



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 121031

(13) C2

(51) МПК

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2016 12087	(72) Винахідник(и):	Оден Фелікс (DE), Марино Штефен (DE), Даумке Олівер (DE)
(22) Дата подання заявки:	30.04.2015	(73) Власник(и):	МАКС-ДЕЛЬБРЮК-ЦЕНТРУМ ФЮР МОЛЕКУЛЯРЕ МЕДИЦИН ІН ДЕР ГЕЛЬМГОЛЬТЦ-ГЕМАЙНШАФТ, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlin, Germany (DE)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.03.2020	(74) Представник:	Опанасенко Ольга Сергіївна, реєстр. №471
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	14166729.5	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	ODEN F. Generation of an antibody targeting B cell maturation antigen for the treatment of multiple myeloma and autoimmune diseases: Dr. rer. nat. / ODEN F. Freien Univ. Berlin – B., 2013, - 93
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	30.04.2014		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	EP		
(41) Публікація відомостей про заявку:	27.03.2017, Бюл.№ 6		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.03.2020, Бюл.№ 6		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/EP2015/059562, 30.04.2015		

(54) ГУМАНІЗОВАНЕ АНТИТІЛО ПРОТИ CD269 (BCMA)

(57) Реферат:

Винахід стосується гуманізованого антитіла або фрагменту антитіла, що зв'язує CD269 (BCMA), кон'югату, молекули нуклеїнової кислоти, клітини-хазяїна, фармацевтичної композиції та застосування для лікування опосередковуваних плазмодитами захворювань, таких як множинна мієлома й аутоімунні захворювання.

UA 121031 C2

Опис

Винахід стосується гуманізованих антитіл або фрагментів антитіл, які зв'язують CD269 (BCMA), тим самим порушуючи взаємодію між CD269 і його нативними лігандами (BAFF і APRIL), і їх застосування для лікування опосередковуваних плазмоцитами захворювань, таких як множинна мієлома й аутоімунні захворювання.

Рівень техніки, до якого належить винахід

В-клітинний антиген дозрівання (BCMA) є представником 17 суперсімейства рецептора фактора некрозу пухлини (TNFRSF). Його нативними лігандами є В-клітинний активуючий фактор (BAFF; також називаний BLyS або TALL-1, TNFSF13B) і індукуючий проліферацію ліганд (APRIL, TNFSF13, CD256), які залучені (за допомогою взаємодії з іншими лігандами) у регуляцію різних аспектів гуморального імунітету, розвиток В-клітин і гомеостаз.

BCMA на високому рівні експресується на злоякісних плазмоцитах, наприклад, при множинній мієломі (MM), яка являє собою В-клітинну неходжкінську лімфому кісткового мозку, і плазмноклітинному лейкозі (PCL), що є більш агресивним, ніж MM, і складає приблизно 4% від усіх випадків плазмодитарних порушень. На доповнення до MM і PCL, BCMA також виявляється на клітинах Ходжкіна і клітинах Рід-Штернберга у пацієнтів, що страждають на лімфому Ходжкіна (Chiu et al. (2007), Blood, 109:729-739). Було показано, що аналогічно функціонуванню на плазмоцитах, зв'язування ліганду з BCMA модулює ріст і виживаність клітин множинної мієломи, експресуючих BCMA (Novak et al. (2004), Blood, 103:689-694). Передача сигналу BAFF і APRIL через BCMA вважається фактором, що сприяє виживанню для злоякісних плазмоцитів; таким чином, виснаження BCMA-позитивних пухлинних клітин і/або порушення взаємодії ліганд-рецептор повинно поліпшити терапевтичний результат множинної мієломи і залежних від аутоантитіл аутоімунних захворювань.

На даний час існують різні доступні підходи для лікування множинної мієломи (Raab et al. (2009), Lancet. 374:324-339). Хіміотерапія забезпечує у більшості індивідумів тільки частковий контроль множинної мієломи; рідко хіміотерапія приводить до повної ремісії. Таким чином, часто використовують підходи комбінування, що включають додаткове введення кортикостероїдів, таких як дексаметазон або преднізон. Однак з кортикостероїдами пов'язані побічні ефекти, такі як зниження щільності кісток. Також була запропонована трансплантація стовбурових клітин з використанням власних стовбурових клітин індивідуума (аутологічні) або з використанням клітин від близького родича або співпадаючого неспорідненого донора (алогенні). При множинній мієломі більшість трансплантацій, що проводяться, являє собою трансплантації аутологічного типу. Було показано, що такі трансплантації, хоча і не є виліковуючими, продовжують життя окремих пацієнтів (Suzuki (2013), Jpn. J. Clin. Oncol. 43:116-124). Альтернативно для лікування з нещодавнього часу використовують талідомід і його похідні, однак вони також асоційовані з недостатніми показниками успіху і високою вартістю. Пізніше інгібітор протеасом бортезоміб (PS-341) був схвалений для лікування рецидивуючої і рефрактерної MM, і його використовували в численних клінічних випробуваннях окремо або в комбінації з загальноновизнаними лікарськими засобами, що забезпечувало обнадійливий клінічний результат (Richardson et al. (2003), New Engl. J. Med. 348:2609-2617; Kapoor et al. (2012), Semin. Hematol. 49:228-242). Вартість комбінованого лікування, відповідно, є високою, і показники успіху, проте, могли б бути суттєво кращими. Комбінування варіантів лікування також не є ідеальним унаслідок накопичення побічних ефектів, якщо декілька лікарських засобів використовують одночасно. Необхідні нові підходи для лікування плазмодитарних захворювань, зокрема множинної мієломи.

Можливість специфічного націлювання на плазмоцити також має високу перевагу для лікування аутоімунних захворювань. М'які форми аутоімунного захворювання спочатку лікують нестероїдними протизапальними лікарськими засобами (NSAID) або модифікуючими захворювання протиревматичними лікарськими засобами (DMARD). Більш важкі форми системного червоного вовчка (SLE), що включають дисфункцію органів внаслідок активного захворювання, звичайно лікують стероїдами разом із сильнодіючими імунодепресивними засобами, такими як циклофосфамід - цитотоксичний засіб, що націлений на клітини, що поділяються. Тільки нещодавно белімумаб - антитіло, націлене на цитокін BAFF, що виявляється на підвищених рівнях у сироватці пацієнтів з аутоімунними захворюваннями, одержав схвалення Food and Drug Administration (FDA) для застосування при SLE. Однак у людини BAFF необхідний для виживання знову утворюваних В-клітин, у той час як В-клітини пам'яті і плазмоцити є менш чутливими до селективного інгібування BAFF (Jacobi et al. (2010), Arthritis Rheum. 62:201-210). Для ревматоїдного артриту (RA) інгібітори TNF були першими ліцензованими біологічними засобами, за якими пішли абатацепт, ритуксимаб і тоцілізумаб, і інші, вони пригнічують ключові запальні каскади, залучені в запалення і руйнування суглобів,

що, однак, відбувається за рахунок підвищеного ризику інфекції унаслідок відносної імуносупресії (Chan et al. (2010), Nat. Rev. Immunol. 10:301-316, Keyser (2011), Curr. Rheumatol. Rev. 7:77-87). Незважаючи на схвалення цих біологічних засобів, пацієнти, що страждають на RA і SLE, часто демонструють персистенцію аутоімунних маркерів, яка, найбільш імовірно, пов'язана з присутністю довгоживучих осілих плазмочитів у кістковому мозку, що є стійкими, наприклад, до опосередкованого CD20 знищення ритуксимабом і глюкокортикоїдів у високій дозі, і терапії циклофосфамідом.

Антитіла, які зв'язують CD269 (BCMA), і їх застосування для лікування різних обумовлених В-клітинами медичних порушень описані в даній галузі. Ryan et al. (Molecular Cancer Therapeutics, 2007 6(11), 3009) описують антитіло проти BCMA, одержане вакцинацією щурів з використанням пептиду з амінокислот з 5 по 54 білка BCMA. У WO 2012/163805 описані зв'язуючі BCMA білки, такі як химерні і гуманізовані антитіла, їх застосування для блокування взаємодії BAFF і/або APRIL з BCMA і їх потенційне застосування для лікування плазмочитарних злоякісних пухлин, таких як множинна мієлома. Антитіло, описане в даному документі, було одержане за допомогою вакцинації мишей з використанням рекомбінантного пептиду з амінокислот з 4 по 53 білка BCMA. У WO 2010/104949 також описані різні антитіла, що переважно зв'язують позаклітинний домен BCMA, і їх застосування для лікування опосередкованих В-клітинами медичних станів і порушень. У WO 2002/066516 і WO 2012/066058 описані двовалентні антитіла, що зв'язують як BCMA, так і додаткові мішені, і їх потенційне застосування для лікування обумовлених В-клітинами медичних порушень. Деталі, які стосуються зв'язувальних властивостей і конкретних епітопів двовалентних антитіл, не надані в жодному з описів.

Суть винаходу

Зважаючи на рівень техніки, технічною проблемою, що лежить в основі винаходу, було надання засобу, придатного для лікування захворювань людини, асоційованих з патогенними плазмочитами, таких як множинна мієлома й аутоімунні захворювання. Ця проблема вирішується за допомогою ознак незалежних пунктів формули винаходу. Переважні варіанти здійснення даного винаходу надані в залежних пунктах формули винаходу.

Таким чином, задачею винаходу є надання гуманізованого антитіла або фрагмента антитіла, що зв'язує CD269 (BCMA), зокрема епітоп позаклітинного домену CD269 (BCMA).

Антитіла, описані в даному документі, містять гуманізовані послідовності, особливо гуманізовані послідовності переважних зв'язувальних областей VL і VH, що зберігають відповідну афінність до ліганду, як описано відносно химерного антитіла J22.9-хі.

У різних варіантах здійснення винаходу модифікація амінокислотної послідовності для одержання зазначених гуманізованих послідовностей може бути проведена або в областях CDR вихідного химерного антитіла J22.9-хі, або в каркасних областях, де каркасну область варто розуміти як область у варіабельному домені білка, що належить до суперсімейства імуноглобулінів, яка є менш "варіабельною", ніж CDR.

Було зовсім несподіваним, що конкретні гуманізовані послідовності, описані в даному документі, переважно області CDR областей VL і VH, залучені в зв'язування, виявляють специфічне і високе зв'язування, як продемонстровано в експериментальних прикладах, і зберігають характеристики зв'язування вихідного химерного антитіла J22.9-хі у такому ступені, що зберігається їх бажаний терапевтичний ефект.

Таким чином, винахід стосується антитіла або фрагмента антитіла, що містить VH-домен, який містить послідовності CDR:

- RYWX₁S (H-CDR1; SEQ ID NO: 15), де X₁: I, F, L, V, Y, C, G, A, S, T;

- EINPX₂X₃STINYAPSLKDK (H-CDR2; SEQ ID NO: 16), де X₂X₃: SS, NS, TS, GS, KS, RS, SD, SN, DE; і/або

- SLYX₄DYGDAX₅DYW (H-CDR3; SEQ ID NO: 17), де X₄: Y, L, A, V, F, I, W, і/або X₅: Y, L, F, I, V, A, C,

де зазначене антитіло або його фрагмент специфічно зв'язує епітоп позаклітинного домену CD269 (BCMA).

Зокрема, було несподіваним, що гуманізовані антитіла, описані в даному документі, що мають зміни послідовності в порівнянні з вихідним химерним антитілом, зокрема зміни послідовності в CDR зазначеного химерного антитіла, зберігають достатні зв'язувальні властивості відносно їх мішені для терапевтичної ефективності.

Для кваліфікованого фахівця є несподіваним, що характеристики зв'язування гуманізованих варіантів можуть бути подібними з вихідним химерним антитілом або антитілом миші. Враховуючи зміни послідовності у варіабельних доменах, зокрема у CDR, сприятливі характеристики зв'язування у гуманізованих послідовностей, продемонстровані в даному описі,

вважаються несподіваним технічним ефектом. Порівняння характеристик зв'язування між частково і повністю гуманізованими антитілами також демонструє поліпшення повністю гуманізованих послідовностей. Це є цілком несподіваним результатом. Початкові модифікації химери (частково гуманізовані послідовності) привели до деякої втрати афінності зв'язування.

Однак внесення додаткової гуманізації згодом привело до посилення зв'язування, у результаті чого "повністю гуманізовані" послідовності показують властивості зв'язування, подібні з вихідною химерою, тим самим демонструючи несподіваний технічний ефект після внесення таких значних модифікацій послідовності без суттєвого зниження афінності зв'язування.

У переважному варіанті здійснення антитіло або фрагмент антитіла, як описано в даному документі, відрізняється тим, що домен VH містить послідовність CDR RYWis (SEQ ID NO: 18) або RYWFs (SEQ ID NO: 19).

У переважному варіанті здійснення антитіло або фрагмент антитіла, як описано в даному документі, відрізняється тим, що зазначений домен VH містить послідовність CDR EIPNSSTINYAPSLKDK (SEQ ID NO: 20) або EIPSSSTINYAPSLKDK (SEQ ID NO: 21).

У наступних варіантах здійснення винаходу амінокислота 54 домену VH може належати до будь-якої зазначеної амінокислоти або модифікованої амінокислоти. Як показано в прикладах нижче, потенційне глікозилювання амінокислоти N у цьому залишку не порушує значною мірою специфічне і високе зв'язування антитіла з його епітопом-мішенню. В зв'язку з цією інформацією, винахід стосується антитіла або фрагмента антитіла, що містить послідовність CDR2, як описано в даному документі, де будь-яка зазначена амінокислота або модифікована амінокислота може бути присутня в амінокислоті 54 домену VH послідовності CDR2.

У переважному варіанті здійснення антитіло або фрагмент антитіла, як описано в даному документі, відрізняється тим, що зазначений домен VH містить послідовність CDR SLYYDYGDAYDYW (SEQ ID NO: 22).

Крім того, винахід стосується антитіла або фрагмента антитіла, що містить домен VL, який містить послідовності CDR:

- KASQSVX₁X₂NVA (L-CDR1; SEQ ID NO: 23), де X₁X₂: ES, SS, TS, QS, HS, DH;

- SASLRFS (L-CDR2; SEQ ID NO: 24); i/або

- QQYNNYPLTFG (L-CDR3; SEQ ID NO: 25),

де зазначене антитіло або його фрагмент специфічно зв'язує епітоп позаклітинного домену CD269 (BCMA).

Також відносно послідовності LC було несподіваним, що модифікована послідовність CDR3 не мала вираженого несприятливого ефекту на зв'язування мішені BCMA.

Більше того, антитіла за даним винаходом також демонструють несподівані і сприятливі характеристики стабільності, коли вони знаходяться в розчині, як у виділеному або очищеному стані, або *in vitro*, так і *in vivo* після введення, які не можна було очікувати в результаті змін послідовності, проведених відносно вихідного химерного антитіла.

У переважному варіанті здійснення антитіло або фрагмент антитіла, як описано в даному документі, відрізняється тим, що VL-домен містить послідовність CDR KASQSVDSNVA (SEQ ID NO: 26).

У переважному варіанті здійснення антитіло або фрагмент антитіла, як описано в даному документі, містить домен VH, що містить послідовність

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYW_{X1}SWVRQAPGKGLVWVGEINP_{X2}_{X3}STINYAPSLKDKFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLY_{X4}DYGDAX₅DYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 4), де _{X1}: I, F, L, V, Y, C, G, A, S, T; _{X2}_{X3}: SS, NS, TS, GS, KS, RS, SD, SN, DE, переважно SS; _{X4}: Y, L, A, V, F, I, W; i _{X5}: Y, L, F, I, V, A, C.

У переважному варіанті здійснення антитіло або фрагмент антитіла, як описано в даному документі, відрізняється тим, що антитіло або фрагмент містить домен VH, що містить послідовність згідно з SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 або SEQ ID NO: 9.

У переважному варіанті здійснення антитіло або фрагмент антитіла, як описано в даному документі, містить домен VL, що містить послідовність

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCASQSV_{X1}_{X2}NVAWYQQKPGQAPRALIYSASLRFSGIPARFSGSGSGTEFTLTISLSQSEDFAVYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR (SEQ ID NO: 12), де _{X1}_{X2}: ES, SS, TS, QS, HS, DH.

У переважному варіанті здійснення антитіло або фрагмент антитіла, як описано в даному документі, містить домен VL, що містить послідовність згідно з SEQ ID NO: 14.

У переважному варіанті здійснення антитіло або фрагмент антитіла, як описано в даному документі, містить домен VH, що містить послідовність згідно з SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 або SEQ ID NO: 9, і домен VL, що містить послідовність згідно з SEQ ID NO: 14.

Крім того, винахід стосується антитіла або фрагмента антитіла, як описано в даному

документі, що містить домен VH, де зазначений домен VH містить послідовність згідно з

X₁VQLX₂X₃SGGGLVQPGGSLX₄LSCAASGX₅X₆FX₇X₈YWZ₁SWVRX₉APGKGLEWX₁₀GEINPZ₂SS
TINYAPSLKX₁₁X₁₂FX₁₃ISRDNAKNTLYLQMX₁₄X₁₅X₁₆RX₁₇EDTAX₁₈YYCASLYYDYGDAZ₃DYWGQGT
X₁₉VTVSS (SEQ ID NO: 41), де X₁: Q, E; X₂: Q, V; X₃: Q, E; X₄: K, R; X₅: I, F; X₆: D, T; X₇: S, D; X₈: R,
D; X₉: R, Q; X₁₀: I, V; X₁₁: D, G; X₁₂: K, R; X₁₃: I, T; X₁₄: S, N; X₁₅: K, S; X₁₆: V, L; X₁₇: S, A; X₁₈: L, V;
X₁₉: S, L;

і де щонайменше один з Z₁: I, F, L, V, Y, C, G, A, S, T, переважно I або F; Z₂: S, N, T, G, K, R,
D, переважно S; i/або Z₃: Y, L, F, I, V, A, C, переважно Y;

і де зазначене антитіло або його фрагмент специфічно зв'язує епітоп позаклітинного домену
CD269 (BCMA).

Цей варіант здійснення охоплює різні гуманізовані антитіла, зокрема їх послідовності VH, усі
варіанти, визначувані переважною гуманізацією, проведеною в CDR, як описано в даному
документі.

Крім того, винахід стосується антитіла або фрагмента антитіла, як описано в даному
документі, що містить VL-домен, де зазначений VL-домен містить послідовність згідно з

DIVMTQXSX₁X₂X₃X₄X₅X₆SVGD₇VX₈X₉TCKASQSVESNVAWYQQKPX₁₀QX₁₁PKX₁₂LIX₁₃SX₁₄X₁₅L
RFSGV₁₆PARFX₁₆GSGSGTDFTLTISX₁₇LQSEDX₁₈AX₁₉YX₂₀CQQYNNYPLTFGAGTKLELKR (SEQ ID
NO: 42), де X₁: Q, P; X₂: R, A; X₃: F, T; X₄: M, L; X₅: T, S; X₆: T, V; X₇: R, E; X₈: S, T; X₉: V, L; X₁₀: R,
G; X₁₁: S, A; X₁₂: A, L; X₁₃: F, Y; X₁₄: A, D; X₁₅: S, D; X₁₆: T, S; X₁₇: N, S; X₁₈: L, F; X₁₉: E, V; X₂₀: F, Y;

і де зазначене антитіло або його фрагмент специфічно зв'язує епітоп позаклітинного домену
CD269 (BCMA). Цей варіант здійснення охоплює різні гуманізовані антитіла, зокрема їх
послідовності VL, усі варіанти, визначувані переважною гуманізацією, проведеною в CDR, як
описано в даному документі.

Переважні варіанти здійснення, які стосуються гуманізованих варіантів антитіл

Як докладно описано в даному документі, послідовність переважних варіантів здійснення
винаходу згідно з J22.9-хі гуманізували для надання більш сумісного реагенту для введення
людині. Були одержані різні гуманізовані варіанти послідовності J22.9-хі і вони були досліджені
відносно їх афінності зв'язування і специфічності відносно CD269 як людини, так і яванського
макака (BCMA). Результати аналізів зв'язування демонструють, що гуманізовані послідовності
зберігають бажані властивості зв'язування химерного реагенту J22.9-хі. У послідовностях нижче
підкреслені області відповідають CDR або передбачуваним CDR.

Переважні варіанти здійснення, які стосуються гуманізованих варіантів VH

Нижче надана додаткова інформація, яка стосується послідовності гуманізованого антитіла
за даним винаходом.

Химерна послідовність

HC миші (SEQ ID NO: 1):

QVQLQQSGGGLVQPGGSLKLSAASGIDFSRYWMSWVRRAPGKGLEWIGEINPDSSTINYAPSL
KDKFIISRDNAKNTLYLQMSKVRSEDTALYYCASLYYDYGDAMDYWGQGTSTVTVSS.

Послідовність HC миші відповідає варіабельній області важкого ланцюга (VH), початково
розроблений для химерного антитіла J22.9-хі, яке містить домени VL і VH, одержані з антитіла
миші, здатні зв'язуватися з епітопом позаклітинного домену CD269 (BCMA), і в якому домени VL
і VH злиті з доменами CL і CH людини, відповідно.

Частково гуманізовані послідовності

Частково гуманізована HC (SEQ ID NO: 2):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYWMSWVRQAPGKGLEWVGEINPDSSTINYAPS
LKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYYDYGDAMDYWGQGTSLTVTVSS.

Частково гуманізована послідовність HC являє собою модифіковану амінокислотну
послідовність (за допомогою амінокислотних замінів) у порівнянні з химерним антитілом,
описаним у даному документі, у якій зв'язувальні області VL і VH модифіковані відносно їх
послідовності, що робить їх більш придатними для введення людині.

Гуманізована послідовність VH

hHC01 (SEQ ID NO: 3):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLVWVGEINPDSSTINYAPS
LKDKFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYYDYGDAMDYWGQGTSLTVTVSS.

Гуманізована послідовність VH з видаленням мотивів посттрансляційної модифікації

hHC02 (SEQ ID NO: 4):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWX₁SWVRQAPGKGLVWVGEINPX₂X₃STINYAP
SLKDKFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYX₄DYGDAX₅DYWGQGTSLTVTVSS,

де:

X₁: I, F, L, V, Y, C, G, A, S, T, переважно I або F;

X₂X₃: SS, NS, TS, GS, KS, RS, SD, SN, DE, переважно SS;

X₄: Y, L, A, V, F, I, W, переважно Y; i/або

X₅: Y, L, F, I, V, A, C, переважно Y.

Гуманізовані послідовності "hHC01" і "hHC02" являють собою нові амінокислотні послідовності, які містять зміни послідовності в порівнянні як з вихідною химерною послідовністю, так і з частково гуманізованими послідовностями, описаними в даному документі.

Мутації PTM призначені для видалення потенційно шкідливих мотивів посттрансляційної модифікації з зазначених білків, при збереженні переважних властивостей зв'язування. Положення 1, 5, 6, 19, 27, 28, 34, 39, 46, 48, 54, 69, 84, 85, 86, 88, 93, 107 i/або 115 hHC01 і hHC02 переважно є мутантними (заміщеними) у порівнянні з вихідною химерною послідовністю. Важливість заміни обумовлена в основному кінцевою амінокислотою, а не вихідною амінокислотою. Таким чином, заміну також можна проводити з відповідної вихідної химерної амінокислоти або іншого варіанта, такого як частково гуманізовані послідовності.

Наступні заміни є новими в порівнянні з химерною (SEQ ID NO: 1) послідовністю:

- амінокислота M34 послідовності HC (VH) замінена будь-якою амінокислотою, переважно I, L, F, V, Y, C, G, A, S, T;

- амінокислота E46 послідовності HC (VH) замінена на V;

- амінокислоти D54 і S55 послідовності HC (VH) замінені будь-якою комбінацією амінокислот, переважно SS, TS, GS, KS, RS, SD, SN, DE;

- амінокислота Y101 послідовності HC (VH) замінена будь-якою амінокислотою, переважно L, A, V, F, I, W; i/або

- амінокислота M107 послідовності HC (VH) замінена будь-якою амінокислотою, переважно L, Y, F, I, V, A, C.

Послідовності, які можуть бути модифікованими в залишках, необхідних для прямої взаємодії з BCMA

hHC03 - модифіковані амінокислоти, залучені у взаємодію з BCMA (SEQ ID NO: 5):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYX₁MX₂WVRQAPGKGLVX₃VGX₄INPDSSTINYAP
SLKDKFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASX₅X₆X₇DYGD₈MDYWGGGTLTVTSS,

де переважними амінокислотами є:

X₁: W, F, Y, переважно W;

X₂: S, T, N, Q, D, E, переважно S;

X₃: W, F, Y, переважно W;

X₄: E, Q, переважно E;

X₅: L, I, V, G, A, переважно L;

X₆: Y, X, переважно Y;

X₇: Y, F, L, I, V, M, переважно Y; i/або

X₈: A, G, V, переважно A.

Гуманізована послідовність "hHC03" відповідає новим амінокислотним послідовностям, що містять заміни амінокислотної послідовності в порівнянні як з вихідною химерною послідовністю, так і з частково гуманізованою послідовністю. Ці зміни послідовності відображають потенційні зміни амінокислот, що зв'язують мішень BCMA, які можуть бути замінені при збереженні переважних властивостей зв'язування. Важливість заміни обумовлена в основному кінцевою амінокислотою, а не вихідною амінокислотою. Таким чином, зміну також можна проводити з відповідної амінокислоти вихідної химерної амінокислотної послідовності або іншого варіанта.

Наприклад:

- амінокислота W33 послідовності HC (VH) являє собою W, F, Y;

- амінокислота S35 послідовності HC (VH) являє собою S, T, N, Q, D, E;

- амінокислота W47 послідовності HC (VH) являє собою W, F, Y;

- амінокислота E50 послідовності HC (VH) являє собою E, Q;

- амінокислота L99 послідовності HC (VH) являє собою L, I, V, G, A;

- амінокислота Y100 послідовності HC (VH) являє собою Y, X;

- амінокислота Y101 послідовності HC (VH) являє собою Y, F, L, I, V, M; i/або

- амінокислота A106 послідовності HC (VH) являє собою A, G, V.

Як правило, будь-яку зміну області CDR, внесену в процесі гуманізації, також можна вважати ознакою послідовності CDR при розгляді незалежно від каркасної послідовності загалом. Такі модифіковані послідовності CDR можна вважати визначальними ознаками даного винаходу, або в межах, або незалежно від їх контексту в цілій каркасній області, описаній в даному документі. Наприклад, послідовності CDR, позначені підкресленням у hHC01-hHC03,

можна вважати визначальною ознакою винаходу незалежно від оточуючої каркасної послідовності.

Конкретні приклади гуманізованих послідовностей HC (VH)

hHC04 (SEQ ID NO: 6):

5 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWISWVRQAPGKGLVWVGEINPNSSTINYAPSL
KDKFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYYDYGDAYDYWGQGTLLTVSS,

hHC05 (SEQ ID NO: 7):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWFSWVRQAPGKGLVWVGEINPNSSTINYAPS
LKDKFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYYDYGDAYDYWGQGTLLTVSS,

10 hHC06 (SEQ ID NO: 8):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWISWVRQAPGKGLVWVGEINPSSSTINYAPSL
KDKFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYYDYGDAYDYWGQGTLLTVSS,

hHC07 (SEQ ID NO: 9):

15 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWFSWVRQAPGKGLVWVGEINPSSSTINYAPSL
KDKFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYYDYGDAYDYWGQGTLLTVSS.

Вирівнювання

Множинне вирівнювання послідовностей CLUSTAL W (1.83) різних заміщених положень у послідовності HC забезпечує відповідні порівняння послідовностей, наведені на Фіг. 8. "Загальна послідовність" являє собою послідовність HC, у якій кожен X являє собою потенційну амінокислотну заміну на будь-яку дану амінокислоту. Переважні амінокислотні заміни являють собою заміни, описані вище, для кожного з потенційно мутантних положень.

Переважні варіанти здійснення, які стосуються гуманізованих варіантів VL

Химерна послідовність

LC миші (SEQ ID NO: 43):

25 DIVMTQSQRFMFTTSGDRVSVTCKASQSVDSNVAWYQQKPRQSPKALIFSASLRFSGVPARFTG
SGSGTDFTLTISNLQSEDLAEYFCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR.

Послідовність LC миші являє собою варіабельну область легкого ланцюга (VL), спочатку розроблену для химерного антитіла J22.9-xi, яка містить домени VL і VH, одержані з антитіла миші, здатні зв'язувати епітоп позаклітинного домену CD269 (BCMA), і в якій домени VL і VH злиті з доменами CL і CH людини, відповідно.

Частково гуманізовані послідовності

Частково гуманізована LC (SEQ ID NO: 10):

35 DIVMTQSPATLSVSVGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKPGQAPKLLIYSDDLRFSGVPARFSG
SGSGTDFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR.

Частково гуманізована послідовність LC являє собою модифіковану послідовність (за допомогою амінокислотних заміни) у порівнянні з химерним антитілом, описаним у прикладах даного винаходу, у якому послідовність зв'язувальних областей VL і VH модифікована так, щоб вони були більш придатними для введення людині.

Гуманізована послідовність VL

40 hLC01 (SEQ ID NO: 11):

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVDSNVAWYQQKPGQAPRALIYSASLRFSGIPARFSG
SGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR.

Гуманізована послідовність VL з видаленням мотивів посттрансляційної модифікації

hLC02 (SEQ ID NO: 12):

45 EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVX₁X₂NVAWYQQKPGQAPRALIYSASLRFSGIPARFSG
SGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR,

де:

X₁X₂: ES, SS, TS, QS, HS, DH, переважно ES.

50 Гуманізовані послідовності "hLC01" і "hLC02" являють собою нові амінокислотні послідовності, які містять зміни амінокислотної послідовності в порівнянні як з вихідною химерною послідовністю, так і з частково гуманізованими послідовностями, описаними в даному документі.

Мутації PTM призначені для видалення частково несприятливих мотивів посттрансляційної модифікації з зазначених білків при збереженні переважних властивостей зв'язування. Положення 1, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 30, 41, 43, 45, 49, 58, 63, 70, 77, 83, 85 і/або 87 hLC01 і hLC02 переважно є мутантними (замінені) у порівнянні з вихідною химерною послідовністю. Важливість заміни обумовлена в основному кінцевою амінокислотою, а не вихідною амінокислотою. Таким чином, зміну можна проводити з відповідної вихідної химерної амінокислоти або іншого варіанта.

60 Наступні заміни є новими відносно химерних і частково гуманізованих послідовностей:

- амінокислота D1 послідовності LC (VL) замінена на E;
- амінокислота V15 послідовності LC (VL) замінена на P;
- амінокислота D17 послідовності LC (VL) замінена на E;
- амінокислота V19 послідовності LC (VL) замінена на A;
- 5 - амінокислота T22 послідовності LC (VL) замінена на S;
- амінокислоти D30 і S31 послідовності LC (VL) замінені будь-якою комбінацією амінокислот, переважно ES, SS, TS, QS, HS, DH;
- амінокислота V58 послідовності LC (VL) замінена на I; i/або
- амінокислота D70 послідовності LC (VL) замінена на E.

10 Послідовності, які можуть бути модифіковані в їх зв'язувальних областях CDR у залишках, необхідних для взаємодії BCMA

hLC03 - модифіковані амінокислоти, залучені у взаємодію з BCMA (SEQ ID NO: 13):

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCASQSVDX₁X₂VX₃WX₄QQKPGQAPRALIX₅X₆AX₇X₈RX₉SGIPA
RFGSGSX₁₀X₁₁GTEFTLTISSLQSEDFAVYYCX₁₂QX₁₃NNX₁₄PX₁₅TFGAGTKLELKR,

15 де переважними амінокислотами є:

X₁: S, H, T, N, D, Q;

X₂: N, E, Q;

X₃: A, G, V, S, T, L, I;

X₄: Y, F, L, I, V, A, G;

20 X₅: Y, F, L;

X₆: S, T;

X₇: S, T, D, N, H, E, Q;

X₈: L, V, I, M;

X₉: F, L, I, V, Y, M;

25 X₁₀: G, X;

X₁₁: S, X;

X₁₂: Q, V, L, I, M;

X₁₃: Y, F, L, I, Q;

X₁₄: Y, F, R, Q, K; i/або

30 X₁₅: L, I, V, F.

"Гуманізована послідовність hLC03" відповідає новим амінокислотним послідовностям, які містять зміни амінокислотної послідовності у порівнянні як з вихідною химерною послідовністю, так і з частково гуманізованою послідовністю. Мається на увазі, що ці зміни послідовності відображають потенційні зміни амінокислот, що зв'язують мішень BCMA, які можуть бути замінені при збереженні переважних властивостей зв'язування. Важливість заміни обумовлена в основному кінцевою амінокислотою, а не вихідною амінокислотою. Таким чином, зміну також можна проводити з відповідної вихідної химерної амінокислоти або іншого варіанта.

Наприклад:

- амінокислота S31 послідовності LC (VL) являє собою S, H, T, N, D, Q;

40 - амінокислота N32 послідовності LC (VL) являє собою N, E, Q;

- амінокислота A34 послідовності LC (VL) являє собою A, G, V, S, T, L, I;

- амінокислота Y36 послідовності LC (VL) являє собою Y, F, L, I, V, A, G;

- амінокислота Y49 послідовності LC (VL) являє собою Y, F, L;

- амінокислота S50 послідовності LC (VL) являє собою S, T;

45 - амінокислота S52 послідовності LC (VL) являє собою S, T, D, N, H, E, Q;

- амінокислота L53 послідовності LC (VL) являє собою L, V, I, M;

- амінокислота F55 послідовності LC (VL) являє собою F, L, I, V, Y, M;

- амінокислота G66 послідовності LC (VL) являє собою G, X;

- амінокислота S67 послідовності LC (VL) являє собою S, X;

50 - амінокислота Q89 послідовності LC (VL) являє собою Q, V, L, I, M;

- амінокислота Y91 послідовності LC (VL) являє собою Y, F, L, I, Q;

- амінокислота Y94 послідовності LC (VL) являє собою Y, F, R, Q, K; i/або

- амінокислота L96 послідовності LC (VL) являє собою L, I, V, F.

55 Як правило, будь-яка зміна області CDR також може вважатися ознакою послідовності CDR при розгляді незалежно від каркасної послідовності загалом. Такі модифіковані послідовності CDR можна вважати визначальними ознаками даного винаходу, або в межах, або незалежно від їх контексту в цілій каркасній області, описаній в даному документі. Наприклад, послідовності CDR, позначені підкресленням у hLC01-hLC03 можуть - у їх немодифікованій або заміщеній формі - вважатися визначальною ознакою винаходу незалежно від оточуючої

60 каркасної послідовності.

Приклад гуманізованої послідовності LC

hLC04 (SEQ ID NO: 14):

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCASQSVESENVAWYQQKPGQAPRALIYSASLRFSGIPARFSGS
GSGTEFTLTISLQSEDAVYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR.

5 Вирівнювання

Множинне вирівнювання послідовностей CLUSTAL W (1.83) різних потенційно змінених ділянок у послідовності LC забезпечує відповідні порівняння послідовностей, представлені на Фіг. 9. "Загальна послідовність" являє собою послідовність LC, у якій кожен X являє собою потенційну амінокислотну заміну. Переважні амінокислотні заміни являють собою заміни, описані вище, для кожного з потенційно мутантних положень.

Таким чином, даний винахід стосується гуманізованих послідовностей згідно з hHC01, hHC02, hHC03, hHC04, hHC05, hHC06, hHC07, hLC01, hLC02, hLC03 і/або hLC04 або будь-якої їх зазначеної комбінації.

Даний винахід охоплює всі можливі комбінації потенційних модифікацій для будь-якого даного потенційно варіантного залишку, запропонованого в даному описі (як позначено за допомогою X у "загальній" послідовності). Шляхом комбінування однієї або декількох з цих заміни можна одержувати гуманізовані варіанти, що виявляють бажані властивості зв'язування химерного антитіла, початково розробленого і продемонстрованого в даному описі. Антитіла або їх частини, описані в даному документі, також охоплюють послідовність щонайменше з 80%, переважно 90%, ідентичністю послідовності з гуманізованими послідовностями, описаними явним чином або описаними за допомогою формули послідовності.

Переважають варіанти здійснення, які стосуються епітопа антитіла

Таким чином, винахід стосується виділеного антитіла або фрагмента антитіла, що зв'язує CD269 (BCMA), де антитіло зв'язує епітоп, що містить одну або декілька амінокислот у залишках з 13 по 32 CD269 (BCMA).

Амінокислотна послідовність у залишках з 13 по 32 CD269 представлена в SEQ ID NO: 40. N-кінцева послідовність CD269 представлена в SEQ ID NO: 39. Позаклітинний домен CD269 представлений як SEQ ID NO: 38.

Антиген, що містив позаклітинний домен CD269 згідно з SEQ ID NO: 38, використовували для вакцинації для досягнення специфічності зв'язування антитіла миші і химерного антитіла, описаного в даному документі. Використання усього білка CD269 або його фрагментів, що містять або мембранозв'язаний, або внутрішньоклітинний домен як антиген, у процесі одержання антитіла може забезпечити антитіла, що зв'язують приховані або внутрішньоклітинні домени CD269, що, тим самим, робить такі засоби непридатними або несприятливими для терапевтичного застосування. Таким чином, антитіла за даним винаходом визначаються їх зв'язуванням з позаклітинною частиною CD269. Визначений епітоп у позаклітинному домені також являє собою нову і несподівану відмітну ознаку винаходу.

Fab-фрагменти, одержані з антитіл миші або химерних антитіл, кристалізували в комплексі з очищеним позаклітинним доменом BCMA і визначали структуру комплексу. Структурний аналіз продемонстрував детальну інформацію про епітоп антитіла за даним винаходом і його біологічне значення. Зв'язування епітопа, що містить одну або декілька амінокислот із залишків 13-32 CD269 (BCMA) позаклітинного домену, антитілом за даним винаходом є переважною властивістю, оскільки ця область демонструє значне перекривання з ділянками зв'язування BAFF і APRIL, двох природних лігандів CD269. Жодне з антитіл проти CD269, описаних у даній галузі на сьогоднішній день, не продемонструвало такого великого перекривання з ділянками зв'язування BAFF і APRIL.

В одному варіанті здійснення виділене антитіло або фрагмент антитіла за даним винаходом відрізняється тим, що антитіло зв'язує епітоп, який містить одну або декілька з амінокислот 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 26, 27 або 32 CD269 (BCMA). В іншому варіанті здійснення виділене антитіло або фрагмент антитіла за даним винаходом відрізняється тим, що антитіло зв'язує епітоп, який складається з амінокислот 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 26, 27 і 32 CD269 (BCMA). Ці залишки являють собою амінокислоти, що взаємодіють безпосередньо з антитілом за даним винаходом, як ідентифіковано за допомогою даних про кристалічну структуру, представлених у даному описі. Нумерація цих залишків проведена відносно SEQ ID NO: 39, що являє собою N-кінцеву послідовність CD269.

В одному варіанті здійснення винаходу виділене антитіло або фрагмент антитіла відрізняється тим, що зв'язування антитіла з CD269 (BCMA) порушує взаємодію BAFF-CD269 і/або APRIL-CD269.

Зв'язування антитіл за даним винаходом з позаклітинним доменом CD269 порушує взаємодію BAFF-CD269. Унаслідок того факту, що ділянки зв'язування APRIL і BAFF

розташовані в подібних ділянках з епітопом антитіла, зв'язування антитіла з CD269 також блокує взаємодію APRIL-CD269.

Порівняння специфічного епітопа антитіла за даним винаходом з ділянками зв'язування APRIL і BAFF, для яких була визначена кристалічна структура і були картовані їх ділянки взаємодії, показує всебічне перекривання ділянок зв'язування природних лігандів і антитіла, описаного в даному документі. Це являє собою сприятливий і несподіваний аспект винаходу і забезпечує надійне й ефективне порушення взаємодій BAFF-CD269 і/або APRIL-CD269.

Таким чином, винахід стосується виділеного антитіла або фрагмента антитіла, як описано в даному документі, де антитіло порушує взаємодію APRIL-CD269 шляхом зв'язування епітопа, який містить одну або декілька амінокислот із залишків 13, 15, 17, 18, 19, 22, 26, 27, 30, 31, 32, 33, 34, 35 CD269 (BCMA), зокрема складається з амінокислот 13, 15, 17, 18, 19, 22, 26, 27, 32. Ці амінокислоти відповідають ділянці зв'язування APRIL на CD269 і залишкам CD269, що перекриваються, які зв'язуються як з антитілом, як описано в даному документі, так і з APRIL, відповідно.

Таким чином, в іншому варіанті здійснення винахід стосується виділеного антитіла або фрагмента антитіла, як описано в даному документі, де антитіло порушує взаємодію BAFF-CD269 за допомогою зв'язування епітопа, який містить одну або декілька амінокислот із залишків 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 34, 35 CD269 (BCMA), зокрема епітопа, що складається з амінокислот 13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 26, 27, 32. Ці амінокислоти відповідають ділянці зв'язування BAFF на CD269 і залишкам CD269, що перекриваються, які зв'язуються з антитілом, як описано в даному документі, і з BAFF, відповідно.

Хоча в даній галузі описані антитіла, що зв'язують CD269, які також потенційно порушують взаємодії APRIL або BAFF з CD269, не надано відповідного опису, що стосується конкретного епітопа таких антитіл. Не можна передбачити, що раніше описані антитіла також зв'язують епітоп з таким широким перекриванням, що й у антитіл за даним винаходом. Навіть якби було показано, що порушуються взаємодії APRIL або BAFF з CD269, це потенційно могло відбутися внаслідок зв'язування багато в чому відмінного епітопа і наступного просторового перешкоджання зв'язуванню APRIL або BAFF. Ступінь порушення взаємодій APRIL або BAFF з CD269, викликаного антитілами рівня техніки, раніше не був задокументований.

Антитіла за даним винаходом забезпечують ефективне і надійне порушення взаємодії, що потенційно являє собою поліпшений технічний ефект у порівнянні з антитілами, описаними на рівні техніки. Для визначення і порівняння порушення взаємодії з BAFF і/або APRIL можна проводити аналіз блокування *in vitro*, наприклад, з позаклітинним доменом BCMA людини і рекомбінантним BAFF або APRIL.

У переважному варіанті здійснення епітопна специфічність у комбінації з високою афінністю, демонстрованою антитілами, описаними в даному документі, являє собою новий і несподіваний технічний ефект. По суті, виключно висока афінність антитіла J22.9 і його гуманізованих варіантів забезпечує не тільки "порушення" або "блокування" зв'язування природних лігандів; але також надвисока афінність антитіла за винаходом забезпечує виключення повністю або практично повністю зв'язування ними їх мішені BCMA, коли антитіло присутнє.

Як описано в розділі "Приклади" нижче, афінність гуманізованих антитіл, як описано в даному документі, несподівано є високою і порівняно кращою, ніж у подібних підходах, здійснених в рівні техніки. K_d у пМ-діапазоні (як показано нижче) звичайно сприймають як чудову афінність, не очікувану в звичайній практиці.

В іншому аспекті гуманізоване антитіло або фрагменти антитіл за винаходом зв'язують CD269 з високою афінністю, наприклад, при вимірювання з використанням поверхневого плазмонного резонансу, такого як *Biacore*, антитіло зв'язується з CD269 людини з високою афінністю 100 нМ, 90 нМ, 80 нМ, 70 нМ, 60 нМ, 50 нМ, 40 нМ, 30 нМ або менше або 20 нМ або менше, або афінністю 15 нМ або менше, або афінністю 5 нМ або менше, або афінністю 1000 пМ або менше, або афінністю 500 пМ або менше, або афінністю 100 пМ або менше, або 80 пМ або менше, або, наприклад, приблизно 50 пМ.

У наступному варіанті здійснення антитіло зв'язується з CD269 людини з афінністю, вимірюваною способом поверхневого плазмонного резонансу, таким як *Biacore*, від приблизно 1 пМ до приблизно 100 нМ або від приблизно 100 пМ до приблизно 50 нМ, або від приблизно 200 пМ до приблизно 20 нМ.

Наступні переважні варіанти здійснення винаходу

В одному варіанті здійснення винахід стосується антитіла або фрагмента антитіла, що містить амінокислотну послідовність, визначувану однією або декількома амінокислотами, які прямо взаємодіють з мішенню CD269, і/або однією або декількома амінокислотами, що взаємодіють через водні взаємодії (див. таблиці 1-6). Велика кількість водних взаємодій,

залучених у зв'язування антитіла, як описано в даному документі, з епітопом, являє собою незвичайний і несподіваний аспект зв'язування. Зокрема, висока афінність антитіла, спрямованого на конкретний епітоп, описаний у даному документі, у комбінації з великою кількістю водних взаємодій, залучених у поверхню зв'язування між антитілом і епітопом, являє собою дивний і несподіваний аспект винаходу.

Таким чином, винахід стосується антитіла або фрагмента антитіла, що містить амінокислотну послідовність, як описано в даному документі, де послідовність характеризується присутністю конкретних амінокислотних залишків, що залучені в поверхню взаємодії з епітопом-мішенню через водний місток відповідно до таблиці 5, вибраних із групи, що містить Ser31, Asn32, Tyr36, Ser50, Ser52, Gly66, Gln89, Tyr91 і/або Tyr94 легкого ланцюга і/або Trp33, Ser35, Trp47, Glu50, Leu99 і/або Tyr101 важкого ланцюга, відносно химери, описаної в даному документі, або відносно відповідного залишку гуманізованих варіантів послідовності, описаних у даному документі.

Хоча приклади відносно утворення водних містків антитіла проводили з химерою J22.9-хі, автори винаходу установили, що цей технічний ефект зберігається в гуманізованих варіантах за даним винаходом внаслідок збереження характеристик зв'язування в гуманізованих варіантах у порівнянні з вихідним дослідженим химерним антитілом. У важкому ланцюзі єдиним мутантним залишком водного містка є Y101, однак його водна взаємодія залучає атом основного ланцюга (тобто кістяка), і, таким чином, можна обґрунтовано передбачити, що воно не змінюється внаслідок мутації бічного ланцюга; у легкому ланцюзі відсутні мутації залишків, залучених у водні містки.

Антитіло за винаходом може далі характеризуватися амінокислотними залишками епітопа, залученими у взаємодію через водні містки з антитілом, як описано в даному документі. Відповідні ознаки представлені в таблиці 5. Таким чином, наприклад, в одному варіанті здійснення винахід відрізняється тим, що залишок Ser31 легкого ланцюга взаємодіє з Thr32 CD269 через молекулу води. Такий опис властивостей зв'язування антитіл за даним винаходом передбачається для кожної взаємодії, як показано в таблиці 5.

Більше того, варіанти послідовності антитіл, описаних у даному документі, охоплюються даним винаходом, де один або декількох залишків, залучених у взаємодію за принципом утворення "водного містка", модифіковані для "включення" прямої взаємодії бічного ланцюга в послідовність за рахунок водного "містка". Наприклад, в амінокислотну послідовність можна вносити мутацію або зміну, що витісняє воду з поверхні взаємодії, але по суті не впливає на афінність взаємодії. Таким чином, винахід стосується антитіла або фрагмента антитіла, що містить амінокислотну послідовність, як описано в даному документі, де послідовність характеризується варіюванням послідовності в тих амінокислотних залишках, що залучені в поверхню взаємодії з епітопом-мішенню через водний місток відповідно до таблиці 5, вибраних із групи, що містить Ser31, Ser31, Asn32, Tyr36, Ser50, Ser52, Gly66, Gln89, Tyr91 і/або Tyr94 легкого ланцюга і/або Trp33, Ser35, Trp47, Glu50, Leu99 і/або Tyr101 важкого ланцюга, відносно химери, описаної в даному документі, або відносно відповідного залишку гуманізованих варіантів послідовності, описаних у даному документі. Варіювання у відповідних положеннях гуманізованих антитіл, описаних у даному документі, може бути пов'язане з будь-якою даною амінокислотою заміною, переважно амінокислотою заміною, що ефективно витісняла б воду зі взаємодії, але зберігала б подібні властивості зв'язування з точки зору афінності і специфічності до епітопа.

В одному варіанті здійснення винаходу виділене антитіло або фрагмент антитіла відрізняється тим, що антитіло є глікозилованим і переважно містить N-зв'язаний олігосахаридний ланцюг, переважно на Asn297 важкого ланцюга.

Глікозилювання антитіла стосується зв'язування вуглеводів або гліканів з антитілом. N-зв'язані глікани зв'язуються з азотом бічних ланцюгів аспарагіну або аргініну. Вуглеводні ланцюги, зв'язані з білками-мішенями, виконують різні функції. Наприклад, деякі білки не згортаються правильно, якщо вони не глікозилюються спочатку. Також полісахариди, зв'язані з азотом амідів аспарагіну в білку, можуть забезпечувати стабільність деяких секретованих глікопротеїнів. Глікозилювання в цьому випадку не є строгою вимогою для належного згортання, однак неглікозилований білок може деградувати швидше.

Як демонструють приклади даного винаходу деглікозилювання антитіла, описаного в даному документі, приводить до зменшення терапевтичного ефекту в порівнянні з глікозилованими формами антитіла. Було несподіваним, що глікозилювання може відігравати значну роль у підтриманні активності антитіла. Таким чином, глікозилювання являє собою переважний варіант здійснення винаходу, асоційований з несподіваними технічними перевагами.

Як продемонстровано в розділі "Приклади" цього опису, хоча загальне пухлинне

навантаження у тварин, яким вводили J22.9-xi-N-glycan (деглікозиловане), не відрізнялося значно від пухлинного навантаження у тварин, яким вводили ізотипічне контрольне антитіло, тривалість життя цих мишей суттєво зростала в порівнянні з групою, у якій вводили isoAb. Оскільки було показано, що J22.9-xi-N-glycan не здатне індукувати ADCC або CDC, цей результат указує на те, що вже одне зв'язування J22.9-xi з BCMA перешкоджає росту пухлини. Можна обґрунтовано зробити висновок, що це є наслідком блокування взаємодії між рецептором і його нативними лігандами (APRIL і BAFF). Цей аспект винаходу й антитіл, описаних у даному документі, являє собою несподіваний технічний ефект, що не міг бути досягнутий за допомогою антитіл рівня техніки. J22.9-xi-N-glycan (деглікозиловане) можна вважати контрольним зразком в описаних експериментах, що забезпечує зв'язування антитіла з його епітопом-мішенню без наступних ефектів ADCC або CDC, для оцінки потенційного терапевтичного ефекту. Таким чином, антитіла за винаходом, переважно з глікозилюванням, демонструють таке ефективне зв'язування епітопа, яке забезпечує попередження (або значне порушення) зв'язування природних лігандів, що приводить до клітинної токсичності. Ця характеристика антитіл, описаних у даному документі, не була описана для подібних антитіл, описаних у даній галузі.

Хоча приклади відносно глікозилювання антитіла наводили для химери J22.9-xi, автори винаходу установили, що цей технічний ефект зберігається в гуманізованих варіантах за даним винаходом внаслідок збереження характеристик зв'язування в гуманізованих варіантах у порівнянні з вихідним дослідженням химерним антитілом. Переважне положення глікозилювання (Asn297 важкого ланцюга) не має прямого зв'язку з яким-небудь з мутантних залишків і знаходиться в константній області повнорозмірного IgG людини. Таким чином, є обґрунтованим припущення, що не існує відмінностей у профілі глікозилювання в будь-якому з цих варіантів J22.9 у порівнянні з химерним антитілом.

Застосування і функціональні аспекти винаходу

Антитіла за даним винаходом здатні зв'язувати епітопи, описані в даному документі, блокувати взаємодію природних лігандів цього епітопа і індукувати CDC і ADCC.

Антитілозалежна клітинно-опосередковувана цитотоксичність (ADCC) є одним з факторів, індукованих антитілом за даним винаходом, які індукують бажаний терапевтичний ефект. ADCC являє собою механізм клітинно-опосередкованого імунного захисту, у якому ефекторна клітина імунної системи активно здійснює лізис клітини-мішені, у якій антигени поверхні мембрани зв'язані специфічними антитілами. Після зв'язування експресуючих CD269 клітин антитілами за даним винаходом може індукуватися ADCC. Класична ADCC опосередковується натуральними кілерами (NK); макрофаги, нейтрофіли і еозинофіли також можуть опосередковувати ADCC. ADCC є частиною адаптивної імунної відповіді внаслідок її залежності від попередньої антитільної відповіді. Експерименти на мишах можуть указувати на те, що ADCC є важливим механізмом дії терапевтичних антитіл, як описано в даному документі.

Переважаючий варіант здійснення винаходу стосується виділеного антитіла або фрагмента антитіла, як описано в даному документі, для застосування як лікарського засобу для лікування медичного порушення, асоційованого з присутністю патогенних В-клітин.

В одному варіанті здійснення винаходу медичне порушення являє собою асоційоване з CD269 порушення, переважно асоційоване з патогенними В-клітинами, що переважно являє собою захворювання плазматичних клітин і/або В-клітин пам'яті.

Захворювання плазматичних клітин може являти собою злоякісну пухлину плазматичних клітин, наприклад множинну мієлому, плазмоцитому, макроглобулінемію Вальденстрема або плазмоклітинний лейкоз. Захворювання плазматичних клітин може являти собою злоякісну пухлину В-лімфоцитів, таку як хвороба Ходжкіна.

В одному варіанті здійснення винаходу медичне порушення являє собою аутоімунне захворювання, асоційоване з аутореактивними плазмоцитами і/або аутореактивними В-клітинами пам'яті, таке як запальне аутоімунне захворювання, наприклад системний червоний вовчак або ревматоїдний артрит.

Таким чином, винахід також стосується способу лікування медичних порушень, описаних у даному документі, який переважно включає введення терапевтично ефективною кількості антитіла індивідууму, що потребує такого лікування.

Наступний аспект винаходу стосується кон'югата антитіло-лікарський засіб (ADC), що містить антитіло або фрагменти антитіл, як описано в даному документі. Кон'югати антитіло проти CD269-лікарський засіб "ADC проти CD269" можуть бути описані як антитіло проти CD269 або його фрагмент, кон'юговані з лікарським засобом. У визначених варіантах здійснення ADC містить антитіло проти CD269 (наприклад, гуманізований варіант J22.9-xi, як описано в даному документі).

ADC або похідні ADC, як описано в даному документі, надають клінічно корисні ефекти на експресуючі CD269 клітини при введенні індивідууму з медичним станом, асоційованим з експресією CD269, таким як злоякісна пухлина або аутоімунне порушення. В одному варіанті здійснення антитіло проти CD269 або його похідне кон'юговане з цитотоксичним засобом, так

що кінцевий ADC або похідне ADC надає цитотоксичну дію на експресуючу CD269 злоякісну клітину, переважно при захопленні і інтерналізації клітиною.

ADC проти CD269 або похідне ADC переважно інтерналізується і накопичується у експресуючій CD269 клітині, де ADC або похідне ADC виявляє терапевтичний ефект (наприклад, цитотоксичний ефект). Особливо придатними частинами для кон'югації з антитілами або похідними антитіл є хіміотерапевтичні засоби, конвертуючі проліки ферменти, радіоактивні ізотопи або сполуки або токсини. Наприклад, антитіло проти CD269 або його похідне можна кон'югувати з цитотоксичним засобом, таким як хіміотерапевтичний засіб, або токсином (наприклад, цитостатичний або цитоцидний засіб).

Інший аспект винаходу стосується переважно виділеної молекули нуклеїнової кислоти, вибраної з групи, що складається з:

а) молекули нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність

- яка кодує виділене антитіло або фрагмент антитіла відповідно до будь-якого з попередніх пунктів,

- яка кодує амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з послідовностей згідно з SEQ ID NO: 1-31 і 41-42,

- яка містить послідовність або фрагмент послідовності SEQ ID NO: 32-36,

б) молекули нуклеїнової кислоти, що комплементарна нуклеотидній послідовності згідно з а);

с) молекули нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність, яка має достатню ідентичність послідовності для того, щоб бути функціонально аналогічною/еквівалентною нуклеотидній послідовності згідно з а) або б), яка переважно має ідентичність послідовності з нуклеотидною послідовністю згідно з а) або б) щонайменше 80%, переважно 90%, більш переважно 95%;

д) молекули нуклеїнової кислоти, що унаслідок генетичного коду є виродженою у нуклеотидну послідовність згідно з а)-с); і

е) молекули нуклеїнової кислоти згідно з нуклеотидною послідовністю а)-д), що модифікована за допомогою делецій, вставок, замін, транслокацій, інверсій і/або інсерцій і функціонально аналогічна/еквівалентна нуклеотидній послідовності згідно з а)-д).

Наступний аспект винаходу стосується клітини-хазяїна, такої як бактеріальна клітина або клітина ссавця, переважно гібридомна клітина або клітинна лінія, яка здатна продукувати антитіло або фрагменти антитіл, як описано в даному документі, і/або містить молекулу нуклеїнової кислоти, як описано в даному документі.

Наступний аспект винаходу стосується фармацевтичної композиції, яка містить виділене антитіло або фрагмент антитіла, як описано в даному документі, молекулу нуклеїнової кислоти, як описано в даному документі, або клітину-хазяїна, як описано в даному документі, разом з фармацевтично прийнятним носієм.

Додатковим і несподіваним аспектом винаходу є підвищення стабільності антитіла, описаного в даному документі. Антитіло можна без складності зберігати протягом тривалих періодів часу в придатних умовах без якого-небудь зниження афінності. Були проведені відповідні тести, що стосуються підтримання активності після зберігання або при -80 °C, або при 4 °C, які продемонстрували несподівано високу стабільність антитіла і підтримання активності після зберігання при обох вищезгаданих температурах (Фіг. 3с). Ця підвищена стабільність є очевидною для химерного антитіла, а також несподівано для його гуманізованих варіантів. Несподівано, стабільність гуманізованих варіантів є підвищеною відносно химери при тривалому зберіганні.

Наступною перевагою антитіл, як описано в даному документі, є ефективне системне виснаження клітин мієломи, як продемонстровано в розділі "Приклади". Для антитіл, раніше описаних в рівні техніки, не було продемонстровано, що вони виявляють бажаний ефект проти плазмочитів системним чином. У дослідженнях, проведених для антитіл рівня техніки, описана тільки підшкірна ін'єкція клітин мієломи і наступна обробка виділеної клітинної маси. Даний винахід стосується антитіла, здатного до системного виснаження злоякісних клітин множинної мієломи після їх в/в ін'єкції, як продемонстровано в розділі "Приклади". Ефективне виснаження клітини-мішені являє собою технічний ефект, який раніше не був продемонстрований на рівні техніки, на доповнення до корисної властивості антитіл за даним винаходом.

Докладний опис винаходу

Як використовують у рамках винаходу, "антитіло", головним чином, стосується білка, що

складається з одного або декількох поліпептидів, по суті кодованих генами імуноглобулінів або фрагментами генів імуноглобулінів. Коли використовують термін "антитіло", також мається на увазі термін "фрагменти антитіл". Відомі гени імуноглобулінів включають гени константної області каппа, лямбда, альфа, гамма, дельта, епсилон і мію, а також множини генів варіабельних областей імуноглобулінів. Легкі ланцюги класифікують або як каппа, або як лямбда. Важкі ланцюги класифікують як гамма, мію, альфа, дельта або епсилон, які у свою чергу визначають класи імуноглобулінів IgG, IgM, IgA, IgD і IgE, відповідно. Відомо, що основний структурний елемент імуноглобуліну (антитіла) являє собою тетрамер або димер. Кожен тетрамер складається з двох ідентичних пар поліпептидних ланцюгів, кожна з яких має один "легкий" (L) (приблизно 25 кДа) і один "важкий" (H) ланцюг (приблизно 50-70 кДа). N-кінець кожного ланцюга визначає варіабельну область із приблизно від 100 до 110 або більше амінокислот, в основному відповідальних за розпізнавання антигену. Терміни "варіабельна область легкого ланцюга" і "варіабельна область важкого ланцюга" стосуються цих варіабельних областей легкого і важкого ланцюгів, відповідно. Необов'язково, антитіло або імунологічну частину антитіла можна хімічно кон'югувати або експресувати як білок, злитий з іншими білками.

Антитіла за винаходом призначені для зв'язування білкових мішеней ссавців, зокрема людини. Використання назв білків може відповідати варіантам білка або миші, або людини.

"Специфічне зв'язування" повинно бути зрозуміло фахівцю в даній галузі, причому фахівцю в даній галузі добре відомі різні експериментальні методики, які можна використовувати для дослідження зв'язування і специфічності зв'язування. Деяка перехресна реакція або фонове зв'язування можуть бути неминучими при багатьох білок-білкових взаємодіях; це не зменшує "специфічності" зв'язування між антитілом і епітопом. Термін "спрямований проти" також застосовний при розгляді терміна "специфічність" для розуміння взаємодії між антитілом і епітопом.

Антитіла за винаходом включають, але не обмежуються ними, поліклональні, моноклональні, біспецифічні, людські, гуманізовані або химерні антитіла, одиничні варіабельні фрагменти (ssFv), односторонні антитіла (такі як фрагменти VHH з наноантитіл), односторонні фрагменти (scFv), Fab-фрагменти, F(ab')₂-фрагменти, фрагменти, продуковані експресуючою Fab бібліотекою, антиідіотипічні антитіла і зв'язуючі епітоп фрагменти або комбінації будь-якого з вищевказаних, за умови, що вони зберігають вихідні властивості зв'язування. Також у способі за винаходом можна використовувати міні-антитіла і полівалентні антитіла, такі як діантитіла, триантитіла, чотиривалентні антитіла і пептаантитіла. Молекули імуноглобулінів за винаходом можуть належати до будь-якого класу (тобто IgG, IgE, IgM, IgD і IgA) або підкласу молекул імуноглобулінів. Таким чином, термін "антитіло", як використовують у рамках винаходу, також включає антитіла і фрагменти антитіл, або продуковані за допомогою модифікації цілих антитіл, або синтезовані de novo з використанням методологій рекомбінантних ДНК.

Гуманізоване антитіло, яке містить одну або декілька CDR антитіл за винаходом або одну або декілька CDR, що походять з зазначених антитіл, можна одержувати з використанням будь-яких способів, відомих у даній галузі. Наприклад, для гуманізації моноклонального антитіла можна використовувати чотири основних стадії. Вони являють собою: (1) визначення нуклеотидної і спрогнозованої амінокислотної послідовності вихідних варіабельних доменів легкого і важкого ланцюгів, (2) моделювання гуманізованого антитіла, тобто визначення того, яку каркасну область антитіла використовувати в процесі гуманізації, (3) фактичні методології/технології гуманізації і (4) трансфекцію й експресію гуманізованого антитіла. Див., наприклад, патенти США №№ 4816567; 5807715; 5866692; 6331415; 5530101; 5693761; 5693762; 5585089; 6180370; 5225539; 6548640.

Термін "гуманізоване антитіло" означає, що щонайменше частина каркасних областей і необов'язково частина областей CDR або інших областей, залучених у зв'язування імуноглобуліну, походить з або скоректована в напрямку послідовностей імуноглобулінів людини. Гуманізовані, химерні або частково гуманізовані версії моноклональних антитіл миші можна одержувати, наприклад, за допомогою технології рекомбінантних ДНК, починаючи з послідовностей геномної ДНК миші і/або людини, кодуючих ланцюги H і L, або з клонів кДНК, кодуючих ланцюги H і L. Гуманізовані форми антитіл миші можна одержувати шляхом зв'язування областей CDR антитіл, що не є людськими, з константними областями людини способами рекомбінантних ДНК (Queen et al., 1989; WO 90/07861). Альтернативно моноклональні антитіла, використовувані в способі за винаходом, можуть являти собою моноклональні антитіла людини. Антитіла людини можна одержувати, наприклад, з використанням способів фагового дисплея (WO 91/17271; WO 92/01047).

Як використовують у рамках винаходу, гуманізовані антитіла також належать до форм антитіл, що не є людськими (наприклад, миші, верблюда, лами, акули), які являють собою специфічні химерні імунoglobуліни, ланцюги імунoglobулінів або їх фрагменти (такі як Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ або інші антигензв'язувальні підпоследовності антитіл), що містять мінімальну

5 последовність, яка походить з імунoglobуліну, що не є людським.

Як використовують у рамках винаходу, антитіло людини або гуманізоване антитіло означає антитіло, яке має амінокислотну последовність, що відповідає последовності антитіла, продукованого у людини і/або одержаного з використанням будь-якого зі способів одержання антитіл людини, відомих у даній галузі або описаних у даному документі. Селекцію антитіл

10 людини можна проводити за допомогою експериментів з конкурентним зв'язуванням або іншим способом, щоб епітопна специфічність була такою ж, як і у конкретного антитіла миші. Гуманізовані антитіла за даним винаходом несподівано у великому ступені мають ті ж корисні функціональні властивості, що й антитіла миші. Також можна надавати поліклональні антитіла людини у формі сироватки від людини, імунізованої імунотенним засобом. Необов'язково, такі

15 поліклональні антитіла можна концентрувати за допомогою афінного очищення з використанням амілоїдних фібрилярних і/або нефібрилярних поліпептидів або їх фрагментів як афінного реагенту. Моноклональні антитіла можна одержувати із сироватки способом, описаним у WO 99/60846.

Крім того, даний винахід стосується застосування антитіл або їх фрагментів, як описано в

20 даному документі, наприклад варіабельних областей, у молекулах розпізнавання або афінних реагентах, що придатні для селективного зв'язування з мішенню. Афінний реагент, антитіло або його фрагмент відповідно до винаходу можуть бути пегілюваними, де пегілювання стосується ковалентного приєднання полімерних ланцюгів поліетиленгліколю (PEG) до антитіла за винаходом. Пегілювання можна стандартним чином проводити шляхом інкубації реактивного

25 похідного PEG з молекулою-мішенню. Пегілювання з антитілом може потенційно замаскувати засіб від імунної системи хазяїна, що приводить до зниження імунотенності й антигенності, або збільшити гідродинамічний розмір засобу, що може продовжити його час у кровотоку шляхом зниження ниркового виведення.

Варіабельна область антитіла належить до варіабельної області легкого ланцюга антитіла або до варіабельної області важкого ланцюга антитіла, або окремо, або в комбінації. Кожна з варіабельних областей важкого і легкого ланцюгів складається з чотирьох каркасних областей (FR), з'єднаних трьома областями, що визначають комплементарність (CDR), також відомими як гіперваріабельні області. CDR у кожному ланцюзі утримуються поблизу за допомогою FR і разом з CDR з іншого ланцюга додають внесок в утворення антигензв'язувального центра

35 антитіла. Існує щонайменше два способи визначення CDR: (1) підхід на основі перехресно-видової варіабельності последовностей (тобто Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)); і (2) підхід на основі кристалографічних досліджень комплексів антиген-антитіло (Al-lazikani et al. (1997), J. Molec. Biol. 273:927-948). Як використовують у рамках винаходу, CDR може належати до CDR, визначуваних за допомогою будь-якого підходу або комбінації обох підходів.

40

У деяких варіантах здійснення винахід стосується антитіла, яке містить щонайменше одну CDR, щонайменше дві, щонайменше три або більше CDR, які є по суті ідентичними щонайменше одній CDR, щонайменше двом, щонайменше трьом або більше CDR антитіла за винаходом. Інші варіанти здійснення включають антитіла, які мають щонайменше дві, три,

45 чотири, п'ять або шість CDR, що по суті ідентичні щонайменше двом, трьом, чотирьом, п'яти або шести CDR антитіла за винаходом або походять з антитіла за винаходом. У деяких варіантах здійснення щонайменше одна, дві, три, чотири, п'ять або шість CDR щонайменше приблизно на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% або 99% ідентичні щонайменше одній, двом або трьом CDR антитіла за винаходом. Зрозуміло, що для цілей даного винаходу специфічність зв'язування і/або загальна активність в основному зберігаються, хоча ступінь активності може варіюватися в порівнянні з зазначеним антитілом (може бути більш високим або менш високим).

50

Час напівжиття і цитотоксичний потенціал антитіла залежать в основному від взаємодії Fc-домену з різними Fc-гамма-рецепторами. У випадку часу напівжиття антитіла, головну роль грає неонатальний Fc-рецептор (FcRn). Цей рецептор експресується на декількох типах клітин і тканин, таких як моноцити і судинно-ендотеліальні клітини, що можуть захоплювати сироваткові білки в утилізуючі їх ендосоми. У ендосомах значення pH знижене приблизно до 6 і в цих умовах антитіла здатні зв'язуватися з FcRn. Ця взаємодія захищає антитіла від деградації доти, поки вони знову не вивільняються в кров, де фізіологічні значення pH порушують зв'язування з

60 рецептором (Roopenian and Akillesh (2007), Nat. Rev. Immunol. 7:715-725). Чим більш високою є

афінність антитіла до FcRn при pH 6, тим більш високим є час напівжиття цього антитіла. Мутації Fc-фрагмента, про які відомо, що вони стабілізують цю взаємодію, узагальнено представлені в Presta (2008, Curr. Opin. Immunol. 20:460-470).

При зв'язуванні мішені терапевтичні антитіла можуть діяти через декілька механізмів. Зв'язування саме по собі може запускати передачу сигналу, що може приводити до запрограмованої клітинної загибелі (Chavez-Galan et al. (2009), Cell Mol. Immunol. 6:15-25). Також воно може блокувати взаємодію рецептора з його лігандом шляхом зв'язування або з рецептором, або з лігандом. Це переривання може викликати апоптоз, якщо порушуються сигнали, важливі для виживання (Chiu et al. (2007), Blood, 109:729-739). Що стосується клітинного виснаження, існує два основних ефекторних механізми. Першим є комплементозалежна цитотоксичність (CDC) відносно клітини-мішені. Існує три відомих каскади. Однак у випадку антитіл, важливим каскадом для CDC є класичний каскад, що ініціюється через зв'язування C1q з константною областю IgG або IgM (Wang and Weiner (2008), Expert. Opin. Biol. Ther. 8:759-768).

Другий механізм називається антитілозалежною клітинною цитотоксичністю (ADCC). Ця ефекторна функція характеризується залученням імунних клітин, що експресують Fc-рецептори для відповідного ізотипу антитіл. ADCC більшою частиною опосередковується активацією Fc-гамма-рецепторів (FcγR), що здатні зв'язуватися з IgG-молекулами, або окремо, або у вигляді імунних комплексів. Миші мають три (FcγRI, FcγRIII і FcγRIV), а люди мають п'ять (FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIC, FcγRIIIA і FcγRIIIB) активуючих Fcγ-рецепторів. Ці рецептори експресуються на клітинах уродженого імунітету, таких як гранулоцити, моноцити, макрофаги, дендритні клітини і натуральні кілери, і, таким чином, зв'язують уроджену імунну систему з адаптивною. Залежно від типу клітин існує декілька способів дії клітин, що несуть FcγR, при розпізнаванні маркованих антитілом клітин-мішеней. Гранулоцити в основному вивільняють вазоактивні і цитотоксичні речовини або хемоатрактанти, але також здатні до фагоцитозу. Моноцити і макрофаги відповідають фагоцитозом, окисним вибухом, цитотоксичністю або вивільненням прозапальних цитокінів, у той час як натуральні кілери вивільняють гранзими і перфोरин, і також можуть запускати клітинну смерть через взаємодію з FAS на клітині-мішені і їх Fas-ліганді (Nimmerjahn and Ravetch (2008), Nat. Rev. Immunol. 8:34-47; Wang and Weiner (2008), Expert. Opin. Biol. Ther. 8:759-768; Chavez-Galan et al. (2009), Cell. Mol. Immunol. 6:15-25).

Антитілозалежна клітинна цитотоксичність (ADCC) також може бути посилена шляхом зміцнення зв'язування Fc-домену з активуючими Fc-гамма-рецепторами (FcγR). Цього також можна досягати за допомогою мутацій у Fc-гамма-домені, як узагальнено представлено в Presta (2008, Curr. Opin. Immunol. 20:460-470).

Іншим способом зміни ADCC є маніпулювання цукровою частиною, присутньою у кожному IgG на Asn297. Відомо, що дефукозилювання і видалення сілової кислоти з кінця молекул цукрів підвищує цитотоксичний потенціал антитіла (Anthony and Ravetch (2010), J. Clin. Immunol. 30 Suppl. 1: S9-14).

Також в обсяг винаходу входять варіанти послідовностей заявлених нуклеїнових кислот, білків і антитіл, наприклад, визначувані заявленою % ідентичністю послідовностей, що зберігають зазначені властивості за винаходом. Такі варіанти, що демонструють альтернативні послідовності, але зберігають по суті ті ж властивості зв'язування, такі як специфічність до мішені, що і конкретні представлені послідовності, відомі як функціональні аналоги або як функціонально аналогічні послідовності. Ідентичність послідовностей належить до відсотка ідентичних нуклеотидів або амінокислот при проведенні вирівнювання послідовностей.

Фахівцю в даній галузі буде зрозуміло, що в результаті виродженості генетичного коду існує множина нуклеотидних послідовностей, які кодують поліпептид, як описано в даному документі. Деякі з цих поліпептидів мають мінімальну гомологію або ідентичність послідовності з нуклеотидною послідовністю будь-якого нативного гена. Проте, даний винахід конкретно передбачає поліпептиди, що варіюються унаслідок відмінностей у використанні кодонів. Також винахід охоплює делеції, заміни й інші зміни послідовності, що відповідають описаній ідентичності послідовностей.

Модифікації білкової послідовності, які можуть бути здійснені за допомогою заміни, також входять в обсяг винаходу. Заміни, як визначають у даному описі, являють собою модифікації, внесені в амінокислотну послідовність білка, де одна або декілька амінокислот замінені тією ж кількістю (відмінних) амінокислот, з утворенням білка, який містить амінокислотну послідовність, що відрізняється від первинного білка, переважно без значної зміни функції білка. Подібно вставкам, заміни можуть бути природними або штучними. У даній галузі добре відомо, що амінокислотні заміни можна вносити без значної зміни функції білка. Це є особливо справедливим, коли модифікація належить до "консервативної" амінокислотної заміни, що

являє собою заміну однієї амінокислоти іншою амінокислотою з подібними властивостями. Такі "консервативні" амінокислоти можуть являти собою природні або синтетичні амінокислоти, які, завдяки розміру, заряду, полярності і конформації, можуть бути замінені без значного впливу на структуру і функцію білка. Часто багато амінокислот можуть бути замінені консервативними амінокислотами без несприятливого впливу на функцію білка.

Як правило, неполярні амінокислоти Gly, Ala, Val, Ile і Leu; неполярні ароматичні амінокислоти Phe, Trp і Tyr; нейтральні полярні амінокислоти Ser, Thr, Cys, Gln, Asn і Met; позитивно заряджені амінокислоти Lys, Arg і His; негативно заряджені амінокислоти Asp і Glu являють собою групи консервативних амінокислот. Цей перелік не є вичерпним. Наприклад, добре відомо, що Ala, Gly, Ser і іноді Cys можуть замінити одна одну, навіть незважаючи на те, що вони належать до різних груп.

У варіантах із заміною щонайменше один амінокислотний залишок у молекулі антитіла видалений і на його місце вбудований інший залишок. Ділянки, що представляють найбільший інтерес, для мутагенезу з замінами включають гіперваріабельні області, однак також передбачені зміни FR. Якщо такі заміни приводять до зміни біологічної активності, тоді можна вносити більш суттєві зміни, позначені як "ілюстративні заміни" у таблиці, представленій нижче, або як додатково описано нижче відносно класів амінокислот, і продукти можна піддавати скринінгу.

Потенційні амінокислотні заміни

Вихідний залишок	Переважають консервативні заміни	Приклади ілюстративних заміні
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Asg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn, Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Норлейцин
Leu (L)	Ile	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Норлейцин

Суттєві модифікації біологічних властивостей антитіла проводять, вибираючи заміни, що значно відрізняються по їх ефекту на підтримання (а) структури поліпептидного кістяка в області заміни, наприклад, такої як конформація шару або спіралі, (b) заряду або гідрофобності молекули в ділянці-мішені, або (c) об'єму бічного ланцюга.

Консервативні амінокислотні заміни не обмежуються амінокислотами, що зустрічаються в природі, але також включають синтетичні амінокислоти. Широко використовуваними синтетичними амінокислотами є омега-амінокислоти різної довжини ланцюга і циклогексилаланін, що є нейтральними неполярними аналогами; цитрулін і метіонінсульфоксид, що є нейтральними неполярними аналогами, фенілгліцин, що являє собою ароматичний нейтральний аналог; цистеїнова кислота, що являє собою негативно заряджений аналог, і орнітин, що являє собою позитивно заряджений аналог амінокислоти. Подібно амінокислотам, що зустрічаються в природі, цей перелік не є вичерпним, а є тільки ілюструючим заміни, що добре відомі в даній галузі.

Антитіла за даним винаходом можна одержувати шляхом трансфекції клітини-хазяїна експресуючим вектором, який містить кодуючу послідовність для антитіла за винаходом. Експресуючий вектор або рекомбінантну плазмиду продукують, поміщаючи ці кодуючі

послідовності для антитіла у функціональний зв'язок із загальноприйнятими регуляторними послідовностями контролю, здатними контролювати реплікацію й експресію в клітині-хазяїні і/або секрецію з неї. Регуляторні послідовності включають промоторні послідовності, наприклад промотор CMV, і сигнальні послідовності, що можуть походити з інших відомих антитіл.

5 Аналогічно, може бути одержаний другий експресуючий вектор, що має послідовність ДНК, яка кодує комплементарний легкий або важкий ланцюг антитіла. У визначених варіантах здійснення цей другий експресуючий вектор ідентичний першому, за винятком кодуєчих послідовностей і селективних маркерів, щоб гарантувати функціональну експресію кожного поліпептидного ланцюга настільки, наскільки це можливо. Альтернативно кодуєчі послідовності важкого і

10 легкого ланцюгів для антитіла можуть знаходитися на одному векторі.
Вибрану клітину-хазяїна співтрансфікують загальноприйнятими способами як першим, так і другим векторами (або просто трансфікують одним вектором) з одержанням трансфікованої клітини-хазяїна за винаходом, що містить як рекомбінантні, так і синтетичні легкі і важкі ланцюги. Потім трансфіковану клітину культивують загальноприйнятими способами з

15 одержанням сконструйованого антитіла за винаходом. Скринінг антитіла, яке включає асоціацію як рекомбінантного важкого ланцюга, так і/або легкого ланцюга, проводять у культурі з використанням придатного аналізу, такого як ELISA або RIA. Для конструювання інших антитіл можна використовувати подібні загальноприйняті способи.
Придатні вектори для стадій клонування і субклонування, використовуваних у способах, і

20 конструювання композицій за даним винаходом може вибрати фахівець у даній галузі. Наприклад, можна використовувати загальноприйнятую серію клонуючих векторів pUC. Один вектор, pUC19, є комерційно доступним. Компоненти таких векторів, наприклад реплікони, селективні гени, енхансери, промотори, сигнальні послідовності і т. п., можна одержувати з

25 комерційних або природних джерел або можна синтезувати з використанням відомих методик, застосовуваних для контролю експресії і/або секреції продукту рекомбінантної ДНК в вибраному хазяїні. Для цієї мети можуть бути вибрані інші придатні експресуючі вектори, численні типи яких відомі в даній галузі для експресії в клітинах ссавців, бактерій, комах, дріжджів і грибів.

Також даний винахід охоплює клітинну лінію, трансфіковану рекомбінантною плазмідною, що містить кодуєчі послідовності антитіла за даним винаходом. Клітини-хазяїни, придатні для

30 клонування й інших маніпуляцій цими клонуючими векторами, також є загальновідомими.
Придатні клітини-хазяїни або клітинні лінії для експресії антитіла за винаходом включають клітини ссавців, такі як NS0, Sp2/0, CHO (наприклад, DG44), COS, HEK, фібробластну клітину (наприклад, 3T3) і клітини мієломи, наприклад, їх можна експресувати у клітинах CHO або клітинах мієломи. Можна використовувати клітини людини, таким чином забезпечуючи

35 модифікацію молекули для характеру глікозилування людини. Альтернативно можна використовувати інші лінії прокаріотичних або еукаріотичних клітин. Вибір придатних клітин-хазяїнів ссавців і способів трансформації, культивування, ампліфікації, скринінгу і продукції продукту відомий у даній галузі.
Відповідно до даного винаходу передбачається спосіб продукування антитіла проти CD269

40 за даним винаходом, що зв'язує і нейтралізує активність CD269, який включає стадії: (а) надання першого вектора, кодуєчого важкий ланцюг антитіла; (b) надання другого вектора, кодуєчого легкий ланцюг антитіла; (c) трансформації клітини-хазяїна ссавця (наприклад, CHO) зазначеними першим і другим векторами; (d) культивування клітини-хазяїна зі стадії (c) в умовах, що сприяють секреції антитіла з зазначеної клітини-хазяїна в зазначене культуральне

45 середовище; (e) виділення секретованого антитіла стадії (d). Після експресії антитіла можна оцінювати відносно бажаних властивостей зв'язування з використанням способів, описаних у даному документі.

Винахід охоплює імунокон'югати (взаємозамінно позначувані як "кон'югати антитіло-лікарський засіб" або "ADC"), які містять антитіло відповідно до винаходу, як описано в даному

50 документі, включаючи, але не обмежуючись ними, антитіло, кон'юговане з одним або декількома цитотоксичними засобами, такими як хіміотерапевтичний засіб, лікарський засіб, інгібуючий ріст засіб, токсин (наприклад, білковий токсин, ферментативний токсин, що походить з бактерій, грибів, рослин або тварин, або їх фрагменти) або радіоактивний ізотоп (тобто радіокон'югат). Способи кон'югації лікарських засобів з білками, зокрема з антитілами, такими як

55 кон'югати антитіла проти CD269-лікарський засіб за даним винаходом, добре відомі (див., наприклад, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy (Reisfeld et al. eds., Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", Controlled Drug Delivery (Robinson et al. eds., Marcel Dekker, Inc., 2nd ed. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications (Pinchera et al. eds., 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., Academic Press, 1995); i Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev. 62:119-58. Також див., наприклад, публікацію PCT WO 89/12624).

5 Як правило, ADC або похідне ADC містить лінкерну область між лікарським засобом і антитілом проти CD269 або його похідним. Як відзначалося вище, у типових варіантах здійснення лінкер є розщеплюваним у внутрішньоклітинних умовах, так що розщеплення лінкера звільняє лікарський засіб від антитіла у внутрішньоклітинному середовищі. Наприклад, у деяких варіантах здійснення лінкер розщеплюється розщеплювальним засобом, присутнім у

10 внутрішньоклітинному середовищі (наприклад, у лізосомі або ендосомі, або кавеолі). Лінкер може являти собою, наприклад, пептидильний лінкер, який розщеплюється внутрішньоклітинним ферментом пептидазою або протеазою, включаючи, але не обмежуючись ними, лізосомальну або ендосомальну протеазу. В інших варіантах здійснення розщеплюваний лінкер є чутливим до pH, тобто чутливим до гідролізу при визначених значеннях pH. Як

15 правило, pH-чутливий лінкер гідролізується в кислих умовах. В інших варіантах здійснення лінкер розщеплюється у відновних умовах (наприклад, дисульфідний лінкер). У даній галузі відома множина дисульфідних лінкерів (див., наприклад, Wawrzynczak et al., Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimager and Therapy of Cancer (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987); також див. патент США № 4880935).

20 Як правило, лінкер по суті не є чутливим до позаклітинного середовища. В інших варіантах здійснення, що не є взаємовиключними, лінкер індукуює клітинну інтерналізацію. У визначених варіантах здійснення лінкер індукуює клітинну інтерналізацію, коли він кон'югований з лікарським засобом (тобто у випадку частини лінкер-лікарський засіб у ADC або похідному ADC, як описано в даному документі). В інших варіантах здійснення лінкер індукуює клітинну інтерналізацію, коли він кон'югований як з лікарським засобом, так і з антитілом проти CD269 або його похідним (тобто у випадку ADC або похідного ADC, як описано в даному документі). Множина лінкерів, які можна використовувати з композиціями і способами за винаходом, описана в WO 2004010957 під назвою "Drug Conjugates and Their Use for Treating Cancer, An Autoimmune Disease or an Infectious Disease", поданий 31 липня 2003 року, і тимчасовій заявці США № 60/400403, під

25 назвою "Drug Conjugates and their use for treating cancer, an autoimmune disease or an infectious disease", поданий 31 липня 2002 року (зміст якої включений в даний опис як посилання).

У визначених варіантах здійснення імунокон'югат містить антитіло, як описано в даному документі, включаючи, але не обмежуючись ними, антитіло і хіміотерапевтичний засіб або інший токсин. Ферментативно активні токсини і їх фрагменти, які можна використовувати,

35 включають А-ланцюг дифтерійного токсину, незв'язуючі активні фрагменти дифтерійного токсину, А-ланцюг екзотоксину (з *Pseudomonas aeruginosa*), А-ланцюг рицину, А-ланцюг абрину, А-ланцюг модецину, альфа-сарцин, білки *Aleurites fordii*, діантинові білки, білки *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII і PAP-S), інгібітор *tomomordica charantia*, курцин, кротин, інгібітор *saraonaria officinalis*, гелонін, мітогелін, рестриктоцин, феноміцин, еноміцин і трихотецени.

40 Доступні різні радіонукліди для одержання радіокон'югатів антитіл.

Антитіла або їх фрагменти за даним винаходом також можна кон'югувати з одним або декількома токсинами, включаючи, але не обмежуючись ними, каліхеаміцин, майтанзиноїди, доластатини, ауристатини, трихотецен і CC1065, і похідні цих токсинів, що мають токсичну активність. Придатні цитотоксичні засоби включають, але не обмежуються ними, ауристатин,

45 включаючи довалін-валін-долаізолейнін-долапроїн-фенілаланін (MMAF) і монометилауристатин Е (MMAE), а також форми складних ефірів MMAE, сполуки, що зв'язуються з малою борозенкою ДНК, засоби, алкілюючі малу борозенку ДНК, енедіїн, лекситропсин, дуокарміцин, таксан, включаючи паклітаксел і доцетаксел, пуроміцин, доластатин, майтанзиноїд і алкалоїд барвінку. Конкретні цитотоксичні засоби включають топотекан, морфоліно-доксорубіцин, ризоксин,

50 ціаноморфоліно-доксорубіцин, доластатин-10, ехіноміцин, комбретастантин, каліхеаміцин, майтанзин, DM-1, DM-4, нетропсин. Інші придатні цитотоксичні засоби включають антитубулінові засоби, такі як ауристатин, алкалоїд барвінку, подофілотоксин, таксан, похідне бакатину, криптофіцин, майтанзиноїд, комбретастантин або доластатин. Антитубуліновий засіб включає (AFP), MMAF, MMAE, ауристатин Е, вінкрестин, вінбластин, віндезин, вінорелбін, VP-16, камптотецин, паклітаксел, доцетаксел, епотилон А, епотилон В, нокодазол, колхіцини, колцимід, естрамустин, цематодин, дискодермолід, майтанзин, DM-1, DM-4 або елеутеробін.

У деяких варіантах здійснення імунокон'югат містить антитіло, кон'юговане з доластатинами або пептидними аналогами або похідними доластатину ауристатинами (патенти США №№ 5635483; 5780588). Було показано, що доластатини й ауристатини перешкоджають динаміці мікротрубочок, гідролізу GTP і поділу ядра і клітин (Woyke et al. (2001), Antimicrob. Agents and

60

Chemother. 45(12):3580-3584) і мають активність проти злоякісної пухлини (патент США № 5663149) і протигрибкову активність (Pettit et al. (1998), Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). Лікарські частини доластатину або ауристатину (які являють собою пентапептидні похідні доластатинів) можуть бути зв'язані з антитілом через N(аміно)-кінець C(карбоксильний)-кінець пептидної лікарської частини (WO 02/088172). Ілюстративні варіанти здійснення ауристатину включають зв'язані з N-кінцем лікарської частини монометилауристатину DE і DF, описані в "Monomethylvalin Compounds Capable of Conjugation to Ligands", патент США № 7498298. Як використовують у рамках винаходу, скорочене позначення "MMAE" стосується монометилауристатину E. Як використовують у рамках винаходу, скорочене позначення "MMAF" стосується довалін-валін-долаізолейнін-долапроїн-фенілаланіну.

Як правило, лікарські частини на основі пептидів можна одержувати шляхом формування пептидного зв'язку між двома або більше амінокислотами і/або пептидними фрагментами. Такі пептидні зв'язки можна одержувати, наприклад, способом рідкофазового синтезу (див. Schroder E. and Lubke K., "The Peptides", volume 1, pp. 76-136, 1965, Academic Press), що добре відомий в галузі хімії пептидів.

Як активний засіб, зв'язаний з антитілом або його фрагментом відповідно до винаходу, можна використовувати майтанзиноїди. Майтанзиноїди являють собою інгібітори мітозу, що діють, інгібуючи полімеризацію тубуліну. Майтанзин уперше був виділений з східноафриканського чагарнику *Maytenus serrata* (патент США № 3896111). Потім було відкрито, що визначені мікроорганізми також продукують майтанзиноїди, такі як майтанзинол і C-3 складні ефіри майтанзинолу (патент США № 4151042). Високоцитотоксичні майтанзиноїдні лікарські засоби можна одержувати з ансамітоцинових попередників, продукованих за допомогою ферментації мікроорганізмів, таких як *Actinosynnema*. Кон'югати антитіло-майтанзиноїд одержують шляхом хімічного зв'язування антитіла з молекулою майтанзиноїду без суттєвого зменшення біологічної активності як молекули антитіла, так і молекули майтанзиноїду. Див., наприклад, патент США № 5208020. У середньому 3-4 кон'югованих молекули майтанзиноїду на молекулу антитіла продемонстрували ефективність підвищення цитотоксичності відносно клітин-мішеней без негативного впливу на функцію або розчинність антитіла, хоча можна очікувати, що навіть одна молекула токсину/антитіла буде підсилювати цитотоксичність відносно застосування простого антитіла. Майтанзиноїди добре відомі в даній галузі і їх можна синтезувати відомими способами або виділяти з природних джерел.

Як активний засіб, зв'язаний з антитілом або його фрагментом відповідно до винаходу, можна використовувати окремі приклади каліхеаміцинового сімейства антибіотиків. Каліхеаміцинове сімейство антибіотиків здатне утворювати дволанцюжкові розриви ДНК у субпікомолярних концентраціях. Для одержання кон'югатів сімейства каліхеаміцинів, див. патенти США №№ 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001, 5877296. Інший протипухлинний лікарський засіб, з яким можна кон'югувати антитіло, являє собою QFA, що являє собою антифолат. Як каліхеаміцин, так і QFA, мають внутрішньоклітинні ділянки дії і складно проходять через плазматичну мембрану. Таким чином, клітинне захоплення цих засобів через опосередковувану антитілом інтерналізацію значно підсилює їх цитотоксичні ефекти.

Інші протипухлинні засоби, які можна кон'югувати з антитілами, включають BCNU, стрептозоїцин, вінкрестин і 5-фторурацил, сімейство засобів, у сукупності відомих як комплекс LL-E33288, описаний у патентах США №№ 5053394, 5770710, а також еспераміцини (патент США № 5877296). Крім того, даний винахід стосується імунокон'югата, утвореного між антитілом і сполукою з нуклеолітичною активністю (наприклад, рибонуклеаза або ДНК-ендонуклеаза, така як дезоксирибонуклеаза; ДНКаз). Для селективного руйнування пухлини антитіло може містити високорадіоактивний атом.

Фармацевтично прийнятний носій з точки зору даного винаходу може являти собою будь-який нетоксичний матеріал, що не надає значного шкідливого впливу на ефективність біологічної активності антитіла за даним винаходом. Очевидно, що характеристики носія залежать від шляху введення. Така композиція може містити, на доповнення до активної речовини і носія, розріджувачі, наповнювачі, солі, буфери, стабілізатори, солюбілізатори й інші матеріали, відомі в даній галузі. Складання фармацевтично прийнятних ексципієнтів і розчинів носіїв добре відоме фахівцям у даній галузі, так само, як і розробка придатних режимів дозування і лікування для застосування конкретних композицій, описаних у даному документі, у різних режимах лікування, включаючи, наприклад, пероральне, парентеральне, внутрішньовенне, інтраназальне і внутрішньом'язове введення і складання.

Лікарський засіб, також відомий як фармацевтична композиція, що містить активний інгредієнт (антитіло або фрагменти антитіла), може бути у формі, придатній для перорального

застосування, наприклад у формі таблеток, коржів, пастилок, водних або маслянистих суспензій, диспергованих порошків або гранул, емульсій, твердих або м'яких капсул або сиропів або еліксирів. Композиції, призначені для перорального застосування, можна одержувати будь-яким способом виробництва фармацевтичних композицій, відомим у даній галузі, і такі композиції можуть містити один або декілька засобів, вибраних із групи, що складається з підсолоджувачів, смакових добавок, барвників і консервантів, для забезпечення фармацевтично елегантних і приємних на смак препаратів. Таблетки містять активний інгредієнт у суміші з нетоксичними фармацевтично прийнятними ексципієнтами, що придатні для виробництва таблеток. Ці ексципієнти можуть являти собою, наприклад, інертні розріджувачі, такі як карбонат кальцію, карбонат натрію, лактоза, фосфат кальцію або фосфат натрію; гранулюючі речовини і розпушувачі, наприклад кукурудзяний крохмаль або альгінову кислоту, зв'язувальні речовини, наприклад крохмаль, желатин і гуміарабік, і мастильні речовини, наприклад стеарат магнію, стеаринову кислоту або тальк. Таблетки можуть бути непокритими або вони можуть бути покриті відомими способами, щоб уповільнити дезінтеграцію й усмоктування в шлунково-кишковому тракті і тим самим забезпечити безперервний вплив протягом більш тривалого періоду часу. Наприклад, може бути використаний такий матеріал з уповільненим вивільненням, як гліцерилмоностеарат або гліцерилдистеарат. Також вони можуть бути покритими. Даний винахід також стосується фармацевтичної композиції для місцевого застосування, перорального прийому, інгаляції або шкірної, підшкірної або внутрішньовенної ін'єкції. Фахівцю в даній галузі відомі носії і добавки, необхідні для конкретних форм застосування.

Коли терапевтично ефективну кількість активної речовини (антитіла або фрагментів антитіл) за винаходом вводять за допомогою внутрішньовенної, шкірної або підшкірної ін'єкції, активна речовина може мати форму парентерально прийнятного водного розчину, що не містить пірогенів.

Також винахід стосується введення терапевтично значимої кількості антитіла, як описано в даному документі, для лікування індивідуума, що має медичні порушення, як описано в даному документі. Як використовують у рамках винаходу, термін "терапевтично ефективна кількість" означає загальну кількість кожного активного компонента фармацевтичної композиції або способу, яка є достатньою для того, щоб продемонструвати суттєву користь у пацієнта. Кількість активної речовини у фармацевтичній композиції за даним винаходом залежить від природи і тяжкості стану, що піддається лікуванню, і від природи попередніх способів лікування, яким піддавався пацієнт. Можна вводити більш високі дози доти, поки не досягнуть оптимального терапевтичного ефекту для пацієнта, і в цей момент дозування більше не збільшують.

Одержання таких парентерально прийнятих розчинів, що мають необхідне значення рН, ізотонічність, стабільність і т. п., входить у межі кваліфікації фахівця в даній галузі. Переважна фармацевтична композиція для внутрішньовенної, шкірної або підшкірної ін'єкції повинна містити на доповнення до активної речовини ізотонічний носій, такий як хлорид натрію для ін'єкцій, розчин Рінгера для ін'єкцій, розчин декстрози для ін'єкцій, розчин декстрози і хлориду натрію для ін'єкцій, лактатний розчин Рінгера для ін'єкцій або інший носій, відомий у даній галузі. Фармацевтична композиція за даним винаходом також може містити стабілізатори, консерванти, буфери, антиоксиданти або інші добавки, відомі фахівцям у даній галузі.

Очевидно, що доза антитіла, що вводиться, залежить від численних факторів, добре відомих у даній галузі, наприклад, таких як хімічна природа і фармацевтичний склад антитіла і маса тіла, поверхня тіла, вік і стать пацієнта, а також час і шлях введення. Для дорослого ілюстративна доза може складати від 0,001 мг до 1 г на добу, переважно від 0,1 мг до 100 мг на добу, більш переважно від 1 мг до 100 мг на добу, ще більш переважно від 5 мг до 10 мг на добу. У випадку безперервної інфузії ілюстративна доза може складати від 0,01 мг до 100 мг, переважно від 1 мг до 10 мг на кілограм маси тіла на хвилину.

В іншому аспекті даного винаходу передбачається антитіло відповідно до винаходу, як описано в даному документі, для застосування для лікування опосередкованого В-клітинами або опосередкованого плазмочитами захворювання або опосередкованого антитілом захворювання або порушення, вибраного з множинної мієломи (MM), хронічного лімфоцитарного лейкозу (CLL), несекреторної множинної мієломи, в'ялотекучої множинної мієломи, моноклональної гаммапатії невизначеного значення (MGUS), ізольованої плазмочитоми (кісткова, екстремедулярна), лімфоплазматичної лімфоми (LPL), макроглобулінемії Вальденстрема, плазмоклітинного лейкозу, первинного амілоїдозу (AL), хвороби важких ланцюгів, системного червоного вовчака (SLE), синдрому POEMS/остеосклеротичної мієломи, кріоглобулінемії типу I і II, хвороби накопичення легких ланцюгів, синдрому Гудпасчера, ідіопатичної тромбоцитопенічної пурпури (ITP), гострого

гломерулонефриту, пемфігусу і пемфігоїдних порушень, і набутого бульозного епідермолізу або будь-якого В-клітинного лейкозу по типу неходжкінської лімфоми або лімфоми Ходжкіна (HL) з експресією ВСМА, або будь-яких захворювань, при яких у пацієнтів розвиваються нейтралізуючі антитіла до замісної терапії рекомбінантним білком, де зазначений спосіб включає стадію введення зазначеному пацієнту терапевтично ефективної кількості антитіла, як описано в даному документі.

В-клітинні порушення можна підрозділити на дефекти розвитку В-клітин/продукції імунoglobulinів (імунодефіцити) і надмірну/неконтрольовану проліферацію (лімфоми, лейкози). Як використовують у рамках винаходу, В-клітинне порушення належить до обох типів захворювань, і передбачаються способи лікування В-клітинних порушень антитілом.

В одному аспекті даного винаходу захворювання являє собою множинну мієлому.

Також передбачається застосування антитіла, як описано в даному документі, для виробництва лікарського засобу для лікування захворювань і порушень, як описано в даному документі.

Наприклад, в одному аспекті винаходу передбачається застосування антитіла, як описано в даному документі, для лікування або профілактики захворювань і порушень, що відповідають на модулювання (таке як інгібування або блокування) взаємодії між ВСМА і лігандами BAFF і APRIL.

В одному варіанті здійснення винаходу виділене антитіло або фрагмент антитіла призначені для лікування В-лімфоцитарних злоякісних пухлин, таких як лімфома Ходжкіна.

В одному варіанті здійснення винаходу виділене антитіло або фрагмент антитіла призначені для застосування для лікування аутоімунного захворювання, такого як медичне порушення, асоційоване з запаленням, переважно аутоімунне захворювання з запальним компонентом, де аутоімунне захворювання вибрано з артеріїту Такаюса, гігантоклітинного артеріїту, сімейної середземноморської пропасниці, хвороби Кавасакі, вузликового поліартеріїту, шкірного вузликового поліартеріїту, асоційованого з гепатитом артеріїту, синдрому Бехчета, гранулематозу Вегенера, ANCA-васкулітів, синдрому Черджа-Стросс, мікроскопічного поліангіїту, васкуліту при захворюваннях сполучної тканини, пурпури Геноха-Шенлейна, кріоглобулінемічного васкуліту, шкірного лейкоцитокластичного ангіїту, тропічного аортиту, саркоїдозу, синдрому Когана, синдрому Віскотта-Олдрича, лепроматозного артеріїту, первинного ангіїту ЦНС, облітеруючого тромбангіїту, паранеопластичного артеріїту, кропивниці, хвороби Дегоса, мієлодиспластичного синдрому, стійкої піднесеної еритеми, синдрому гіперімунoglobulinу D, алергічного риніту, бронхіальної астми, хронічного обструктивного захворювання легень, періодонтиту, ревматоїдного артриту, атеросклерозу, амілоїдозу, хвороби Крона, виразкового коліту, аутоімунного міозиту, цукрового діабету, розсіяного склерозу, синдрому Гійєна-Барре, гістіоцитозу, остеоартриту, atopічного дерматиту, періодонтиту, хронічного риносинуситу, псоріазу, псоріатичного артриту, мікроскопічного коліту, фіброзу легень, гломерулонефриту, хвороби Уїппла, хвороби Стілла, вузлуватої еритеми, отиту, кріоглобулінемії, синдрому Шегрена, червоного вовчака, апластичної анемії, остеомієлофіброзу, хронічної запальної демієлінізуючої поліневропатії, хвороби Кімура, системної склеродермії, хронічного періаортиту, хронічного простатиту, ідіопатичного фіброзу легень, хронічного гранулематозного захворювання, ідіопатичної ахалазії, індукованого блеомицином запалення легень, індукованого цитарабіном запалення легень, аутоімунної тромбоцитопенії, аутоімунної нейтропенії, аутоімунної гемолітичної анемії, аутоімунної лімфоцитопенії, хвороби Чагаса, хронічного аутоімунного тиреоїдиту, аутоімунного гепатиту, тиреоїдиту Хашимото, атрофічного тиреоїдиту, хвороби Грейвса, аутоімунного полігландулярного синдрому, аутоімунного синдрому Аддісона, пемфігусу звичайного, пемфігусу листоподібного, герпетиформного дерматиту, аутоімунної алопеції, вітиліго, антифосфоліпідного синдрому, міастенії, синдрому ригідності м'язів, синдрому Гудпасчера, симпатичної офтальмії, фолікуліту, синдрому Шарпа і/або синдрому Еванса, зокрема сімної пропасниці, періодонтиту, атеросклерозу, ревматоїдного артриту, переважно ревматоїдного артриту або розсіяного склерозу.

Послідовності

Переважні послідовності антитіл за винаходом

SEQ ID NO:	Послідовність	Опис
SEQ ID NO: 1	QVQLQQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSRYWMSWVRRAPGKGLE WIGEINPDSSTINYAPSLKDKFIISRDNAKNTLYLQMSKVRSEDTALYYCA SLYYDYGDAMDYWGQGTSTVTVSS	HC (VH) миші
SEQ ID NO: 2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYWMSWVRQAPGKGLE WVGEINPDSSTINYAPSLKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ASLYYDYGDAMDYWGQGTSTVTVSS	HC, частково гуманізована
SEQ ID NO: 3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLV WVGEINPDSSTINYAPSLKDKFTISRDNANTLYLQM NSL RAEDTAVYYC ASLYYDYGDAMDYWGQGTSTVTVSS	hHC01
SEQ ID NO: 4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYW X₁ SWVRQAPGKGLV WVGEINP X₂X₃ STINYAPSLKDKFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYY CASLY X₄ DYGD X₅ DYWGQGTSTVTVSS, де X ₁ : I, F, L, V, Y, C, G, A, S, T, переважно I або F; X ₂ X ₃ : SS, NS, TS, GS, KS, RS, SD, SN, DE, переважно SS; X ₄ : Y, L, A, V, F, I, W, переважно Y; i/або X ₅ : Y, L, F, I, V, A, C, переважно Y	hHC02
SEQ ID NO: 5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRY X₁MX₂ WVRQAPGKGLV X₃VGX₄ INPDSSTINYAPSLKDKFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAS X₅X₆X₇ DYGD X₈ MDYWGQGTSTVTVSS де X ₁ : W, F, Y, переважно W; X ₂ : S, T, N, Q, D, E, переважно S; X ₃ : W, F, Y, переважно W; X ₄ : E, Q, переважно E; X ₅ : L, I, V, G, A, переважно L; X ₆ : Y, X, переважно Y; X ₇ : Y, F, L, I, V, M, переважно Y; i/або X ₈ : A, G, V, переважно A	hHC03
SEQ ID NO: 6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYW IS WVRQAPGKGLVW VGEINP NS STINYAPSLKDKFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA SLYYDYGD AYDY WGQGTSTVTVSS	hHC04
SEQ ID NO: 7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYW FS WVRQAPGKGLVW VGEINP NS STINYAPSLKDKFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA SLYYDYGD AYDY WGQGTSTVTVSS	hHC05
SEQ ID NO: 8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYW IS WVRQAPGKGLVW VGEINP SS STINYAPSLKDKFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA SLYYDYGD AYDY WGQGTSTVTVSS	hHC06
SEQ ID NO: 9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYW FS WVRQAPGKGLVW VGEINP SS STINYAPSLKDKFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA SLYYDYGD AYDY WGQGTSTVTVSS	hHC07
SEQ ID NO: 43	DIVMTQSQRFMTTSVGDRVSVTCKASQSVDSNVAWYQQKPRQSPKALI F SAS LRFSGVPARFTGSGSGTDFTLTISNLQSEDLAEYFC QQYNNYPLT FGATKLELKR	LC (VL) миші
SEQ ID NO: 10	DIVMTQSPATLSVSGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKPGQAPKLLIY SDDLRFSGVPARFSGSGSGTDFTLTIS SL QSEDFAVYYC QQYNNYPLTF GAGTKLELKR	LC, частково гуманізована
SEQ ID NO: 11	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVDSNVAWYQQKPGQAPRALI YSAS LRFSGIPARF SGSGSGTEFTLTIS SL QSEDFAVYYC QQYNNYPLTF GAGTKLELKR	hLC01
SEQ ID NO: 12	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVX₁X₂NVAWYQQKPGQAPRALI YSAS LRFSGIPARFSGSGSGTEFTLTIS SL QSEDFAVYYC QQYNNYPLTF GAGTKLELKR де X ₁ X ₂ : ES, SS, TS, QS, HS, DH, переважно ES	hLC02

Продовження таблиці

SEQ ID NO: 13	<p>EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVDX₁X₂VX₃WX₄QQKPGQAPRALIX₅AX₆AX₇AX₈RX₉SGIPARFSGSX₁₀X₁₁GTEFTLTISLQSEDFAVYYCX₁₂QX₁₃NNX₁₄PX₁₅TFGAGTKLELKR</p> <p>де</p> <p>X₁: S, H, T, N, D, Q; X₂: N, E, Q; X₃: A, G, V, S, T, L, I; X₄: Y, F, L, I, V, A, G; X₅: Y, F, L; X₆: S, T; X₇: S, T, D, N, H, E, Q; X₈: L, V, I, M; X₉: F, L, I, V, Y, M; X₁₀: G, X; X₁₁: S, X; X₁₂: Q, V, L, I, M; X₁₃: Y, F, L, I, Q; X₁₄: Y, F, R, Q, K; i/або X₁₅: L, I, V, F</p>	hLC03
SEQ ID NO: 14	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVESNVAWYQQKPGQAPRALIY SASLRFS GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQYNNYPLTFG AGTKLELKR	hLC04
SEQ ID NO: 15	RYWX ₁ S де X ₁ : I, F, L, V, Y, C, G, A, S, T, переважно I або F	H-CDR1 з PTM
SEQ ID NO: 16	EINPX ₂ X ₃ STINYAPSLKDK де X ₂ X ₃ : SS, NS, TS, GS, KS, RS, SD, SN, DE, переважно SS	H-CDR2 з PTM
SEQ ID NO: 17	SLYX ₄ DYGDAX ₅ DYW де X ₄ : Y, L, A, V, F, I, W, переважно Y; i/або X ₅ : Y, L, F, I, V, A, C, переважно Y	H-CDR3 з PTM
SEQ ID NO: 18	RYWIS	H-CDR1 з PTM a
SEQ ID NO: 19	RYWFS	H-CDR1 з PTM b
SEQ ID NO: 20	EINPNSSTINYAPSLKDK	H-CDR2 з PTM a
SEQ ID NO: 21	EINPSSSTINYAPSLKDK	H-CDR2 з PTM b
SEQ ID NO: 22	SLYYDYGDAYDYW	H-CDR3 з PTM a
SEQ ID NO: 23	KASQSVX ₁ X ₂ NVA де X ₁ X ₂ : ES, SS, TS, QS, HS, DH, переважно ES	L-CDR1 з PTM
SEQ ID NO: 24	SASLRFS	L-CDR2 з PTM
SEQ ID NO: 25	QQYNNYPLTFG	L-CDR3 з PTM
SEQ ID NO: 26	KASQSVDSNVA	L-CDR1 з PTM a

Продовження таблиці

SEQ ID NO: 27	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLV WVGEINPDSSTINYAPSLKDKFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ASLYYDYGDAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK	Повнорозмірна гуманізована НС
SEQ ID NO: 28	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWFSWVRQAPGKGLVW VGEINPSSSTINYAPSLKDKFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA SLYYDYGDAYDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK	Повнорозмірна гуманізована НС з мутаціями PTM 1 (FSY)
SEQ ID NO: 29	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWISWVRQAPGKGLVW VGEINPSSSTINYAPSLKDKFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA SLYYDYGDAYDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK	Повнорозмірна гуманізована НС з мутаціями PTM 2 (ISY)
SEQ ID NO: 30	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCASQSVDSNVAWYQQKPGQAPRALIY SASLRFSGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNTPLTFG AGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVДHKLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVT HQLSSPVTKSFNRGEC	Повнорозмірна гуманізована LC
SEQ ID NO: 31	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCASQSVESNVAWYQQKPGQAPRALIY SASLRFSGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNTPLTFG AGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVДHKLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVT HQLSSPVTKSFNRGEC	Повнорозмірна гуманізована LC з мутаціями PTM

Переважають нуклеотидні послідовності

SEQ ID NO: 32	GAATTCCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAAC TGCAACCGGTGTCCACAGTGAAGTGCAGCTGGTCTGAATCTGGAGGA GGCCTGGTTCAGCCTGGTGGCAGCCTTAGGCTCTCTTGTGCAGCCT CTGGCTTTACCTTCTCACGGTATTGGATGAGCTGGGTGAGACAGGCT CCAGGGAAAGGTCTGGTGTGGGTAGGGGAGATAAACCCCGATAGCA GCACGATCAACTATGCTCCGTCACTGAAAGACAAGTTCACCATTTCC CGCGATAATGCCAAGAACAACCTCTCTACTTGCAGATGAATCCCTTCG AGCCGAGGATACAGCGGTGTACTACTGCGCCAGTCTGTACTacgactAT GGGGACGCAATGGACTATTGGGGACAAGGCACACTGGTGACTGTTA GCTCCGCGTCGACCAAGGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTC CTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT CAAGGACTACTTCCCCGAACCTGTGACGGTCTCGTGGAACCTCAGGC GCCCTGACCAGCGGCGTGACACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCT CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAG CTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCA ACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAC CACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGT CAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC CGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCC CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACC AGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGA CCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGC AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCT CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG AGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATGAGTGCGACGGCCGGGCGGC GGCGGCGGATCC	Повнорозмірна гуманізована НС
------------------	---	----------------------------------

Продовження таблиці

SEQ ID NO: 33	GAATTCCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAAC TGCAACCGGTGTCCACAGTGAAGTGCAGCTGGTCGAATCTGGAGGA GGCCTGGTTACGCTGGTGGCAGCCTTAGGCTCTCTTGTGCAGCCT CTGGCTTTACCTTCTCACGGTATTGGTTCAGCTGGGTGAGACAGGCT CCAGGGAAAGGTCTGGTGTGGGTAGGGGAGATAAACCCACAGCAGCA GCACGATCAACTATGCTCCGTCACTGAAAGACAAGTTCACCATTTCC CGCGATAATGCCAAGAACAACCTCTCTACTTGCAGATGAATTCCTTCG AGCCGAGGATACAGCGGTGTACTACTGCGCCAGTCTGTACTACGACT ATGGGGACGCATACGACTATTGGGGACAAGGCACACTGGTGACTGT TAGCTCCGCGTCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCC TCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCTGTGACGGTCTCGTGGAACCTCAG GCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTC CTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGC AGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCACAG CAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAA CTCACACATGCCACCGTGCCACAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACC GTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCT CCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA TGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC CACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAA CCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACA AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTAT AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG AAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATGAGTGCGACGGCCGGGCG GCGGCGGGCGGATCC	Повнорозмірна гуманізована НС з мутаціями РТМ 1
------------------	---	--

Продовження таблиці

SEQ ID NO: 34	GAATTCCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAAC TGCAACCGGTGTCCACAGTGAAGTGCAGCTGGTCGAATCTGGAGGA GGCCTGGTTTCAGCCTGGTGGCAGCCTTAGGCTCTCTTGTGCAGCCT CTGGCTTTACCTTCTCACGGTATTGgaTCAGCTGGGTGAGACAGGCT CCAGGGAAAGGTCTGGTGTGGGTAGGGGAGATAAACCCCAGCAGCA GCACGATCAACTATGCTCCGTCACTGAAAGACAAGTTCACCATTTCC CGCGATAATGCCAAGAACAACCTCTCTACTTGCAGATGAATTCCTTCG AGCCGAGGATACAGCGGTGTACTACTGCGCCAGTCTGTACTACGACT ATGGGGACGCATACGACTATTGGGGACAAGGCACACTGGTGACTGT TAGCTCCGCGTCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCC TCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCTGTGACGGTCTCGTGGAACCTCAG GCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTC CTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGC AGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAG CAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAA CTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACC GTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCT CCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGA AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA TGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC CACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAA CCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACA AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTAT AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCT TCTATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG AAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATGAGTGCGACGGCCGGGCG GCGGCGGGGATCC	Повнорозмірна гуманізована НС з мутаціями PTM 2
SEQ ID NO: 35	GAATTCCACCATGGGATGGTcATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACT GCAACCGGTGTACACTCCGAGATCGTGATGACCCAGTCTCCTGCTAC CCTGAGCGTTTTCTCCCGGTGAAAGGGCCACACTCAGCTGCAAAGCC TCTCAAAGCGTGGACAGCAATGTCGCCTGGTATCAGCAGAAACCTGG CCAAGCTCCGAGAGCACTGATCTATTCCGCGTCATTGCGCTTTTCCG GCATACCAGCACGGTTTAGTGGCTCAGGGAGTGGGACTGAGTTCAC TCTGACGATTAGCTCCCTTCAGTCAGAGGATTTGCGCGTGTACTACT GTCAGCAGTACAACAACCTATCCCCTCACATTCGGAGCTGGAACCAAG CTGGAACCTGAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCC TGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTG GATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGC AGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCT GAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCA CCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGG AGAGTGTTAGGGATCC	Повнорозмірна гуманізована LC

Продовження таблиці

SEQ ID NO: 36	GAATTCCACCATGGGATGGtATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACT GCAACCGGTGTACACTCCGAGATCGTGATGACCCAGTCTCCTGCTAC CCTGAGCGTTTCTCCCGGTGAAAGGGCCACACTCAGCTGCAAAGCC TCTCAAAGCGTGGAGAGCAATGTGCGCTGGTATCAGCAGAAACCTG GCCAAGCTCCGAGAGCACTGATCTATCCGCGTCATTGCGCTTTTCC GGCATACCAGCACGGTTTAGTGGCTCAGGGAGTGGGACTGAGTTCA CTCTGACGATTAGCTCCCTTCAGTCAGAGGATTCGCCGTGTACTAC TGTCAGCAGTACAACAACACTATCCCCTCACATTCCGAGCTGGAACCAA GCTGGAACCTGAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCC CGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGC CTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGT GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAG CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGC TGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTC ACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGG GAGAGTGTTAGGGATCC	Повнорозмірна гуманізована LC з мутаціями PTM
---------------	--	--

Переважні послідовності за винаходом, що належать до CD269 (BCMA)

SEQ ID NO:	Послідовність	Опис
SEQ ID NO: 37	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELG LEFPNLPYYIDGDVKLTQSMARIYIADKHNMLGGCPKERAISMLEGAVL DIRYGVSR IAYS KDFETLKVDFLSKLP EMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTH PDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIA WPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSMAGQCSQNEYFDSLLHACIPC QLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNALEHHHHHH	GST-BCMA-His
SEQ ID NO: 38	MAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKG TNALE	Позаклітинний домен BCMA
SEQ ID NO: 39	MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNS VKGTNALE	N-кінцева послідовність BCMA
SEQ ID NO: 40	YFDSLLHACIPCQLRCSSNT	Епітоп антитіла проти BCMA - амінокислоти 13-32 BCMA

5

Переважні узагальнені амінокислотні послідовності, які містять модифікації гуманізованої послідовності

SEQ ID NO:	Послідовність	Опис
SEQ ID NO: 41	X ₁ VQLX ₂ X ₃ SGGGLVQPGGSLX ₄ LSCAASGX ₅ X ₆ FX ₇ X ₈ YWZ ₁ SWVRX ₉ AP GKGLEWX ₁₀ GEINPZ ₂ SSTINYAPSLKX ₁₁ X ₁₂ FX ₁₃ ISRDNANTLYLQMX ₁₄ X ₁₅ X ₁₆ RX ₁₇ EDTAX ₁₈ YYCASLYDYGDZ ₃ DYWGQGTGX ₁₉ VTVSS, де X ₁ : Q, E; X ₂ : Q, V; X ₃ : Q, E; X ₄ : K, R; X ₅ : I, F; X ₆ : D, T; X ₇ : S, D; X ₈ : R, D; X ₉ : R, Q; X ₁₀ : I, V; X ₁₁ : D, G; X ₁₂ : K, R; X ₁₃ : I, T; X ₁₄ : S, N; X ₁₅ : K, S; X ₁₆ : V, L; X ₁₇ : S, A; X ₁₈ : L, V; X ₁₉ : S, L; і де щонайменше один з Z ₁ : I або F; Z ₂ : S; i/або Z ₃ : Y	Загальна послідовність для антитіл з гуманізованою НС, що містить делеційні модифікації PTM
SEQ ID NO: 42	DIVMTQSX ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ SVGD ₇ VX ₈ X ₉ TCKASQSVESNVAWYQQKPX ₁₀ QX ₁₁ PKX ₁₂ LIX ₁₃ SX ₁₄ X ₁₅ LRFSGVPARFX ₁₆ GSGSGTDFTLTISX ₁₇ LQSED X ₁₈ AX ₁₉ YX ₂₀ CQQYNNYPLTFGAGTKLELKR, де X ₁ : Q, P; X ₂ : R, A; X ₃ : F, T; X ₄ : M, L; X ₅ : T, S; X ₆ : T, V; X ₇ : R, E; X ₈ : S, T; X ₉ : V, L; X ₁₀ : R, G; X ₁₁ : S, A; X ₁₂ : A, L; X ₁₃ : F, Y; X ₁₄ : A, D; X ₁₅ : S, D; X ₁₆ : T, S; X ₁₇ : N, S; X ₁₈ : L, F; X ₁₉ : E, V; X ₂₀ : F, Y	Загальна послідовність для антитіл з гуманізованою LC, що містить делеційні модифікації PTM

Креслення

Винахід демонструється як приклад за допомогою прикладів і креслень, описаних у даному документі. На кресленнях, представлених у даному описі, показані конкретні варіанти здійснення винаходу і вони не призначені для обмеження обсягу винаходу. Креслення потрібно розглядати як надання додаткового опису можливих і потенційно переважних варіантів здійснення, що підкріплюють технічне підтримання одного або декількох необмежувальних варіантів здійснення.

Короткий опис креслень

Фіг. 1. Охарактеризація J22.9-хi *in vitro*.

Фіг. 2. Структура CD269 (BCMA) і комплексу J22.9-хi Fab:CD269.

Фіг. 3. Цитотоксичність J22.9-хi *in vitro*.

Фіг. 4. Ефективність J22.9-хi у мишей NSG із ксенотрансплантатами.

Фіг. 5. Лікування розвинених пухлин.

Фіг. 6. Лікування пухлини на ранній фазі захворювання.

Фіг. 7. Нестабільність гібридоми J22.9.

Фіг. 8. Послідовності гуманізованих послідовностей HC у порівнянні з J22.9-хi.

Фіг. 9. Послідовності гуманізованих послідовностей LC у порівнянні з J22.9-хi.

Фіг. 10. Варіанти J22.9-хi з оптимізованою послідовністю демонструють подібне зв'язування в ELISA.

Фіг. 11. Варіанти J22.9-хi з оптимізованою послідовністю демонструють подібне зв'язування при проточній цитометрії.

Фіг. 12. Вихідні дані SPR.

Фіг. 13. Гель-електрофорез варіантів антитіл.

Докладний опис креслень

Фіг. 1. Охарактеризація J22.9-хi *in vitro*. Залежне від концентрації зв'язування J22.9-хi з BCMA у (a) ELISA і (b) проточній цитометрії з використанням CD269-позитивних клітин MM.1S. (c) Афіність зв'язування J22.9-хi з BCMA визначали з вимірювань способом поверхневого плазмонного резонансу з зазначеними концентраціями BCMA. (d) J22.9-хi блокує взаємодію між BAFF і BCMA, адсорбованим на мікропланшетах для титрування.

Фіг. 2. (a) Поверхня розпізнавання CD269 (BCMA). Три види на позаклітинний домен CD269 (BCMA), що демонструють зв'язування залишків епітопів BAFF/APRIL і J22.9-хi. Зверху представлений вигляд безпосередньо поверхні зв'язування CD269 (BCMA): ясно-сіре виділення кольором вказує на всі залишки, що складають зв'язуваний епітоп BAFF і APRIL, як ідентифіковано з їх кристалічних структур, чорні залишки (показані як сфери) не контактують з жодним з BAFF, APRIL або J22.9-хi; підгрупа залишків епітопів, залучених у зв'язування J22.9-хi, показана в поверхневому представленні; інші ясно-сірі залишки, показані у вигляді сфер, є частиною епітопів як BAFF, так і APRIL, однак не мають прямих контактів з J22.9-хi. На середніх і нижніх панелях показане те ж представлення, що і на верхній панелі, однак з обертанням на 90° у напрямку до і від глядача, відповідно. (b) Два вигляди комплексу J22.9-хi Fab:CD269. J22.9-хi показане в поверхневому представленні з важким ланцюгом, зафарбованим ясно-сірим кольором, і легким ланцюгом, зафарбованим темно-сірим кольором. CD269 (BCMA) показаний у стрічковому представленні, зв'язаний з антигенним карманом J22.9-хi. Ліворуч представлений повний вигляд комплексу Fab:CD269; праворуч представлений комплекс, нахилений у бік глядача для демонстрації зв'язувального кармана.

Фіг. 3. Цитотоксичність J22.9-хi *in vitro*. (a) CD269-позитивні клітини MM.1S-Luc, змішані з PBMC людини у співвідношенні ефектора і мішені 20:1, інкубували з зазначеними концентраціями J22.9-хi протягом 4 годин. Незафарбовані символи вказують на цитотоксичну активність J22.9-хi без N-гліканів при інкубації з PBMC від донорів 1 і 2. Планки похибки вказують на SEM. (b) Деглікозилювання не впливає на зв'язування J22.9-хi з клітинами MM.1S. (c) Зберігання J22.9-хi протягом 3 тижнів при 4°C або -80°C не впливає на цитотоксичність.

Фіг. 4. Ефективність J22.9-хi у мишей NSG із ксенотрансплантатами. (a) Розвиток пухлини з перебігом часу при введенні 200 мкг J22.9-хi або контрольного антитіла два рази на тиждень або у контрольних мишей без введення. (b) Загальне пухлинне навантаження між 6 і 41 добами (площа під кривою (AUC) (a)). На графік нанесені середні значення з SEM (**P<0,01, ***P<0,001, t-критерій). (c) Загальна виживаність мишей, яким вводили J22.9-хi і ізотипічний контроль. Значення P обчислювали з використанням логарифмічного рангового критерію (Мантеля-Кокса). (d-1) Виявлення клітин MM.1S-Luc у зазначених групах без введення терапевтичного антитіла. Числа (41, 41, 44, 40) нижче крайнього праворуч зображення вказують на кількість діб після ін'єкції пухлинних клітин, на які конкретна миша загинула. (d-2) Виявлення клітин MM.1S-Luc у зазначених групах на 21 і 28 добу. Вид ззаду. (e) Взаємозв'язок між концентрацією J22.9-хi

і розвитком пухлини. (f) Загальне пухлинне навантаження між 6 і 42 добами (AUC для (e)). Середні величини з SEM (**P<0,01, ***P<0,001, t-критерій). (g) Огляд хронології експерименту.

Фіг. 5. Лікування розвинених пухлин. (a) Розвиток пухлини з перебігом часу при введенні 200 мкг J22.9-хі або контрольного антитіла два рази на тиждень або у контрольних мишей без введення. (b) Загальне пухлинне навантаження між добами 8 і 48 (AUC для (a)). На графік нанесені середні значення з SEM (*P<0,05, **P<0,01, t-критерій). (c) Загальна виживаність у мишей з J22.9-хі і мишей з ізотипічним контролем. Значення P обчислювали з використанням логарифмічного рангового критерію (Мантеля-Кокса). Огляд хронології експерименту представлений на Фіг. 5d.

Фіг. 6. Лікування пухлини на ранній фазі захворювання. (a) Динаміка росту пухлини при лікуванні 2 мкг, 20 мкг або 200 мкг J22.9-хі або 200 мкг або ізотипічного контрольного антитіла, або J22.9-хі без N-гліканів, і без пухлини. (b) Загальне пухлинне навантаження протягом діб з 9 по 44 (AUC для (a)). Показані середні значення з SEM (*P<0,05, **P<0,01, t-критерій). (c) Виживання мишей SCID-Beige із ксенотрансплантатом, яких лікували антитілом, і контрольних мишей. Значення P обчислювали з використанням логарифмічного рангового критерію (Мантеля-Кокса). Огляд хронології експерименту представлений на Фіг. 6d.

Фіг. 7. Нестабільність гібридами J22.9. Супернатант гібридами J22.9 мав позитивні результати дослідження на зв'язування з BCMA у ELISA на покритих BCMA мікропланшетах для титрування на 1 добу. Наступний аналіз у зазначені моменти часу виявив зниження зв'язувальної здатності супернатанту. Середовище заміняли на 7, 14 і 21 добу.

Фіг. 8. Узагальнення послідовностей гуманізованих антитіл у порівнянні з J22.9-хі. Порівняння послідовностей проводили з використанням стандартного програмного забезпечення для вирівнювання.

Фіг. 9. Узагальнення послідовностей гуманізованих антитіл у порівнянні з J22.9-хі. Порівняння послідовностей проводили з використанням стандартного програмного забезпечення для вирівнювання.

Фіг. 10. Зв'язування химерного J22.9-хі і гуманізованих варіантів досліджували за допомогою ELISA з використанням мікропланшетів для титрування, покритих BCMA людини (hBCMA) або BCMA яванського макака (суBCMA) (J22.9-Н відповідає гуманізованій послідовності SEQ ID NO: 27; J22.9-FSY відповідає гуманізованій і модифікованій відносно PTM SEQ ID NO: 28; J22.9-ISY відповідає гуманізованій і модифікованій відносно PTM SEQ ID NO: 29).

Фіг. 11. Зв'язування химерного J22.9-хі і гуманізованих варіантів досліджували проточною цитометрією з використанням клітинної лінії MM людини RPMI-8226 (J22.9-FSY відповідає гуманізованій і модифікованій відносно PTM SEQ ID NO: 28; J22.9-ISY відповідає гуманізованій і модифікованій відносно PTM SEQ ID NO: 29).

Фіг. 12. Вихідні дані SPR: афінність зв'язування химерного J22.9-хі і гуманізованих варіантів з BCMA людини (Фіг. 12A) і яванського макака (Фіг. 12B) вимірювали з використанням спектрометрії поверхневого плазмонного резонансу (SPR). IgG іммобілізували за допомогою хімії амінів на сенсорному чипі Proteon GLH і зв'язування вимірювали з використанням BCMA у рухомій фазі. Порядок кривих вихідних даних на графіку відповідає порядку зразків, наведених на легенді фігури.

Фіг. 13. Гель-електрофорез варіантів антитіл. Варіанти антитіл аналізували в невідновному SDS-PAGE і забарвлювали для демонстрації міграції білків.

Приклади

Винахід демонструється за допомогою прикладів, описаних у даному документі. Приклади, надані в даному описі, являють собою тільки конкретні варіанти здійснення винаходу і не призначені для обмеження обсягу винаходу. Приклади варто вважати такими, що забезпечують додатковий опис можливих і потенційно переважних варіантів здійснення, що підкріплюють технічне підтримання одного або декількох необмежувальних варіантів здійснення.

Хоча приклади відносно кристалізації комплексу антитіло-епітоп і протипухлинного ефекту *in vitro* і *in vivo* були наведені з використанням вихідного химерного антитіла J22.9-хі, автори винаходу показали, що ці технічні ефекти зберігаються для гуманізованих варіантів за даним винаходом, унаслідок збереження характеристик зв'язування у гуманізованих варіантів у порівнянні з дослідженим вихідним химерним антитілом. Таким чином, дані, надані для химерного антитіла, надані як довідковий матеріал і для представлення промислової застосовності і корисності заявлених людських варіантів. Попередні біологічні дані вказують на порівнянні ефекти між J22.9-хі і гуманізованими варіантами.

Характеристики зв'язування і блокування взаємодії J22.9-хі і BCMA

Нове химерне антитіло (J22.9-хі) зв'язується з позаклітинним доменом CD269 людини (BCMA, TNFRSF17). Початково це було встановлено за допомогою ELISA і проточної цитометрії

на клітинній лінії множинної мієломи людини MM.1S (Фіг. 1а, b). Афінність J22.9-хі до BCMA визначали з використанням поверхневого плазмонного резонансу (SPR). Середня K_d складає 54 пМ, як показано на Фіг. 1с.

Відомо, що BCMA запускає сигнали, важливі для виживання клітин множинної мієломи і плазмочитів *in vivo*, за допомогою взаємодії з його лігандами BAFF і/або APRIL (Mackay F. et al. (2003), *Annu. Rev. Immunol.* 21:231-264). Таким чином, проводили аналіз блокування *in vitro* з позаклітинним доменом BCMA людини і рекомбінантним BAFF. Зв'язування J22.9-хі з BCMA явно блокує взаємодію між рецептором і його лігандом BAFF. При використанні ізотипічного контрольного антитіла замість J22.9-хі зв'язування рекомбінантного BAFF з BCMA не змінювалося (Фіг. 1d).

Кристалічна структура комплексу J22.9-хі-Fab-BCMA демонструє широку поверхню зв'язування з BCMA

Fab-фрагменти, одержані з J22.9-хі, кристалізували в комплексі з очищеним позаклітинним доменом BCMA з 46 амінокислотних залишків, і структуру комплексу визначали до розрізнення 1,9 ангстрема. Електронну щільність високої якості спостерігали для залишків 6-41 BCMA, і вони демонструють велику взаємодію з J22.9-хі, в основному з легким ланцюгом антитіла (Фіг. 2В). Ця поверхня контакту, що охоплює 740,4 квадратних ангстрема і залучає одну третину залишків BCMA, охоплює 12 з 16 залишків ідентичного епітопа, спостережуваних в кристалічних структурах комплексів BCMA з APRIL і sTALL1 (також відомого як BAFF), включаючи консервативний мотив DxL (Gordon N. C. et al. (2003), BAFF/BlysS receptor 3 comprises a minimal TNF receptor-like module that encodes a highly focused ligand-binding site. *Biochemistry* 42(20):5977-83, і Patel D. R. et al. (2004), Engineering an APRIL-specific B Cell Maturation Antigen. *JBC* 279(16):16727-35), забезпечуючи чітке обґрунтування блокувального ефекту, спостережуваного в аналізах *in vitro* з BAFF (Фіг. 2А). Взаємодія з J22.9-хі, крім того, включає прямий контакт бічного ланцюга з Ala20 і Pro23 у BCMA, залишками, що не є частиною зв'язуваного епітопа, охоплюваного BAFF і APRIL, і декілька опосередковуваних водою водневих зв'язків. Загальна конформація BCMA у всіх трьох структурах є у високому ступені подібною, з С-альфа rmsd 1,4 ангстрема для комплексів J22.9-хі і APRIL і 1,5 ангстрема для комплексів J22.9-хі і sTALL1; відповідні С-альфа rmsd для зв'язуваного J22.9-хі епітопа BCMA (залишки 13-30) складають 0,98 і 0,88 ангстрема. Незважаючи на розпізнавання того ж епітопа BCMA, що має мотив DxL у його центрі, ділянка зв'язування J22.9-хі значною мірою відрізняється від ділянок зв'язування sTALL1 і APRIL, також як і сукупність взаємодій, що утворюють поверхню контакту.

Як можна бачити на Фіг. 2В і в таблицях 1 і 2, 19 амінокислот з J22.9-хі (6 з важкого ланцюга (таблиця 1), 13 з легкого ланцюга (таблиця 2)) утворюють прямі зв'язки з 12 залишками з позаклітинного домену CD269.

Таблиця 1

Перелік взаємодій амінокислот між важким ланцюгом J22.9-хі і BCMA. Цей перелік взаємодій був одержаний з використанням програмного забезпечення PDBsum (Laskowski R. A. (2009))

Важкий ланцюг		CD269
Trp33	>	His19
Glu50	>	His19
Leu99	> >	Leu17 Leu18
Tyr100		Leu18
Tyr101	> > >	Ala20 Ile22 Pro23
Ala106	>	Leu18

Таблиця 2

Перелік взаємодій амінокислот між легким ланцюгом J22.9-хі і BCMA. Цей перелік взаємодій був одержаний з використанням програмного забезпечення PDBsum (Laskowski R. A. (2009))

Легкий ланцюг		CD269
Ser31	>	Arg27 Thr32
Ala34	>	Leu17
Tyr36	>	Leu17
Phe49	>	Leu18 Asp15

Таблиця 2 (продовження)

Легкий ланцюг		CD269
Ser50	>	Tyr13 Asp15 Arg27
Ser52	>	Arg27
Ser67	>	Thr32
Leu53	>	Tyr13 Leu26 Arg27
Phe55	>	Leu18
Gln89	>	Leu17
Tyr91	>	Asp15 Ser16 Leu17
Tyr94	>	His19
Leu96	>	Leu17

Таблиця 3

Перелік взаємодій залишків, залучених у зв'язування CD269:APRIL і CD269:BAFF (залишки, що не контактують прямо з J22.9, підкреслені). Цей перелік взаємодій був одержаний з використанням програмного забезпечення PDBsum (Laskowski R. A. (2009))

APRIL	CD269
Asp121	Leu35
Asp123	Pro33
	Pro34
	Leu35
Asp164	Asn31
Thr166	Arg27
	Ser30
Phe167	Tyr13
	Leu18
	Ile22
	Leu26
	Arg27
	Asn31
Thr168	Leu18
	Leu26
Met169	Leu17
Gly170	Leu17
	His19
Gln171	Leu17
Arg186	Leu17
	Leu18
	His19
Cys187	Leu17
Ile188	Asp15
	Leu17
	Leu18
Asp196	Leu26
Arg197	Leu26
Tyr199	Leu18
Pro221	Leu17
	His19
Arg222	Asp15
	Leu17
	Arg27
Asn224	Thr32
Lys226	Asn31

Таблиця 3 (продовження)

His232	His19
BAFF	CD269
Tyr22	Ser16
Asp62	Asn31
Lys63	Ser30
	Asn31
Thr64	Arg27
	Ser30
	Asn31
Tyr65	Tyr13
	Asp15
	Leu18
	Ile22
Ala66	Leu17
Met67	Leu17
Gly68	Leu17
Arg90	Leu17
	His19
Cys91	Leu17
Ile92	Leu17
	Leu18
Glu97	Ser29
	Ser30
	Asn31
Leu99	Ile22
	Leu26
Asn101	Leu18
Pro123	Ser16
	Leu17
Arg124	Tyr13
	Asp15
	Leu17
	Arg27
Glu125	Arg27
	Thr25
	Pro34
	Leu35
Asn126	Thr32
Asp132	His19

Таблиця 4

Залишки мішені CD269, що зв'язуються за допомогою прямих контактів J22.9, APRIL і/або BAFF.

Залишки мішені CD269, прямо контактуючі тільки з J22.9, підкреслені (20, 23). Залишки мішені CD269, що не контактують прямо з J22.9, виділені напівжирним шрифтом (30, 31, 33, 34, 35 для APRIL; 25, 29, 30, 31, 34, 35 для BAFF)

J22.9	13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 26, 27, 32
APRIL	13, 15, 17, 18, 19, 22, 26, 27, 30, 31, 32, 33, 34, 35
BAFF	13, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 34, 35

Таблиця 5

Водні взаємодії J22.9 (J22.9-xi:H₂O:CD269). Дані, наведені в таблиці 5, були одержані з використанням програмного забезпечення LigPlot (Wallace and Laskowski, European Bioinformatics Institute). (sc=Н-зв'язок бічного ланцюга; mc=Н-зв'язок основного ланцюга)

Легкий ланцюг	H ₂ O#	CD269
Ser31 (sc)	285	Thr32 (sc, mc)
	285, 286	Arg27 (sc)
	285, 286	Ser30 (sc)
Ser31 (mc)	283, 284	Arg27 (sc)
Asn32 (sc)	105	Asp15 (sc)
	105, 284	Arg27 (sc)
	56	Ser16 (sc)
Tyr36	66, 93, 450	Leu17 (mc)
Ser50 (sc)	105	Asp15 (sc)
Ser52 (sc)	286	Ser30 (sc)
	286	Arg27 (sc)
	286, 285	Thr32 (sc, mc)
Gly66 (mc)	287	Thr32 (sc)
	285, 286	Arg27 (sc)
	285, 286	Ser30 (sc)
Gln89 (sc)	66, 93, 450	Leu17 (mc)
Tyr91 (mc)	282	Ser16 (sc)
	282, 281	Ser16 (mc)
Tyr94 (sc)	281	Ser16 (mc)
	281, 282	Ser16 (sc)
Важкий ланцюг	H ₂ O#	CD269
Trp33 (mc)	42, 280	Leu17 (mc)
	183, 279, 26	Leu18 (mc)
Ser35 (sc)	42, 66, 93, 280, 450	Leu17 (mc)
Trp47 (sc)	93, 450	Leu17 (mc)
Glu50 (sc)	281	Ser16 (mc)
	281, 282	Ser16 (sc)
	450	Leu17 (mc)
	450, 280	Leu17 (mc)
Leu99 (mc)	280	Leu17 (mc)
Tyr101 (mc)	26	Leu18 (mc)

Виразена цитотоксична ефективність J22.9-xi суттєво знижується після деглікозилювання

- 5 Аналіз цитотоксичності на основі люциферази був розроблений з використанням трансдукованої люциферазої клітинної лінії MM.1S-Luc. У цьому аналізі біоломінесценція виявлялася тільки в живих клітинах, оскільки люцифераза, що вивільняється загиблими клітинами, не здатна функціонувати внаслідок нестачі АТФ у середовищі. PBMC від здорових донорів виділяли і змішували з клітинами MM.1S-Luc у співвідношенні 20 до 1. Через 4 години вимірювали біоломінесценцію.

- 10 За допомогою вибору 4 нестимульованих препаратів донорських PBMC визначали цитотоксичність J22.9-xi in vitro. Цитотоксичний потенціал дещо варіюється між PBMC від здорових донорів. Після інкубації протягом 4 годин клітинний лізис досягав 18-35% при концентрації 125 нг/мл J22.9-xi. Збільшення концентрації J22.9-xi до 1 мкг/мл підвищувало клітинний лізис на аж до 56% (Фіг. 3а).

- 15 Після деглікозилювання J22.9-xi (J22.9-xi-N-glycan) за допомогою PNGази F цитотоксична активність знижувалася до рівня нижче 8%, у той час як зв'язування J22.9-xi-N-glycan з позитивними по ВСМА клітинами MM.1S залишалося незмінним (Фіг. 3а, b).

J22.9-xi знижує пухлинне навантаження у мишей з ксенотрансплантатами і продовжує виживаність

- 20 Автори даного винаходу використовували мишей з нокаутом загального гамма-ланцюга

NOD scid (NSG), позбавлених функціональних популяцій B-, T- і NK-клітин. У цих мишей після ін'єкції 1×10^7 клітин MM.1S-Luc внутрішньовенно розвивається параліч задніх кінцівок у межах 6 тижнів (Фіг. 4d-1). День, у який з'являється перший симптом, визначають як день смертності.

Після ін'єкції 1×10^7 MM.1S-Luc у хвостову вену мишей випадковим чином розподіляли на 3 групи. У першій групі (n=2) лікування не проводили до кінця експерименту, у той час як у другій (n=5) і в третій (n=6) групах проводили ін'єкції два рази на тиждень 200 мкг ізотипічного контролю або антитіла J22.9-хі, відповідно. Антитіла вводили протягом 6 тижнів внутрішньоочеревинно (в/о), починаючи в день ін'єкції пухлинних клітин. Моніторинг росту пухлини проводили один раз на тиждень з використанням IVIS Spectrum. Вимірювання біolumінесценції проводили через 3 хвилини після в/о ін'єкції люциферину.

Подібний перебіг розвитку пухлини спостерігали як у групі без введення, так і в групі, у якій вводили контрольне антитіло, у той час як група, у якій вводили J22.9-хі, продемонструвала значно менше пухлинне навантаження, починаючи вже з першого моменту вимірювання на шосту добу (Фіг. 4a). Крім того, ця група продемонструвала менше загальне пухлинне навантаження протягом усього періоду моніторингу (Фіг. 4b). Тварини, яким вводили ізотипічний контроль, мали середню виживаність 46 днів після ін'єкції клітин. Миші, яким вводили J22.9-хі, жили в середньому на 26 днів довше. Це відповідає продовженню виживаності на 55% у порівнянні з мишами, яким вводили контрольне антитіло (Фіг. 4c). У мишей, яким не проводили введення, і мишей, яким вводили ізотипічне контрольне антитіло, на 28 добу після ін'єкції клітин спостерігали масивні інфільтрати пухлинних клітин у хребет і пахові лімфатичні вузли (Фіг. 4d-2).

Введення 200 мкг антитіла миші відповідає приблизно 10 мг/кг маси тіла. Для дослідження ефективності J22.9-хі при більш низьких дозах автори даного винаходу підрозділили мишей із ксенотрансплантатом MM.1S-Luc на чотири групи. У першій групі (n=7) вводили 200 мкг контрольного антитіла два рази на тиждень, і в групах 2, 3 (у кожній n=3) і 4 (n=9) ін'єктували 2 мкг, 20 мкг або 200 мкг два рази на тиждень, відповідно. Ін'єкції і моніторинг проводили, як описано вище.

Хоча, як і очікувалося, у контрольній групі мишей розвивалися пухлини, значно обмежений ріст пухлини спостерігали в групах, у яких вводили 20 мкг або 200 мкг J22.9-хі (Фіг. 4e, f). Огляд хронології експерименту представлений на Фіг. 4g.

Ріст розвинених пухлин зупиняється на 5 тижнів у ході лікування J22.9-хі

Терапевтичне введення імітували шляхом відстрочення початку введення антитіла на 5 днів після ін'єкції пухлинних клітин. Мишей із ксенотрансплантатами розділяли на 2 групи (n=6). Тваринам вводили 200 мкг на ін'єкцію або ізотипічного контролю, або антитіла J22.9-хі, два рази на тиждень. Перше вимірювання проводили через 8 днів після ін'єкції клітин. У той час як у групі, у якій вводили J22.9-хі (n=5), біolumінесценція пухлини не виявлялася аж до 35 доби, стійке збільшення пухлинного навантаження спостерігали у тварин, яким вводили ізотипічне контрольне антитіло (n=6) (Фіг. 5a, b). Миші з групи ізотипічного контролю виживали в середньому 56 днів після ін'єкції клітин, у той час як усі миші, яким вводили J22.9-хі, усе ще були живі на 77 добу (Фіг. 5c). Огляд хронології експерименту представлений на Фіг. 5d.

Інтенсивне лікування J22.9-хі на ранній фазі перешкоджає росту пухлини протягом 7 тижнів

Для подальшої оцінки ефекту розкладу лікування на ріст пухлини різні антитіла вводили протягом п'яти послідовних днів, починаючи з доби ін'єкції пухлинних клітин. Після в/в ін'єкції клітин тварин випадковим чином розділяли на 5 груп. У групі 1 (n=5) вводили 200 мкг ізотипічного контрольного антитіла на ін'єкцію (в/о), у той час як у групі 2 (n=6) вводили 200 мкг/ін'єкцію антитіла J22.9-хі-N-glycan. Мишам із групи 3 (n=4), групи 4 (n=5) і групи 5 (n=5) вводили 200 мкг, 20 мкг і 2 мкг на ін'єкцію антитіла J22.9-хі, відповідно. Вимірювання біolumінесценції починали на 9 добу після ін'єкції клітин. Аж до 44 доби не спостерігали біolumінесценції пухлини ні в одній з груп, у яких вводили інтактне антитіло J22.9-хі. Хоча ріст пухлини у тварин, яким вводили J22.9-хі-N-glycan, уповільнювався, загальне пухлинне навантаження не відрізнялося значно від пухлинного навантаження у тварин, яким вводили ізотипічне контрольне антитіло (Фіг. 6a, b). Хоча загальне пухлинне навантаження у тварин, яким вводили J22.9-хі-N-glycan (деглікозизоване), не відрізнялося значно (Фіг. 6b) від групи введення isoAb, тривалість їх життя була значно збільшена (Фіг. 6c). Оскільки було показано, що J22.9-хі-N-glycan не здатне індукувати ADCC або CDC, цей результат показує, що вже тільки зв'язування J22.9-хі з BCMA перешкоджає росту пухлини. Можна обґрунтовано зробити висновок, що це є наслідком блокування взаємодії між рецептором і його нативними лігандами (APRIL і BAFF). Огляд хронології експерименту представлений на Фіг. 6d.

Гуманізація J22.9-хі

Антитіло J22.9-хі гуманізували на основі вирівнювання послідовностей і даних, одержаних із

кристалічної структури. Послідовності варіабельних областей вирівнювали з їх відповідними гомологами людини з використанням IgBLAST (NCBI) або Clustal (EBI). Кожну запропоновану мутацію оцінювали за допомогою візуального дослідження структури до зміни.

Зв'язування гуманізованих варіантів з мішенню BCMA

Зв'язування мутантів з BCMA досліджували з використанням проточної цитометрії, ELISA і SPR. Афінність гуманізованих антитіл вимірювали з використанням поверхневого плазмонного резонансу (ProteOn™ XPR36; Bio-Rad). Дані про зв'язування демонструють несподівані результати відносно специфічності й афінності гуманізованих варіантів антитіл відносно того ж епітопа, який тестували відносно зв'язування J22.9-хі. Як показано в таблиці нижче, було зовсім несподіваним, що гуманізовані антитіла, як описано в даному документі, виявляли порівнянні характеристики зв'язування з вихідним химерним антитілом. Дані SPR показали, що афінність гуманізованих варіантів є подібною з афінністю химер і вона є достатньою для припущення про їх клінічну значимість через дані, представлені у даному описі з вихідним химерним антитілом. Кваліфікований фахівець не може очікувати, що за допомогою модифікації CDR у процесі гуманізації химери, характеристики зв'язування можуть зберегтися до такого ступеня.

ELISA проводили, як описано в даному документі, з використанням покритих BCMA мікропланшетів для титрування (мкг/мл). Як спостерігали на Фіг. 10, зв'язування було порівнянним для всіх гуманізованих варіантів у порівнянні з J22.9-хі при використанні BCMA як людини, так і яванського макака.

Проточну цитометрію також проводили з використанням гуманізованих варіантів, описаних у даному документі, і було показано еквівалентне зв'язування з BCMA як людини, так і яванського макака, для всіх досліджених гуманізованих варіантів (див. Фіг. 11).

Також проводили аналіз SPR і вимірювали афінність для гуманізованих варіантів антитіл. Як можна спостерігати в таблиці нижче (таблиця 6), афінність гуманізованих варіантів (J22.9-H відповідає гуманізованій послідовності SEQ ID NO: 27; J22.9-FSY відповідає гуманізованій і модифікованій відносно PTM SEQ ID NO: 28; J22.9-ISY відповідає гуманізованій і модифікованій відносно PTM SEQ ID NO: 29).

Таблиця 6

Дані SPR

Назва	ELISA (людина)	ELISA (яванський макак)	Проточна цитометрія	Температури плавлення	Афінність (SPR) (людина) (n=3)	Афінність (SPR) (яванський макак) (n=2)
J22.9-хі	+++	+++	+++	86/94 °C	$2,8 \pm 0,7 \times 10^{-10}$ M	$2,7 \times 10^{-9}$ M
J22.9-H	++	+	nd	86/94 °C	$1,5 \pm 0,3 \times 10^{-8}$ M	$2,0 \times 10^{-7}$ M
J22.9-FSY	+++	+++	+++	87/94 °C	$2,2 \pm 0,3 \times 10^{-9}$ M	$2,0 \times 10^{-8}$ M
J22.9-ISY	+++	+++	+++	86/94 °C	$2,0 \pm 0,2 \times 10^{-9}$ M	$1,7 \times 10^{-8}$ M

Амінокислота 54 в CDR2 важкого ланцюга J22.9

Для видалення потенційної ділянки посттрансляційної модифікації в гуманізованому J22.9 залишок D54 CDR2 важкого ланцюга заміняли на аспарагін (N), ненавмисно створивши нову потенційну ділянку модифікації за допомогою N-зв'язаного глікозилювання. Мутантний важкий ланцюг, що містив N54, мігрував повільніше на гелях SDS (Фіг. 13), що вказує на більший розмір і на те, що CDR була глікозилюваною.

Проте, відповідний IgG, J22.9-FNY, зв'язував BCMA у FACS і ELISA і кристалізувався в комплекс із BCMA. Хоча і не повністю уточнена, структура з розрізненням 2,7 ангстрема демонструє явну електронну щільність, що виходить з бічного ланцюга N54 - що узгоджується з модифікацією залишку цукром. Несподіване, таке велике подовження бічного ланцюга не порушило зв'язування BCMA, і, виходячи з цих спостережень, можна було очікувати, що в цьому положенні допустима множина різних амінокислотних замінів, а також потенційно дериватизацій, відмінних від цукрів.

Способи

Клітинні лінії і культура

Клітинну лінію множинної мієломи людини MM.1S (Greenstein et al. (2003), Exp. Hematol. 31:271-282) одержували від Prof. B. Dörken (MDC, Берлін, Німеччина). Для моніторингу росту клітин in vivo, люциферазу і GFP клонували у вектор pFU лентивірусної векторної системи ViraPower (Invitrogen). За допомогою експресії GFP трансдукованими клітинами виділяли

моноклональні клітинні лінії з використанням сортування флуоресцентно активованих одиничних клітин. Клітинні лінії культивували в середовищі RPMI-1640 без фенолового червоного, що містило 10 % ембріональну телячу сироватку, 100 одиниць/мл пеніциліну і 100 мкг/мл стрептомицину (усі від PAA).

5 Клітини HEK293-6E, придбані від National Research Council of Canada, підтримували в середовищі Freestyle F17 (Invitrogen), доповненому 7,5 мМ L-глутаміном (PAA), 0,1 % Pluronic F-68 (Invitrogen) і 25 мкг/мл G418 (Invitrogen). Клітини вирощували в колбах Ерленмейєра (Corning) при 110 об./хв. і 37 °C в атмосфері з 5 % CO₂.

Продукція й очищення антитіл

10 Для одержання зв'язуючого ВСМА антитіла використовували стандартний спосіб гібридом. 4 миші BL/6 дикого типу імунізували 6 разів неповним ад'ювантом Фрейнда і 30 мкг позаклітинного домену ВСМА людини, злитого на С-кінці з глутатіон-S-трансферазою (GST). Після злиття клітин з наступним періодом скринінгу було показано, що гібридома J22.9 секритує антитіло проти ВСМА.

15 Унаслідок нестабільності гібридом варіабельні області легкого і важкого ланцюгів гібридами J22.9 ампліфікували і клонували вище генів каппа людини або константних доменів IgG1, відповідно. Химерне антитіло J22.9-хі одержували за допомогою тимчасової співтрансфекції клітин 293-6E сумішшю 1:2 плазмідної ДНК, кодуєчої легкий і важкий ланцюги, відповідно. У короткому викладі: клітини 293-6E ресуспендували до $1,7 \times 10^6$ клітин/мл у безсироватковому середовищі Freestyle F17 і трансфікували з використанням поліетиленіміну в кінцевій концентрації 1 мкг/мл культури. Через дві доби після трансфекції клітини підживлювали 100 % використаним для трансфекції об'ємом середовища Freestyle F17, що містило 1 % триптон N1 (Organo Technie). На 7 добу клітини збирали центрифугуванням і фільтроване (0,45 мкм) культуральне середовище пропускали через 3,5-мл колонку Protein A-Sepharose (Bio-Rad).
20 Колонку промивали 10 мл фосфатно-сольового буфера (PBS) і антитіло елюювали додаванням 20 мМ ацетату натрію, 150 мМ NaCl, рН 3,5. Фракції об'ємом 2 мл збирали безпосередньо в пробірки, що містили 100 мкл 1М HEPES, рН 7,5, для нейтралізації. Кінцевий вихід повнорозмірного IgG складав приблизно 40 мг/л культури.

Оскільки гібридома J22.9 втрачала здатність продукувати/секретувати антитіло проти ВСМА (Fig. 8), варіабельні області важкого і легкого ланцюгів ампліфікували з використанням ПЛР, а потім клонували на 5'-кінці генів константної області IgG1 і легкого ланцюга κ, відповідно. За допомогою співтрансфекції клітин 293-6E цими двома плазмідами одержували химерне антитіло J22.9-хі. Таким чином, продукція антитіла за винаходом була у своїй основі ускладнена і не здійснювалася простими стандартними способами.

35 Паралельно з антитілом J22.9-хі продукували ізотипічне контрольне антитіло, що складалося з важкого ланцюга J22.9-хі і випадкового химерного легкого ланцюга каппа. За допомогою ELISA і проточної цитометрії було показано, що це антитіло було не здатне зв'язуватися з ВСМА.

40 N-зв'язані олігосахаридні ланцюги на Asn297 важкого ланцюга J22.9-хі видаляли ферментативно з використанням N-глікозидази F (PNGаза F) (NEB). 10 мг J22.9-хі інкубували з 15000 одиниць PNGази F у 500 мкл PBS (рН 7,4) протягом 36 годин при 37 °C, а потім проводили заміну буфера на стерильний PBS.

Визначення здатності J22.9-хі до зв'язування і блокування з використанням твердофазного імуоферментного аналізу (ELISA)

45 Мікропланшети для титрування покривали 10 мкг/мл позаклітинного домену ВСМА людини. Детекцію нанесеного ВСМА проводили з використанням серійного розведення J22.9-хі і ізотипічного контролю в діапазоні від 1 до 1000 нг. Зв'язування J22.9-хі або ізотипічного контрольного антитіла з нанесеним ВСМА виявляли з використанням кон'югованого з пероксидазою хрому (HRP) вторинного антитіла кози проти антитіл людини (Jackson ImmunoResearch, 109-035-098, розведення 1:5000).

50 Мікропланшети для титрування покривали 1 мкг/мл позаклітинного домену ВСМА людини або яванського макака (hBCMA або суBCMA, відповідно). Детекцію нанесеного ВСМА проводили з використанням серійних розведень J22.9-хі, J22.9-H, J22.9-ISY і J22.9-FSY у діапазоні від 0,26 пМ до 500 нМ. Виявлення зв'язування антитіл з нанесеним ВСМА проводили з використанням кон'югованого з пероксидазою хрому (HRP) вторинного антитіла кози проти антитіл людини (Jackson ImmunoResearch, 109-035-098, розведення 1:5000).

60 Для експерименту по блокуванню 1 мг/мл рекомбінантного BAFF людини, злитого з His-міткою (Biomol), наносили після антитіл і промивання, і виявляли з використанням антитіла миші проти His-мітки (AbD Serotec, AD1.1.10, розведення 1:5000, кон'юговане з HRP). В усіх випадках ELISA проводили з використанням реагентів А і В BD OptEIA (BD Bioscience) і вимірювання

проводили з використанням спектрофотометра для мікропланшетів (BioTek) при 450 нм і 570 нм.

Проточно-цитометричний аналіз

Для експериментів по виявленню антигенів клітинної поверхні використовували антитіла власного виготовлення (J22.9- α i, J22.9-H, J22.9-ISY, J22.9-FSY і ізотипічний контроль) і комерційно доступне антитіло миші проти His-мітки (AbD Serotec, AD1.1.10, розведення 1:100, кон'юговане з Alexa Fluor 488), і антитіло кози проти IgG1 людини (Jackson ImmunoResearch, 109-116-098, розведення 1:400, кон'юговане з PE), і рекомбінантний BAFF людини, злитий з His-міткою (Biomol). Експерименти проводили на проточному цитометрі FACSCalibur або FACSCanto II (BD Bioscience). Дані аналізували з використанням програмного забезпечення Flowjo версії 7.6 (TreeStar Inc.).

Одержання Fab і комплексів Fab:BCMA

(Fab)₂-фрагменти одержували з повнорозмірного IgG J22.9- α i за допомогою інкубації з пепсином. J22.9- α i пропускали через колонку для заміни буфера PD-10 у 50 mM ацетаті натрію, pH 3,5, і додавали пепсин у кількості 30 мкг на міліграм J22.9- α i. Інкубація при 37 °C протягом 2,5 години була достатньою для повного розщеплення області фрагмента, що кристалізується (Fc), і пепсин інактивували шляхом заміни через колонку PD-10 на PBS (pH 7,2). Відновлення (Fab)₂-фрагментів на індивідуальні Fab проводили в PBS за допомогою додавання 2-меркаптоетиламіну (50 mM) у присутності 5 mM етилендіамінтетраоцтової кислоти (EDTA). Після інкубації протягом 90 хвилин при 37 °C, відновлені залишки цистеїну блокували алкілюванням з 500 мкМ йодацетамідом протягом 30 хвилин, а потім проводили заміну буфера на свіжий PBS. Fab-фрагменти комбінували з 1,5 молярними еквівалентами очищеного BCMA і комплекси виділяли за допомогою ексклюзійної хроматографії на колонці Superdex 75 16/60. Фракції аналізували на 4-12 % SDS-поліакриламідних гелях і фракції, що містили як Fab, так і BCMA, об'єднували і концентрували для випробувань по кристалізації.

Кристалізація комплексів Fab:BCMA

Концентровані комплекси доповнювали 0,5 молярного еквівалента чистого BCMA, щоб гарантувати насичення, і піддавали скринінгу за допомогою кристалізації. Вихідні умови кристалізації Fab:BCMA ідентифікували за допомогою комерційного скринінгу (Qiagen) у 96-ямкових планшетах у форматі сидячої краплі з використанням пристрою для дозування Gryphon (краплі 200 нл), і оптимізували в 24-ямкових планшетах у висячих краплях (2-3 мкл). Комплекс концентрували до 8 мг/мл і кристалізували в 21 % PEG 3350, 0,1M BisTris, pH 6,5, і 5 mM CuCl₂ при 20 °C. Кристали з'являлися через три доби як кластери тонких пластинок і досягали їх кінцевого розміру (0,2-0,3 мм) у межах приблизно 7 діб. Кластери розділяли й індивідуальні пластинки швидко заморожували в рідкому азоті в маточній рідині з 20 % гліцерином як кріопротектором. Повні дані дифракції одержували для окремого кристала на синхротроні BESSY від Helmholtz Zentrum Berlin. Структуру визначали до розрізнення 1,9 ангстрема за допомогою молекулярного заміщення з використанням експериментальних фаз зі структури ефалізумабу (3EO9) як моделі пошуку. Обробку даних проводили з використанням пакета програм sscr4, уточнення структури проводили з використанням Phenix (Adams P. D. et al. (2010), Acta Cryst. D66:213-221) і побудову й оцінку моделі проводили з використанням Coot. (Emsley et al., Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography, 2010, 66:486-501). Зображення одержували з використанням PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC).

Аналіз цитотоксичності in vitro

У цьому аналізі визначали цитотоксичний ефект J22.9- α i шляхом вимірювання люмінесценції живих клітин, що залишилися, у пристрої для зчитування біолюмінесценції. У короткому викладі: знову одержані лейкоцитарні плівки людини (FBC) піддавали зворотному промиванню під дією гравітації за допомогою 160 мл буфера для елюювання (PBS (pH 7,4), що містить 5 mM Na₂-EDTA і 2,5 [мас./об.] сахарози). Мононуклеарні клітини виділяли з елююваних клітин центрифугуванням у градієнті Ficoll. Мононуклеарні клітини з інтерфази відбирали і промивали два рази буфером для елюювання. Після лізису еритроцитів PBMC знову промивали, підраховували і доводили шляхом розведення в RPMI/10 % FCS без фенолового червоного до 1×10^7 клітин/мл. У мікропланшети для титрування висівали 5×10^4 клітин MM.1S-Luc у 50 мкл RPMI. За десять хвилин до додавання 100 мкл PBMC, клітини MM.1S-Luc інкубували із серійними розведеннями J22.9- α i або ізотипічного контрольного антитіла в об'ємі зразка 200 мкл. Після додавання клітин-мішеней, антитіл і ефекторних клітин, мікропланшети для титрування центрифугували (300×g) протягом 2 хвилин при кімнатній температурі (к.т.) і зберігали при 37 °C з 5 % CO₂. Контрольні ямки обробляли 1 % Triton X замість антитіла для завершення лізису. Після інкубації протягом 4 годин у кожному ямку додавали 25 мкл PBS з

люциферин (250 нг/мл), і біоломінесценцію живих клітин вимірювали в пристрої для зчитування біоломінесценції (Tecan). Питому цитотоксичність обчислювали за наступною формулою:

$$100 - \frac{[\text{величина (J22.9-xi) - величина (загальний лізис)}]}{[\text{величина (ізотипічний контроль) - величина (загальний лізис)}]} \times 100.$$

Дослідження *in vivo*

Використовували мишей NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl Tg(CSF2)2Ygy Tg(IL3)1Ygy Tg(KITLG)3YgyJGckRolyJ (NSG) з The Jackson Laboratory і мишей CB17.Cg-Prkdcscid Lystbg/Crl з Charles River Deutschland (Sulzfeld, Німеччина). Експерименти проводили на мишах у віці 8-14 тижнів. Усі дослідження на тваринах проводили відповідно до посібників установи і штату в спеціальних умовах без патогенів. В експериментальних прикладах, пов'язаних з лікуванням розвинених пухлин і лікуванням пухлини на ранній фазі захворювання, використовували мишей CB17.Cg-Prkdcscid Lystbg/Crl. Фенотип двох ліній мишей, згаданих у даному описі, є у високому ступені подібним. Тварини не мають функціональних В-, Т- і NK-клітин. Трохи більш повільний ріст пухлини спостерігали у мишей CB17.Cg, що вказує на ще більш перспективний ефект терапевтичного антитіла за даним винаходом.

Модель множинної мієломи з ксенотрансплантатом індукували за допомогою внутрішньовенної ін'єкції 1×10^7 клітин MM.1S-Luc у хвостову вену на нульову добу. У цій моделі у тварин без лікування розвивається параліч задніх кінцівок у межах 6 тижнів. Виникнення цього симптому вказує на кінцеву точку експерименту.

Для досліджень ефективності антитіла вводили внутрішньоочеревинно (в.о.) два рази на тиждень або протягом 5 послідовних діб, починаючи на нульову добу. Антитіло J22.9-xi вводили в дозах 2 мкг, 20 мкг або 200 мкг на ін'єкцію; для ізотипічного контрольного антитіла використовували 200 мкг/ін'єкцію. Біоломінесценцію клітин MM.1S-Luc вимірювали після в/о ін'єкції 150 мкг люциферину з використанням IVIS Spectrum (Caliper Life Sciences). Вимірювання проводили щотижня. У кожен момент часу 3 контрольним мишам без введення також вводили люциферин. Загальні величини потоку у цих тварин або віднімали з кожного результату вимірювання, або вони представлені на графіках.

Для лікування розвинених пухлин терапію антитілом починали через 5 діб після ін'єкції клітин MM.1S-Luc. 200 мкг J22.9-xi або ізотипічного контрольного антитіла вводили два рази на тиждень протягом періоду 6 тижнів.

Гуманізація J22.9-xi

Послідовності варіабельних областей важкого і легкого ланцюгів (миші) вирівнювали з відповідними послідовностями варіабельних областей важкого і легкого ланцюгів підтипів людини для визначення того, які зміни залишків були потрібні для одержання повністю гуманізованого варіанта послідовності. З використанням кристалічної структури комплексу J22.9-xi:hBCMA кожну модифікацію спочатку оцінювали *in silico* для ідентифікації мутацій, що могли потенційно порушити зв'язування антитіла з BCMA. Синтезували два повних гени варіабельної області J22.9 для кожного ланцюга, один з вихідною послідовністю миші й один з повністю гуманізованою послідовністю (тобто, яка містить усі з необхідних гуманізуючих мутацій) із двома доданими ділянками ферментів рестрикції для розділення генів на три касети кожний. Після маркування потенційно проблематичних мутацій одержували різні комбінації вихідних касет генів миші і повністю гуманізованих касет генів і їх відповідні IgG експресували, очищали і піддавали FACS-аналізу з позитивними по BCMA клітинами для оцінки зв'язування. У марковані проблематичні залишки вносили мутації індивідуально з використанням ПЛР для перевірки їх ефекту на афінність BCMA, а потім кінцеві оптимізовані конструкції кількісно оцінювали відносно зв'язування з BCMA як людини, так і яванського макака, за допомогою SPR.

SPR

SPR проводили на ProteonXPR36 з використанням фосфатно-сольового буфера, доповненого 0,005 % Tween-20 (PBST). Цілий IgG у концентрації 15 мкг/мл іммобілізували на сенсорному чипі Proteon GLH з використанням стандартної хімії амінів відповідно до інструкцій виготовлювача. Для експериментів по зв'язуванню як рухому фазу використовували BCMA людини або яванського макака в PBST. Афінність зв'язування (K_d) обчислювали з констант асоціації (k_{on}) і дисоціації (k_{off}), визначених паралельно, при множині концентрацій BCMA (у діапазоні від 0,4 нМ до 800 нМ для hBCMA і від 2,7 нМ до 1 мкМ для супоBCMA), що передбачає модель однієї ділянки зв'язування.

Крім того, подальше експериментування демонструє, що переважні варіанти здійснення винаходу забезпечують дивні і несподівані ефекти, тим самим вирішуючи проблему винаходу неочевидним чином.

Посилання

- Adams P. D., Afonine P. V., Bunkoczi G., Chen V. B., Davis I. W., Echols N., Headd J. J., Hung L. W., Kapral G. J., Grosse-Kunstleve R. W. et al. (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 213-221.
- 5 Al-Lazikani B., Lesk A. M. and Chothia C. (1997). Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* 273, 927-948.
- Anthony R. M. and Ravetch J. V. (2010). A novel role for the IgG Fc glycan: the anti-inflammatory activity of sialylated IgG Fcs. *J. Clin. Immunol.* 30 Suppl 1, S9-14.
- Chan et al. (2010), *Nat. Rev. Immunol.* 10:301-316.
- 10 Chavez-Galan L., Arenas-Del Angel M. C., Zenteno E., Chavez R. and Lascurain, R. (2009). Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol. Immunol.* 6, 15-25.
- Chiu A., Xu W., He B., Dillon S. R., Gross J. A., Sievers E., Qiao X., Santini P., Hyjek E., Lee J. W. et al. (2007). Hodgkin lymphoma cells express TACI and BCMA receptors and generate survival and proliferation signals in response to BAFF and APRIL. *Blood*, 109, 729-739.
- 15 Gordon N. C., Pan B., Hymowitz S. G., Yin J., Kelley R. F., Cochran A. G., Yan M., Dixit V. M., Fairbrother W. J. and Starovasnik M. A. (2003). BAFF/BLyS receptor 3 comprises a minimal TNF receptor-like module that encodes a highly focused ligand-binding site. *Biochemistry*, 42, 5977-5983.
- Greenstein S., Krett N. L., Kurosawa Y., Ma C., Chauhan D., Hideshima T., Anderson K. C. and Rosen S. T. (2003). Characterization of the MM.1 human multiple myeloma (MM) cell lines: a model system to elucidate the characteristics, behavior, and signaling of steroid-sensitive and-resistant MM cells. *Exp Hematol.* 31, 271-282.
- 20 Jacobi A. M., Huang W., Wang T., Freimuth W., Sanz I., Furie R., Mackay M., Aranow C., Diamond B. and Davidson A. (2010). Effect of long-term belimumab treatment on B cells in systemic lupus erythematosus: extension of a phase II, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study. *Arthritis Rheum.* 62, 201-210.
- 25 Kapoor P., Ramakrishnan V. and Rajkumar S. V. (2012). Bortezomib combination therapy in multiple myeloma. *Semin. Hematol.* 49, 228-242.
- Keyser F. D. (2011). Choice of Biologic Therapy for Patients with Rheumatoid Arthritis: The Infection Perspective. *Curr. Rheumatol. Rev.* 7, 77-87.
- 30 Laskowski R. A. (2009). PDBsum new things. *Nucleic Acids Res.* 37, D355-359.
- Mackay F., Schneider P., Rennert P. and Browning J. (2003). BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 231-264.
- Nimmerjahn F. and Ravetch J. V. (2008). Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 34-47.
- 35 Novak A. J., Darce J. R., Arendt B. K., Harder B., Henderson K., Kindsvogel W., Gross J. A., Greipp P. R. and Jelinek D. F. (2004). Expression of BCMA, TACI, and BAFF-R in multiple myeloma: a mechanism for growth and survival. *Blood*, 103, 689-694.
- Queen et al., 1989; WO 90/07861.
- 40 Patel D. R., Wallweber H. J., Yin J., Shriver S. K., Marsters S. A., Gordon N. C., Starovasnik M. A. and Kelley R. F. (2004). Engineering an APRIL-specific B cell maturation antigen. *J. Biol. Chem.* 279, 16727-16735.
- Presta L. G. (2008). Molecular engineering and design of therapeutic antibodies. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 460-470.
- 45 Raab M. S., Podar K., Breitkreutz I., Richardson P. G. and Anderson K. C. (2009). Multiple myeloma. *Lancet*, 374, 324-339.
- Richardson et al. (2003), *New Engl. J. Med.* 348:2609-2617.
- Ryan et al. (*Molecular Cancer Therapeutics*, 2007 6(11), 3009).
- Roopenian D. C. and Akilesh S. (2007). FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 715-725.
- 50 Suzuki K. (2013). Current therapeutic strategy for multiple myeloma. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 43, 116-124.
- Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.* 62:119-58.
- Wang S. Y. and Weiner G. (2008). Complement and cellular cytotoxicity in antibody therapy of cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.* 8, 759-768.
- 55 Woyke et al. (2001), *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584.

1

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> MAX-DELBRÜCK-CENTRUM

<120> ГУМАНІЗОВАНИ АНТИТІЛА ПРОТИ CD269 (BCMA)

<130> XII 2136/14WO

<160> 43

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 120

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Ab

<400> 1

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Asp Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

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

Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2

<211> 120

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Ab

<400> 2

2

```

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
          20          25          30

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

Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
50          55          60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

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

Ala Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
          100          105          110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

```

<210> 3
<211> 120
<212> БІЛЛОК
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<223> Ab

```

```

<400> 3

```

```

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
          20          25          30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
          35          40          45

Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
50          55          60

Lys Asp Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

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

```

Ala Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 4
<211> 120
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Ab

<220>
<221> додаткова ознака
<222> (34)..(34)
<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
<221> додаткова ознака
<222> (54)..(55)
<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
<221> додаткова ознака
<222> (101)..(101)
<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
<221> додаткова ознака
<222> (107)..(107)
<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<400> 4

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Trp Xaa Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Xaa Xaa Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Asp Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ser Leu Tyr Xaa Asp Tyr Gly Asp Ala Xaa Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 5
<211> 120
<212> ВІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Ab

<220>
<221> додаткова ознака
<222> (33)..(33)
<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
<221> додаткова ознака
<222> (35)..(35)
<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
<221> додаткова ознака
<222> (47)..(47)
<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
<221> додаткова ознака
<222> (50)..(50)
<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
<221> додаткова ознака
<222> (99)..(101)
<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
<221> додаткова ознака
<222> (106)..(106)
<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<400> 5

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

5

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Xaa Met Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Xaa Val
35 40 45

Gly Xaa Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Asp Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ser Xaa Xaa Xaa Asp Tyr Gly Asp Xaa Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 6
<211> 120
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Ab

<400> 6

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

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

Gly Glu Ile Asn Pro Asn Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Asp Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

6

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 7
<211> 120
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Ab

<400> 7

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Trp Phe Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asn Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Asp Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8
<211> 120
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Ab

<400> 8

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

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

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Asp Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 9
<211> 120
<212> БІЛІОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Ab

<400> 9

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Trp Phe Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Asp Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

8

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10
<211> 108
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Ab

<400> 10

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 11
<211> 108
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Ab

<400> 11

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

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

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

9

Tyr Ser Ala Ser Leu Arg Phe Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 12
<211> 108
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Ab

<220>
<221> додаткова ознака
<222> (30)..(31)
<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<400> 12

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Xaa Xaa Asn
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Leu Arg Phe Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 13
<211> 108
<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Ab

<220>

<221> додаткова ознака

<222> (31)..(32)

<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>

<221> додаткова ознака

<222> (34)..(34)

<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>

<221> додаткова ознака

<222> (36)..(36)

<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>

<221> додаткова ознака

<222> (49)..(50)

<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>

<221> додаткова ознака

<222> (52)..(53)

<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>

<221> додаткова ознака

<222> (55)..(55)

<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>

<221> додаткова ознака

<222> (66)..(67)

<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>

<221> додаткова ознака

<222> (89)..(89)

<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>

<221> додаткова ознака

<222> (91)..(91)

<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>

<221> додаткова ознака

<222> (94)..(94)

11

<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>

<221> додаткова ознака

<222> (96)..(96)

<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<400> 13

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

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

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

Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Arg Xaa Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Xaa Xaa Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Xaa Gln Xaa Asn Asn Xaa Pro Xaa
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 14

<211> 108

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Ab

<400> 14

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Leu Arg Phe Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

12

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 15
<211> 5
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Ab

<220>
<221> додаткова ознака
<222> (4)..(4)
<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<400> 15

Arg Tyr Trp Xaa Ser
1 5

<210> 16
<211> 18
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Ab

<220>
<221> додаткова ознака
<222> (5)..(6)
<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<400> 16

Glu Ile Asn Pro Xaa Xaa Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu Lys
1 5 10 15

Asp Lys

<210> 17
<211> 13
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

13

<220>
<223> Ab

<220>
<221> додаткова ознака
<222> (4)..(4)
<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
<221> додаткова ознака
<222> (10)..(10)
<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<400> 17

Ser Leu Tyr Xaa Asp Tyr Gly Asp Ala Xaa Asp Tyr Trp
1 5 10

<210> 18
<211> 5
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Ab

<400> 18

Arg Tyr Trp Ile Ser
1 5

<210> 19
<211> 5
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Ab

<400> 19

Arg Tyr Trp Phe Ser
1 5

<210> 20
<211> 18
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Ab

<400> 20

Glu Ile Asn Pro Asn Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu Lys
1 5 10 15

14

Asp Lys

<210> 21
<211> 18
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Ab

<400> 21

Glu Ile Asn Pro Ser Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu Lys
1 5 10 15

Asp Lys

<210> 22
<211> 13
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Ab

<400> 22

Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Tyr Asp Tyr Trp
1 5 10

<210> 23
<211> 11
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Ab

<220>
<221> додаткова ознака
<222> (7)..(8)
<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<400> 23

Lys Ala Ser Gln Ser Val Xaa Xaa Asn Val Ala
1 5 10

<210> 24
<211> 7
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Ab

15

<400> 24

Ser Ala Ser Leu Arg Phe Ser
1 5

<210> 25

<211> 11

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Ab

<400> 25

Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly
1 5 10

<210> 26

<211> 11

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Ab

<400> 26

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Ser Asn Val Ala
1 5 10

<210> 27

<211> 450

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Ab

<400> 27

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Asp Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

16

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

17

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
450

<210> 28

<211> 450

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Ab

<400> 28

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Trp Phe Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Asp Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

18

85 90 95

Ala Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

19

340

345

350

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
450

<210> 29

<211> 450

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Ab

<400> 29

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

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

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Asp Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

20

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

21

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
450

<210> 30
<211> 214
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Ab

<400> 30

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Leu Arg Phe Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala

22

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> 31
<211> 214
<212> БІЛКОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Ab

<400> 31

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Leu Arg Phe Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu
85 90 95

23

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu 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> 32

<211> 1450

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> кодуєча послідовність Ab

<400> 32

gaattccacc atgggatggg catgtatcat cctttttcta gtagcaactg caaccgggtg 60

ccacagtga gtcagctgg tcgaatctgg aggaggcctg gttcagcctg gtggcagcct 120

taggtctct tgtgcagcct ctggctttac cttctcagcg tattggatga gctgggtgag 180

acaggctcca gggaaaggtc tgggtgtgggt aggggagata aaccccgata gcagcacgat 240

caactatgct ccgtcactga aagacaagtt caccatttcc cgcgataatg ccaagaacac 300

tctctacttg cagatgaatt cccttcgagc cgaggatata gcggtgtact actgcgccag 360

tctgtactac gactatgggg acgcaatgga ctattgggga caaggcacac tgggtgactgt 420

tagctccgcg tcgaccaagg gcccatcggt ctccccctg gcacctcct ccaagagcac 480

ctctgggggc acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aacctgtgac 540

gggtctctgg aactcaggcg cctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtctaca 600

gtcctcagga ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac 660

24

ccagacctac atctgcaacg tgaatcaciaa gccagcaac accaagggtg acaagagagt	720
tgagcccaaa tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg tgccagcac ctgaactcct	780
ggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctccc	840
gacctctgag gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt	900
caactgttac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccgc gggaggagca	960
gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa	1020
tggcaaggag tacaagtga aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaa	1080
catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc ccccatccc	1140
ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgctg gtcaaaggct tctatcccag	1200
cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc	1260
tcccggtctg gactccgacg gctccttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag	1320
caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctcgtgatg catgaggctc tgcacaacca	1380
ctacacgcag aagagcctct ccctgtcccc gggtaaatga gtgcgacggc cgggcggcgg	1440
cggcggtacc	1450

<210> 33
 <211> 1450
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> кодує послідовність Ab

<400> 33	
gaattccacc atgggatggt catgtatcat cctttttcta gtagcaactg caaccggtgt	60
ccacagtga gtgcagctgg tcgaatctgg aggaggcctg gttcagcctg gtggcagcct	120
taggtctct tgtgcagcct ctggctttac cttctcacgg tattgggttca gctgggtgag	180
acaggctcca gggaaaggct tgggtgtgggt aggggagata aacccagca gcagcacgat	240
caactatgct cgtcactga aagacaagtt caccatttcc cgcgataatg ccaagaacac	300
tctctacttg cagatgaatt cccttcgagc cgaggatata gcggtgtact actgcgccag	360
tctgtactac gactatgggg acgcatacga ctattgggga caaggcacac tgggtgactgt	420
tagctccgcg tcgaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcacctcct ccaagagcac	480
ctctgggggc acagcggccc tgggtgtgct ggtcaaggac tacttccccg aacctgtgac	540
ggtctcgtgg aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcttaca	600
gtcctcagga ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac	660
ccagacctac atctgcaacg tgaatcaciaa gccagcaac accaagggtg acaagagagt	720
tgagcccaaa tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg tgccagcac ctgaactcct	780

25

```

gggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg      840
gaccctctgag gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt      900
caactggtac gtggacggcg tggagggtgca taatgccaaag acaaagccgc gggaggagca      960
gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacgcgc ctgcaccagg actggctgaa     1020
tggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccc tgcagaaaac     1080
catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacagggtg tacaccctgc ccccatcccg     1140
ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatccag      1200
cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc      1260
tcccgctgctg gactccgacg gctccttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag      1320
cagggtggcag cagggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca      1380
ctacacgcag aagagcctct cctgttcccc gggtaaatga gtgcgacggc cgggcggcgg      1440
cggcggatcc                                     1450

```

```

<210> 34
<211> 1450
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<223> Кодуюча послідовність Ab

```

```

<400> 34
gaattccacc atgggatggt catgtatcat cctttttcta gtagcaactg caaccgggtg      60
ccacagtga gtcgagctgg tcgaatctgg aggaggcctg gttcagcctg gtggcagcct      120
taggctctct tgtgcagcct ctggctttac cttctcacgg tattggatca gctgggtgag      180
acaggctcca gggaaaggtc tgggtgtgggt aggggagata aacccagca gcagcacgat      240
caactatgct ccgtcactga aagacaagtt caccatttcc cgcgataatg ccaagaacac      300
tcttacttg cagatgaatt ccttcgagc cgaggatata gcggtgtact actgcgccag      360
tctgtactac gactatgggg acgcatacga ctattgggga caaggcacac tggtgactgt      420
tagctccgcg tcgaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac      480
ctctgggggc acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aacctgtgac      540
ggtctcgtgg aactcaggcg ccttgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca      600
gtcctcagga ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac      660
ccagacctac atctgcaacg tgaatcaca gccagcaac accaagggtg acaagagagt      720
tgagcccaaa tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg tgcccagcac ctgaactcct      780
gggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg      840
gaccctctgag gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt      900

```

26

caactggtac	gtggacggcg	tggaggtgca	taatgccaaag	acaagccgc	gggaggagca	960
gtacaacagc	acgtaccgtg	tggtcagcgt	cctcaccgtc	ctgcaccagg	actggctgaa	1020
tggcaaggag	tacaagtgc	aggtctccaa	caaagccctc	ccagccccc	tcgagaaaac	1080
catctccaaa	gccaagggc	agccccgaga	accacaggtg	tacaccctgc	ccccatccc	1140
ggaggagatg	accaagaacc	aggtcagcct	gacctgcctg	gtcaaaggct	tctatcccag	1200
cgacatcgcc	gtggagtggg	agagcaatgg	gcagccggag	aacaactaca	agaccacgcc	1260
tcccgtgctg	gactccgacg	gctccttctt	cctctatagc	aagctcaccg	tggacaagag	1320
caggtggcag	caggggaacg	tcttctcatg	ctcgtgatg	catgaggctc	tgcacaacca	1380
ctacacgcag	aagagcctct	ccctgtcccc	gggtaaatga	gtgcgacggc	cgggcggcgg	1440
cgccggatcc						1450

<210> 35
 <211> 718
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Ab

<400> 35						
gaattccacc	atgggatggg	catgtatcat	cctttttcta	gtagcaactg	caaccgggtg	60
acactccgag	atcgtgatga	cccagtctcc	tgctaccctg	agcgtttctc	ccggtgaaag	120
ggccacactc	agctgcaaag	cctctcaaag	cgtggacagc	aatgtcgctt	ggatcagca	180
gaaacctggc	caagctccga	gagcactgat	ctattccgcg	tcattgcgct	tttccggcat	240
accagcacgg	tttagtggtt	cagggagtgg	gactgagttc	actctgacga	ttagctccct	300
tcagtcagag	gatttcgccc	tgtactactg	tcagcagtac	aacaactatc	ccctcacatt	360
cggagctgga	accaagctgg	aactgaagcg	tacggtggct	gcaccatctg	tcttcattct	420
cccgccatct	gatgagcagt	tgaaatctgg	aactgcctct	gttgtgtgcc	tgctgaataa	480
cttctatccc	agagaggcca	aagtacagtg	gaaggtggat	aacgccctcc	aatcgggtaa	540
ctcccaggag	agtgtcacag	agcaggacag	caaggacagc	acctacagcc	tcagcagcac	600
cctgacgctg	agcaaagcag	actacgagaa	acacaaagtc	tacgcctgcg	aagtcaccca	660
tcagggcctg	agctcgcccc	tcacaaagag	cttcaacagg	ggagagtgtt	agggatcc	718

<210> 36
 <211> 718
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> AB

<400> 36

27

```

gaattccacc atgggatggt catgtatcat cctttttcta gtagcaactg caaccggtgt      60
acactccgag atcgtgatga cccagtctcc tgctaccctg agcgtttctc ccggtgaaag      120
ggccacactc agctgcaaag cctctcaaag cgtggagagc aatgtcgctt ggtatcagca      180
gaaacctggc caagctccga gagcactgat ctattccgcg tcattgcgct tttccggcat      240
accagcacgg tttagtggct cagggagtgg gactgagttc actctgacga ttagctccct      300
tcagtcagag gatttcgccg tgtactactg tcagcagtac aacaactatc ccttcacatt      360
cggagctgga accaagctgg aactgaagcg tacggtggct gcaccatctg tcttcatctt      420
cccgccatct gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa      480
cttctatccc agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa      540
ctcccaggag agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac      600
cctgacgctg agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca      660
tcagggcctg agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt agggatcc      718

```

<210> 37
 <211> 285
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> HIS-MITKA

<400> 37

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
1 5 10 15

Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu
20 25 30

Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu
35 40 45

Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys
50 55 60

Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn
65 70 75 80

Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu
85 90 95

Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser
100 105 110

Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu

28

115

120

125

Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn
130 135 140

Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp
145 150 155 160

Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu
165 170 175

Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr
180 185 190

Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala
195 200 205

Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Leu Val Pro Arg
210 215 220

Gly Ser Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser Leu
225 230 235 240

Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr Pro
245 250 255

Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser Val
260 265 270

Lys Gly Thr Asn Ala Leu Glu His His His His His His
275 280 285

<210> 38

<211> 53

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> позаклітинний домен

<400> 38

Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser Leu Leu His
1 5 10 15

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

Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser Val Lys Gly
35 40 45

29

Thr Asn Ala Leu Glu
50

<210> 39
<211> 56
<212> БІЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 39

Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser
1 5 10 15

Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr
20 25 30

Pro Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser
35 40 45

Val Lys Gly Thr Asn Ala Leu Glu
50 55

<210> 40
<211> 20
<212> БІЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 40

Tyr Phe Asp Ser Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys
1 5 10 15

Ser Ser Asn Thr
20

<210> 41
<211> 120
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Ab

<220>
<221> додаткова ознака
<222> (1)..(1)
<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
<221> додаткова ознака
<222> (5)..(6)
<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
<221> додаткова ознака
<222> (19)..(19)
<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
<221> додаткова ознака
<222> (27)..(28)
<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
<221> додаткова ознака
<222> (30)..(31)
<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
<221> додаткова ознака
<222> (39)..(39)
<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
<221> додаткова ознака
<222> (48)..(48)
<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
<221> додаткова ознака
<222> (66)..(67)
<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
<221> додаткова ознака
<222> (69)..(69)
<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
<221> додаткова ознака
<222> (84)..(86)
<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
<221> додаткова ознака
<222> (88)..(88)
<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
<221> додаткова ознака
<222> (93)..(93)
<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
<221> додаткова ознака
<222> (115)..(115)

31

<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<400> 41

Xaa Val Gln Leu Xaa Xaa Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Xaa Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Tyr
20 25 30

Trp Glx Ser Trp Val Arg Xaa Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Xaa
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Glx Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Xaa Xaa Phe Xaa Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Glu Asp Thr Ala Xaa Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Leu Tyr Tyr Asp Tyr Gly Asp Ala Glx Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 42

<211> 108

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Ab

<220>

<221> додаткова ознака

<222> (8)..(13)

<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>

<221> додаткова ознака

<222> (18)..(18)

<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>

<221> додаткова ознака

<222> (20)..(21)

<223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
 <221> додаткова ознака
 <222> (41)..(41)
 <223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
 <221> додаткова ознака
 <222> (43)..(43)
 <223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
 <221> додаткова ознака
 <222> (46)..(46)
 <223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
 <221> додаткова ознака
 <222> (49)..(49)
 <223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
 <221> додаткова ознака
 <222> (51)..(52)
 <223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
 <221> додаткова ознака
 <222> (63)..(63)
 <223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
 <221> додаткова ознака
 <222> (77)..(77)
 <223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
 <221> додаткова ознака
 <222> (83)..(83)
 <223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
 <221> додаткова ознака
 <222> (85)..(85)
 <223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<220>
 <221> додаткова ознака
 <222> (87)..(87)
 <223> Хаа може являти собою будь-яку амінокислоту, що зустрічається в природі

<400> 42

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

33

Asp Xaa Val Xaa Xaa Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Glu Ser Asn
20 25 30

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

Xaa Ser Xaa Xaa Leu Arg Phe Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Xaa Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 43
<211> 108
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Ab

<400> 43

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Arg Phe Met Thr Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

Phe Ser Ala Ser Leu Arg Phe Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Thr Gly
50 55 60

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

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

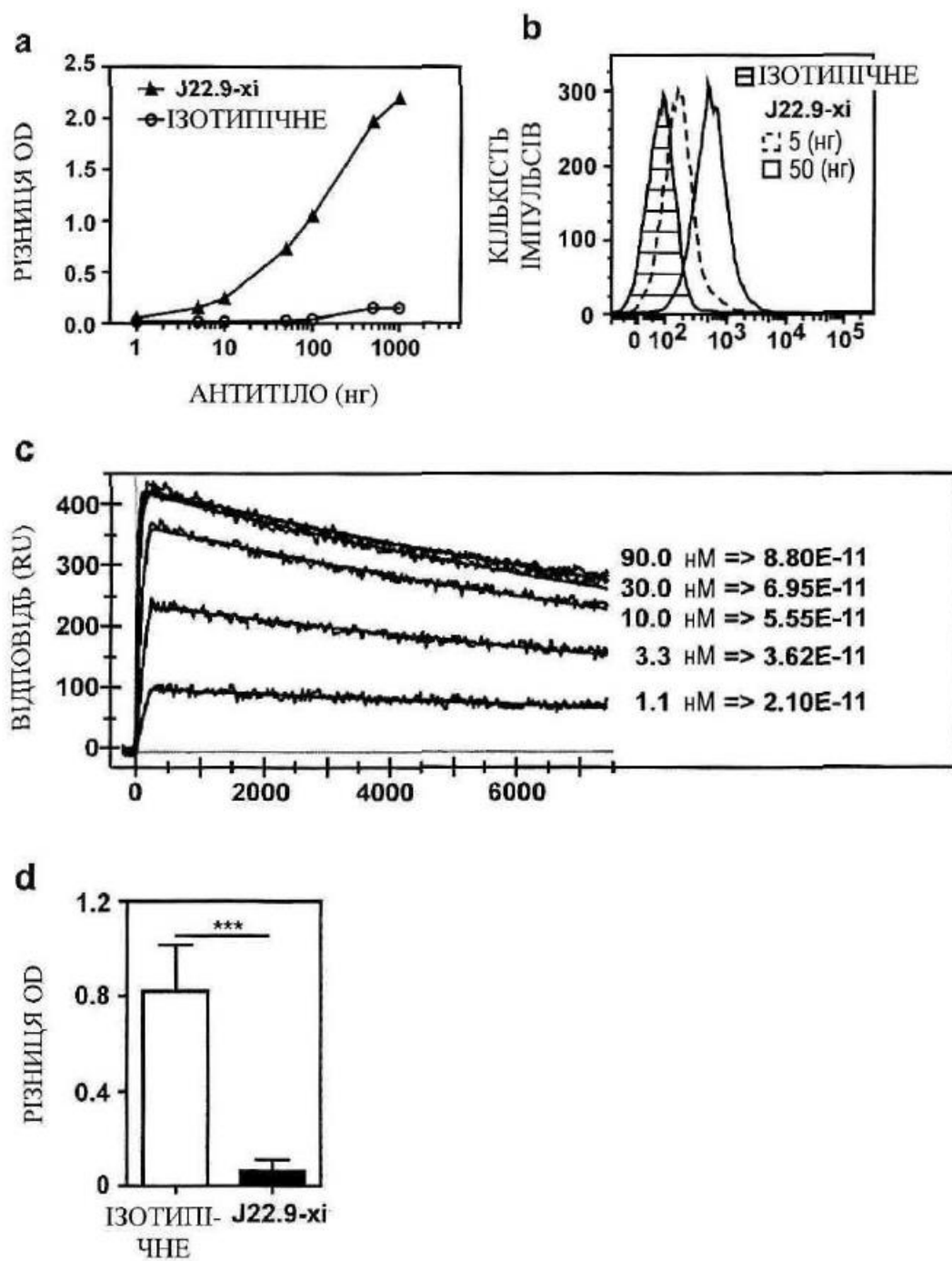
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Антитіло або фрагмент антитіла, яке специфічно зв'язується з епітопом позаклітинного домену CD269 (BCMA), що містить домен VH, який містить CDR з послідовностями: RYWX₁S (H-CDR1; SEQ ID NO: 15),

- де X_1 : I, F, L, V, Y, C, G, A, S, T;
 EINPX₂X₃STINYAPSLKDK (H-CDR2; SEQ ID NO: 16),
 де X_2X_3 : SS, NS, TS, GS, KS, RS, SD, SN, DE; і
 SLYX₄DYGDAX₅DYW (H-CDR3; SEQ ID NO: 17),
- 5 де X_4 : Y, L, A, V, F, I, W, і/або
 X_5 : Y, L, F, I, V, A, C, і
 домен VL, який містить CDR з послідовностями:
 KASQSVX₁X₂NVA (L-CDR1; SEQ ID NO: 23),
 де X_1X_2 : ES, SS, TS, QS, HS, DH;
- 10 SASLRFS (L-CDR2; SEQ ID NO: 24); і
 QQYNNYPLTFG (L-CDR3; SEQ ID NO: 25).
 2. Антитіло або фрагмент антитіла за п. 1, де домен VH містить CDR1 з послідовністю RYWIS
 (SEQ ID NO: 18) або RYWFS (SEQ ID NO: 19), CDR2 з послідовністю EINPNSSTINYAPSLKDK
 (SEQ ID NO: 20) або EINPSSSTINYAPSLKDK (SEQ ID NO: 21), і CDR3 з послідовністю
- 15 SLYYDYGDAYDYW (SEQ ID NO: 22), і,
 де домен VL містить CDR1 з послідовністю KASQSVESNVA, CDR2 з послідовністю SASLRFS
 (SEQ ID NO: 24) і CDR3 з послідовністю QQYNNYPLTFG (SEQ ID NO: 25).
 3. Антитіло або фрагмент антитіла за п. 1, яке містить домен VH, який містить послідовність
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWX₁SWVRQAPGKGLVWVGGEINP
- 20 X₂X₃STINYAPSLKDKFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLYX₄DYGD
 AX₅DYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 4),
 де X_1 : I, F, L, V, Y, C, G, A, S або T;
 X_2X_3 : SS, NS, TS, GS, KS, RS, SD, SN або DE, переважно SS;
 X_4 : Y, L, A, V, F, I або W;
 і X_5 : Y, L, F, I, V, A, C і
- 25 домен VL, який містить послідовність
 EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCASQSVX₁X₂NVAWYQQKPGQAPRALIYSASL
 RFSGIPARFSGSGSGTEFTLTISLSQSEDAVYYCQQYNNYPLTFGAGTKLELKR
 (SEQ ID NO: 12),
 де X_1X_2 : ES, SS, TS, QS, HS або DH.
- 30 4. Антитіло або фрагмент антитіла за будь-яким з попередніх пунктів, що містить:
 домен VH, який містить послідовність SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 або SEQ ID
 NO: 9, і
 домен VL, який містить послідовність SEQ ID NO: 14.
- 35 5. Антитіло або фрагмент антитіла за будь-яким з попередніх пунктів, де антитіло або фрагмент
 антитіла зв'язується з епітопом, що складається з амінокислот 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23,
 26, 27 або 32 CD269.
- 40 6. Антитіло або фрагмент антитіла за будь-яким з попередніх пунктів, де зв'язування антитіла
 або фрагмента антитіла з CD269 (BCMA) порушує взаємодію BAFF-CD269 і/або APRIL-CD269.
7. Антитіло або фрагмент антитіла за будь-яким з попередніх пунктів, де антитіло або фрагмент
 антитіла є глікозилізованим.
8. Антитіло або фрагмент антитіла за будь-яким з попередніх пунктів, де глікан являє собою N-
 зв'язаний олігосахаридний ланцюг на Asn297 важкого ланцюга.
9. Застосування антитіла або фрагмента антитіла за будь-яким з попередніх пунктів як
 45 лікарського засобу для лікування медичного порушення, асоційованого з наявністю патогенних
 В-клітин.
10. Застосування антитіла або фрагмента антитіла за п. 9, де медичне порушення, пов'язане з
 патогенними В-клітинами, являє собою захворювання плазмоцитів і/або В-клітин пам'яті.
11. Застосування антитіла або фрагмента антитіла за п. 9, де медичне порушення, пов'язане з
 50 патогенними В-клітинами, являє собою злоякісну пухлину з плазмоцитів, наприклад множинну
 мієлому, плазмочитому, макроглобулінемію Вальденстрема або плазмоклітинний лейкоз, або
 злоякісну пухлину В-лімфоцитів, таку як хвороба Ходжкіна.
12. Застосування антитіла або фрагмента антитіла за п. 9, де медичне порушення, пов'язане з
 патогенними В-клітинами, являє собою аутоімунне захворювання, асоційоване з
- 55 аутореактивними плазмоцитами і/або аутореактивними В-клітинами пам'яті, таке як запальне
 аутоімунне захворювання, наприклад системний червоний вовчак (SLE) або ревматоїдний
 артрит.
13. Кон'югат антитіло-лікарський засіб (ADC), який містить антитіло або фрагмент антитіла за
 будь-яким з пп. 1-8, кон'юговане з лікарським засобом.
- 60 14. Молекула нуклеїнової кислоти, вибрана з групи, що містить:

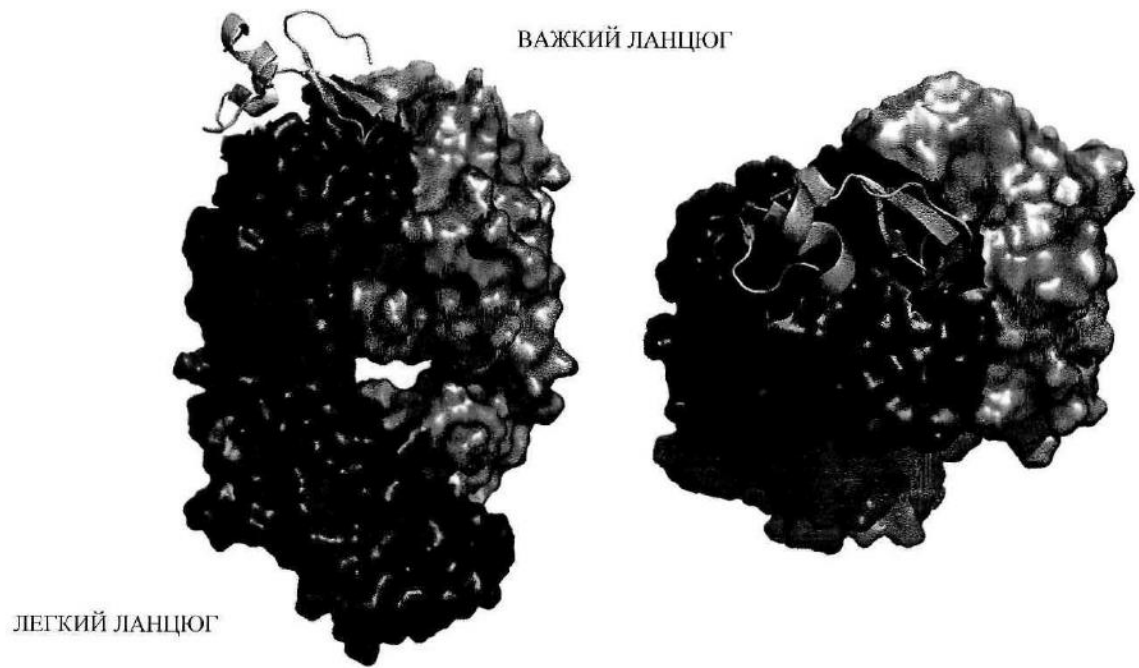
- а) молекулу нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує виділене антитіло або фрагмент антитіла за будь-яким з пп. 1-8, кодує амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з послідовностей SEQ ID NO: 1-31 і 41-42, містить послідовність або фрагмент послідовності SEQ ID NO: 32-36,
- 5 б) молекулу нуклеїнової кислоти, що комплементарна нуклеотидній послідовності, вказаній в а);
- с) молекулу нуклеїнової кислоти, яка містить нуклеотидну послідовність, яка в достатній мірі ідентична послідовності і є функціонально аналогічною/еквівалентною нуклеотидній послідовності, вказаній в а) або б), переважно, яка ідентична нуклеотидній послідовності, вказаній в а) або б) щонайменше на 80 %, переважно на 90 %, більш переважно на 95 %;
- 10 д) молекулу нуклеїнової кислоти, яка внаслідок виродженості генетичного коду є варіантом нуклеотидної послідовності, вказаної в а)-с); і
- е) молекулу нуклеїнової кислоти згідно з нуклеотидною послідовністю а)-д), яка модифікована за допомогою делецій, вставок, замін, транслокацій, інверсій і/або інсерпцій, і функціонально аналогічна/еквівалентна нуклеотидній послідовності, вказаній в а)-д).
- 15 15. Клітина-хазяїн, така як бактеріальна клітина або клітина ссавця, переважно гібридна клітина або клітинна лінія, яка здатна продукувати антитіло або фрагмент антитіла і/або містить молекулу нуклеїнової кислоти за будь-яким з попередніх пунктів.
16. Фармацевтична композиція, яка містить виділене антитіло або фрагмент антитіла, молекулу нуклеїнової кислоти, ADC або клітину-хазяїна за будь-яким з попередніх пунктів разом з
- 20 фармацевтично прийнятним носієм.



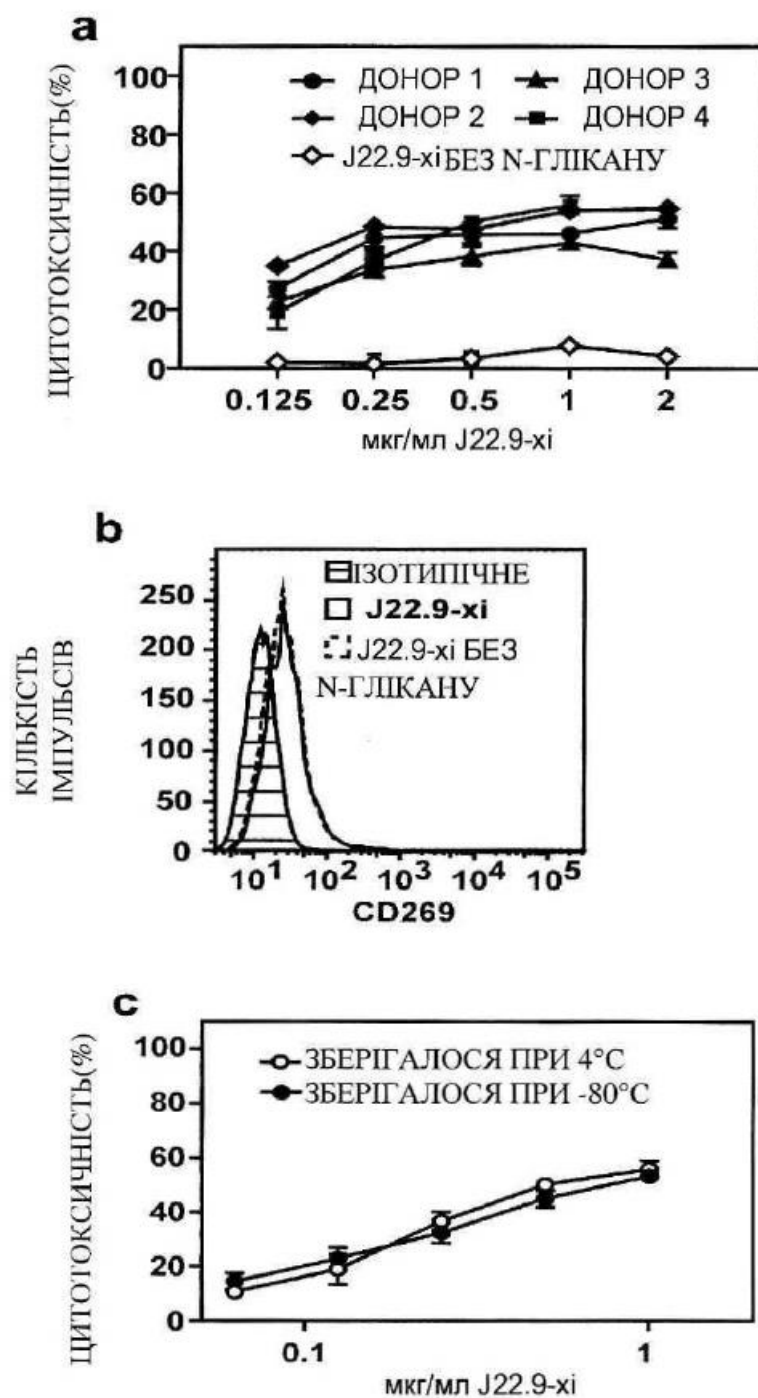
Фіг. 1



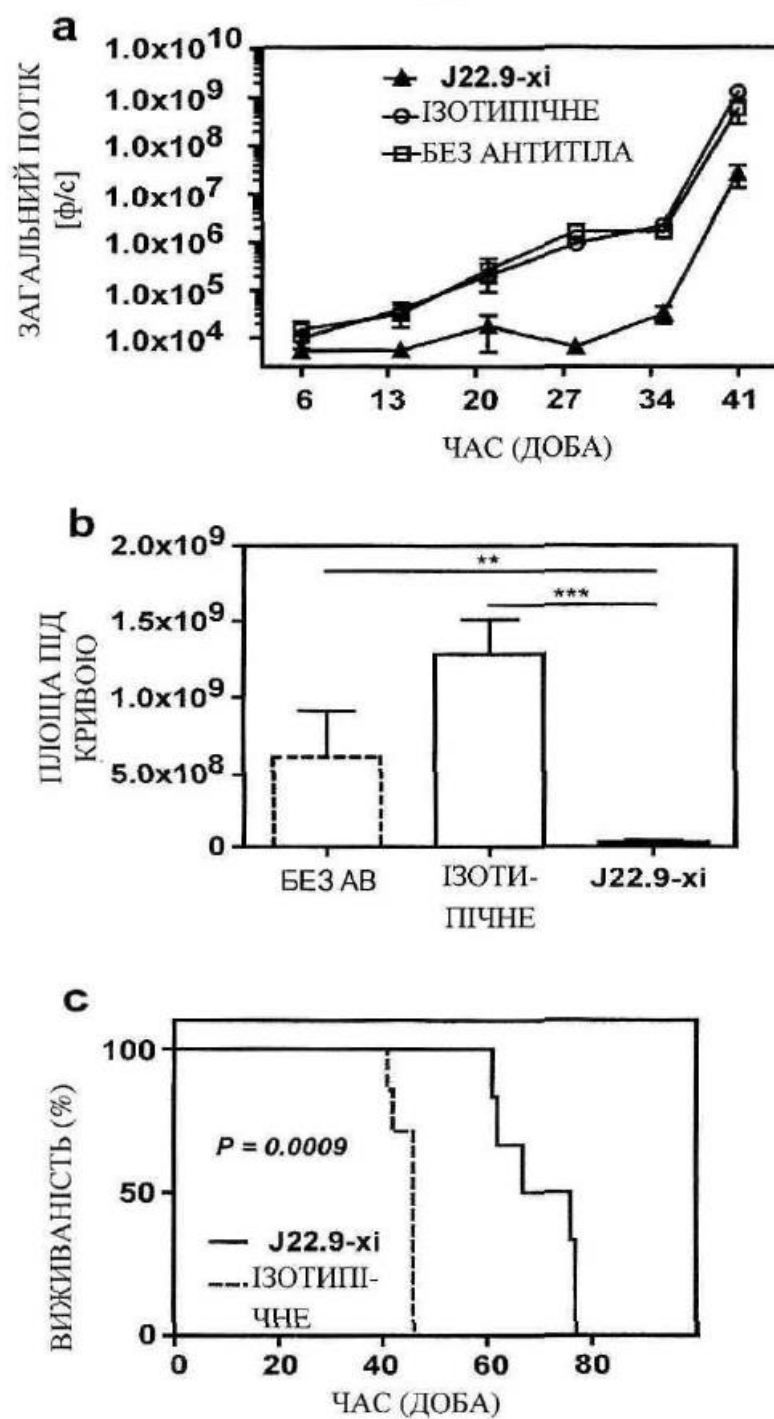
Fig. 2



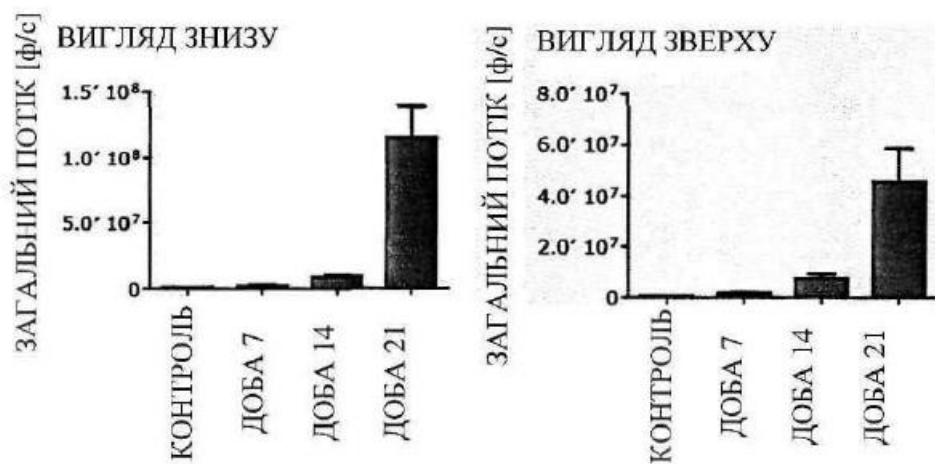
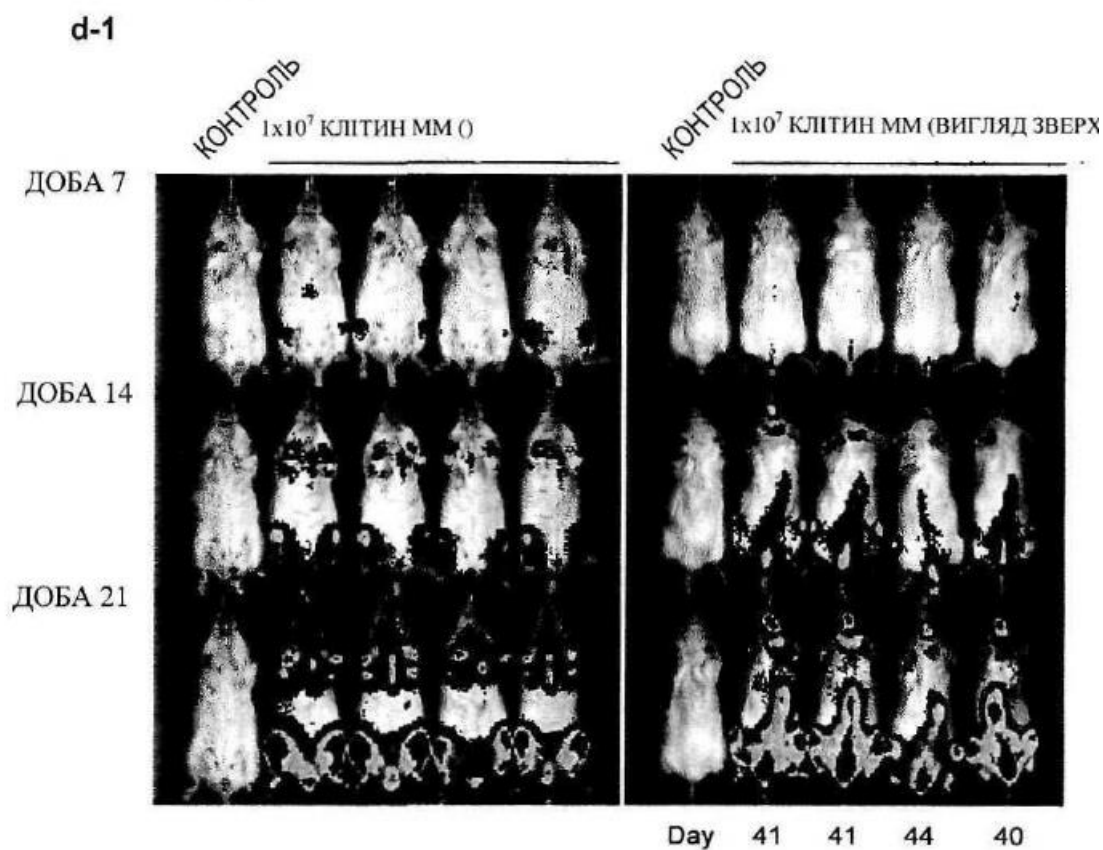
Фіг. 2В



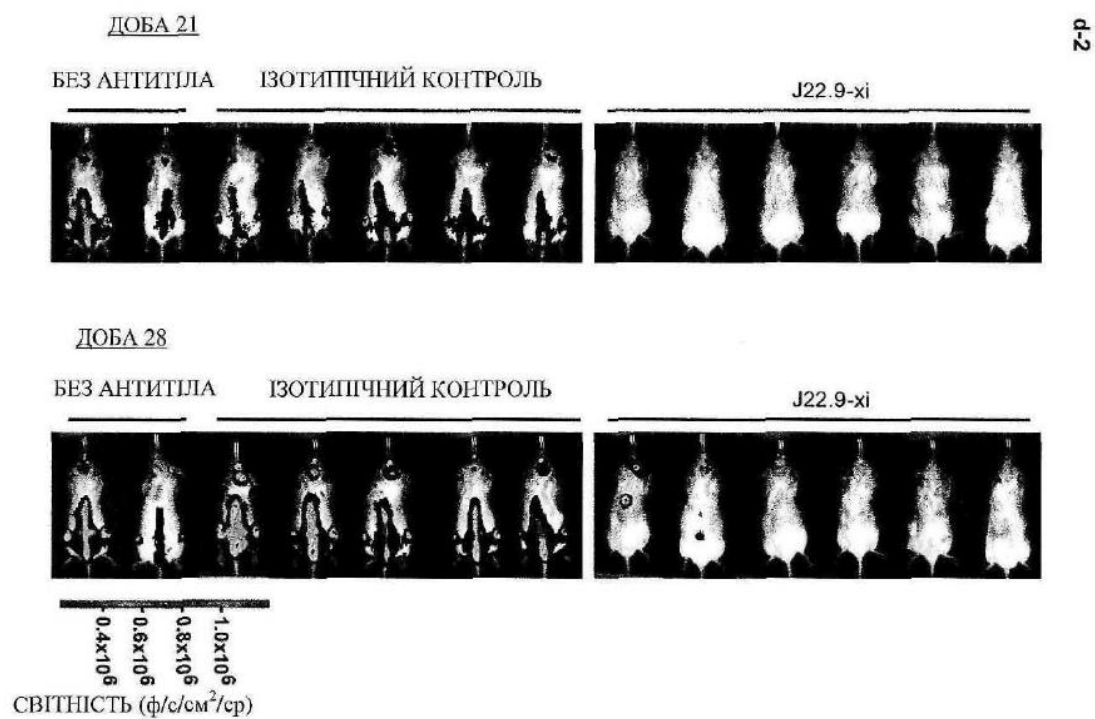
Фіг. 3



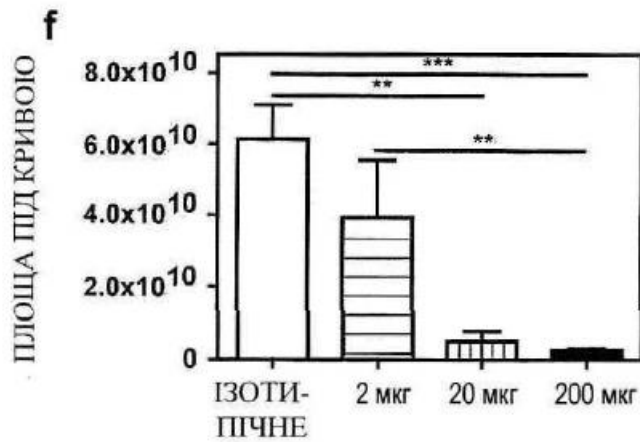
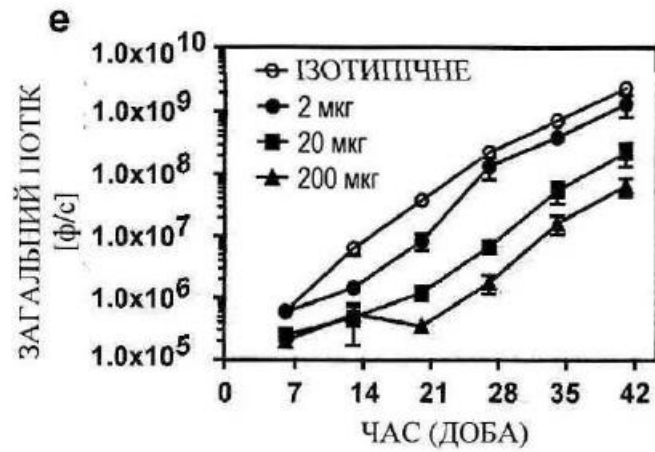
Фіг. 4



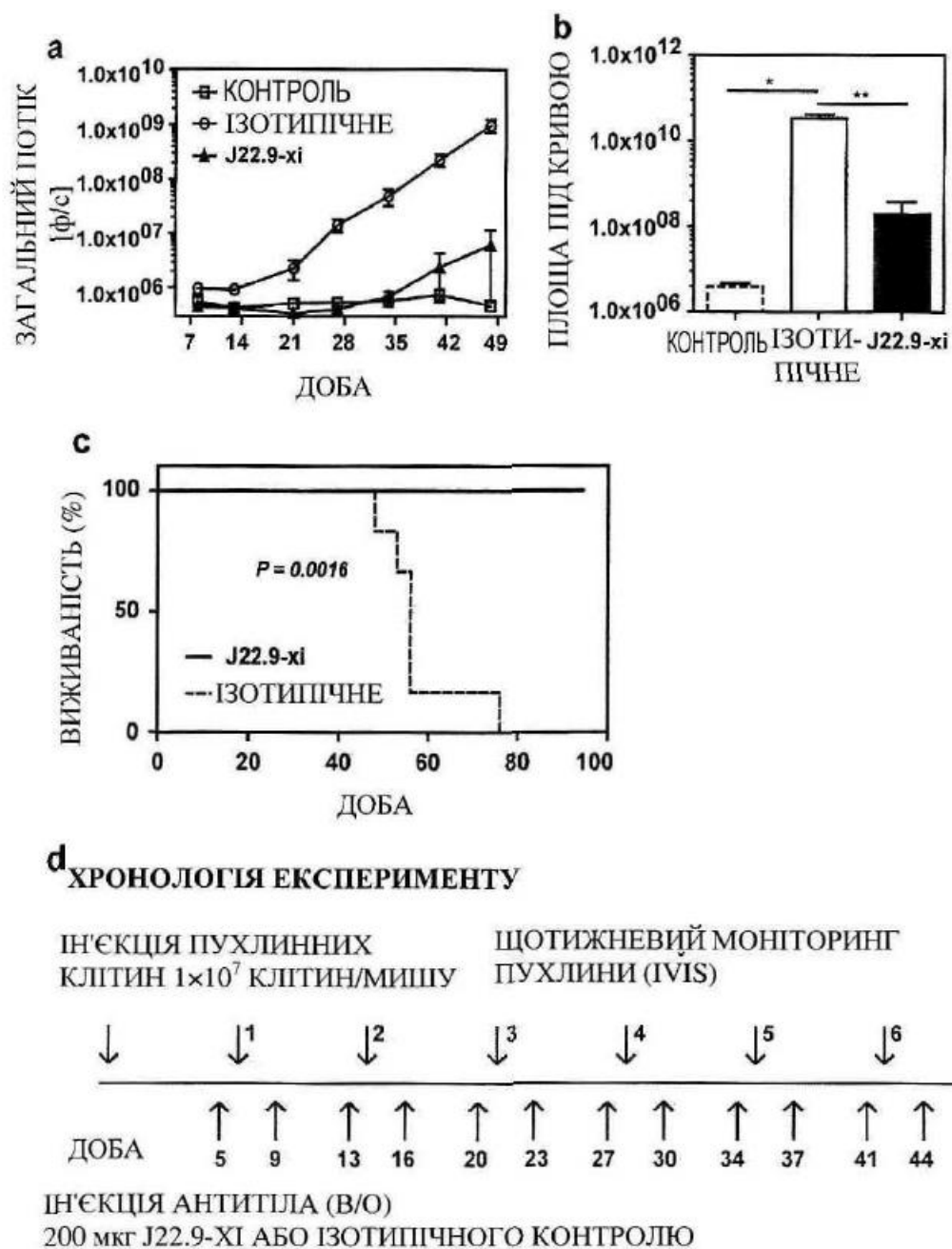
Фіг. 4 (продовження) d-1



Фіг. 4 (продовження) d-2



Фіг. 4 (продовження)



Фіг. 5

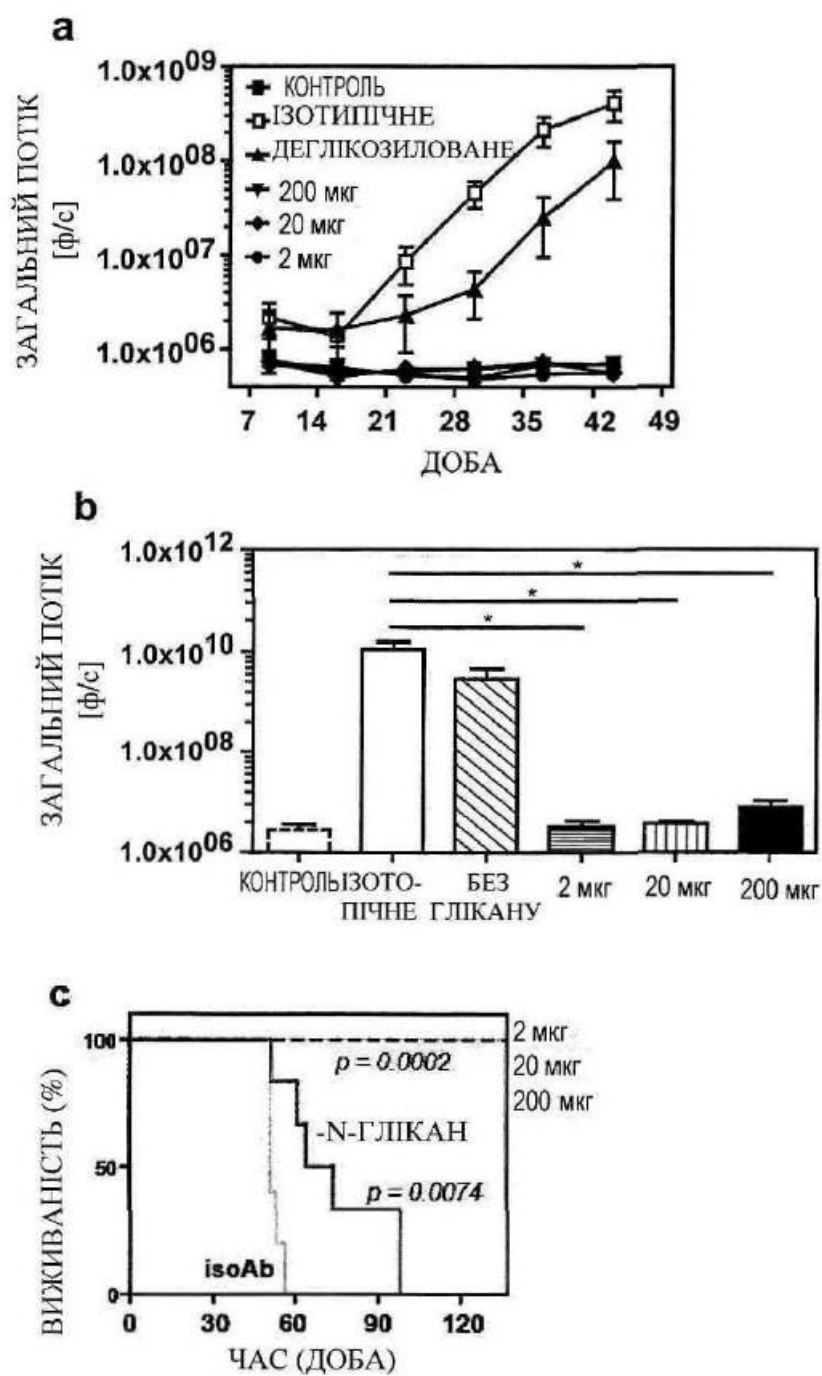
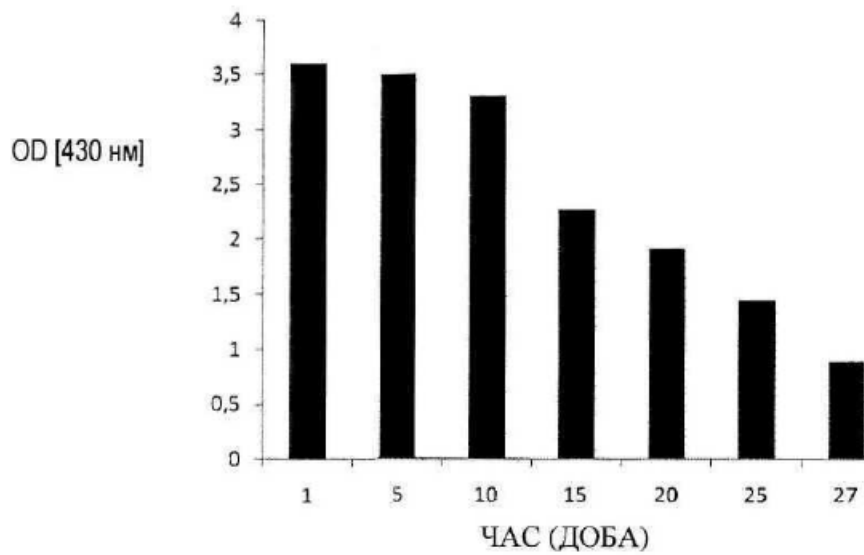


Fig. 6

d ХРОНОЛОГІЯ ЕКСПЕРИМЕНТУ



Фіг. 6 (продовження)



Фіг. 7

HC

	1	10	20	30	40	50
HCg	<u>XVQLXXSGGGLVQPGGSLXLSCAASGXFXFXXXXXWVRXAPGKGLXXXGX</u>					
HCm	<u>QVQLQQSGGGLVQPGGSLKLSCAASGIDFSRYWMSWVRRAPGKGLEWIGE</u>					
HCpH	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYWMSWVRQAPGKGLEWVGE</u>					
hHC01	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLVWVGE</u>					
hHC02	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWXS WVRQAPGKGLVWVGE</u>					
hHC03	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYXMXWVRQAPGKGLVXVGX</u>					
hHC04	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWISWVRQAPGKGLVWVGE</u>					
hHC05	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWFSWVRQAPGKGLVWVGE</u>					
hHC06	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWISWVRQAPGKGLVWVGE</u>					
hHC07	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWFSWVRQAPGKGLVWVGE</u>					
	51	60	70	80	90	100
HCg	<u>INPXXSTINYAPSLKXXFXISRDNAKNTLYLQMXXRSEDTAXYYCASXX</u>					
HCm	<u>INPDSSTINYAPSLKDKFII SRDNAKNTLYLQMSKVRSEDTALYYCASLY</u>					
HCpH	<u>INPDSSTINYAPSLKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLY</u>					
hHC01	<u>INPDSSTINYAPSLKDKFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLY</u>					
hHC02	<u>INPXXSTINYAPSLKDKFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLY</u>					
hHC03	<u>INPDSSTINYAPSLKDKFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASXX</u>					
hHC04	<u>INPNSSTINYAPSLKDKFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLY</u>					
hHC05	<u>INPNSSTINYAPSLKDKFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLY</u>					
hHC06	<u>INPSSSTINYAPSLKDKFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLY</u>					
hHC07	<u>INPSSSTINYAPSLKDKFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLY</u>					
	101	110				
HCg	<u>XDYGDXDYWGQGTXTVTVSS</u>					
HCm	<u>YDYGDAYDYWGQGTSLTVVSS</u>					
HCpH	<u>YDYGDAYDYWGQGTSLTVVSS</u>					
hHC01	<u>YDYGDAYDYWGQGTSLTVVSS</u>					
hHC02	<u>XDYGDAYDYWGQGTSLTVVSS</u>					
hHC03	<u>XDYGDXMDYWGQGTSLTVVSS</u>					
hHC04	<u>YDYGDAYDYWGQGTSLTVVSS</u>					
hHC05	<u>YDYGDAYDYWGQGTSLTVVSS</u>					
hHC06	<u>YDYGDAYDYWGQGTSLTVVSS</u>					
hHC07	<u>YDYGDAYDYWGQGTSLTVVSS</u>					

X: ВАРІАБЕЛЬНА АМІНОКИСЛОТА ЗГІДНО З ГУМАНІЗОВАНИМИ ПОСЛІДОВНОСТЯМИ

HCg: ЗАГАЛЬНА ПОСЛІДОВНІСТЬ ВАРІАБЕЛЬНОЇ ОБЛАСТІ ВАЖКОГО ЛАНЦЮГА

HCm: ПОСЛІДОВНІСТЬ ВАРІАБЕЛЬНОЇ ОБЛАСТІ ВАЖКОГО ЛАНЦЮГА МИШИ

HCpH: ЧАСТКОВО ГУМАНІЗОВАНА ПОСЛІДОВНІСТЬ ВАРІАБЕЛЬНОЇ ОБЛАСТІ ВАЖКОГО ЛАНЦЮГА

CDR ПІДКРЕСЛЕНІ В ЗАГАЛЬНІЙ ПОСЛІДОВНОСТІ І ПОСЛІДОВНОСТІ МИШИ

Fig. 8

LC

	1	10	20	30	40	50
LCg	XIVMTQSXXXXXXXXSXGXVVSXXCKASQSVXXXVXWXQQKXPQXPKXLIXX					
LCm	DIVMTQSQRFMTTISVGDRVSVTCKASQSVDSNVAWYQQKPRQSPKALIFS					
LCpH	DIVMTQSPATLSVSVGDEVTLTCKASQSVDSNVAWYQQKPGQAPKLLIYS					
hLC01	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVDSNVAWYQQKPGQAPRALIYS					
hLC02	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVXXNVAWYQQKPGQAPRALIYS					
hLC03	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVDXVXVXWXQQKPGQAPRALIXX					
hLC04	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVESNVAWYQQKPGQAPRALIYS					
	51	60	70	80	90	100
LCg	AXXRXSXGXPAREFXGSXXGTXFTLTISXLQSEDXAXYXCXQXNNXPXTFGA					
LCm	ASLRFSGVPARFTGSGSGTDFTLTISNLQSEDLAEYFCQQYNNYPLTFGA					
LCpH	DDLRFSGVPARFSGSGSGTDFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNYPLTFGA					
hLC01	ASLRFSGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNYPLTFGA					
hLC02	ASLRFSGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNYPLTFGA					
hLC03	AXXRXSXGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCXQXNNXPXTFGA					
hLC04	ASLRFSGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNYPLTFGA					
	101					
LCg	GTKLELKR					
LCm	GTKLELKR					
LCpH	GTKLELKR					
hLC01	GTKLELKR					
hLC02	GTKLELKR					
hLC03	GTKLELKR					
hLC04	GTKLELKR					

X: ВАРІАБЕЛЬНА АМІНОКИСЛОТА ЗГІДНО АБО З ПОСЛІДОВНОСТЯМИ
МИШІ, АБО З ГУМАНІЗОВАНИМИ ПОСЛІДОВНОСТЯМИ

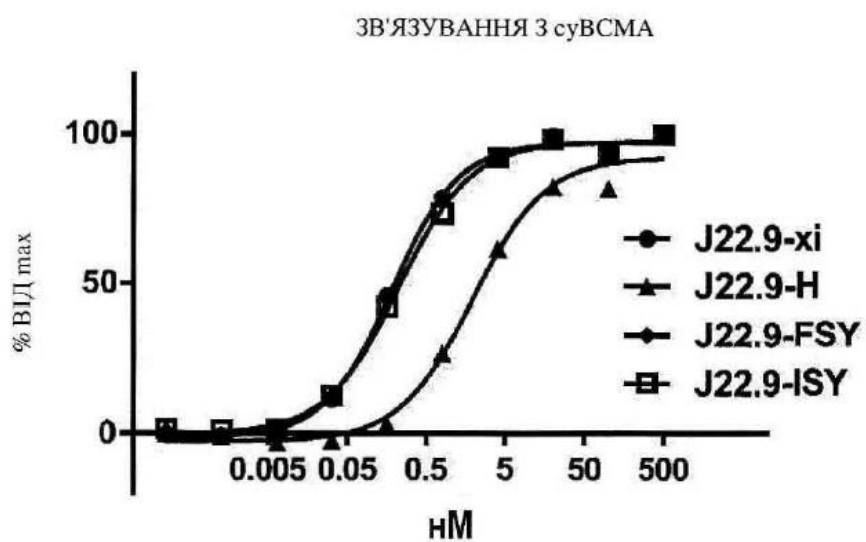
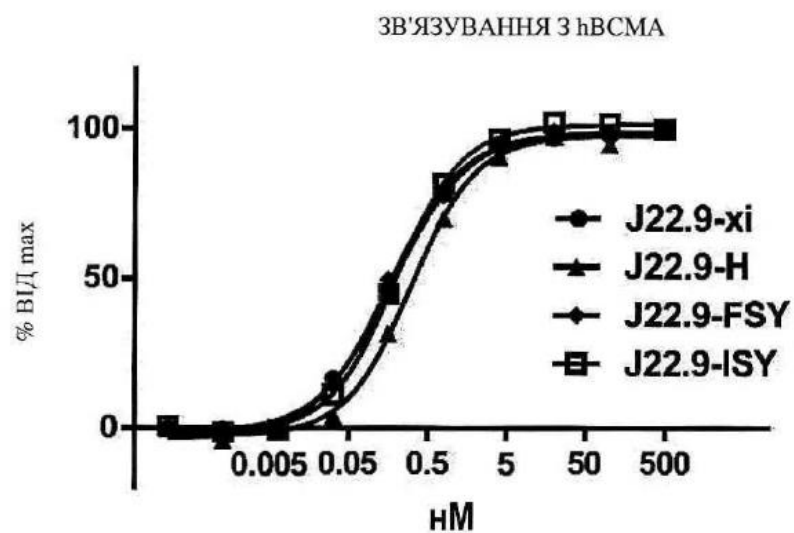
LCg: ЗАГАЛЬНА ПОСЛІДОВНІСТЬ ВАРІАБЕЛЬНОЇ ОБЛАСТІ ВАЖКОГО
ЛАНЦЮГА

LCm: ПОСЛІДОВНІСТЬ ВАРІАБЕЛЬНОЇ ОБЛАСТІ ВАЖКОГО ЛАНЦЮГА
МИШІ

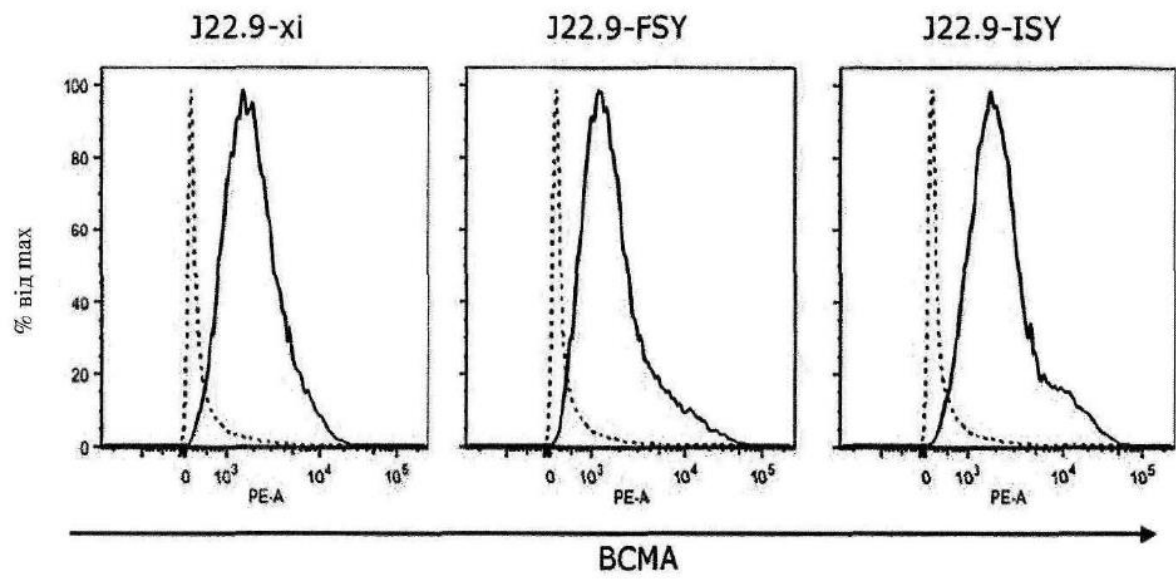
LCpH: ЧАСТКОВО ГУМАНІЗОВАНА ПОСЛІДОВНІСТЬ ВАРІАБЕЛЬНОЇ
ОБЛАСТІ ВАЖКОГО ЛАНЦЮГА

CDR ПІДКРЕСЛЕНІ В ЗАГАЛЬНІЙ ПОСЛІДОВНОСТІ І ПОСЛІДОВНОСТІ
МИШІ

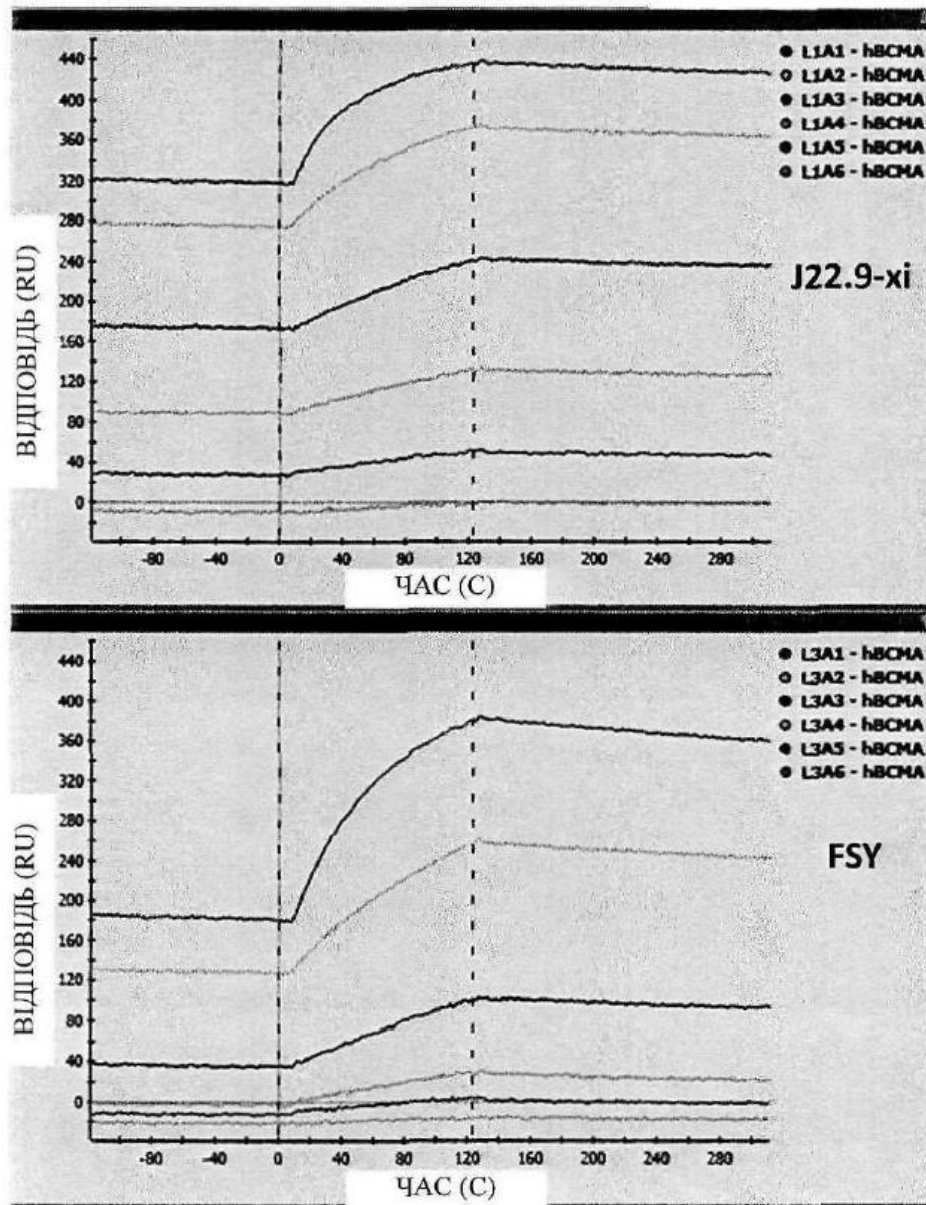
Fig. 9



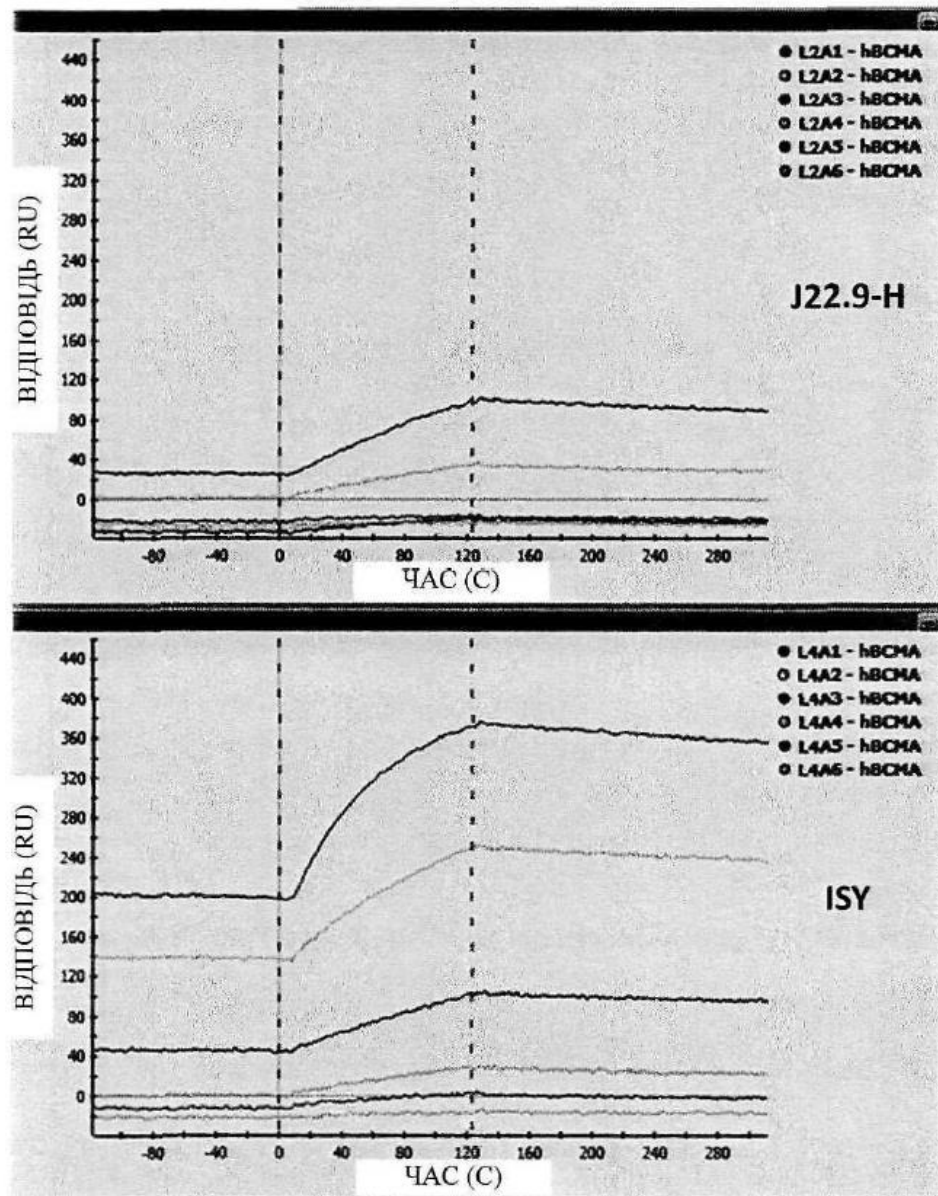
Фіг. 10



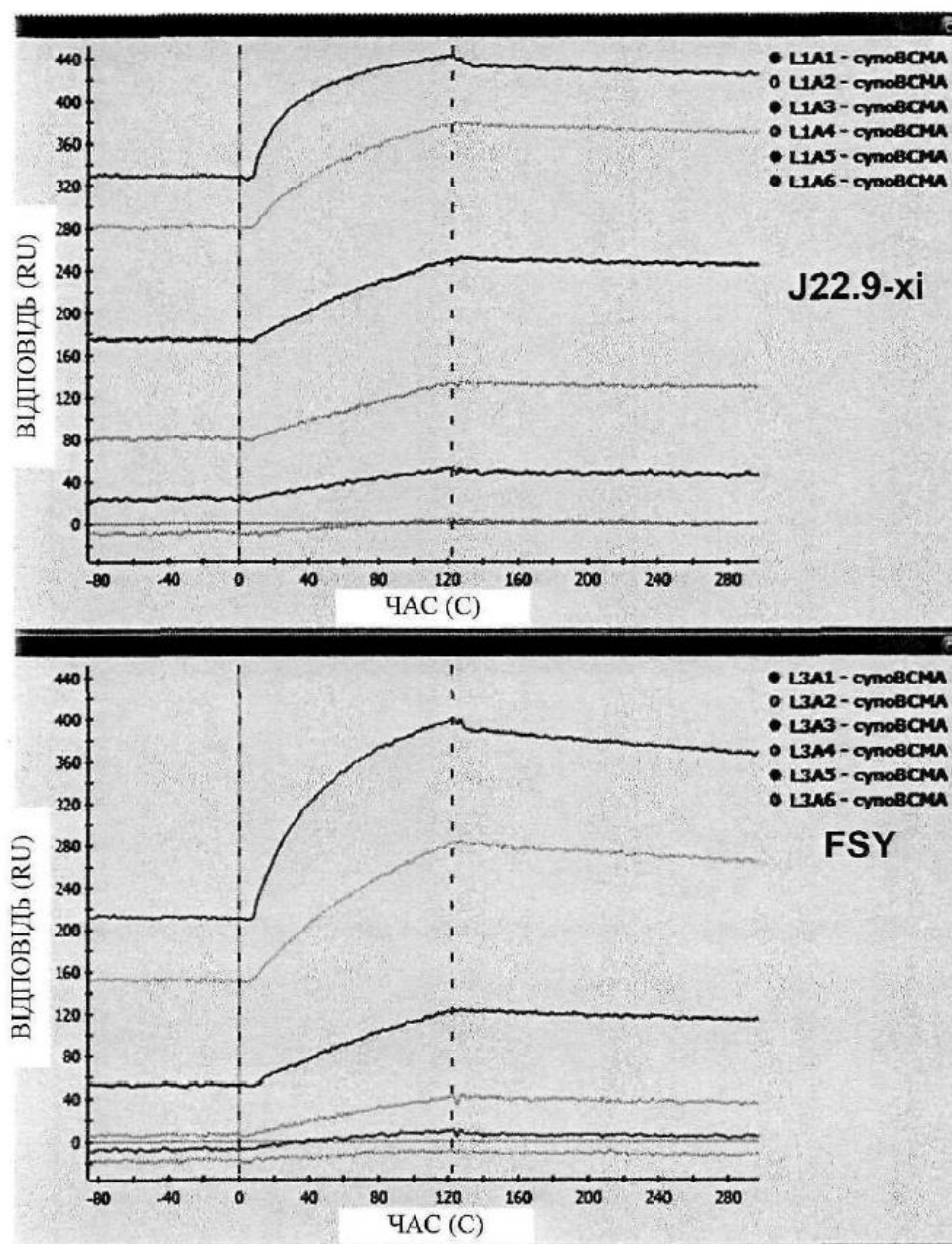
Фіг. 11



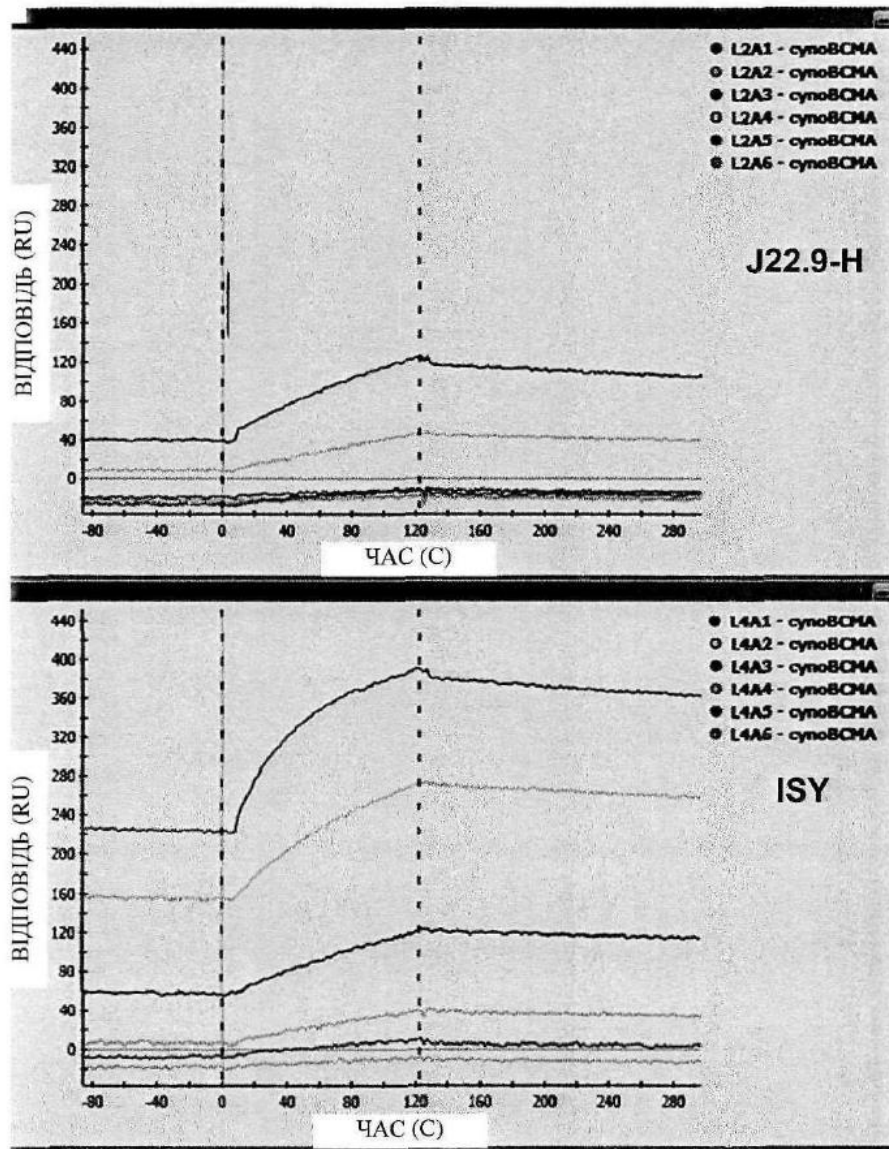
Фіг. 12А



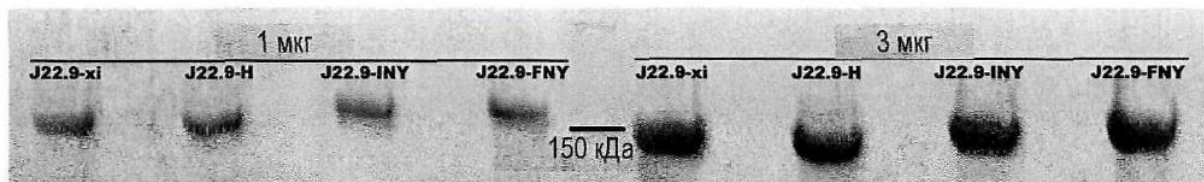
Фіг. 12А (продовження)



Фіг. 12В



Фіг. 12В (продовження)



Фіг. 13

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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