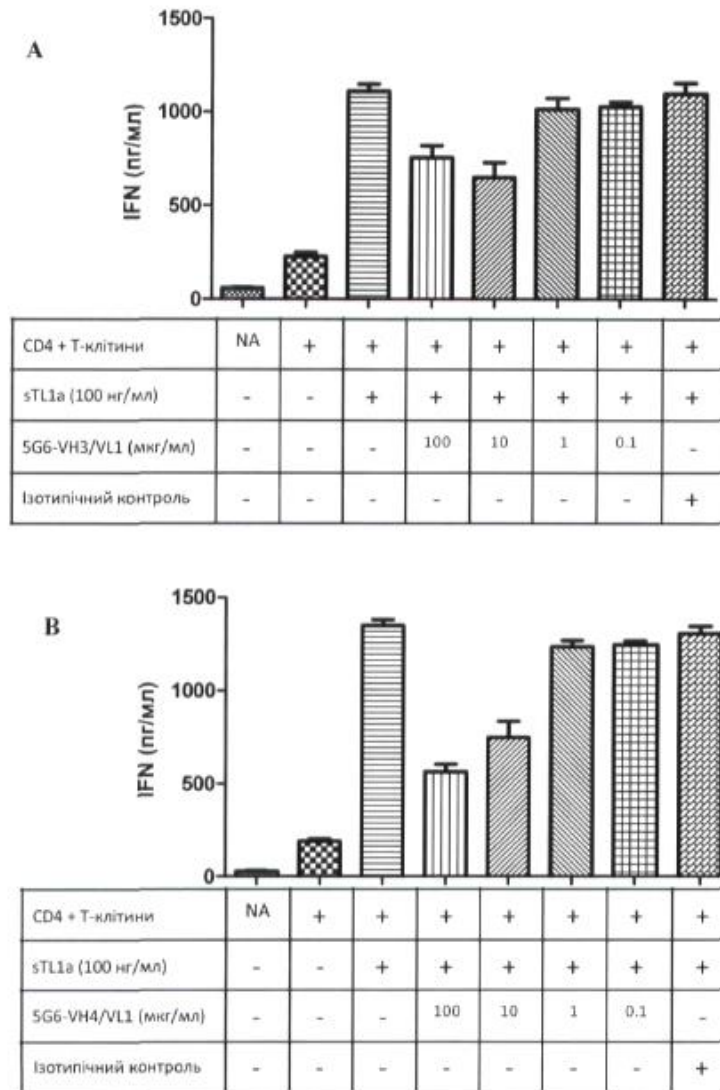


IL-12 + IL18	-	+	+	+	+	+	+
IC моноцити	-	-	+	+	+	+	+
5G6 (мкг/мл)	-	-	-	10	1	0,1	-
Ізотипічний контроль	-	-	-	-	-	-	+

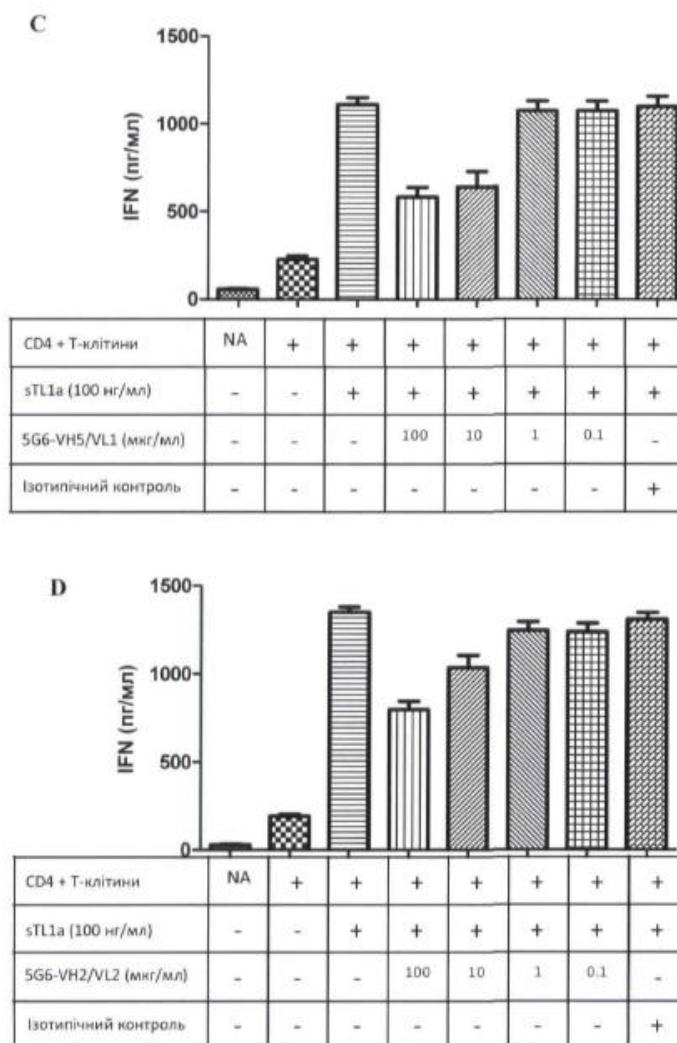
Фіг. 3 продовження



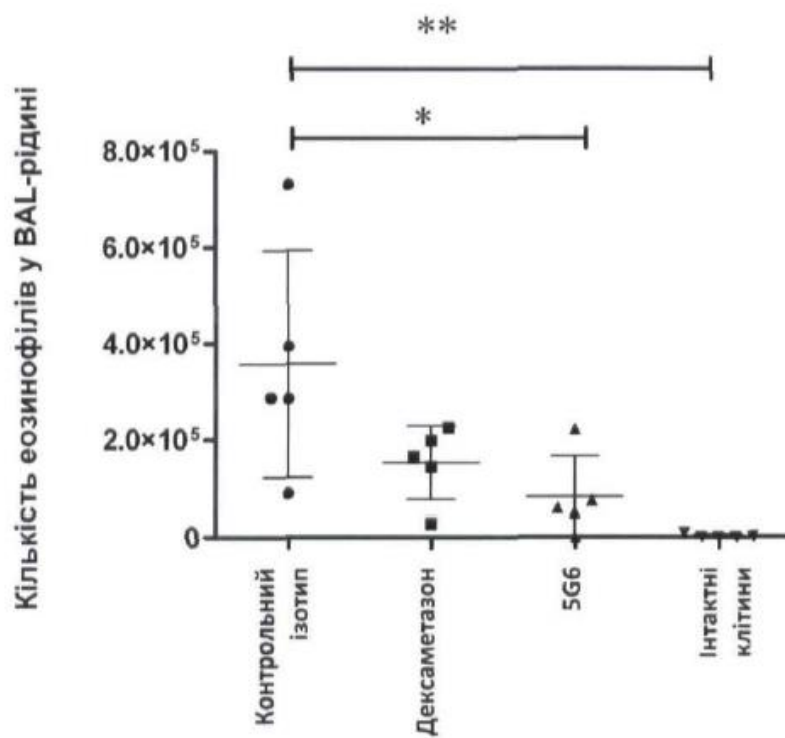
Фіг. 4



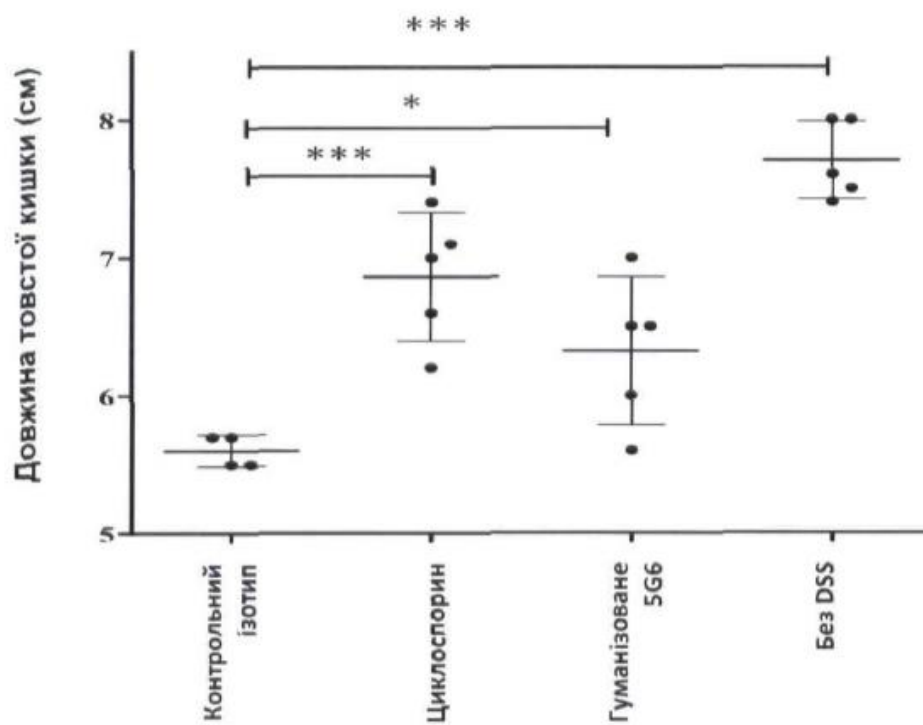
Фіг. 5



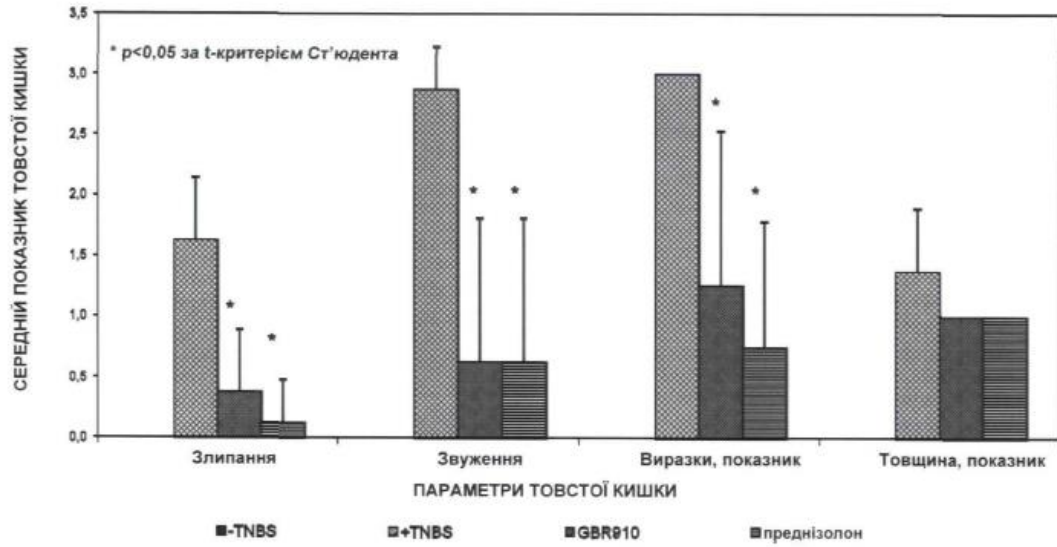
Фіг. 5 продовження



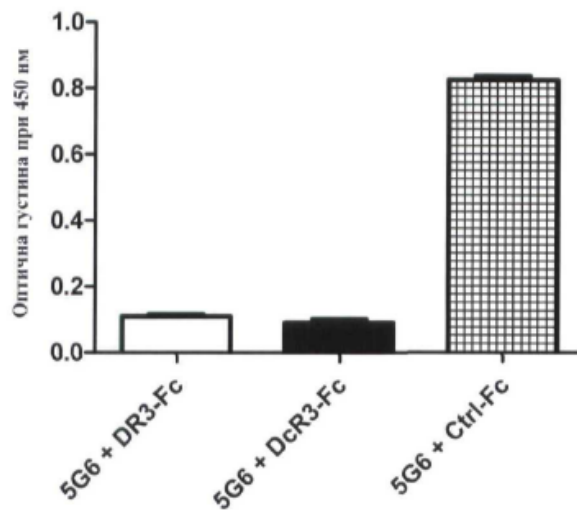
Фіг. 6



Фіг. 7



Фіг. 8



Фіг. 9

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

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

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