

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201990493** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2019.11.29**

(22) Дата подачи заявки  
**2017.09.18**

(51) Int. Cl. *C07K 16/24* (2006.01)  
*C12N 15/13* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61P 29/00* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*A61P 37/02* (2006.01)  
*A61P 35/02* (2006.01)  
*A61P 19/02* (2006.01)  
*G01N 33/577* (2006.01)  
*G01N 33/68* (2006.01)

---

(54) **АНТИТЕЛА К ГМ-КСФ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

(31) **201610831525.9; 201610832677.0**

(32) **2016.09.19**

(33) **CN**

(86) **PCT/CN2017/102057**

(87) **WO 2018/050111 2018.03.22**

(71) Заявитель:  
**АЙ-МАБ (КУ)**

(72) Изобретатель:  
**Ван Чжэнъи, Фан Лэй, Гуо Бинши,  
Цзан Цзинъу (CN)**

(74) Представитель:  
**Нилова М.И. (RU)**

(57) Предложены антитела к ГМ-КСФ или их фрагменты, включая гуманизированные антитела и фрагменты. Также предложены применения антител и фрагментов в терапевтических, диагностических и прогностических целях. Терапевтические применения антител и фрагментов, например, включают лечение воспалительных и аутоиммунных заболеваний и расстройств.

**A1**

**201990493**

**201990493**

**A1**

## АНТИТЕЛА К ГМ-КСФ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

**[0001]** Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ или GM-CSF), также известный как колониестимулирующий фактор 2 (КСФ2), представляет собой мономерный гликопротеин, секретируемый макрофагами, Т-клетками, тучными клетками, NK-клетками, эндотелиальными клетками и фибробластами, выполняющий функцию цитокина. Фармацевтические аналоги природного ГМ-КСФ также называют сарграмостимом и молграмостимом. В отличие от гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, который способствует пролиферации и созреванию исключительно нейтрофилов, ГМ-КСФ воздействует на большее число типов клеток, особенно на макрофаги и эозинофилы.

**[0002]** ГМ-КСФ представляет собой мономерный гликопротеин, выполняющий функцию цитокина. ГМ-КСФ стимулирует стволовые клетки к образованию гранулоцитов (нейтрофилов, эозинофилов и базофилов) и моноцитов. Моноциты выходят из кровообращения и мигрируют в ткани, после чего они созревают в макрофаги и дендритные клетки. Таким образом, он является частью иммунного/воспалительного каскада, посредством которого активация небольшого количества макрофагов может быстро привести к увеличению их числа, что является решающим процессом для борьбы с инфекцией. ГМ-КСФ также оказывает некоторое действие на зрелые клетки иммунной системы. Оно включает, например, ингибирование миграции нейтрофилов и инициирование изменения экспрессии рецепторов на поверхности клеток.

**[0003]** ГМ-КСФ передает сигналы через передатчик сигналов и активатор транскрипции, STAT5. Было также показано, что в макрофагах он передает сигналы через STAT3. Цитокин активирует подавление макрофагами выживания грибков. Он вызывает недостаток внутриклеточного свободного цинка и увеличивает выработку активных форм кислорода, что приводит к нехватке цинка и токсичности для грибка. Таким образом, ГМ-КСФ содействует развитию иммунной системы и способствует защите от инфекций. ГМ-КСФ также играет роль в эмбриональном развитии, выполняя функцию эмбриокина, вырабатываемого репродуктивным трактом.

**[0004]** ГМ-КСФ получают с использованием технологии рекомбинантных ДНК и реализуют как белковое терапевтическое средство, называемое молграмостимом, или, когда белок экспрессируется в клетках дрожжей, сарграмостимом. Он используется в качестве лекарственного средства для стимуляции выработки лейкоцитов и, таким образом, предотвращения нейтропении после химиотерапии. Также в клинических испытаниях была проведена оценка потенциала ГМ-КСФ в качестве адъюванта вакцины у ВИЧ-инфицированных пациентов.

**[0005]** Ингибирование ГМ-КСФ, напротив, может быть полезным для лечения заболеваний, таких как воспалительные заболевания и аутоиммунные расстройства, включая ревматоидный артрит (РА), рассеянный склероз (РС) и бляшечный псориаз. Ингибирование ГМ-КСФ также может быть эффективным для лечения рака.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

**[0006]** Настоящее изобретение относится к антителу к ГМ-КСФ, обладающему высокой аффинностью связывания с человеческими белками ГМ-КСФ и обладающим высокой ингибирующей активностью в отношении связывания ГМ-КСФ с его рецептором. Эти антитела к ГМ-КСФ пригодны для терапевтических целей, таких как лечение различных типов воспалительных заболеваний, аутоиммунных расстройств и раковых заболеваний, а также могут быть использованы в диагностических и прогностических целях.

**[0007]** В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предложено выделенное антитело или его фрагмент, причем указанное антитело или его фрагмент обладает специфичностью к человеческому белку ГМ-КСФ и содержит CDR1 VH с последовательностью SEQ ID NO: 1, CDR2 VH с последовательностью SEQ ID NO: 2, CDR3 VH с последовательностью SEQ ID NO: 3, CDR1 VL с последовательностью SEQ ID NO: 4, CDR2 VL с последовательностью SEQ ID NO: 5 и CDR3 VL с последовательностью SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент дополнительно содержит константную область тяжелой цепи, константную область легкой цепи, область Fc или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления константная область легкой цепи представляет собой константную область каппа-цепи или лямбда-цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент имеет изотип IgG, IgM, IgA, IgE или IgD. В

некоторых вариантах осуществления изотип представляет собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент представляет собой химерное антитело, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело.

**[0008]** В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую один или более аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из: (a) Glu в положении 1, (b) Arg в положении 98, (c) Ser в положении 72, (d) Ala в положении 68, (e) Leu в положении 70, Le в положении 48, (g) Asp в положении 26 и (h) Leu в положении 29, согласно системе нумерации по Kabat, и их комбинации.

**[0009]** В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи содержит фрагмент DYTLLT (SEQ ID NO: 42) или GYTFTT (SEQ ID NO: 43), начинающийся с положения 26 согласно системе нумерации по Kabat.

**[0010]** В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент содержит переменную область легкой цепи, содержащую один или более аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из: (a) Ala в положении 46, (b) Asp в положении 60, (c) Asp в положении 70, (d) Ser в положении 43 и (f) Phe в положении 87, согласно системе нумерации по нумерации по Kabat, и их комбинации.

**[0011]** В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-17, или пептид, последовательность которого по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-17. В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, 14 или 17.

**[0012]** В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19-22, или пептид, последовательность которого по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:

19-22. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 или 22.

**[0013]** В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент представляет собой биспецифическое антитело или одноцепочечный вариабельный фрагмент.

**[0014]** В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предложено выделенное антитело или его фрагмент, причем указанное антитело или его фрагмент обладает специфичностью к человеческому белку ГМ-КСФ и содержит CDR1 VH с последовательностью SEQ ID NO: 23, CDR2 VH с последовательностью SEQ ID NO: 24, CDR3 VH с последовательностью SEQ ID NO: 25, CDR1 VL с последовательностью SEQ ID NO: 26, CDR2 VL с последовательностью SEQ ID NO: 27 и CDR3 VL с последовательностью SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент дополнительно содержит константную область тяжелой цепи, константную область легкой цепи, область Fc или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления константная область легкой цепи представляет собой константную область каппа-цепи или лямбда-цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент имеет изотип IgG, IgM, IgA, IgE или IgD. В некоторых вариантах осуществления изотип представляет собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент представляет собой химерное антитело, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело.

**[0015]** В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую один или более аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из E1, R84, Y27, I28, I48, T68, L70 или T30, согласно системе нумерации по нумерации по Kabat, и их комбинации.

**[0016]** В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи содержит фрагмент GYIFT (SEQ ID NO: 44), GYIFS (SEQ ID NO: 45) или GGTFSS (SEQ ID NO: 46), начинающийся с положения 26 согласно системе нумерации по Kabat.

**[0017]** В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент содержит переменную область легкой цепи, содержащую один или более аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из: V48, D57, Q70 или S43, согласно системе нумерации по Kabat, и их комбинации.

**[0018]** В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29-35, или пептид, последовательность которого по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29-35. В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 или 35.

**[0019]** В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 36-41, или пептид, последовательность которого по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 36-41. В некоторых вариантах осуществления переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38 или 39.

**[0020]** В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент представляет собой биспецифическое антитело или одноцепочечный переменный фрагмент.

**[0021]** В одном из вариантов осуществления предложена композиция, содержащая антитело или его фрагмент согласно настоящему изобретению и фармацевтически

приемлемый носитель. В одном из вариантов осуществления также предложена выделенная клетка, содержащая один или более полинуклеотидов, кодирующих антитело или его фрагмент согласно настоящему изобретению.

**[0022]** В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения воспалительного или аутоиммунного заболевания или состояния у нуждающегося в этом пациента, включающий введение указанному пациенту антитела, или его фрагмента, или композиции согласно настоящему изобретению. Также предложены применения антитела, или его фрагмента, или композиции для изготовления лекарственного средства для лечения воспалительного или аутоиммунного заболевания или состояния.

**[0023]** В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание или состояние выбрано из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, болезни Аддисона, атеросклероза, анкилозирующего спондилита, артрита, остеоартрита (ОА), ревматоидного артрита (РА), псориатического артрита (ПА), анкилозирующего спондилита, астмы, атеросклероза, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), болезни Крона, колита, дерматита, дивертикулита, фибромиалгии, гепатита, синдрома раздраженного кишечника (СРК), системной красной волчанки (СКВ), нефрита, болезни Паркинсона (БП), васкулита и язвенного колита.

**[0024]** В одном из вариантов осуществления также предложен способ уменьшения или облегчения боли у нуждающегося в этом пациента, включающий введение указанному пациенту антитела или его фрагмента согласно настоящему изобретению.

**[0025]** В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное заболевание или состояние выбрано из группы, состоящей из очаговой алопеции, аутоиммунной гемолитической анемии, аутоиммунного гепатита, дерматомиозита, диабета (1 типа), целиакии, аутоиммунного ювенильного идиопатического артрита, гломерулонефрита, болезни Грейвса, синдрома Гийена-Барре, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, миастении гравис, аутоиммунного миокардита, рассеянного склероза, пемфигуса/пемфигоида, пернициозной анемии, узелкового полиартериита, полимиозита, первичного билиарного цирроза, псориаза, ревматоидного артрита, склеродермии/системного склероза, синдрома Шегрена, системной красной волчанки,

аутоиммунного тиреоидита, тиреоидита Хашимото, аутоиммунного увеита, витилиго и гранулематоза с полиангиитом (Вегенера).

[0026] Также предложен способ обнаружения экспрессии ГМ-КСФ в образце, включающий приведение образца в контакт с антителом или его фрагментом в условиях, обеспечивающих связывание антитела или его фрагмента с ГМ-КСФ, и обнаружение связывания, свидетельствующего об экспрессии ГМ-КСФ в образце.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

[0027] На **ФИГ. 1** показаны результаты подтверждающих анализов связывания ELISA для отбора первичных гибридомных клонов для субклонирования.

[0028] На **ФИГ. 2** показаны результаты подтверждающих анализов связывания ELISA для отбора первичных гибридомных клонов для субклонирования.

[0029] На **ФИГ. 3** показано дозозависимое связывание тестируемых антител с человеческим ГМ-КСФ.

[0030] На **ФИГ. 4** приведено графическое представление кинетики связывания антител с рекомбинантным человеческим ГМ-КСФ.

[0031] На **ФИГ. 5** показано дозозависимое ингибирование антителами связывания ГМ-КСФ с альфа-субъединицей рецептора ГМ-КСФ.

[0032] На **ФИГ. 6** показано, что антитела значительно снижали уровень активации pSTAT5, вызванной ГМ-КСФ.

[0033] На **ФИГ. 7** показано ингибирование антителами ГМ-КСФ-зависимой пролиферации TF-1.

[0034] На **ФИГ. 8** показано, что все гуманизированные антитела продемонстрировали высокую способность связывания с человеческим ГМ-КСФ.

[0035] На **ФИГ. 9** показано, что несколько гуманизированных антител демонстрировали сильнейшее ингибирование пролиферации TF-1.



[0036] На **ФИГ. 10** показано, что исследованные антитела эффективно блокировали передачу сигналов pSTAT5.

[0037] На **ФИГ. 11** показано дозозависимое связывание антител с ГМ-КСФ макака-резуса.

[0038] На **ФИГ. 12** приведено графическое представление фармакокинетических параметров Nu23F4-27.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

### *Определения*

[0039] Следует отметить, что термин в единственном числе в полной мере относится к одному или более выраженным таким термином объектам; например, под «антителом» подразумевается одно или более антител. Соответственно, термины в единственном числе, термины «один», «один или более» и «по меньшей мере один» в настоящем документе могут использоваться взаимозаменяемо.

[0040] В контексте настоящего документа подразумевается, что термин «полипептид» включает «полипептид» в единственном числе, а также множество «полипептидов», и относится к молекуле, состоящей из мономеров (аминокислот), линейно связанных амидными связями (также известными как пептидные связи). Термин «полипептид» относится к любой цепи или цепям из двух или более аминокислот, и не относится к определенной длине продукта. Таким образом, пептиды, дипептиды, трипептиды, олигопептиды, «белок», «аминокислотная цепь» или любой другой термин, используемый для обозначения цепи или цепей из двух или более аминокислот, охватываются определением «полипептид», и термин «полипептид» может использоваться вместо или взаимозаменяемо с любым из этих терминов. Также подразумевается, что термин «полипептид» относится к продуктам постэкспрессионных модификаций полипептида, в том числе, не ограничиваясь перечисленным, гликозилирования, ацетилирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации известными защитными/блокирующими группами, протеолитиза или модификации аминокислотами неприродного происхождения. Полипептид может происходить из естественного биологического источника или быть получен с помощью рекомбинантной технологии, однако он не обязательно

транслирован с заданной последовательности нуклеиновой кислоты. Он может быть получен любым способом, в том числе путем химического синтеза.

**[0041]** В контексте настоящего документа термин «выделенный», используемый в отношении клеток, нуклеиновых кислот, таких как ДНК или РНК, относится к молекулам, отделенным от других ДНК или РНК, соответственно, которые присутствуют в природном источнике макромолекулы. В контексте настоящего документа термин «выделенный» также относится к нуклеиновой кислоте или пептиду, которые по существу не содержат клеточного материала, вирусного материала или культуральной среды, если они были получены технологией рекомбинантных ДНК, или химических прекурсоров или других химических веществ, если они были получены путем химического синтеза. Кроме того, подразумевается, что «выделенная нуклеиновая кислота» включает фрагменты нуклеиновой кислоты, которые не встречаются в природе в виде фрагментов и не встречаются в естественном состоянии. Термин «выделенный» также используется в настоящем документе для обозначения клеток или полипептидов, выделенных из других клеточных белков или тканей. Подразумевается, что выделенные полипептиды включают как очищенные, так и рекомбинантные полипептиды.

**[0042]** В контексте настоящего документа подразумевается, что термин «рекомбинантный» при использовании в отношении полипептидов или полинуклеотидов означает форму полипептида или полинуклеотида, не существующей в природе, неограничивающий пример которой может быть создан путем объединения полинуклеотидов или полипептидов, которые в обычных условиях не встречаются вместе.

**[0043]** «Гомологичность», или «идентичность», или «сходство» относится к сходству последовательностей между двумя пептидами или между двумя молекулами нуклеиновой кислоты. Гомологичность может быть определена путем сравнения положения в каждой последовательности, которые для целей сравнения могут быть выравнены. Когда положение в сравниваемой последовательности занято одним и тем же основанием или аминокислотой, молекулы в этом положении гомологичны. Степень гомологичности последовательностей зависит от количества совпадающих или гомологичных положений, общих для последовательностей. «Неродственная» или

«негомологичная» последовательность идентична менее чем на 40%, предпочтительно менее чем на 25%, одной из последовательностей согласно настоящему изобретению.

**[0044]** Если полинуклеотид или полинуклеотидная область (или полипептид или полипептидная область) имеет определенный процент (например, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) «идентичности последовательностей» с другой последовательностью, это означает, что при выравнивании последовательностей этот процент оснований (или аминокислот) при сравнении двух последовательностей является одинаковым. Это выравнивание и процент гомологичности или идентичности последовательностей могут быть определены с использованием программного обеспечения, известного в данной области техники, например, описанного в Ausubel *et al.* eds. (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*. Предпочтительно для выравнивания используются параметры по умолчанию. Одной из программ для выравнивания является BLAST, использующая параметры по умолчанию. В частности, программами являются BLASTN и BLASTP, использующие следующие параметры по умолчанию: Генетический код = стандартный; фильтр = отсутствует; цепь = обе; отсечка = 60; ожидание = 10; Матрица = BLOSUM62; Описания = 50 последовательностей; сортировать по = ВЫСОКИЙ ПРОЦЕНТ СОВПАДЕНИЯ; Базы данных = избыточные, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + SwissProtein + SPupdate + PIR. Биологически эквивалентными полинуклеотидами являются полинуклеотиды, имеющие указанный выше процент гомологичности и кодирующие полипептид, имеющий такую же или схожую биологическую активность.

**[0045]** Термин «эквивалентная нуклеиновая кислота или полинуклеотид» относится к нуклеиновой кислоте, имеющей нуклеотидную последовательность, имеющую определенную степень гомологичности или идентичности последовательностей с нуклеотидной последовательностью нуклеиновой кислоты или ее комплемента. Подразумевается, что гомолог двухцепочечной нуклеиновой кислоты включает нуклеиновые кислоты, имеющие нуклеотидную последовательность, которая имеет определенную степень гомологичности с ней или с ее комплементом. В одном из аспектов гомологи нуклеиновых кислот способны гибридизоваться с нуклеиновой кислотой или ее комплементом. Аналогичным образом «эквивалентный полипептид» относится к полипептиду, имеющему определенную степень гомологичности или идентичности последовательностей с аминокислотной последовательностью

референсного полипептида. В некоторых аспектах идентичность последовательностей составляет по меньшей мере приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%. В некоторых аспектах эквивалентный полипептид или полинуклеотид имеет одно, два, три, четыре или пять вставок, делеций, замен и их комбинаций по сравнению с референсным полипептидом или полинуклеотидом. В некоторых аспектах эквивалентная последовательность сохраняет активность (например, связывание с эпитопом) или структуру (например, солевой мостик) референсной последовательности.

**[0046]** Реакции гибридизации могут быть проведены в условиях различной «жесткости». Как правило, реакцию гибридизации низкой жесткости проводят при температуре приблизительно 40 °С в приблизительно 10 × SSC (цитрат и хлорид натрия) или растворе с эквивалентной ионной силой/температурой. Гибридизацию средней жесткости обычно проводят при приблизительно 50 °С в приблизительно 6 × SSC, и реакцию гибридизации высокой жесткости обычно проводят при приблизительно 60 °С в приблизительно 1 × SSC. Реакции гибридизации также могут быть проведены в «физиологических условиях», хорошо известных специалисту в данной области техники. Неограничивающим примером физиологических условий являются температура, ионная сила, pH и концентрация  $Mg^{2+}$ , обычно встречающиеся в клетке.

**[0047]** Полинуклеотид состоит из определенной последовательности четырех нуклеотидных оснований: аденин (A); цитозин (C); гуанин (G); тимин (T); и урацил (U) вместо тимина, когда полинуклеотид представляет собой РНК. Таким образом, термин «полинуклеотидная последовательность» является буквенным представлением молекулы полинуклеотида. Это буквенное представление может быть введено в базы данных на компьютере, имеющем центральный процессор, и использовано в целях биоинформатики, таких как функциональная геномика и поиск гомологичных последовательностей. Термин «полиморфизм» относится к сосуществованию более чем одной формы гена или его части. Часть гена, имеющая по меньшей мере две разные формы, то есть две разные нуклеотидные последовательности, называется «полиморфной областью гена». Полиморфная область может представлять собой один нуклеотид, который может быть различным в различных аллелях.

**[0048]** Термины «полинуклеотид» и «олигонуклеотид» используются взаимозаменяемо и относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, либо дезоксирибонуклеотидов, либо рибонуклеотидов, либо их аналогов. Полинуклеотиды могут иметь любую трехмерную структуру и могут выполнять любую функцию, известную или неизвестную. Ниже приведены неограничивающие примеры полинуклеотидов: ген или фрагмент гена (например, зонд, праймер, метка EST или SAGE), экзоны, интроны, информационная РНК (иРНК), транспортная РНК, рибосомная РНК, рибозимы, кДНК (комплементарная ДНК), дцРНК (двухцепочечная РНК), миРНК (малые интерферирующие РНК), микроРНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенная ДНК любой последовательности, выделенная РНК любой последовательности, нуклеотидные зонды и праймеры. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и нуклеотидные аналоги. Модификация структуры нуклеотида, если она имеет место, может быть проведена до или после сборки полинуклеотида. Последовательность нуклеотидов может быть прервана ненуклеотидными компонентами. Полинуклеотид может быть дополнительно модифицирован после полимеризации, например, путем конъюгации с метящим компонентом. Термин также относится как к двухцепочечным, так и к одноцепочечным молекулам. Если иное не указано или не требуется, любой вариант осуществления настоящего изобретения, который представляет собой полинуклеотид, охватывает как двухцепочечную форму, так и каждую из двух комплементарных одноцепочечных форм, образующих или теоретически образующих двухцепочечную форму.

**[0049]** Термин «кодировать» в контексте полинуклеотидов относится к полинуклеотиду, о котором говорят, что он «кодирует» полипептид, если в его нативном состоянии или при изменении способами, хорошо известными специалистам в данной области техники, он может подвергаться транскрипции и/или трансляции с получением иРНК полипептида и/или его фрагмента. Антисмысловая цепь является комплементом такой нуклеиновой кислоты, и из нее может быть получена кодирующая последовательность.

**[0050]** В контексте настоящего документа термин «антитело» или «антигенсвязывающий полипептид» относится к полипептиду или полипептидному

комплексу, который специфически распознает и связывается с антигеном. Антитело может представлять собой целое антитело и любой антигенсвязывающий фрагмент, или одну его цепь. Таким образом, термин «антитело» включает любую молекулу, содержащую белок или пептид, которая содержит по меньшей мере часть молекулы иммуноглобулина, обладающую биологической активностью связывания с антигеном. Их примеры включают, не ограничиваясь перечисленным, определяющую комплементарность область (CDR) тяжелой или легкой цепи или ее лигандсвязывающую часть, переменную область тяжелой цепи или легкой цепи, константную область тяжелой цепи или легкой цепи, каркасную (FR) область, или любые их части, или по меньшей мере одну часть связывающего белка.

**[0051]** Термины «фрагмент антитела» или «антигенсвязывающий фрагмент» в контексте настоящего документа представляют собой часть антитела, такую как  $F(ab')_2$ ,  $F(ab)_2$ ,  $Fab'$ ,  $Fab$ ,  $Fv$ ,  $scFv$  и тому подобное. Независимо от структуры фрагмент антитела связывается с тем же антигеном, который распознается интактным антителом. Термин «фрагмент антитела» включает аптамеры, шпигельмеры и диатела. Термин «фрагмент антитела» также включает любой синтетический или генетически модифицированный белок, действующий как антитело, связываясь с определенным антигеном с образованием комплекса.

**[0052]** «Одноцепочечный переменный фрагмент» или « $scFv$ » относится к слитому белку переменных областей тяжелой ( $V_H$ ) и легкой ( $V_L$ ) цепей иммуноглобулинов. В некоторых аспектах области соединены коротким линкерным пептидом длиной от 10 до приблизительно 25 аминокислот. Линкер может иметь высокое содержание глицина для гибкости, а также серина или треонина для растворимости, и может либо соединять N-конец  $V_H$  с C-концом  $V_L$ , либо наоборот. Этот белок сохраняет специфичность исходного иммуноглобулина, несмотря на удаление константных областей и введение линкера. Молекулы  $ScFv$  известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США 5892019.

**[0053]** Термин «антитело» охватывает различные широкие классы полипептидов, которые являются биохимически различимыми. Специалистам в данной области техники известно, что тяжелые цепи классифицируются на гамма, мю, альфа, дельта или эpsilon ( $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ), среди которых есть некоторые подклассы (например,  $\gamma 1$ - $\gamma 4$ ). Именно природа этой цепи определяет «класс» антитела как IgG, IgM, IgA, IgG или IgE,

соответственно. Подклассы (изотипы) иммуноглобулинов, например, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgG<sub>5</sub> и т. д., хорошо охарактеризованы и, как известно, придают функциональную специализацию. Модифицированные версии каждого из этих классов и изотипов легко различимы специалистом в данной области техники с учетом настоящего описания и, соответственно, находятся в пределах объема настоящего изобретения. Все классы иммуноглобулинов со всей очевидностью находятся в пределах объема настоящего изобретения, при этом последующее обсуждение будет большей частью касаться класса IgG молекул иммуноглобулинов. Что касается IgG, стандартная молекула иммуноглобулина содержит два идентичных полипептида легкой цепи молекулярной массой приблизительно 23000 дальтон и два идентичных полипептида тяжелой цепи молекулярной массой 53000-70000. Четыре цепи, как правило, соединены дисульфидными связями в конфигурацию «Y», где легкие цепи включают в себе тяжелые цепи, начинающиеся в устье «Y» и продолжающиеся через переменную область.

**[0054]** Антитела, антигенсвязывающие полипептиды, их варианты или производные согласно настоящему изобретению включают, не ограничиваясь перечисленным, поликлональные, моноклональные, полиспецифические, человеческие, гуманизированные, приматизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, эпитоп-связывающие фрагменты, например, Fab, Fab' и F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fvs, одноцепочечные Fvs (scFv), одноцепочечные антитела, дисульфид-связанные Fvs (sdFv), фрагменты, содержащие VK- или VH-домен, фрагменты, полученные с помощью экспрессионной библиотеки Fab-фрагментов, и антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-Id-антитела к антителам LIGHT, раскрытым в настоящем документе). Молекулы иммуноглобулинов или антител согласно настоящему изобретению могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса молекулы иммуноглобулина.

**[0055]** Легкие цепи классифицируют на каппа или лямбда (K, λ). Каждый класс тяжелой цепи может быть связан с легкой каппа- или лямбда-цепью. Как правило, легкая и тяжелая цепи ковалентно связаны друг с другом, а «хвостовые» части двух тяжелых цепей связаны друг с другом ковалентными дисульфидными связями или нековалентными связями, когда молекулы иммуноглобулинов вырабатываются

гибридомами, В-клетками или генетически модифицированными клетками-хозяевами. В тяжелой цепи аминокислотные последовательности проходят от N-конца на раздвоенных концах Y-образной конфигурации до С-конца в нижней части каждой цепи.

**[0056]** Как легкие, так и тяжелые цепи делятся на области структурной и функциональной гомологичности. Термины «константа» и «переменная» используются функционально. В этой связи следует понимать, что переменные домены частей легкой (VK), так и тяжелой (VH) цепей определяют распознавание антигена и специфичность. И наоборот, константные домены легкой цепи (СК) и тяжелой цепи (СН1, СН2 или СН3) придают важные биологические свойства, такие как секреция, трансплацентарный перенос, связывание Fc-рецептора, связывание комплемента и тому подобное. Принято, что номера доменов константной области возрастают при удалении от антигенсвязывающего сайта или аминоконца антитела. N-концевая часть является переменной областью, а С-концевая часть является константной областью; домены СН3 и СК фактически содержат карбоксиконец тяжелой и легкой цепей, соответственно.

**[0057]** Как указано выше, переменная область позволяет антителу селективно распознавать и специфически связывать эпитопы на антигенах. То есть, VK-домен и VH-домен, или подмножество определяющих комплементарность областей (CDR) антитела объединяются, образуя переменную область, которая определяет трехмерный антигенсвязывающий сайт. Эта четвертичная структура антитела образует антигенсвязывающий сайт, присутствующий на конце каждого плеча Y. Более конкретно, антигенсвязывающий сайт определяется тремя CDR на каждой из VH- и VK-цепей (т. е. CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3). В некоторых случаях, например, в определенных молекулах иммуноглобулинов, происходящих из верблюдовых или полученных на основе иммуноглобулинов верблюдовых с помощью генной инженерии, полная молекула иммуноглобулина может состоять только из тяжелых цепей без легких цепей. См., например, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993).

**[0058]** В природных антителах шесть «определяющих комплементарность областей» или «CDR», присутствующих в каждом антигенсвязывающем домене, представляют собой короткие несмежные последовательности аминокислот, расположенные особым



образом, образуя антигенсвязывающий домен при принятии антителом его трехмерной конфигурации в водной среде. Остальные аминокислоты в антигенсвязывающих доменах, называемые «каркасными» областями, демонстрируют меньшую межмолекулярную вариабельность. Каркасные области в основном принимают конформацию  $\beta$ -листа, а CDR образуют петли, которые соединяют, а в некоторых случаях являются частью структуры  $\beta$ -листа. Таким образом, каркасные области формируют каркас, который обеспечивает расположение CDR в правильной ориентации посредством межцепочечных нековалентных взаимодействий.

Антигенсвязывающий домен, образованный занявшими свои положения CDR, определяет поверхность, комплементарную эпитопу на иммунореактивном антигене. Эта комплементарная поверхность способствует нековалентному связыванию антитела с распознанным эпитопом. Аминокислоты, составляющие CDR и каркасные области, соответственно, могут быть легко установлены для любой данной вариабельной области тяжелой или легкой цепи специалистом в данной области техники, поскольку они были точно определены (см. “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” Kabat, E., *et al.*, U.S. Department of Health and Human Services, (1983); и Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987)).

**[0059]** В случае, когда существует два или более определений термина, который используется и/или принят в данной области техники, подразумевается, что определение термина, используемое в настоящем документе, включает все такие значения, если явно не указано иное. Конкретным примером является использование термина «определяющая комплементарность область» («CDR») для описания несмежных антигенсвязывающих сайтов, присутствующих в вариабельной области полипептидов как тяжелой, так и легкой цепи. Эта конкретная область была описана в источниках Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of Proteins of Immunological Interest” (1983) и Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), полностью включенных в настоящий документ посредством ссылки. Определения CDR по Kabat и Chothia включают перекрывающиеся или подмножества аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Тем не менее, подразумевается, что использование любого из определений в контексте CDR антитела или его вариантов находится в рамках этого термина, как определено и используется в настоящем документе. Сравнение соответствующих аминокислотных остатков, включающих CDR, как определено в каждом из приведенных выше источников,

приведено в таблице ниже. Точные номера остатков, включающих конкретную CDR, будут варьировать в зависимости от последовательности и размера CDR. Специалисты в данной области техники могут рутинным образом определять, какие остатки образуют конкретную CDR, при известной аминокислотной последовательности переменной области антитела.

	<b>Kabat</b>	<b>Chothia</b>
CDR-H1	31-35	26-32
CDR-H2	50-65	52-58
CDR-H3	95-102	95-102
CDR-L1	24-34	26-32
CDR-L2	50-56	50-52
CDR-L3	89-97	91-96

**[0060]** Kabat *et al.* также определили систему нумерации для последовательностей переменных доменов, которая применима к любому антителу. Специалист в данной области техники может однозначно применить эту систему «нумерации по Kabat» к любой последовательности переменной области, не полагаясь на какие-либо экспериментальные данные, помимо самой последовательности. В контексте настоящего документа термин «система нумерации по Kabat» относится к системе нумерации, установленной Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequence of Proteins of Immunological Interest” (1983).

**[0061]** В дополнение к вышеприведенной таблице система нумерации по Kabat описывает области CDR следующим образом: CDR-H1 начинается приблизительно с 31 аминокислоты (*m. e.*, приблизительно через 9 остатков после первого остатка цистеина), включает приблизительно 5-7 аминокислот и заканчивается на следующем остатке триптофана. CDR-H2 начинается с пятнадцатого остатка после окончания CDR-H1, включает приблизительно 16-19 аминокислот и заканчивается на следующем остатке аргинина или лизина. CDR-H3 начинается приблизительно с тридцать третьего аминокислотного остатка после окончания CDR-H2; включает 3-25 аминокислот; и заканчивается на последовательности W-G-X-G, где X представляет собой любую аминокислоту. CDR-L1 начинается приблизительно с 24 остатка (*t. e.*, после остатка цистеина); включает приблизительно 10-17 остатков; и заканчивается на следующем остатке триптофана. CDR-L2 начинается приблизительно с шестнадцатого остатка после окончания CDR-L1 и включает приблизительно 7 остатков. CDR-L3 начинается

приблизительно с тридцать третьего остатка после окончания CDR-L2 (т. е., после остатка цистеина); включает приблизительно 7-11 остатков и заканчивается на последовательности F или W-G-X-G, где X представляет собой любую аминокислоту.

**[0062]** Антитела, раскрытые в настоящем документе, могут иметь происхождение от любого животного, включая птиц и млекопитающих. Предпочтительно антитела представляют собой антитела человека, мыши, осла, кролика, козы, морской свинки, верблюда, ламы, лошади или курицы. В еще одном варианте осуществления переменная область может иметь происхождение от хрящевых рыб (например, от акул).

**[0063]** В контексте настоящего документа термин «константная область тяжелой цепи» включает аминокислотные последовательности, полученные из тяжелой цепи иммуноглобулина. Полипептид, содержащий константную область тяжелой цепи, содержит по меньшей мере одно из следующего: домен СН1, шарнирный (например, верхняя, средняя и/или нижняя шарнирная область) домен, домен СН2, домен СН3 или его вариант или фрагмент. Например, антигенсвязывающий полипептид для использования в изобретении может содержать полипептидную цепь, содержащую домен СН1; полипептидную цепь, содержащую домен СН1, по меньшей мере часть шарнирного домена и домен СН2; полипептидную цепь, содержащую домен СН1 и домен СН3; полипептидную цепь, содержащую домен СН1, по меньшей мере часть шарнирного домена и домен СН3, или полипептидную цепь, содержащую домен СН1, по меньшей мере часть шарнирного домена, домен СН2 и домен СН3. В еще одном варианте осуществления полипептид согласно изобретению содержит полипептидную цепь, содержащую домен СН3. Кроме того, антитело для использования в изобретении может не иметь по меньшей мере части домена СН2 (например, всего или части домена СН2). Как указано выше, специалисту в данной области техники будет ясно, что константная область тяжелой цепи может быть модифицирована таким образом, что ее аминокислотная последовательность будет отличаться от природной молекулы иммуноглобулина.

**[0064]** Константная область тяжелой цепи антитела, раскрытого в настоящем документе, может происходить из разных молекул иммуноглобулина. Например, константная область тяжелой цепи полипептида может содержать домен СН1, происходящий из молекулы IgG<sub>1</sub>, и шарнирную область, происходящую из молекулы

IgG<sub>3</sub>. В еще одном примере константная область тяжелой цепи может содержать шарнирную область, происходящую частично из молекулы IgG<sub>1</sub> и частично из молекулы IgG<sub>3</sub>. В еще одном примере участок тяжелой цепи может содержать химерный шарнир, происходящий частично из молекулы IgG<sub>1</sub> и частично из молекулы IgG<sub>4</sub>.

**[0065]** В контексте настоящего документа термин «константная область легкой цепи» включает аминокислотные последовательности, происходящие из легкой цепи антитела. Предпочтительно константная область легкой цепи содержит по меньшей мере один из константного каппа-домена или константного лямбда-домена.

**[0066]** «Пара легкой и тяжелой цепей» относится к набору легкой цепи и тяжелой цепи, которые могут образовывать димер посредством дисульфидной связи между доменом CL легкой цепи и доменом CH1 тяжелой цепи.

**[0067]** Как указывалось ранее, структуры субъединиц и трехмерная конфигурация константных областей различных классов иммуноглобулинов хорошо известны. В контексте настоящего документа термин «домен VH» включает аминоконцевой переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, и термин «домен CH1» включает первый (наиболее аминоконцевой) домен константной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Домен CH1 соседствует с доменом VH и является аминоконцевым относительно шарнирной области молекулы тяжелой цепи иммуноглобулина.

**[0068]** В контексте настоящего документа термин «домен CH2» включает часть молекулы тяжелой цепи, которая простирается, например, с приблизительно 244 остатка до 360 остатка антитела, как указано с помощью традиционных схем нумерации (остатки 244-360, система нумерации по Kabat, и остатки 231-340, система нумерации EU, см. Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983)). Домен CH2 уникален тем, что не тесно связан с другим доменом. Скорее, две N-связанные разветвленные углеводные цепи расположены между двумя доменами CH2 интактной нативной молекулы IgG. Также хорошо описано, что домен CH3 простирается от домена CH2 до C-конца молекулы IgG и содержит приблизительно 108 остатков.

**[0069]** В контексте настоящего документа термин «шарнирная область» включает часть молекулы тяжелой цепи, которая соединяет домен CH1 с доменом CH2. Эта

шарнирная область содержит приблизительно 25 остатков и является гибкой, что позволяет двум N-концевым антигенсвязывающим областям перемещаться независимо друг от друга. Шарнирные области можно подразделить на три отдельных домена: верхний, средний и нижний шарнирные домены (Roux *et al.*, *J. Immunol* 161:4083 (1998)).

**[0070]** В контексте настоящего документа термин «дисульфидная связь» включает ковалентную связь, образованную между двумя атомами серы. Аминокислота цистеин содержит тиольную группу, которая может образовывать дисульфидную связь или мостик со второй тиольной группой. В большинстве природных молекул IgG области СН1 и СК связаны дисульфидной связью, а две тяжелых цепи связаны двумя дисульфидными связями в положениях, соответствующих положениям 239 и 242 в системе нумерации по Kabat (положение 226 или 229, система нумерации EU).

**[0071]** В контексте настоящего документа термин «химерное антитело» будет означать любое антитело, в котором иммунореактивная область или сайт получены или происходят из первого вида, а константная область (которая может быть интактной, частичной или модифицированной в соответствии с настоящим изобретением) получена из второго вида. В некоторых вариантах осуществления целевая область или сайт связывания будут происходить из источника, не являющегося человеком (например, мыши или примата), а константная область является человеческой.

**[0072]** В контексте настоящего документа термин «процент гуманизации» рассчитывается путем определения количества различий в аминокислотах каркасной области (т. е. различий без учета CDR) между гуманизированным доменом и доменом зародышевой линии, вычитания этого количества из общего количества аминокислот и его последующего деления на общее количество аминокислот и умножения на 100.

**[0073]** Под «специфически связывает» или «обладает специфичностью к» обычно подразумевается, что антитело связывается с эпитопом посредством своего антигенсвязывающего домена, и что связывание сопряжено с некоторой комплементарностью между антигенсвязывающим доменом и эпитопом. Согласно этому определению антитело, как говорят, «специфически связывается» с эпитопом, когда оно связывается с этим эпитопом посредством своего антигенсвязывающего домена легче, чем оно связалось бы со случайным, неродственным эпитопом. Термин

«специфичность» используется в настоящем документе для оценки относительной аффинности, с которой определенное антитело связывается с определенным эпитопом. Например, можно считать, что антитело «А» имеет более высокую специфичность для данного эпитопа, чем антитело «В», или об антителе «А» можно сказать, что оно связывается с эпитопом «С» с более высокой специфичностью, чем его специфичность для родственного эпитопа «D».

**[0074]** В контексте настоящего документа термины «лечить» или «лечение» относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам, где целью является предупреждение или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или расстройства, например, прогрессирования аутоиммунного заболевания. Благоприятные или желательные клинические результаты включают, не ограничиваясь перечисленным, частичное снятие симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизированное (т.е. не ухудшающееся) состояние заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, уменьшение интенсивности или временное ослабление течения заболевания и ремиссию (частичную или полную), как обнаружимые, так и необнаружимые. «Лечение» также может означать увеличение выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью, если лечение не проводится. Субъекты, нуждающиеся в лечении, включают уже имеющих состояние или расстройство, а также тех, кто предрасположен к развитию этого состояния или расстройства, или тех, у кого состояние или расстройство необходимо предупредить.

**[0075]** Под «субъектом», «индивидуумом», «животным», «пациентом» или «млекопитающим» подразумевается любой субъект, в частности млекопитающее, для которого желательны диагностика, прогнозирование или терапия. Субъекты-млекопитающие включают людей, домашних животных, сельскохозяйственных животных и животных зоопарка, животных, принимающих участие в спорте или домашних животных, таких как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы, мыши, лошади, крупный рогатый скот, коровы и так далее.

**[0076]** В контексте настоящего документа такие фразы, как «нуждающемуся в лечении пациенту» или «нуждающемуся в лечении субъекту», включают субъектов, таких как млекопитающие, которые получили бы пользу от введения антитела или композиции

согласно настоящему изобретению при использовании, например, для обнаружения, для процедуры диагностики и/или для лечения.

### *Антитела к ГМ-КСФ*

**[0077]** Настоящее изобретение относится к антителам к ГМ-КСФ с высокой аффинностью к человеческому белку ГМ-КСФ. Исследованные антитела продемонстрировали высокую связывающую и ингибирующую активность и пригодны для терапевтического и диагностического применения. Помимо исходных мышиных антител гуманизированные антитела также показали высокую аффинность связывания с ГМ-КСФ макака-резуса и ГМ-КСФ человека, которое блокировало связывание ГМ-КСФ с альфа-субъединицей рецептора ГМ-КСФ и блокировало вызванную ГМ-КСФ передачу сигналов pSTAT5, и ингибировало ГМ-КСФ-зависимую пролиферацию TF-1.

**[0078]** Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения предложено антитело, включающее вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепей с областями CDR, как определено в SEQ ID NO: 1-6 или SEQ ID NO: 23-28, как показано ниже.

*Таблица 1a. Последовательности областей CDR 23F4*

Название	Последовательности	SEQ ID NO:
CDR1 VH	SHYLH	1
CDR2 VH	WIFPGDDKTKYNEKFKG	2
CDR3 VH	GTKYLNWNFDV	3
CDR1 VL	KANQNVGTTLA	4
CDR2 VL	SASYRYS	5
CDR3 VL	HQYTTYPLT	6

*Таблица 1b. Последовательности областей CDR 50C5*

Название	Последовательности	SEQ ID NO:
CDR1 VH	PYSIH	23
CDR2 VH	YINPSTGYIEYNQHFKD	24
CDR3 VH	GGDYEGYFDY	25
CDR1 VL	RLNENIYSFLA	26
CDR2 VL	NAETLAE	27
CDR3 VL	QQHYGTPYT	28

**[0079]** Как продемонстрировано в примерах осуществления, антитела, содержавшие эти области CDR, вне зависимости от того, были они мышинными, гуманизированными или химерными, обладали высокой активностью связывания и ингибирования ГМ-КСФ. В некоторых вариантах осуществления антитело к ГМ-КСФ согласно настоящему изобретению включает VH и VL CDR, приведенные в таблицах 1a-b, с одной, двумя или тремя дополнительными модификациями. Такими модификациями могут быть вставка, делеция или замена аминокислот.

**[0080]** В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой замену не более чем в одном остатке в каждой из CDR. В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой замену в одном, двух или трех остатках. В одном из вариантов осуществления модификация представляет собой замену в одном из остатков. Такие замены в некоторых вариантах осуществления являются консервативными заменами.

**[0081]** «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменяется аминокислотным остатком, имеющим схожую боковую цепь. В данной области техники были определены семейства аминокислотных остатков со схожими боковыми цепями, в том числе основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, остаток заменимой аминокислоты в полипептиде иммуноглобулина предпочтительно заменен другим аминокислотным остатком из того же семейства боковых цепей. В еще одном варианте осуществления отрезок аминокислот может быть заменен структурно схожим отрезком, отличающимся порядком и/или составом представителей семейства боковых цепей.



**[0082]** Неограничивающие примеры консервативных аминокислотных замен представлены в приведенной ниже таблице, где показатель сходства, равный 0 или выше, указывает на консервативную замену между двумя аминокислотами.

Таблица 2. Матрица сходства аминокислот

	C	G	P	S	A	T	D	E	N	Q	H	K	R	V	M	I	L	F	Y	W
W	-8	-7	-6	-2	-6	-5	-7	-7	-4	-5	-3	-3	2	-6	-4	-5	-2	0	0	17
Y	0	-5	-5	-3	-3	-3	-4	-4	-2	-4	0	-4	-5	-2	-2	-1	-1	7	10	
F	-4	-5	-5	-3	-4	-3	-6	-5	-4	-5	-2	-5	-4	-1	0	1	2	9		
L	-6	-4	-3	-3	-2	-2	-4	-3	-3	-2	-2	-3	-3	2	4	2	6			
I	-2	-3	-2	-1	-1	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4	2	5				
M	-5	-3	-2	-2	-1	-1	-3	-2	0	-1	-2	0	0	2	6					
V	-2	-1	-1	-1	0	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4						
R	-4	-3	0	0	-2	-1	-1	-1	0	1	2	3	6							
K	-5	-2	-1	0	-1	0	0	0	1	1	0	5								
H	-3	-2	0	-1	-1	-1	1	1	2	3	6									
Q	-5	-1	0	-1	0	-1	2	2	1	4										
N	-4	0	-1	1	0	0	2	1	2											
E	-5	0	-1	0	0	0	3	4												
D	-5	1	-1	0	0	0	4													
T	-2	0	0	1	1	3														
A	-2	1	1	1	2															
S	0	1	1	1																
P	-3	-1	6																	
G	-3	5																		
C	12																			

Таблица 3. Консервативные аминокислотные замены

Для аминокислоты	Замена на
Аланин	D-Ala, Gly, Aib, $\beta$ -Ala, L-Cys, D-Cys
Аргинин	D-Arg, Lys, D-Lys, Orn D-Orn
Аспарагин	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu Gln, D-Gln
Аспарагиновая кислота	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Цистеин	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr, L-Ser, D-Ser
Глутамин	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Глутаминовая кислота	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Глицин	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, $\beta$ -Ala
Изолейцин	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met

Лейцин	Val, D-Val, Met, D-Met, D-Ile, D-Leu, Ile
Лизин	D-Lys, Arg, D-Arg, Orn, D-Orn
Метионин	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
Фенилаланин	D-Phe, Tyr, D-Tyr, His, D-His, Trp, D-Trp
Пролин	D-Pro
Серин	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, L-Cys, D-Cys
Треонин	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Val, D-Val
Тирозин	D-Tyr, Phe, D-Phe, His, D-His, Trp, D-Trp
Валин	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

**[0083]** В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент включает не более одной, не более двух или не более трех из указанных выше замен.

**[0084]** В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент обладает специфичностью к человеческому белку ГМ-КСФ и содержит CDR1 VH с последовательностью SEQ ID NO: 1, CDR2 VH с последовательностью SEQ ID NO: 2, CDR3 VH с последовательностью SEQ ID NO: 3, CDR1 VL с последовательностью SEQ ID NO: 4, CDR2 VL с последовательностью SEQ ID NO: 5 и CDR3 VL с последовательностью SEQ ID NO: 6. Неограничивающие примеры VH представлены в SEQ ID NO: 7-17, из которых SEQ ID NO: 7 представляет собой мышиную VH, а SEQ ID NO: 8-17 представляют собой гуманизированные VH. Кроме того, эти гуманизированные VH включают одну или более обратных мутаций в мышиную версию. Аналогичным образом неограничивающие примеры VL (VK) представлены в SEQ ID NO: 18-22. SEQ ID NO: 18 представляет собой мышиную последовательность, а SEQ ID NO: 19-22 представляют собой гуманизированные последовательности, среди которых SEQ ID NO: 20-22 включают одну или более обратных мутаций, как показано в примерах.

**[0085]** Показано, что обратные мутации эффективны для сохранения определенных характеристик антител к ГМ-КСФ. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления антитела к ГМ-КСФ согласно настоящему изобретению, в частности, человеческие или гуманизированные, включают одну или более обратных мутаций. В некоторых вариантах осуществления обратная мутация VH (т. е. включенная

аминокислота в указанном положении) представляет собой одну или более из (a) Glu в положении 1 (E1), (b) Arg в положении 98 (R98), (c) Ser в положении 72 (S72), (d) Ala в положении 68 (A68), (e) Leu в положении 70 (L70), (f) Ile в положении 48 (I48), (g) Asp в положении 26 (D26) и (h) Leu в положении 29 (L29), согласно системе нумерации по Kabat, и их комбинации.

**[0086]** В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело включает по меньшей мере обратную мутацию VH E1. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело включает по меньшей мере обратные мутации VH E1 и R98. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело включает по меньшей мере обратные мутации VH E1 и еще одну из перечисленных выше. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело включает по меньшей мере группу обратных мутаций VH (E1, R98 и S72), (E1, R98, S72 и A68), (E1, R98, S72, A68, L70 и I48), (E1, R98, S72, A68, L70, I48, D26 и L29), (E1 и S72), (E1, S72 и L70), (E1, S72, L70, I48 и A68), (E1, S72, L70, I48, A68, D26 и L29).

**[0087]** В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит фрагмент DYTTLT (SEQ ID NO: 42) или GYTFTT (SEQ ID NO: 43) на N-конце CDR1, т. е., начинающийся с положения 26 согласно системе нумерации по Kabat. В одном из вариантов осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит DYTTLT (SEQ ID NO: 42). В одном из вариантов осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит GYTFTT (SEQ ID NO: 43).

**[0088]** В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело включает одну или более обратных мутаций. В некоторых вариантах осуществления обратная мутация VL представляет собой одну или более из (a) Ala в положении 46 (A46), (b) Asp в положении 60 (D60), (c) Asp в положении 70 (D70), (d) Ser в положении 43 (S43) и (f) Phe в положении 87 (F87), согласно системе нумерации по Kabat, и их комбинации.

**[0089]** В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело включает по меньшей мере две, три или четыре обратные мутации VL из A46, D60, D70, S43 или F87. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело включает по меньшей мере обратную мутацию VL A46. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело включает по меньшей мере обратные мутации VL A46 и

D60, и еще одну из перечисленных выше. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело включает по меньшей мере группу обратных мутаций VL (A46, D60 и D70) или (A46, D60, D70, S43 и F87).

**[0090]** В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело включает по меньшей мере обратные мутации VH (E1, R98, S72, A68, L70 и I48) и не включает обратных мутаций VL. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело включает по меньшей мере обратные мутации VH (E1, S72, L70, I48, A68, D26 и L29) и не включает обратных мутаций VL. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело включает по меньшей мере обратные мутации VH (E1 и S72) и обратные мутации VL (A46, D60, D70, S43 и F87).

**[0091]** В некоторых вариантах осуществления антитело к ГМ-КСФ согласно настоящему изобретению включает VH с последовательностью SEQ ID NO: 8-17 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 19-22, или их соответствующие биологические эквиваленты. Биологический эквивалент VH или VL представляет собой последовательность, включающую обозначенные аминокислоты, при этом обладающую общей идентичностью последовательностей, составляющей 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%. Таким образом, биологический эквивалент SEQ ID NO: 10 может представлять собой VH, имеющую общую идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 10, составляющую 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, но сохраняющую CDR (SEQ ID NO: 1-3 или их варианты) и необязательно сохраняющую одну или более, или все обратные мутации.

**[0092]** В одном из вариантов осуществления VH имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, а VL имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19. В одном из вариантов осуществления VH имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, а VL имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19. В одном из вариантов осуществления VH имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, а VL имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22. Следует отметить, что каждая из перечисленных последовательностей также может быть заменена их биологическими эквивалентами.

**[0093]** В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент обладает специфичностью к человеческом белку ГМ-КСФ и содержит CDR1 VH с

последовательностью SEQ ID NO: 23, CDR2 VH с последовательностью SEQ ID NO: 24, CDR3 VH с последовательностью SEQ ID NO: 25, CDR1 VL с последовательностью SEQ ID NO: 26, CDR2 VL с последовательностью SEQ ID NO: 27 и CDR3 VL с последовательностью SEQ ID NO: 28. Неограничивающие примеры VH представлены в SEQ ID NO: 29-35, из которых SEQ ID NO: 29 представляет собой мышиную VH, а SEQ ID NO: 30-35 представляют собой гуманизированные VH. Кроме того, эти гуманизированные VH включают одну или более обратных мутаций в мышиную версию. Аналогичным образом неограничивающие примеры VL (VK) представлены в SEQ ID NO: 36-41. SEQ ID NO: 36 представляет собой мышиную последовательность, а SEQ ID NO: 37-41 представляют собой гуманизированные последовательности, среди которых SEQ ID NO: 38-41 включают одну или более обратных мутаций, как показано в примерах.

**[0094]** Показано, что обратные мутации эффективны для сохранения определенных характеристик антител к ГМ-КСФ. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления антитела к ГМ-КСФ согласно настоящему изобретению, в частности, человеческие или гуманизированные, включают одну или более обратных мутаций. В некоторых вариантах осуществления обратная мутация VH (т. е. включенная аминокислота в указанном положении) представляет собой одну или более из E1, R84, Y27, I28, I48, T68, L70 или T30, согласно системе нумерации по Kabat, и их комбинации.

**[0095]** В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело включает по меньшей мере обратную мутацию VH E1. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело включает по меньшей мере обратные мутации VH E1 и R84. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело включает по меньшей мере обратные мутации VH E1 и еще одну из перечисленных выше. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело включает по меньшей мере группу обратных мутаций VH (E1), (E1 и R84), (E1, R84, Y27 и I28), (E1, R84, Y27, I28 и I48), (E1, R84, Y27, I28, I48, T68 и L70) или (E1, R84, Y27, I28, I48, T68, L70 и T30).

**[0096]** В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит фрагмент GYIFT (SEQ ID NO: 44), GYIFS (SEQ ID NO: 45) или GGTFIS (SEQ ID NO: 46) на N-конце CDR1, т. е., начинающийся с положения 26 согласно системе

нумерации по Kabat. В одном из вариантов осуществления переменная область тяжелой цепи содержит GYIFT (SEQ ID NO: 44). В одном из вариантов осуществления переменная область тяжелой цепи содержит GYIFS (SEQ ID NO: 45). В одном из вариантов осуществления переменная область тяжелой цепи содержит GGTFIS (SEQ ID NO: 46).

**[0097]** В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело включает одну или более обратных мутаций. В некоторых вариантах осуществления обратная мутация VL представляет собой одну или более из V48, D57, Q70 или S43, согласно системе нумерации по Kabat, и их комбинации.

**[0098]** В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело включает по меньшей мере две, три или четыре обратные мутации VL из V48, D57, Q70 или S43. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело включает по меньшей мере обратную мутацию VL V48. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело включает по меньшей мере обратные мутации VL V48 и D57, и еще одну из перечисленных выше. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело включает по меньшей мере группу обратных мутаций VL (V48), (V48 и D57), (V48, D57 и Q70) или (V48, D57, Q70 и S43).

**[0099]** В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело включает по меньшей мере обратные мутации VH (E1, R84, Y27, I28, I48, T68 и L70) и обратную мутацию VL V48. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело включает по меньшей мере обратные мутации VH (E1, R84, Y27, I28, I48, T68, L70 и T30) и обратные мутации VL (V48 и D57).

**[0100]** В некоторых вариантах осуществления антитело к ГМ-КСФ согласно настоящему изобретению включает VH с последовательностью SEQ ID NO: 30-35 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 37-41, или их соответствующие биологические эквиваленты. Биологический эквивалент VH или VL представляет собой последовательность, включающую обозначенные аминокислоты, при этом обладающую общей идентичностью последовательностей, составляющей 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%. Таким образом, биологический эквивалент SEQ ID NO: 35 может представлять собой VH, имеющую общую идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 35, составляющую 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, но сохраняющую

CDR (SEQ ID NO: 23-25 или их варианты) и необязательно сохраняющую одну или более, или все обратные мутации.

**[0101]** В одном из вариантов осуществления VH имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, а VL имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38. В одном из вариантов осуществления VH имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, а VL имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. Следует отметить, что каждая из перечисленных последовательностей также может быть заменена их биологическими эквивалентами.

**[0102]** Специалисту в данной области техники также будет ясно, что антитела, раскрытые в настоящем документе, могут быть модифицированы таким образом, что их аминокислотная последовательность будет отличаться от природного связывающего полипептида, от которого они происходят. Например, полипептидная или аминокислотная последовательность, происходящая из обозначенного белка, может быть схожей, например, иметь определенный процент идентичности исходной последовательности, например, она может быть на 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична исходной последовательности.

**[0103]** Антитела и фрагменты согласно настоящему изобретению в некоторых вариантах осуществления могут представлять собой моноспецифические или биспецифические антитела или фрагменты. Биспецифические антитела также может быть специфично к другому эпитопу-мишени ГМ-КСФ или к другому белку-мишени, причем эта специфичность пригодна для определенного применения, например, для терапевтического применения. В одном из аспектов белком-мишенью является цитокин, такой как TNF-альфа (фактор некроза опухоли-альфа), IL(интерлейкин)-6, IL-1 и IL-17. В еще одном аспекте белок-мишень представляет собой хемокин, такой как CCL2, CXCL12 и CXCL13. В еще одном аспекте белок-мишень представляет собой белок клеточной поверхности, такой как CD3, CSF-1R, CD20 и CD73.

**[0104]** В отдельных вариантах осуществления антитело содержит аминокислотную последовательность или один или более фрагментов, которые обычно не связаны с антителом. Примеры модификаций более подробно описаны ниже. Например, антитело согласно изобретению может содержать гибкую линкерную последовательность или

может быть модифицировано с добавлением функционального фрагмента (например, ПЭГ (полиэтиленгликоля), лекарственного средства, токсина или метки).

**[0105]** Антитела, их варианты или производные согласно изобретению включают производные, которые являются модифицированными, т. е., путем ковалентного присоединения молекулы любого типа к антителу таким образом, что ковалентное присоединение не препятствует связыванию антитела с эпитопом. Например, не ограничиваясь перечисленным, антитела могут быть модифицированы, например, путем гликозилирования, ацетилирования, пегилирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации известными защитными/блокирующими группами, протеолитического расщепления, связывания с клеточным лигандом или другим белком и т. д. Любая из многочисленных химических модификаций может быть осуществлена известными методами, включая, не ограничиваясь перечисленным, специфичное химическое расщепление, ацетилирование, формилирование, метаболический синтез туникамицина и т.д. Кроме того, антитела могут содержать одну или более неканонических аминокислот.

**[0106]** В некоторых вариантах осуществления антитела могут быть конъюгированы или связаны другими способами с другой молекулой с образованием бифункциональной молекулы. Вторая молекула может представлять собой одну из терапевтических агентов, пролекарств, пептидов, белков, ферментов, вирусов, липидов, модификаторов биологического ответа, фармацевтических агентов или ПЭГ. Некоторыми неограничивающими примерами являются цитокины или другие растворимые факторы, такие как IL-10, IL-25, IL-27, IL-33, IL-35 и IL-36. В некоторых вариантах осуществления также предложены конъюгаты антитело-лекарственное средство, включающие антитело или фрагмент согласно настоящему изобретению и низкомолекулярное лекарственное средство.

**[0107]** Антитела могут быть конъюгированы или слиты с терапевтическим агентом, который может включать детектируемые метки, такие как радиоактивные метки, иммуномодулятор, гормон, фермент, олигонуклеотид, фотоактивный терапевтический или диагностический агент, цитотоксический агент, который может представлять собой лекарственное средство или токсин, агент, усиливающий контраст ультразвукового изображения, нерадиоактивную метку, их комбинацию и другие подобные агенты, известные в данной области техники.



**[0108]** Антитела могут быть мечены с возможностью обнаружения путем связывания с хемилюминесцентным соединением. Присутствие меченого хемилюминесцентным соединением антиген-связывающего полипептида затем определяют путем обнаружения люминесценции, возникающей в ходе химической реакции. Примерами соединений, особенно подходящих в качестве хемилюминесцентной метки, являются люминол, изолюминол, ароматический сложный эфир акридиния, имидазол, соль акридиния и сложный эфир оксалата.

**[0109]** Антитела также могут быть мечены с возможностью обнаружения с использованием металлов, испускающих флуоресцентное излучение, таких как  $^{152}\text{Eu}$  или другие металлы семейства лантаноидов. Эти металлы могут быть присоединены к антителу с использованием таких групп, образующих комплексы с металлами, как диэтилентриаминпентауксусная кислота (DTPA) или этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA). Методики конъюгирования различных фрагментов с антителами хорошо известны, см. например, Arnon *et al.*, “Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”, in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (под ред.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom *et al.*, “Antibodies For Drug Delivery”, in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson *et al.*, (под ред.), Marcel Dekker, Inc., pp. 623- 53 (1987); Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review”, in *Monoclonal Antibodies ‘84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (под ред.), pp. 475-506 (1985); “Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”, in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (под ред.), Academic Press pp. 303-16 (1985), и Thorpe *et al.*, “The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates”, *Immunol. Rev.* (52:119-58 (1982)).

### ***Полинуклеотиды, кодирующие антитела, и способы получения антител***

**[0110]** Настоящее изобретение также относится к выделенным полинуклеотидам или молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим антитела, их варианты или производные согласно настоящему изобретению. Полинуклеотиды согласно настоящему изобретению могут кодировать целые переменные области тяжелой и легкой цепей антигенсвязывающих полипептидов, их вариантов или производных на одной и той же молекуле полинуклеотида или на отдельных молекулах полинуклеотидов. Кроме того, полинуклеотиды согласно настоящему изобретению

могут кодировать части переменных областей тяжелой и легкой цепей антигенсвязывающих полипептидов, их вариантов или производных на одной и той же молекуле полинуклеотида или на отдельных молекулах полинуклеотидов.

**[0111]** Способы получения антител хорошо известны в данной области техники и описаны в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления как переменные, так и константные области антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему изобретению являются полностью человеческими. Полностью человеческие антитела могут быть получены с использованием методик, описанных в данной области техники и в настоящем документе. Например, полностью человеческие антитела против определенного антигена могут быть получены путем введения антигена трансгенному животному, которое было модифицировано для выработки таких антител в ответ на провокацию антигеном, при этом его собственные локусы были дезактивированы. Примеры методик, которые могут быть использованы для получения таких антител, описаны в патентах США №№ 6150584, 6458592, 6420140, полностью включенных в настоящий документ посредством ссылки.

**[0112]** В некоторых вариантах осуществления полученные антитела не будут вызывать пагубного иммунного ответа у животного, подлежащего лечению, например, у человека. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающие полипептиды, их варианты или производные согласно настоящему изобретению модифицированы для снижения их иммуногенности с использованием известных в данной области техники методик. Например, антитела могут быть гуманизированными, приматизированными, деиммунизированными, или могут быть получены химерные антитела. Эти типы антител происходят от антитела, не являющегося человеческим, обычно от антитела мыши или примата, которое сохраняет или по существу сохраняет антигенсвязывающие свойства исходного антитела, но является менее иммуногенным для людей. Это может быть достигнуто различными способами, включая (a) прививку целых не являющихся человеческими переменных доменов на человеческие константные области для получения химерных антител; (b) прививку по меньшей мере части одной или более не являющихся человеческими определяющих комплементарность областей (CDR) на человеческие каркасную и константную области с сохранением или без сохранения ключевых остатков каркасной области; или (c) трансплантация целых не являющихся человеческими переменных доменов, при

этом «маскируя» их схожим с человеческим звеном путем замены поверхностных остатков. Такие способы раскрыты в Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57:6851-6855 (1984); Morrison *et al.*, *Adv. Immunol.* 44:65-92 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science* 239:1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.* 25:489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immun.* 31:169-217 (1994), и патентах США №№ 5585089, 5693761, 5693762, и 6190370, все из которых полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

**[0113]** Деиммунизация также может быть использована для снижения иммуногенности антитела. В контексте настоящего документа термин «деиммунизация» включает изменение антитела путем модификации Т-клеточных эпитопов (см., например, публикации международных заявок №№ WO/9852976 A1 и WO/0034317 A2). Например, анализируются последовательности вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи из исходного антитела и создается «карта» человеческого Т-клеточного эпитопа из каждой V-области, показывающая расположение эпитопов относительно определяющих комплементарность областей (CDR) и других ключевых остатков в последовательности. Индивидуальные Т-клеточные эпитопы из карты Т-клеточных эпитопов анализируются для выявления альтернативных аминокислотных замен с низким риском изменения активности конечного антитела. Разрабатывается ряд альтернативных последовательностей вариабельной области тяжелой и легкой цепей, содержащих комбинации аминокислотных замен, и эти последовательности впоследствии включаются в ряд связывающих полипептидов. Как правило, получают от 12 до 24 вариантов антител и исследуют на связывание и/или функцию. Полные гены тяжелой и легкой цепей, содержащие модифицированные вариабельные и человеческие константные области, затем клонируют в экспрессионные векторы, и полученные плазмиды вводят в клеточные линии для получения целого антитела. Затем антитела сравнивают в соответствующих биохимических и биологических анализах и определяют оптимальный вариант.

**[0114]** Специфичность связывания антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему изобретению может быть определена с помощью анализов *in vitro*, таких как иммунопреципитация, радиоиммуноанализ (РИА) или иммуноферментный анализ (ELISA).

[0115] В качестве альтернативы методики, описанные для получения одноцепочечных единиц (патент США № 4694778; Bird, *Science* 242:423-442 (1988); Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 55:5879- 5883 (1988); и Ward *et al.*, *Nature* 334:544-554 (1989)), могут быть адаптированы для получения одноцепочечных единиц согласно настоящему изобретению. Одноцепочечные единицы образуются путем связывания фрагментов тяжелой и легкой цепей области Fv посредством аминокислотного мостика, что приводит к образованию одноцепочечного слитого пептида. Также могут быть использованы методики сборки функциональных фрагментов Fv в *E.coli* (Skerra *et al.*, *Science* 242: 1038-1041 (1988)).

[0116] Примеры методик, которые могут быть использованы для получения одноцепочечных Fv (scFv) и антител, включают описанные в патентах США №№ 4946778 и 5258498; Huston *et al.*, *Methods in Enzymology* 203:46-88 (1991); Shu *et al.*, *Proc. Natl. Sci. USA* 90:1995-1999 (1993); и Skerra *et al.*, *Science* 240:1038-1040 (1988). Для некоторых применений, включая применение антител *in vivo* у людей и анализы на обнаружение *in vitro*, может быть предпочтительным использование химерных, гуманизированных или человеческих антител. Химерное антитело представляет собой молекулу, в которой разные части антитела происходят из разных видов животных, такие как антитела, имеющие переменную область, происходящую из мышинового моноклонального антитела, и константную область из человеческого иммуноглобулина. Способы получения химерных антител известны в данной области техники. См., например, источники Morrison, *Science* 229:1202 (1985); Oi *et al.*, *BioTechniques* 4:214 (1986); Gillies *et al.*, *J. Immunol. Methods* 125:191-202 (1989); патенты США №№ 5807715, 4816567, и 4816397, полностью включенные в настоящий документ посредством ссылки.

[0117] Гуманизированные антитела представляют собой молекулы антител, полученные из антител, происходящих от вида, не являющегося человеком, которые связывают желаемый антиген, имеющие одну или более определяющих комплементарность областей (CDR) из вида, не являющегося человеком, и каркасных областей из молекулы человеческого иммуноглобулина. Часто каркасные остатки в человеческих каркасных областях будут заменены соответствующим остатком из антитела-донора CDR, чтобы изменить, предпочтительно улучшить, связывание антигена. Эти замены в каркасной области выявляют способами, хорошо известными в

данной области техники, например, моделированием взаимодействий CDR и каркасных остатков для выявления каркасных остатков, важных для связывания антигена, и сравнением последовательностей для выявления необычных каркасных остатков в определенных положениях. (См., например, источники Queen *et al.*, патент США № 5585089; Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323 (1988), полностью включенные в настоящий документ посредством ссылки.) Антитела могут быть гуманизированы с использованием различных методик, известных в данной области техники, включая, например, прививку CDR (EP 239400; публикация заявки РСТ WO 91/09967; патенты США №№ 5225539, 5530101 и 5585089), венирование или изменение поверхности (EP 592106, EP 519596; Padlan, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka *et al.*, *Protein Engineering* 7(6):805-814 (1994); Roguska. *et al.*, *Proc. Natl. Sci. USA* 91:969-973 (1994)) и перестановку цепей (патент США № 5565332, полностью включенный посредством ссылки).

**[0118]** Полностью человеческие антитела особенно желательны для терапии у людей. Человеческие антитела могут быть получены различными способами, известными в данной области техники, включая способы фагового дисплея с использованием библиотек антител, полученных из последовательностей человеческих иммуноглобулинов. См. также патенты США №№ 4444887 и 4716111; и публикации заявок РСТ WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 и WO 91/10741; каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

**[0119]** Человеческие антитела также могут быть получены с использованием трансгенных мышей, которые неспособны экспрессировать собственные функциональные иммуноглобулины, но способны экспрессировать гены человеческого иммуноглобулина. Например, генные комплексы тяжелой и легкой цепей человеческого иммуноглобулина могут быть случайным образом или путем гомологичной рекомбинации введены в эмбриональные стволовые клетки мыши. В качестве альтернативы, в эмбриональные стволовые клетки мыши в дополнение к генам человеческой тяжелой и легкой цепи могут быть введены человеческая переменная область, константная область и D-область. Гены тяжелой и легкой цепи мышинового иммуноглобулина могут быть сделаны нефункциональными по отдельности или одновременно с введением локусов человеческого иммуноглобулина путем

гомологичной рекомбинации. В частности, гомозиготная делеция области JH предотвращает выработку собственных антител. Модифицированные эмбриональные стволовые клетки размножают и вводят путем микроинъекции в бластоцисты для получения химерных мышей. Затем химерных мышей скрещивают для получения гомозиготного потомства, экспрессирующего человеческие антитела. Трансгенных мышей иммунизируют выбранным антигеном обычным образом, например, всем или частью желаемого целевого полипептида. Моноклональные антитела, направленные против антигена, могут быть получены от иммунизированных трансгенных мышей с использованием обычной гибридомной технологии. Трансгены человеческого иммуноглобулина, которые несут трансгенные мыши, перестраиваются во время дифференцировки В-клеток и впоследствии подвергаются переключению классов и соматическим мутациям. Таким образом, используя такую методику, можно получить терапевтически пригодные антитела IgG, IgA, IgM и IgE. Обзор этой технологии получения человеческих антител приведен в Lonberg and Huszar *Int. Rev. Immunol.* 73:65-93 (1995). Подробное обсуждение этой технологии получения человеческих антител и человеческих моноклональных антител и инструкции для получения таких антител приведены, например, в публикациях заявок PCT WO 98/24893, WO 96/34096, WO 96/33735; патентах США №№ 5413923, 5625126, 5633425, 5569825, 5661016, 5545806, 5814318 и 5939598, полностью включенных в настоящий документ посредством ссылки. Кроме того, такие компании, как Abgenix, Inc. (Фримонт, Калифорния) и GenPharm (Сан-Хосе, Калифорния) могут по заказу предоставить человеческие антитела, направленные против выбранного антигена, используя технологию, схожую с описанной выше.

**[0120]** Полностью человеческие антитела, распознающие выбранный эпитоп, также могут быть получены с использованием методики, называемой «управляемый отбор». В этом подходе выбранное не являющееся человеческим моноклональное антитело, например, мышинное антитело, используется как ориентир для отбора полностью человеческого антитела, распознающего тот же эпитоп. (Jespers *et al.*, *Bio/Technology* 72:899-903 (1988). См. также патент США № 5565332, полностью включенный посредством ссылки.)

**[0121]** В еще одном варианте осуществления ДНК, кодирующая желаемые моноклональные антитела, может быть легко выделена и секвенирована с

использованием обычных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, способных специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи мышинных антител). Выделенные и субклонированные гибридомные клетки служат предпочтительным источником такой ДНК. После выделения ДНК может быть помещена в экспрессионные векторы, которые затем трансфицируют в прокариотические или эукариотические клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, обезьяньи клетки COS, клетки яичника китайского хомячка (СНО) или клетки миеломы, которые в противном случае не вырабатывают иммуноглобулины. Более конкретно, выделенная ДНК (которая может быть синтетической, как описано в настоящем документе) может быть использована для клонирования последовательностей константной и варибельной областей для получения антител, как описано в Newman *et al.*, патент США № 5658570 с датой подачи заявки 25 января 1995 г., включенный в настоящий документ посредством ссылки. По существу, это влечет за собой выделение РНК из выбранных клеток, преобразование в кДНК и амплификацию с помощью ПЦР с использованием Ig-специфичных праймеров. Подходящие для этой цели праймеры также описаны в патенте США № 5658570. Как более подробно обсуждается ниже, трансформированные клетки, экспрессирующие желаемое антитело, могут быть выращены в относительно больших количествах для обеспечения поставок иммуноглобулина в клинических и коммерческих целях.

**[0122]** Кроме того, с помощью рутинных методов рекомбинантной ДНК одна или более CDR антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему изобретению могут быть вставлены в каркасные области, например, в человеческие каркасные области, для гуманизации не являющегося человеческим антитела. Каркасные области могут представлять собой природные или консенсусные каркасные области, и предпочтительно человеческие каркасные области (список человеческих каркасных областей см., например, в Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 278:457-479 (1998)).

Предпочтительно полинуклеотид, образуемый комбинацией каркасных областей и CDR, кодирует антитело, которое специфически связывается с по меньшей мере одним эпитопом желаемого полипептида, например, LIGHT. Предпочтительно в каркасных областях могут быть сделаны одна или более аминокислотных замен и, предпочтительно, аминокислотные замены улучшают связывание антитела с его антигеном. Кроме того, такие способы могут быть использованы для осуществления аминокислотных замен или делеций одного или более остатков цистеина в

вариабельной области, участвующих во внутрипочечной дисульфидной связи, для получения молекул антител, лишенных одной или более внутрипочечных дисульфидных связей. Другие изменения полинуклеотида входят в объем настоящего изобретения и находятся в пределах знаний специалиста в данной области техники.

**[0123]** Кроме того, могут быть использованы методики, разработанные для получения «химерных антител» (Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*:851-855 (1984); Neuberger *et al.*, *Nature* 372:604-608 (1984); Takeda *et al.*, *Nature* 314:452-454 (1985)) путем сплайсинга генов из молекулы мышинового антитела, имеющего подходящую антигенную специфичность, вместе с генами из молекулы человеческого антитела, имеющего подходящую биологическую активность. В контексте настоящего документа химерное антитело представляет собой молекулу, в которой разные части происходят из разных видов животных, такие как антитела, имеющие вариабельную область, происходящую из мышинового моноклонального антитела, и константную область человеческого иммуноглобулина.

**[0124]** Еще одно высокоэффективное средство для получения рекомбинантных антител описано в Newman, *Biotechnology* 10: 1455-1460 (1992). А именно, посредством этой методики получают приматизированные антитела, содержащие обезьяньи вариабельные домены и человеческие константные последовательности. Этот источник полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Кроме того, эта методика также описана в патентах США №№ 5658570, 5693780 и 5756096, принадлежащих одному и тому же патентообладателю, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки.

**[0125]** В качестве альтернативы могут быть выбраны и культивированы клеточные линии, вырабатывающие антитела, с использованием методик, хорошо известных специалисту в данной области техники. Такие методики описаны в различных лабораторных руководствах и первичных публикациях. В этой связи методики, подходящие для использования в настоящем изобретении, как описано ниже, описаны в источнике *Current Protocols in Immunology*, Coligan *et al.*, Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991), полностью включенном в настоящий документ посредством ссылки, включая приложения.



**[0126]** Кроме того, стандартные методики, известные специалистам в данной области техники, могут быть использованы для введения мутаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело согласно настоящему изобретению, включая, не ограничиваясь перечисленным, сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез, которые приводят к возникновению аминокислотных замен. Предпочтительно, варианты (включая производные) кодируют менее 50 аминокислотных замен, менее 40 аминокислотных замен, менее 30 аминокислотных замен, менее 25 аминокислотных замен, менее 20 аминокислотных замен, менее 15 аминокислотных замен, менее 10 аминокислотных замен, менее 5 аминокислотных замен, менее 4 аминокислотных замен, менее 3 аминокислотных замен или менее 2 аминокислотных замен относительно референсной вариабельной области тяжелой цепи, CDR-H1, CDR -H2, CDR-H3, вариабельной области легкой цепи, CDR-L1, CDR-L2 или CDR-L3. В качестве альтернативы, мутации могут быть введены случайным образом по всей или части кодирующей последовательности, например, путем насыщающего мутагенеза, и полученные мутанты могут быть подвергнуты скринингу на биологическую активность для выявления мутантов, сохранивших активность.

### ***Способы лечения и применения***

**[0127]** Как описано в настоящем документе, антитела, варианты или производные согласно настоящему изобретению могут быть использованы в определенных способах лечения и диагностики.

**[0128]** Настоящее изобретение дополнительно относится к видам терапии на основе антител, включающим введение антител согласно изобретению пациенту, такому как животное, млекопитающее и человек, для лечения одного или более расстройств или состояний, описанных в настоящем документе. Терапевтические соединения согласно изобретению включают, не ограничиваясь перечисленным, антитела согласно изобретению (включая их варианты и производные, как описано в настоящем документе) и нуклеиновые кислоты или полинуклеотиды, кодирующие антитела согласно изобретению (включая их варианты и производные, как описано в настоящем документе).

**[0129]** Антитела и фрагменты согласно настоящему изобретению в некоторых вариантах осуществления могут быть использованы для изготовления лекарственного

средства для лечения воспалительного или аутоиммунного заболевания или расстройства, или рака. Также полагают, что антитела и фрагменты согласно настоящему изобретению эффективны для лечения механизмов, лежащих в основе боли, или самой боли.

**[0130]** Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) первоначально был известен своей способностью генерировать колонии как гранулоцитов, так и макрофагов из предшественников костного мозга. Также было показано, что он действует на зрелые миелоидные клетки в качестве фактора выживания, активации и дифференцировки. Недавние исследования показывают, что ГМ-КСФ также обладает большим количеством провоспалительных функций и играет ключевую роль в развитии аутоиммунных и воспалительных заболеваний.

**[0131]** ГМ-КСФ способствует выживанию и активации макрофагов, нейтрофилов и эозинофилов, а также созреванию дендритных клеток (DC). ГМ-КСФ может поляризовать макрофаги в M1-подобные воспалительные макрофаги, которые вырабатывают различные воспалительные цитокины, такие как TNF, IL-6, IL-12p70, IL-23 или IL-1 $\beta$ , и, таким образом, стимулируют ответы Th1-Th17. С другой стороны, также сообщается, что ассоциация ГМ-КСФ и иммунного ответа Th2 также наблюдается при аллергическом воспалении дыхательных путей.

**[0132]** Рецептор ГМ-КСФ состоит из  $\alpha$ -субъединицы, связывающей ГМ-КСФ с низкой аффинностью (GMR $\alpha$ ), и  $\beta$ -субъединицы, передающей сигнал, которая является общей для рецепторов IL-3 и IL-5. Бинарный комплекс ГМ-КСФ и GMR $\alpha$  взаимодействует со свободной  $\beta$ -субъединицей и образует высокоаффинный гексамерный комплекс. Додекамерные комплексы, образованные боковой агрегацией двух гексамерных комплексов, позволяют Jak2, связанному с  $\beta$ -субъединицей, димеризоваться и трансфосфорилировать, в то время как гексамерные комплексы не позволяют этого. Эта структура приводит к дозозависимым ответам на активацию рецептора ГМ-КСФ. Низкая концентрация ГМ-КСФ, такая, как наблюдаемая в норме, вызывает фосфорилирование Ser585  $\beta$ с и активирует сигнальный путь 14-3-3/киназы PI-3, что приводит только к выживанию клеток. Более высокая концентрация ГМ-КСФ, такая, как наблюдаемая при воспалительных состояниях, отключает фосфорилирование Ser585  $\beta$ с и опосредованное фосфорилирование Tyr577  $\beta$ с и активацию сигнального пути Jak2/STAT5, сигнального пути Ras/митоген-активируемой протеинкиназы и

сигнального пути киназы PI-3, что приводит к стимуляции клеточного выживания, пролиферации и активации.

**[0133]** Широкий спектр клеток может вырабатывать ГМ-КСФ. Основными источниками ГМ-КСФ являются Т- и В-клетки, моноциты/макрофаги, эндотелиальные клетки и фибробласты. Нейтрофилы, эозинофилы, эпителиальные клетки, мезотелиальные клетки, клетки Панета, хондроциты и опухолевые клетки также могут вырабатывать ГМ-КСФ. Выработка ГМ-КСФ стимулируется различными факторами, включая TNF, IL-1, агонисты толл-подобных рецепторов и простагландин E2. В последнее время была выяснена патогенность ГМ-КСФ-вырабатывающих CD4 Т-клеток при аутоиммунных и воспалительных заболеваниях, которая привлекает все большее внимание.

**[0134]** Последние данные показали, что ГМ-КСФ играет ключевую роль в развитии многих аутоиммунных заболеваний. Деплеция или дезактивация ГМ-КСФ подавляет многие модели аутоиммунных заболеваний, включая экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЕАЕ), артрит, связанное с артритом интерстициальное заболевание легких, нефрит или псориаз. Также предполагается, что ингибирование ГМ-КСФ может быть эффективным для лечения рака.

**[0135]** В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание или состояние, подлежащее лечению раскрытыми антителами, фрагментами и композициями, включает одно или более из болезни Альцгеймера, болезни Аддисона, атеросклероза, анкилозирующего спондилита, артрита, остеоартрита (ОА), ревматоидного артрита (РА), псориатического артрита (ПА), анкилозирующего спондилита, астмы, атеросклероза, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), болезни Крона, колита, дерматита, дивертикулита, фибромиалгии, гепатита, синдрома раздраженного кишечника (СРК), системной красной волчанки (СКВ), нефрита, болезни Паркинсона (БП), васкулита и язвенного колита.

**[0136]** В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное заболевание или состояние, подлежащее лечению раскрытыми антителами, фрагментами и композициями, включает одно или более из очаговой алопеции, аутоиммунной гемолитической анемии, аутоиммунного гепатита, дерматомиозита, диабета (1 типа), целиакии, аутоиммунного ювенильного идиопатического артрита, гломерулонефрита,

болезни Грейвса, синдрома Гийена-Барре, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, миастении гравис, аутоиммунного миокардита, рассеянного склероза, пемфигуса/пемфигоида, пернициозной анемии, узелкового полиартериита, полимиозита, первичного билиарного цирроза, псориаза, ревматоидного артрита, склеродермии/системного склероза, синдрома Шегрена, системной красной волчанки, аутоиммунного тиреоидита, тиреоидита Хашимото, аутоиммунного увеита, витилиго и гранулематоза с полиангиитом (Вегенера).

**[0137]** Ревматоидный артрит (РА) представляет собой продолжительное аутоиммунное расстройство, в первую очередь поражающее суставы. Обычно приводит к теплым, опухшим и болезненным суставам. Боль и скованность часто ухудшаются после отдыха. Чаще всего поражаются запястье и кисти рук, при этом одни и те же суставы обычно поражаются на обеих сторонах тела. Заболевание также может поражать другие части тела. Хотя причина ревматоидного артрита неясна, считается, что он связан с сочетанием генетических факторов и факторов влияния окружающей среды. Лежащий в основе механизм включает атаку суставов иммунной системой организма. Это приводит к воспалению и утолщению суставной капсулы. Цели лечения состоят в уменьшении боли, снижении воспаления и улучшении уровня общей жизнедеятельности человека. Для облегчения симптомов часто используются обезболивающие средства, стероиды и НПВП (нестероидные противовоспалительные препараты). Для того, чтобы попытаться замедлить прогрессирование заболевания, может быть использована группа лекарственных средств, называемых болезнью-модифицирующими антиревматическими препаратами (БМАРП), таких как гидроксихлорохин и метотрексат.

**[0138]** Остеоартрит (ОА) представляет собой тип заболевания суставов, возникающий в результате разрушения суставного хряща и подлежащей кости. Наиболее распространенными симптомами являются боль и скованность суставов. Изначально симптомы могут появляться только после физических упражнений, но со временем могут стать постоянными. Другие симптомы могут включать отек суставов, уменьшение диапазона движений, а в случае поражения спины – слабость или онемение рук и ног. Причины включают предшествующую травму сустава, патологическое развитие сустава или конечности и наследственные факторы. Риск выше у тех, кто имеет избыточный вес, разную длину ног и работу, приводящую к

высокому уровню нагрузки на суставы. Считается, что остеоартрит вызван механической нагрузкой на сустав и слабо выраженными воспалительными процессами. Лечение включает физические упражнения, усилия по снижению нагрузки на суставы, группы поддержки и обезболивающие средства.

**[0139]** Рассеянный склероз (РС) представляет собой демиелинизирующее заболевание, при котором повреждаются изолирующие оболочки нервных клеток головного и спинного мозга. Это повреждение нарушает способность частей нервной системы к общению, что приводит к ряду признаков и симптомов, включая физические, психические, а иногда и психиатрические проблемы. Конкретные симптомы могут включать двоение в глазах, слепоту на один глаз, мышечную слабость, проблемы с чувственным восприятием или проблемы с координацией. Хотя причина заболевания неясна, лежащим в основе механизмом считается или поражение иммунной системой, или нарушение функции клеток, вырабатывающих миелин. На данный момент не существует способа излечить рассеянный склероз. Лечение направлено на улучшение функции после атаки и предотвращение новых атак.

**[0140]** Астма представляет собой распространенное продолжительное воспалительное заболевание дыхательных путей легких. Оно характеризуется изменяющимися и повторяющимися симптомами, обратимой обструкцией дыхательных путей и бронхоспазмом. Симптомы включают эпизоды хрипов, кашля, чувства стеснения в груди и затруднения дыхания. Считается, что астма вызвана сочетанием генетических факторов и факторов влияния окружающей среды. Факторы влияния окружающей среды включают воздействие загрязнений воздуха и аллергенов. Астму классифицируют в зависимости от частоты симптомов, объема форсированного выдоха за 1 секунду (ОФВ1) и пиковой скорости выдоха. Она также может быть классифицирована как атопическая или неатопическая, где атопия относится к предрасположенности к развитию реакции гиперчувствительности 1 типа. Способа излечить астму не существует. Симптомы можно предотвратить, избегая триггеров, таких как аллергены и раздражители, и путем использования ингаляционных кортикостероидов. Бета-агонисты длительного действия (LABA) или антилейкотриеновые агенты могут быть использованы в дополнение к ингаляционным кортикостероидам, если симптомы астмы остаются неконтролируемыми. Лечение быстро ухудшающихся симптомов обычно проводят с помощью ингаляционного бета-

2-агониста короткого действия, такого как сальбутамол, и кортикостероидов, принимаемых перорально. В очень тяжелых случаях может потребоваться внутривенное введение кортикостероидов, сульфата магния и госпитализация.

**[0141]** Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) представляет собой тип обструктивной болезни легких, характеризующийся ограничением воздушного потока в течение длительного времени. ХОБЛ может включать два основных состояния – эмфизему и хронический бронхит. При эмфиземе повреждаются стенки между большим количеством альвеолярных мешочков. В результате альвеолярные мешочки теряют свою форму и становятся мягкими. Это повреждение также может разрушить стенки альвеолярных мешочков, что приводит к уменьшению их количества и увеличению размера вместо большого количества маленьких альвеолярных мешочков. Если это происходит, легочная способность к газообмену уменьшается. При хроническом бронхите слизистая оболочка дыхательных путей остается постоянно раздраженной и воспаленной, что вызывает ее отек. В дыхательных путях образуется большое количество густой слизи, затрудняющей дыхание. Не существует известного способа излечить ХОБЛ, однако симптомы поддаются лечению и прогрессирование заболевания может быть отсрочено.

**[0142]** Боль представляет собой неприятное ощущение, часто вызванное сильными или причиняющими вред раздражителями, такими как ушиб пальца ноги, ожог пальца, нанесение спирта на порез или ушиб локтевого отростка. Боль представляет собой сложное, субъективно воспринимаемое явление, определение боли было сложной задачей. Боль также относят к неприятному сенсорному и эмоциональному опыту, связанному с фактическим или возможным повреждением тканей. Боль иногда рассматривают как симптом первичного заболевания, такого как воспаление.

**[0143]** В некоторых вариантах осуществления предложены способы лечения рака у нуждающегося в этом пациента. Способ в одном из вариантов осуществления включает введение указанному пациенту эффективного количества антитела согласно настоящему изобретению.

**[0144]** Неограничивающие примеры раковых заболеваний включают рак мочевого пузыря, рак молочной железы, колоректальный рак, рак эндометрия, рак пищевода, рак

головы и шеи, рак почки, лейкоз, рак печени, рак легкого, лимфому, меланому, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы и рак щитовидной железы.

**[0145]** Дополнительные заболевания или состояния, связанные с повышенной выживаемостью клеток, подлежащие лечению, предупреждению, диагностике и/или прогнозированию с помощью антител или их вариантов или производных согласно изобретению включают, не ограничиваясь перечисленным, прогрессирующие и/или метастазы злокачественных образований и ассоциированные расстройства, такие как лейкоз (в том числе острые лейкозы (например, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз (в том числе миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный лейкоз и эритролейкоз)) и хронические лейкозы (например, хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз и хронический лимфоцитарный лейкоз), истинная полицитемия, лимфомы (например, болезнь Ходжкина и неходжкинскую лимфому), множественная миелома, макроглобулинемия Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей и солидные опухоли, в том числе, не ограничиваясь перечисленными, саркомы и карциномы, такие как фибросаркома, миксосаркома, липосаркома, хондросаркома, остеогенная саркома, хордома, ангиосаркома, эндотелиосаркома, лимфангиосаркома, лимфангиоэндотелиосаркома, синовиома, мезотелиома, опухоль Юинга, лейомиосаркома, рабдомиосаркома, карцинома ободочной кишки, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичников, рак предстательной железы, плоскоклеточная карцинома, базально-клеточная карцинома, аденокарцинома, карцинома потовых желез, карцинома сальных желез, папиллярная карцинома, папиллярные аденокарциномы, цистаденокарцинома, медуллярная карцинома, бронхогенная карцинома, почечноклеточный рак, гепатома, карцинома желчных протоков, хориокарцинома, семинома, эмбриональная карцинома, опухоль Вильмса, рак шейки матки, опухоль яичка, карцинома легкого, мелкоклеточная карцинома легкого, карцинома мочевого пузыря, эпителиальная карцинома, глиома, астроцитомы, медуллобластома, краниофарингиома, эпендимомы, пинеаломы, гемангиобластома, акустическая невринома, олигодендроглиома, менингиома, меланома, нейробластома и ретинобластома

**[0146]** Конкретная дозировка и режим лечения для любого конкретного пациента будут зависеть от множества факторов, включая конкретные используемые антитела, их вариант или производное, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и

режим питания пациента, а также время введения, скорость выведения, комбинацию назначенных лекарственных средств и тяжесть конкретного заболевания, подлежащего лечению. Оценка таких факторов медицинскими работниками находится в пределах обычной квалификации специалиста в данной области техники. Количество также будет зависеть от конкретного пациента, подлежащего лечению, способа введения, типа рецептуры, характеристик используемого соединения, тяжести заболевания и желаемого эффекта. Используемое количество может быть определено с помощью фармакологических и фармакокинетических принципов, хорошо известных в данной области техники.

**[0147]** Способы введения антител или их вариантов включают, не ограничиваясь перечисленным, внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути.

Антигенсвязывающие полипептиды или композиции могут быть введены любым подходящим путем, например, путем инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителиальную выстилку или слизистую оболочку (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т. д.), и могут быть введены вместе с другими биологически активными агентами. Таким образом, фармацевтические композиции, содержащие антигенсвязывающие полипептиды согласно настоящему изобретению, могут быть введены перорально, ректально, парентерально, интракостерально, интравагинально, внутрибрюшинно, местно (например, с помощью порошков, мазей, капель или трансдермального пластыря), буккально или в виде перорального или назального спрея.

**[0148]** В контексте настоящего документа термин «парентеральный» относится к способам введения, включающим внутривенную, внутримышечную, внутрибрюшинную, интракостеральную, подкожную и внутрисуставную инъекцию и инфузию.

**[0149]** Введение может быть системным или местным. Кроме того, может быть желательным введение антител согласно изобретению в центральную нервную систему любым подходящим путем, включая внутрижелудочковую и интратекальную инъекцию; внутрижелудочковая инъекция может быть упрощена с помощью внутрижелудочкового катетера, например, присоединенного к резервуару, такому как резервуар Оммая. Также может быть использовано пульмональное введение,



например, с помощью ингалятора или небулайзера и рецептуры с распыляющим агентом.

**[0150]** Может быть желательно вводить антигенсвязывающие полипептиды или композиции согласно изобретению местно в область, нуждающуюся в лечении; это может быть достигнуто, например, но не ограничиваясь перечисленным, путем местной инфузии во время хирургического вмешательства, местного нанесения, например, в сочетании с перевязкой раны после хирургического вмешательства, путем инъекции, с помощью катетера, с помощью суппозитория или с помощью имплантата, причем указанный имплантат может быть выполнен из пористого, непористого или гелеобразного материала, включая мембраны, такие как мембраны Sikalastic, или волокна. Предпочтительно при введении белка, включая антитело, согласно настоящему изобретению, необходимо следить, чтобы использовались материалы, не абсорбирующие белок.

**[0151]** В еще одном варианте осуществления антигенсвязывающий полипептид или композиция могут быть доставлены в везикуле, в частности, в липосоме (см. Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533; Treat *et al.*, in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (под ред.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, там же, стр. 317-327; см. в целом этот же источник).

**[0152]** В еще одном варианте осуществления антигенсвязывающий полипептид или композиция могут быть доставлены в системе с контролируемым высвобождением. В одном из вариантов осуществления может быть использован насос (см. Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201; Buchwald *et al.*, 1980, *Surgery* 88:507; Saudek *et al.*, 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574). В еще одном варианте осуществления данного изобретения могут быть использованы полимерные материалы (см. *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (под ред.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (под ред.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, J., 1983, *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61; см. также Levy *et al.*, 1985, *Science* 228:190; During *et al.*, 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard *et al.*, 1989, *J. Neurosurg.* 71:105). В еще одном варианте осуществления система с контролируемым высвобождением может быть размещена в непосредственной близости от мишени для терапевтического воздействия, например, мозга, при этом требуется только часть системной дозы (см., например,

Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Другие системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре за авт. Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533.

**[0153]** В отдельном варианте осуществления, в котором композиция согласно настоящему изобретению содержит нуклеиновую кислоту или полинуклеотид, кодирующий белок, нуклеиновая кислота может быть введена *in vivo*, чтобы стимулировать экспрессию кодируемого ею белка, путем включения ее в состав подходящей молекулы нуклеиновой кислоты экспрессионного вектора и его введения таким образом, что он проникает внутрь клетки, например, с помощью ретровирусного вектора (см. патент США № 4980286), или с помощью непосредственной инъекции, или с помощью бомбардировки микрочастицами (например, генной пушкой; Biolistic, Dupont), или путем покрытия липидами, или рецепторами клеточной поверхности, или трансфицирующими агентами, или с помощью введения его в связи с гомеобокс-подобным пептидом, который, как известно, проникает в ядро (см., например, Joliot *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1864-1868), и т. д. В качестве альтернативы, нуклеиновая кислота может быть введена внутриклеточно и включена в ДНК клетки-хозяина для экспрессии путем гомологичной рекомбинации.

**[0154]** Количество антител согласно изобретению, которое будет эффективным для лечения, ингибирования и предупреждения воспалительного, иммунного или злокачественного заболевания, расстройства или состояния, может быть определено стандартными клиническими методами. Кроме того, необязательно, в качестве вспомогательных средств для установления оптимальных диапазонов доз могут быть использованы *in vitro* анализы. Точная доза, которую следует использовать в препарате, также будет зависеть от способа введения и серьезности заболевания, расстройства или состояния, и ее следует выбирать в соответствии с мнением практикующего врача и спецификой каждого пациента. Эффективные дозы могут быть экстраполированы из кривых доза-ответ, полученных из систем испытаний *in vitro* или на животных моделях.

**[0155]** В качестве общего предложения, доза антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему изобретению, вводимая пациенту, обычно составляет от 0,1 мг/кг до 100 мг/кг массы тела пациента, от 0,1 мг/кг до 20 мг/кг массы тела пациента или от 1 мг/кг до 10 мг/кг массы тела пациента. Как правило, человеческие антитела имеют

более длительный период полужизни в организме человека, чем антитела, происходящие из других видов, что связано с иммунным ответом на чужеродные полипептиды. Таким образом, часто возможно использование более низких доз человеческих антител и меньшей частоты введения. Кроме того, дозировка и частота введения антител согласно изобретению может быть снижена за счет усиления поглощения и проникновения антител в ткани (например, в мозг) с помощью модификаций, таких как, например, липидирование.

**[0156]** Способы лечения инфекционного или злокачественного заболевания, состояния или расстройства, включающие введение антитела, его варианта или производного согласно настоящему изобретению, обычно тестируют *in vitro*, а затем *in vivo* на приемлемой животной модели для определения желаемой терапевтической или профилактической активности перед тем, как начать использование у людей.

Подходящие животные модели, включая трансгенных животных, хорошо известны специалистам в данной области техники. Например, анализы *in vitro* для демонстрации терапевтической пригодности антигенсвязывающего полипептида, описанного в настоящем документе, включают действие антигенсвязывающего полипептида на клеточную линию или образец ткани пациента. Действие антигенсвязывающего полипептида на клеточную линию и/или образец ткани может быть определено с использованием методик, известных специалистам в данной области техники, таких как анализы, раскрытые в других местах настоящего документа. В соответствии с настоящим изобретением анализы *in vitro*, которые могут быть использованы для определения того, показано ли введение конкретного антигенсвязывающего полипептида, включают анализы культуры клеток *in vitro*, в которых образец ткани пациента выращивают в культуре и подвергают воздействию или иным образом вводят соединение, и наблюдают действие такого соединения на образец ткани.

**[0157]** Различные системы доставки известны и могут быть использованы для введения антитела согласно изобретению или полинуклеотида, кодирующего антитело согласно изобретению, например, заключение в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать соединение, рецепторно-опосредованный эндоцитоз (см., например, Wu and Wu, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432), включение нуклеиновой кислоты в состав ретровирусного или иного вектора и т. д.

**[0158]** В дополнительном варианте осуществления композиции согласно настоящему изобретению вводят в комбинации с противоопухолевым агентом, противовирусным агентом, антибактериальным или антибиотическим агентом или противогрибковыми агентами. Любой из этих агентов, известных в данной области техники, может быть введен в композициях согласно настоящему изобретению.

**[0159]** В еще одном варианте осуществления композиции согласно изобретению вводят в комбинации с химиотерапевтическим агентом. Химиотерапевтические агенты, которые могут быть введены в композициях согласно изобретению, включают, не ограничиваясь перечисленным, производные антибиотиков (например, доксорубин, блеомицин, даунорубин и дактиномицин); антиэстрогены (например, тамоксифен); антиметаболиты (например, фторурацил (5-FU), метотрексат, флоксуридин, интерферон альфа-2b, глутаминовая кислота, пликамицин, меркаптопурин и 6-тиогуанин); цитотоксические агенты (например, кармустин (BCNU), ломустин (CCNU), цитозин-арабинозид, циклофосфамид, эстрамустин, гидроксимочевина, прокарбазин, митомицин, бусульфан, цисплатин и винкристина сульфат); гормоны (например, медроксипрогестерон, эстрамустина фосфата натрия соль, этинилэстрадиол, эстрадиол, мегестрола ацетат, метилтестостерон, диэтилстилбестрола дифосфат, хлортиазин и тестостерон); производные азотистого иприта (например, мефален, хлорамбуцил, мехлоретамин (азотистый иприт) и тиотепа); стероиды и комбинации (например, бетаметазона натрия фосфат); и другие (например, дикарбазин, аспарагиназа, митотан, винкристина сульфат, винбластин сульфат и этопозид).

### ***Комбинированные композиции и способы лечения***

**[0160]** Антитела к ГМ-КСФ согласно настоящему изобретению могут быть использованы, в некоторых вариантах осуществления, вместе с другим терапевтическим агентом.

**[0161]** В некоторых вариантах осуществления второй терапевтический агент представляет собой противовоспалительный агент. Неограничивающие примеры включают аспирин, ибупрофен, напроксен, целекоксиб (целебрекс (Celebrex)), пироксикам (фельден (Feldene)), индометацин (индоцин (Indocin)), мелоксикам (Mobic Vivlodex), кетопрофен (орудис (Orudis)), кетопрофен замедленного высвобождения,

орувейл (Oruvail), актрон (Actron)), сулиндак (клинорил (Clinoril)), дифлунизал (долобид (Dolobid)), набуметон (релафен (Relafen)), оксапрозин (дейпро (Daupro)), толметин (толметин натрия, толектин (Tolectin)), салицил салицилат (дисальцид (Disalcid)), этодолак (лодин (Lodine)), фенпрофен (налфон (Nalfon)), флурбипрофен (ансайд (Ansaid)), кеторолак (торадол (Toradol)), меклофенамат и мефенамовая кислота (понстел (Ponstel)).

**[0162]** В некоторых вариантах осуществления второй терапевтический агент подходит для лечения аутоиммунного заболевания. Неограничивающие примеры включают глюкокортикоид, антитела к CD3, такие как муромонаб-CD3, ингибиторы IL-2а, такие как базиликсимаб (симулект (Simulect)) и даклизумаб (зенапакс (Zenapax)), ингибиторы кальциневрина, такие как такролимус и циклоспорин, сиролимус, эверолимус, интерфероны, опиоидные препараты, TNF-связывающие белки или антитела и микофенолат.

**[0163]** В некоторых вариантах осуществления второй терапевтический агент представляет собой противораковый химиотерапевтический агент. По своему механизму действия химиотерапевтические агенты могут быть классифицированы, например, на следующие группы:

- антиметаболиты/противораковые агенты, такие как аналоги пиримидина флоксуридин, капецитабин и цитарабин;
- аналоги пурина, антагонисты фолиевой кислоты и родственные ингибиторы;
- антипролиферативные/антимитотические агенты, в том числе продукты природного происхождения, такие как алкалоид барвинка (винбластин, винкристин) и агенты, действующие на микротрубочки, такие как таксан (паклитаксел, доцетаксел), винбластин, нокодазол, эпотилоны, винорелбин (навельбин (NAVELBINE<sup>®</sup>)) и эпиподофиллотоксины (этопозид, тенипозид);
- ДНК-повреждающие агенты, такие как актиномицин, амсакрин, бусульфан, карбоплатин, хлорамбуцил, цисплатин, циклофосфамид (цитоксан (CYTOXAN<sup>®</sup>)), дактиномицин, даунорубицин, доксорубицин, эпирубицин, ифосфамид, мелфалан,

мерхлорэтамин, митомицин, митоксантрон, нитрозомочевина, прокарбазин, таксол, таксотер, тенипозид, этопозид и триэтилентифосфорамида;

- антибиотики, такие как дактиномицин, даунорубицин, доксорубицин, идарубицин, антрациклины, митоксантрон, блеомицины, пликамицин (митрамицин) и митомицин;
- ферменты, такие как L-аспарагиназа, которая системно метаболизирует L-аспарагин и лишает его клетки, которые не способны синтезировать свой собственный аспарагин;
- антитромбоцитарные средства;
- антипролиферативные/антимитотические алкилирующие агенты, такие как азотистые иприты циклофосфамид и аналоги (мелфалан, хлорамбуцил, гексаметилмеламин и тиотепа), алкилнитрозомочевины (кармустин) и аналоги, стрептозоцин и триазены (дакарбазин);
- антипролиферативные/антимитотические антиметаболиты, такие как аналоги фолиевой кислоты (метотрексат);
- комплексные соединения платины (цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин), прокарбазин, гидроксимочевина, митотан и аминоклютетимид;
- гормоны, аналоги гормонов (эстроген, тамоксифен, гозерелин, бикалутамид и нилутамид) и ингибиторы ароматазы (летрозол и анастрозол);
- антикоагулянты, такие как гепарин, синтетические соли гепарина и другие ингибиторы тромбина;
- фибринолитические агенты, такие как тканевый активатор плазминогена, стрептокиназа, урокиназа, аспирин, дипиридамол, тиклопидин и клопидогрел;
- антимиграционные агенты;
- антисекреторные средства (брефельдин);
- иммуносупрессоры такролимус, сиролимус, азатиоприн и микофенолат;
- соединения (TNP-470, генистеин) и ингибиторы факторов роста (ингибиторы фактора роста эндотелия сосудов и ингибиторы фактора роста фибробластов);
- блокаторы ангиотензиновых рецепторов, доноры оксида азота;
- бессмысловые олигонуклеотиды;

- антитела, такие как трастузумаб и ритуксимаб;
- ингибиторы клеточного цикла и индукторы дифференцировки, такие как третиноин;
- ингибиторы, ингибиторы топоизомеразы (доксорубицин, даунорубицин, дактиномицин, энипозид, эпирубицин, этопозид, идарубицин, иринотекан, митоксантрон, топотекан и иринотекан) и кортикостероиды (кортизон, дексаметазон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизон и преднизолон);
- ингибиторы киназы, участвующей в передаче сигналов факторами роста;
- индукторы дисфункции;
- токсины, такие как холерный токсин, рицин, экзотоксин *Pseudomonas*, токсин аденилатциклазы *Bordetella pertussis*, дифтерийный токсин и активаторы каспазы;
- и хроматин.

### ***Композиции***

**[0164]** Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям. Такие композиции содержат эффективное количество антитела и приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно включает второй терапевтический агент.

**[0165]** В отдельном варианте осуществления термин «фармацевтически приемлемый» означает одобренный федеральным или региональным надзорным органом или указанный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее как подходящий для применения у животных и, более конкретно, у человека. Кроме того, «фармацевтически приемлемый носитель» обычно представляет собой нетоксичный твердый, полутвердый или жидкий наполнитель, разбавитель, инкапсулирующий материал или вспомогательную композицию любого типа.

**[0166]** Термин «носитель» относится к разбавителю, адьюванту, эксципиенту или наполнителю, с которым вводится терапевтическое средство. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, в том числе нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и тому подобные. Вода является предпочтительным носителем при внутривенном введении фармацевтической композиции. Физиологические растворы и водные

растворы декстрозы и глицерина также могут быть использованы в качестве жидких носителей, в частности, для инъекционных растворов. Подходящие фармацевтические эксципиенты включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и тому подобное. Композиция при необходимости может также содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих агентов или буферных агентов, таких как ацетаты, цитраты или фосфаты. Также предусмотрены антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; комплексообразующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Эти композиции могут принимать форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов с замедленным высвобождением и тому подобного. Композиция может быть получена в виде суппозитория с традиционными связующими агентами и носителями, такими как триглицериды. Пероральный препарат может включать стандартные носители, такие как маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния фармацевтической степени чистоты и т. д. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в источнике Remington's Pharmaceutical Sciences за авт. E. W. Martin, включенном в настоящий документ посредством ссылки. Такие композиции будут содержать терапевтически эффективное количество антигенсвязывающего полипептида, предпочтительно в очищенной форме, вместе с подходящим количеством носителя, чтобы обеспечить форму для надлежащего введения пациенту. Препарат должен соответствовать способу введения. Парентеральный препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многодозовые флаконы из стекла или пластика.

**[0167]** В одном варианте осуществления рецептура фармацевтической композиции разработана в соответствии с рутинными процедурами в виде фармацевтической композиции, адаптированной для внутривенного введения людям. Как правило, композиции для внутривенного введения представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буферном растворе. При необходимости композиция может также включать солюбилизирующий агент и местный анестетик, такой как лигнокаин, для облегчения боли в месте инъекции. Обычно ингредиенты поставляются либо по



отдельности, либо в виде смеси в составе стандартной лекарственной формы, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметически закрытом контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества активного агента. Если композиция подлежит введению путем инфузии, она может быть помещена, например, в инфузионную бутылку, содержащую стерильную воду или физиологический раствор фармацевтической степени чистоты. Если композиция подлежит введению путем инъекции, может быть обеспечена ампула со стерильной водой для инъекций или физиологическим раствором, так что ингредиенты могут быть смешаны перед введением.

**[0168]** Соединения согласно изобретению могут быть получены в виде нейтральных или солевых форм. Фармацевтически приемлемые соли включают соли, образованные с анионами, такими как соли, полученные с соляной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислотой и т. д., и соли, образованные с катионами, такими как соли, полученные с натрием, калием, аммонием, кальцием, гидроксидами железа (III), изопропиламином, триэтиламином, 2-этиламиноэтанолом, гистидином, прокаином и т. д.

## **ПРИМЕРЫ**

### **Пример 1. Получение мышинных антител**

**[0169]** В этом примере описан процесс получения мышинных моноклональных антител к человеческому ГМ-КСФ с использованием гибридной технологии.

Рекомбинантный человеческий белок ГМ-КСФ использовали в качестве антигена. Для получения мышинных моноклональных антител к человеческому ГМ-КСФ 6-8 недельных мышей различных линий, включая мышей BALB/c, C57/BL6 или SJL, сначала иммунизировали 20 мкг рекомбинантного человеческого ГМ-КСФ. На 14, 28 и 42 день после первой иммунизации иммунизированных мышей повторно иммунизировали 5 мкг рекомбинантного белка. Для отбора мышей, вырабатывающих антитела, связывающие белок ГМ-КСФ, сыворотки от иммунизированных мышей исследовали с помощью ELISA. Вкратце, планшеты для микротитрования покрывали человеческим белком ГМ-КСФ в концентрации 1 мкг/мл в PBS (натрий-фосфатном буфере), 100 мкл/лунку при комнатной температуре (комн. темп.) в течение ночи, затем блокировали 100 мкл/лунку 5% BSA (бычьего сывороточного альбумина).

Разведенную плазму иммунизированных мышей добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 1-2 часов при комнатной температуре. Планшеты промывали PBS/Tween и затем инкубировали с антителом к мышинному IgG, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP), в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывки планшеты проявляли субстратом ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота) и анализировали с помощью спектрофотометра для получения значений оптической плотности при 405 нм. Мышей с достаточными титрами IgG к ГМ-КСФ стимулировали 25 мкг рекомбинантного человеческого белка ГМ-КСФ на 60 день после иммунизации. Отобранных мышей использовали для получения слитых белков.

**[0170]** Супернатанты гибридомы исследовали на IgG к ГМ-КСФ с помощью скрининга ELISA. Первичные гибридомные клоны, давшие положительный ответ в анализе ELISA, отбирали для субклонирования с использованием метода предельных разведений и дополнительно исследовали с помощью подтверждающего анализа связывания ELISA (**фиг. 1**) и анализа пролиферации TF-1 (**фиг. 2**). Перед стимуляцией ГМ-КСФ клетки TF-1 промывали минимальной средой RPMI1640 и выдерживали в минимальной среде в течение ночи. На 2 день эти клетки, выдержанные в минимальной среде, собирали и затем высевали их с концентрацией  $3 \times 10^5$  клеток/мл в количестве 50 мкл на лунку 96-луночного планшета для культивирования клеток с плоским дном.

**[0171]** Человеческий рекомбинантный ГМ-КСФ (Genscript) в концентрации 0,2 нг/мл (4X) смешивали в соотношении 1:1 с 20% супернатантом культуры гибридомы (4X), и 50 мкл смеси добавляли к клеткам TF-1 с получением конечной концентрации ГМ-КСФ 0,05 нг/мл, а супернатанта гибридомы – 5%. Максимальную клеточную пролиферацию (0% ингибирования) измеряли путем инкубации клеток TF-1 при конечной концентрации ГМ-КСФ 0,05 нг/мл без добавления супернатанта гибридомы. 100% ингибирование пролиферации TF-1 измеряли путем исключения ГМ-КСФ из анализа и выдерживания клеток только в полной среде RPMI1640. Затем клетки TF-1 инкубировали в течение 72 часов при 37 °С. Жизнеспособность клеток измеряли с помощью люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo® в соответствии с инструкциями производителя.

[0172] В целом три гибридомных моноклона 23F4, 32C4 и 50C5 показали значительное ингибирование пролиферации TF-1, и 23F4 и 50C5 были отобраны для дальнейшего исследования характеристик.

### **Пример 2. Связывание мышинных антител с ГМ-КСФ человека или макака-резуса**

[0173] В этом примере исследуется зависимость доза-ответ связывания в ELISA мышинового моноклонального антитела к ГМ-КСФ с рекомбинантным белком ГМ-КСФ человека или макака-резуса (1 мкг/мл в количестве 100 мкл).

[0174] Рекомбинантный белок ГМ-КСФ человека или макака-резуса (Genscript) наносили в концентрации 1 мкг/мл в PBS на планшеты для микротитрования на 2 ч при комнатной температуре (комн. темп.). После нанесения антигена лунки блокировали PBS/0,05% Tween (PBST) с 1% BSA в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывки лунок PBST в лунку добавляли различные концентрации антител к ГМ-КСФ и инкубировали в течение 1 при комнатной температуре. Для обнаружения связывающих антител добавляли конъюгированные с HRP вторичные антитела к мышинному Fc (Jackson Immuno Research) с последующим добавлением флуорогенных субстратов (Roche). В промежутках между всеми стадиями инкубации лунки планшета трижды промывали PBST. Флуоресценцию измеряли в ридере для микропланшетов TECAN Spectrafluor.

[0175] Как показано на **фиг. 3**, оба антитела 23F4 и 50C5 показали дозозависимое связывание с человеческим ГМ-КСФ с EC<sub>50</sub>, составившими 11,8 нг/мл и 14,6 нг/мл, соответственно, и ГМ-КСФ макака-резуса с EC<sub>50</sub>, составившими 10,2 нг/мл и 21,7 нг/мл, соответственно.

### **Пример 3. Кинетика связывания мышинных антител с человеческим ГМ-КСФ**

[0176] На **фиг. 4** приведено графическое представление кинетики связывания 23F4 и 50C5 с рекомбинантным человеческим ГМ-КСФ. Рекомбинантный человеческий ГМ-КСФ использовали в качестве анализа с серией последовательных концентраций (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 нМ). Анализ кинетики связывания антитела с антигеном проводили с использованием системы Viacore T200 с использованием подхода с захватом мышинового антитела. IgG к мышинному Fc иммобилизовали на сенсорном чипе

СМ5 в соответствии с инструкциями производителя. Вводили исследуемое антитело и захватывали его иммобилизованным IgG к мышиному Fc. И затем по отдельности вводили каждую из серии последовательных концентраций антигена и регистрировали профиль связывания для каждой концентрации анализируемого антигена, соответственно. Систему анализа регенерировали путем введения 10 мМ глицина-HCL с pH 1,5 в течение 30 секунд. Рабочий буфер представлял собой HBS-EP + (10 мМ HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты), pH 7,4, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA и 0,05% P20). Температура проведения анализа составляла 25 °C, а время ассоциации и диссоциации составляло 180 и 600 секунд, соответственно.

[0177] Данные Biacore были аппроксимированы с использованием программного обеспечения для анализа данных Biacore T200 1.0 в соответствии с моделью связывания 1:1 для расчета констант скорости ассоциации ( $k_a$ ) и диссоциации ( $k_d$ ), а также константы равновесия ( $KD$ ). В дополнение к **фиг. 4** некоторые сводные данные представлены в таблице ниже.

Образец	$k_a$ (1/Мс)	$k_d$ (1/с)	$KD$ (М)
23F4	8,723E+05	3,635E-05	4,168E-11
50C5	2,718E+06	1,204E-04	4,431E-11

#### **Пример 4. Блокирование связывания ГМ-КСФ с альфа-субъединицей рецептора ГМ-КСФ мышинными антителами**

[0178] Чтобы исследовать эффективность антител в блокировании связывания ГМ-КСФ с альфа-цепью рецептора ГМ-КСФ, альфа-субъединицу рекомбинантного человеческого белка рецептора ГМ-КСФ (CD116) наносили в концентрации 2 мкг/мл в PBS на планшеты для микротитрования и оставляли на ночь при 4 °C. После нанесения антигена лунки блокировали PBS/0,05% Tween (PBST) с 1% BSA в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывки лунок PBST в лунку добавляли различные концентрации антител к ГМ-КСФ в присутствии биотинилированного человеческого белка ГМ-КСФ (0,05 мкг/мл) и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре.

[0179] Для обнаружения связывания биотинилированного ГМ-КСФ с нанесенным рецептором добавляли конъюгированный с HRP стрептавидин с последующим добавлением флуорогенных субстратов (Roche). В промежутках между всеми стадиями

инкубации лунки планшета трижды промывали PBST. Флуоресценцию измеряли в ридере для микропланшетов TECAN Spectrafluor. Как показано на **фиг. 5**, оба антитела продемонстрировали дозозависимое ингибирование связывания ГМ-КСФ с альфа-субъединицей рецептора ГМ-КСФ.

**Пример 5. Блокирование ГМ-КСФ вызванной мышинными антителами передачей сигналов pSTAT5**

**[0180]** Моноциты CD14+ выделяли из периферической крови человека с использованием CD14-положительных микрогранул (Miltenyi Biotec). Очищенные моноциты стимулировали человеческим ГМ-КСФ (0,2 нг/мл) в течение 30 минут при 37°C в присутствии различных концентраций антитела 23F4. После инкубации клетки собирали и промывали буфером FACS (1x PBS + 2% FBS) и пермеабелизовали 2% PFA (параформальдегидом) с последующей фиксацией клеток с использованием ледяного метанола. Затем к клеткам добавляли конъюгированное с PE (фикоэритрином) антитело к pSTAT5, инкубировали в течение еще 30 минут при 4 °C и анализировали с помощью проточной цитометрии. % ингибирования рассчитывали как  $[1 - (\text{средняя интенсивность флуоресценции исследуемого образца} / \text{средняя интенсивность флуоресценции контроля})] \times 100\%$ . Добавление антител в дозе 0,1 или 1 мкг/мл может значительно снизить уровень вызванной ГМ-КСФ активации pSTAT5 (**фиг. 6**).

**Пример 6. Ингибирование мышинными антителами ГМ-КСФ-зависимой пролиферации TF-1**

**[0181]** Перед стимуляцией ГМ-КСФ клетки TF-1 промывали минимальной средой RPMI1640 и выдерживали в минимальной среде в течение ночи. На 2 день эти клетки, выдержанные в минимальной среде, собирали и затем высевали их с концентрацией  $3 \times 10^5$  клеток/мл в количестве 50 мкл на лунку 96-луночного планшета для культивирования клеток с плоским дном. Человеческий рекомбинантный ГМ-КСФ (Genscript) в концентрации 0,2 нг/мл (4X) смешивали в соотношении 1:1 с мышинными антителами к ГМ-КСФ (0,01 нг/мл – 1000 нг/мл, разведенными в полной среде), и 50 мкл смеси добавляли к клеткам TF-1. Максимальную клеточную пролиферацию (0% ингибирования) измеряли путем инкубации клеток TF-1 при конечной концентрации ГМ-КСФ 0,05 нг/мл без добавления антитела. 100% ингибирование пролиферации TF-1

измеряли путем исключения ГМ-КСФ из анализа и выдерживания клеток только в полной среде RPMI1640. Затем клетки TF-1 инкубировали в течение 72 часов при 37 °С. Жизнеспособность клеток измеряли с помощью люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo® в соответствии с инструкциями производителя. Значение IC50 для ингибирования пролиферации TF-1 как для 23F4, так и для 50C5 составило приблизительно 10,9 нг/мл (фиг. 7).

### Пример 7. Гуманизация мышиных антител

**[0182]** Гены вариабельной области мышиных антител использовали для создания гуманизированного моноклонального антитела. На первой стадии этого процесса аминокислотные последовательности VH и VK антител сравнивали с доступной базой данных последовательностей генов человеческого Ig, чтобы найти в целом наиболее хорошо совпадающие последовательности генов человеческого Ig зародышевой линии.

**[0183]** Затем конструировали гуманизированные последовательности вариабельного домена, где CDR1, 2 и 3 тяжелой и легкой цепей антитела были привиты на каркасные последовательности генов человеческого Ig. Затем была создана трехмерная модель, чтобы определить, существуют ли какие-либо положения каркасной области, в которых замена аминокислоты мыши на аминокислоту человека (обратные мутации) может влиять на связывание и/или конформацию CDR. Соответствующие последовательности и обратные мутации представлены в таблицах ниже.

#### Последовательности CDR VH 23F4

CDR1	SHYLH (SEQ ID NO: 1)
CDR2	WIFPGDDKTKYNEKFKG (SEQ ID NO: 2)
CDR3	GTKYLNWNFDV (SEQ ID NO: 3)

#### Последовательности CDR VL 23F4

CDR1	KANQNVGTTLA (SEQ ID NO: 4)
CDR2	SASYRYS (SEQ ID NO: 5)
CDR3	HQYTTYPLT (SEQ ID NO: 6)

Конструирование гуманизированных антител для 23F4

Конструирование VH I: VH1-f/JH6	
Конструкция	Мутация
23F4 VH	Химерное
23F4 VH.1	Привитые CDR, Q1E, T98R
23F4 VH.1a	Основано на 23F4 VH.1, A72S
23F4 VH.1b	Основано на 23F4VH.1, A72S, V68A
23F4 VH.1c	Основано на 23F4VH.1, A72S, V68A, I70L, M48I
23F4 VH.1d	Основано на 23F4VH.1, A72S, V68A, I70L, M48I, G26D, F29L
Конструирование VH II: VH1-f/JH6	
23F4 VH.2	Привитые CDR, Q1E
23F4 VH.2a	Основано на 23F4 VH.2, R72S
23F4 VH.2b	Основано на 23F4 VH.2, R72S, M70L
23F4 VH.2c	Основано на 23F4 VH.2, R72S, M70L, M48I, V68A
23F4 VH.2d	Основано на 23F4 VH.2, R72S, M70L, M48I, V68A, G26D, F29L
Конструирование VK: L8/Jk4	
Конструкция	Мутация
23F4Vk	Химерное
23F4 Vk.1	Привитые CDR
23F4 Vk.1a	Основано на 23F4 Vk.1, L46A
23F4 Vk.1b	Основано на 23F4 Vk.1, L46A, S60D, E70D
23F4 Vk.1c	Основано на 23F4 Vk.1, L46A, S60D, E70D, A43S, Y87F

**[0184]** Аминокислотные и нуклеотидные последовательности некоторых гуманизированных антител 23F4 перечислены в таблице ниже.

*Последовательности гуманизированных антител (остатки CDR подчеркнуты, а обратные мутации заключены в прямоугольники)*

23F4 VH	QVQLQQSGPELVKPGTSMKISCKTSDYTLTSHYLNHWVKQRPGGLEWIGW <u>IFPGDDKTKYNEKFKG</u> KATLTSCKTSNTAYMQLSSLTSEESAVYFCARGT <u>KYLNWNFDVWGTGTTVTVSS</u>	SEQ ID NO: 7
23F4 VH.1	<span style="border: 1px solid black;">E</span> VQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTF <del>T</del> SHYLNHWVQQAAPGKGLEWMGW <u>IFPGDDKTKYNEKFKG</u> RVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCA <span style="border: 1px solid black;">R</span> GT <u>KYLNWNFDVWGGT<del>T</del>VTVSS</u>	SEQ ID NO: 8

23F4 VH.1a	<u>E</u> VQLVQSGAEVKKPGATVKI SCKVSGY <u>TFTSHY</u> LHWVQQAPGKGLEW <u>M</u> GW <u>I</u> FP <u>GDDKTKYNEKFKG</u> RA <u>T</u> LT <u>S</u> DTSTDTAYMELSSLRSED <u>TAVYYCA</u> <u>R</u> GT <u>KYLNWNFDV</u> WGQGT <u>T</u> TVVSS	SEQ ID NO: 9
23F4 VH.1b	<u>E</u> VQLVQSGAEVKKPGATVKI SCKVSGY <u>TFTSHY</u> LHWVQQAPGKGLEW <u>M</u> GW <u>I</u> FP <u>GDDKTKYNEKFKG</u> RA <u>T</u> LT <u>S</u> DTSTDTAYMELSSLRSED <u>TAVYYCA</u> <u>R</u> GT <u>KYLNWNFDV</u> WGQGT <u>T</u> TVVSS	SEQ ID NO: 10
23F4 VH.1c	<u>E</u> VQLVQSGAEVKKPGATVKI SCKVSGY <u>TFTSHY</u> LHWVQQAPGKGLEW <u>I</u> GW <u>I</u> FP <u>GDDKTKYNEKFKG</u> RA <u>T</u> LT <u>S</u> DTSTDTAYMELSSLRSED <u>TAVYYCA</u> <u>R</u> GT <u>KYLNWNFDV</u> WGQGT <u>T</u> TVVSS	SEQ ID NO: 11
23F4 VH.1d	<u>E</u> VQLVQSGAEVKKPGATVKI SCKVSDY <u>T</u> LT <u>S</u> H <u>Y</u> LHWVQQAPGKGLEW <u>I</u> GW <u>I</u> FP <u>GDDKTKYNEKFKG</u> RA <u>T</u> LT <u>S</u> DTSTDTAYMELSSLRSED <u>TAVYYCA</u> <u>R</u> GT <u>KYLNWNFDV</u> WGQGT <u>T</u> TVVSS	SEQ ID NO: 12
23F4 VH.2	<u>E</u> VQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY <u>TFTSHY</u> LHWVQQAPGQGLEW <u>M</u> GW <u>I</u> FP <u>GDDKTKYNEKFKG</u> RVMTMTRDTSI STAYMELSSLRSDDTAVYYCA <u>R</u> GT <u>KYLNWNFDV</u> WGQGT <u>T</u> TVVSS	SEQ ID NO: 13
23F4 VH.2a	<u>E</u> VQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY <u>TFTSHY</u> LHWVQQAPGQGLEW <u>M</u> GW <u>I</u> FP <u>GDDKTKYNEKFKG</u> RVMTM <u>S</u> DTSI STAYMELSSLRSDDTAVYYCA <u>R</u> GT <u>KYLNWNFDV</u> WGQGT <u>T</u> TVVSS	SEQ ID NO: 14
23F4 VH.2b	<u>E</u> VQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY <u>TFTSHY</u> LHWVQQAPGQGLEW <u>M</u> GW <u>I</u> FP <u>GDDKTKYNEKFKG</u> RVMT <u>L</u> T <u>S</u> DTSI STAYMELSSLRSDDTAVYYCA <u>R</u> GT <u>KYLNWNFDV</u> WGQGT <u>T</u> TVVSS	SEQ ID NO: 15
23F4 VH.2c	<u>E</u> VQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY <u>TFTSHY</u> LHWVQQAPGQGLEW <u>I</u> GW <u>I</u> FP <u>GDDKTKYNEKFKG</u> RA <u>T</u> LT <u>S</u> DTSI STAYMELSSLRSDDTAVYYCA <u>R</u> GT <u>KYLNWNFDV</u> WGQGT <u>T</u> TVVSS	SEQ ID NO: 16
23F4 VH.2d	<u>E</u> VQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASDY <u>T</u> LT <u>S</u> H <u>Y</u> LHWVQQAPGQGLEW <u>I</u> GW <u>I</u> FP <u>GDDKTKYNEKFKG</u> RA <u>T</u> LT <u>S</u> DTSI STAYMELSSLRSDDTAVYYCA <u>R</u> GT <u>KYLNWNFDV</u> WGQGT <u>T</u> TVVSS	SEQ ID NO: 17
23F4Vk	DIVLTQPQKFLSTSVGDRVSVTK <u>KANQNVGTTLA</u> WYQQKPGQSPKAL <u>IYS</u> <u>ASYRYS</u> GVPPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFC <u>HQYTTYPLT</u> FGG GTKLEIK	SEQ ID NO: 18
23F4 Vk.1	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITC <u>KANQNVGTTLA</u> WYQQKPGKAPK <u>LLIYS</u> <u>ASYRYS</u> GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATY <u>YCHQYTTYPLT</u> FGG GTKVEIK	SEQ ID NO: 19
23F4 Vk.1a	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITC <u>KANQNVGTTLA</u> WYQQKPGKAPK <u>A</u> LIYS <u>ASYRYS</u> GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATY <u>YCHQYTTYPLT</u> FGG GTKVEIK	SEQ ID NO: 20
23F4 Vk.1b	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITC <u>KANQNVGTTLA</u> WYQQKPGKAPK <u>A</u> LIYS <u>ASYRYS</u> GVPP <u>D</u> RFSGSGSGT <u>D</u> FTLTISLQPEDFATY <u>YCHQYTTYPLT</u> FGG GTKVEIK	SEQ ID NO: 21
23F4 Vk.1c	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITC <u>KANQNVGTTLA</u> WYQQKPGK <u>S</u> PKAL <u>IYS</u> <u>ASYRYS</u> GVPP <u>D</u> RFSGSGSGT <u>D</u> FTLTISLQPEDFATY <u>F</u> <u>CHQYTTYPLT</u> FGG GTKVEIK	SEQ ID NO: 22

## Комбинация VH/VK для гуманизованного антитела 23F4

Vk \ VH	23F4 Vk.1	23F4 Vk.1a	23F4 Vk.1b	23F4 Vk.1c	23F4 Vk
23F4 VH.1	Hu23F4-1	Hu23F4-2	Hu23F4-3	Hu23F4-4	
23F4 VH.1a	Hu23F4-5	Hu23F4-6	Hu23F4-7	Hu23F4-8	
23F4 VH.1b	Hu23F4-9	Hu23F4-10	Hu23F4-11	Hu23F4-12	



23F4 VH.1c	Hu23F4-13	Hu23F4-14	Hu23F4-15	Hu23F4-16	
23F4 VH.1d	Hu23F4-17	Hu23F4-18	Hu23F4-19		
23F4 VH.2	Hu23F4-20	Hu23F4-21	Hu23F4-22	Hu23F4-23	
23F4 VH.2a	Hu23F4-24	Hu23F4-25	Hu23F4-26	Hu23F4-27	
23F4 VH.2b	Hu23F4-28	Hu23F4-29	Hu23F4-30	Hu23F4-31	
23F4 VH.2c	Hu23F4-32	Hu23F4-33	Hu23F4-34	Hu23F4-35	
23F4 VH.2d	Hu23F4-36	Hu23F4-37	Hu23F4-38		
23F4 VH					Химерное 23F4

### Последовательности CDR VH 50C5

CDR1	PYSIH (SEQ ID NO: 23)
CDR2	YINPSTGYIEYNQHFKD (SEQ ID NO: 24)
CDR3	GGDYEGYFDY (SEQ ID NO: 25)

### Последовательности CDR VL 50C5

CDR1	RLNENIYSFLA (SEQ ID NO: 26)
CDR2	NAETLAE (SEQ ID NO: 27)
CDR3	QQHYGTPYT (SEQ ID NO: 28)

### Конструирование гуманизированных антител для 50C5

<b>Конструирование VH I: VH1-69/JH6</b>	
<b>Конструкция</b>	<b>Мутация</b>
50C5 VH	Химерное
50C5 VH.1	Привитые CDR, Q1E
50C5 VH.1a	Основано на 50C5 VH.1, S84R
50C5 VH.1b	Основано на 50C5 VH.1, S84R, G27Y, T28I
50C5 VH.1c	Основано на 50C5 VH.1, S84R, G27Y, T28I, M48I
50C5 VH.1d	Основано на 50C5 VH.1, S84R, G27Y, T28I, M48I, V68T, I70L
50C5 VH.1e	Основано на 50C5 VH.1, S84R, G27Y, T28I, M48I, V68T, I70L, S30T
<b>Конструирование VK: O12/Jk4</b>	
<b>Конструкция</b>	<b>Мутация</b>
50C5Vk	Химерное

50C5 Vk.1	Привитые CDR
50C5 Vk.1a	Основано на 50C5 Vk.1, I48V
50C5 Vk.1b	Основано на 50C5 Vk.1, I48V, G57D
50C5 Vk.1c	Основано на 50C5 Vk.1, I48V, G57D, D70Q
50C5 Vk.1d	Основано на 50C5 Vk.1, I48V, G57D, D70Q, A43S

Последовательности гуманизированных антител (остатки CDR подчеркнуты, а обратные мутации заключены в прямоугольники)

50C5 VH	QVQLQQSAAELVRPGASVKMSCKASGYIFTPYSIH <sup>W</sup> I <sup>K</sup> QRPQGQGLEWIGY <u>INPSTGYIEYNQHFKD</u> RTT <sup>L</sup> LTADKSSSTAYMQLRSLTSEDSAVYYCARGG <u>DYEGYFDY</u> WGQGT <sup>T</sup> TVTVSS	SEQ ID NO: 29
50C5 VH.1	<sup>E</sup> VQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSPYSIH <sup>W</sup> VRQAPGQGLEWMGY <u>INPSTGYIEYNQHFKD</u> RV <sup>T</sup> ITADKSTSTAYMEL <sup>S</sup> SLRSEDTAVYYCARGG <u>DYEGYFDY</u> WGQGT <sup>T</sup> TVTVSS	SEQ ID NO: 30
50C5 VH.1a	<sup>E</sup> VQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSPYSIH <sup>W</sup> VRQAPGQGLEWMGY <u>INPSTGYIEYNQHFKD</u> RV <sup>T</sup> ITADKSTSTAYMEL <sup>R</sup> SLRSEDTAVYYCARGG <u>DYEGYFDY</u> WGQGT <sup>T</sup> TVTVSS	SEQ ID NO: 31
50C5 VH.1b	<sup>E</sup> VQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYIFSPYSIH <sup>W</sup> VRQAPGQGLEWMGY <u>INPSTGYIEYNQHFKD</u> RV <sup>T</sup> ITADKSTSTAYMEL <sup>R</sup> SLRSEDTAVYYCARGG <u>DYEGYFDY</u> WGQGT <sup>T</sup> TVTVSS	SEQ ID NO: 32
50C5 VH.1c	<sup>E</sup> VQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYIFSPYSIH <sup>W</sup> VRQAPGQGLEW <sup>I</sup> GY <u>INPSTGYIEYNQHFKD</u> RV <sup>T</sup> ITADKSTSTAYMEL <sup>R</sup> SLRSEDTAVYYCARGG <u>DYEGYFDY</u> WGQGT <sup>T</sup> TVTVSS	SEQ ID NO: 33
50C5 VH.1d	<sup>E</sup> VQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYIFSPYSIH <sup>W</sup> VRQAPGQGLEW <sup>I</sup> GY <u>INPSTGYIEYNQHFKD</u> RT <sup>T</sup> L <sup>L</sup> LTADKSTSTAYMEL <sup>R</sup> SLRSEDTAVYYCARGG <u>DYEGYFDY</u> WGQGT <sup>T</sup> TVTVSS	SEQ ID NO: 34
50C5 VH.1e	<sup>E</sup> VQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYIFTPYSIH <sup>W</sup> VRQAPGQGLEW <sup>I</sup> GY <u>INPSTGYIEYNQHFKD</u> RT <sup>T</sup> L <sup>L</sup> LTADKSTSTAYMEL <sup>R</sup> SLRSEDTAVYYCARGG <u>DYEGYFDY</u> WGQGT <sup>T</sup> TVTVSS	SEQ ID NO: 35
50C5 Vk	DIQMTQSPDLSASVGETVTIT <sup>C</sup> RLNENIYSFLAWYQQKQKSPQLLVYNA <u>ETLAE</u> DVPSRFRSGSGSGTQFSLKISSLQDDEFGTY <sup>C</sup> QQHYGTPYTFGGGT NLEIE	SEQ ID NO: 36
50C5 Vk.1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTIT <sup>C</sup> RLNENIYSFLAWYQQKPGKAPKLLIYNA <u>ETLAE</u> GVPSRFRSGSGSGTDF <sup>L</sup> TLTISSLQPEDFATYYC <sup>C</sup> QQHYGTPYTFGGGT KVEIK	SEQ ID NO: 37
50C5 Vk.1a	DIQMTQSPSSLSASVGDRTIT <sup>C</sup> RLNENIYSFLAWYQQKPGKAPKLL <sup>V</sup> YNA <u>ETLAE</u> GVPSRFRSGSGSGTDF <sup>L</sup> TLTISSLQPEDFATYYC <sup>C</sup> QQHYGTPYTFGGGT KVEIK	SEQ ID NO: 38
50C5 Vk.1b	DIQMTQSPSSLSASVGDRTIT <sup>C</sup> RLNENIYSFLAWYQQKPGKAPKLL <sup>V</sup> YNA <u>ETLAE</u> D <sup>V</sup> PSRFRSGSGSGTDF <sup>L</sup> TLTISSLQPEDFATYYC <sup>C</sup> QQHYGTPYTFGGGT KVEIK	SEQ ID NO: 39
50C5 Vk.1c	DIQMTQSPSSLSASVGDRTIT <sup>C</sup> RLNENIYSFLAWYQQKPGKAPKLL <sup>V</sup> YNA <u>ETLAE</u> D <sup>V</sup> PSRFRSGSGSGT <sup>Q</sup> FTLTISSLQPEDFATYYC <sup>C</sup> QQHYGTPYTFGGGT KVEIK	SEQ ID NO: 40
50C5 Vk.1d	DIQMTQSPSSLSASVGDRTIT <sup>C</sup> RLNENIYSFLAWYQQKPGK <sup>S</sup> PKLL <sup>V</sup> YNA <u>ETLAE</u> D <sup>V</sup> PSRFRSGSGSGT <sup>Q</sup> FTLTISSLQPEDFATYYC <sup>C</sup> QQHYGTPYTFGGGT KVEIK	SEQ ID NO: 41

## Комбинация VH/VK для гуманизированного антитела 50C5

Vk \ VH	50C5 Vk.1	50C5 Vk.1a	50C5 Vk.1b	50C5 Vk.1c	50C5 Vk.1d	50C5 Vk
50C5 VH.1						
50C5 VH.1a	Hu50C5-1	Hu50C5-2	Hu50C5-3	Hu50C5-4	Hu50C5-5	
50C5 VH.1b	Hu50C5-6	Hu50C5-7	Hu50C5-8	Hu50C5-9	Hu50C5-10	
50C5 VH.1c	Hu50C5-11	Hu50C5-12	Hu50C5-13	Hu50C5-14	Hu50C5-15	
50C5 VH.1d	Hu50C5-16	Hu50C5-17	Hu50C5-18	Hu50C5-19	Hu50C5-20	
50C5 VH.1e	Hu50C5-21	Hu50C5-22	Hu50C5-23	Hu50C5-24		
50C5 VH						Химерное 50C5

**Пример 8. Связывание гуманизированных антител с человеческим ГМ-КСФ**

[0185] Гуманизированные варианты исследовали на связывание с рекомбинантным человеческим ГМ-КСФ, как описано ранее. Рекомбинантный человеческий белок ГМ-КСФ (Genscript) наносили в концентрации 1 мкг/мл в PBS на планшеты для микротитрования на 2 ч при комнатной температуре (комн. темп.). После нанесения антигена лунки блокировали PBS/0,05% Tween (PBST) с 1% BSA в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывки лунок PBST в лунку добавляли различные концентрации гуманизированных антител к ГМ-КСФ и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре.

[0186] Для обнаружения связывающих антител добавляли конъюгированные с HRP вторичные антитела к мышинному Fc (Jackson Immuno Research) с последующим добавлением флуорогенных субстратов (Roche). В промежутках между всеми стадиями инкубации лунки планшета трижды промывали PBST. Флуоресценцию измеряли в ридере для микропланшетов TECAN Spectrafluor. Как показано на **фиг. 8**, все гуманизированные варианты продемонстрировали схожую эффективность связывания с человеческим ГМ-КСФ по сравнению с химерным антителом.

**Пример 9. Кинетика связывания гуманизированных антител**

[0187] Кинетику связывания гуманизированных антител измеряли с помощью Biacore, как описано ранее. Рекомбинантный человеческий ГМ-КСФ использовали в качестве анализа с серией последовательных концентраций (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 нМ).

Анализ кинетики связывания антитела с антигеном проводили с использованием системы Biacore T200 с использованием подхода с захватом человеческого антитела. IgG к человеческому Fc иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 в соответствии с инструкциями производителя. Вводили исследуемое антитело и захватывали его иммобилизованным IgG к человеческому Fc. И затем по отдельности вводили каждую из серии последовательных концентраций антигена и регистрировали профиль связывания для каждой концентрации анализируемого антигена, соответственно.

**[0188]** Систему анализа регенерировали путем введения 10 мМ глицина-HCL с pH 1,5 в течение 30 секунд. Рабочий буфер представлял собой HBS-EP + (10 мМ HEPES, pH 7,4, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA и 0,05% P20). Температура проведения анализа составляла 25 °C, а время ассоциации и диссоциации составляло 180 и 600 секунд, соответственно. Данные Biacore были аппроксимированы с использованием программного обеспечения для анализа данных Biacore T200 1.0 в соответствии с моделью связывания 1:1 для расчета констант скорости ассоциации ( $k_a$ ) и диссоциации ( $k_d$ ), а также константы равновесия ( $KD$ ). Как показано в таблицах ниже, из 23F4 наибольшую аффинность связывания по сравнению с химерным антителом продемонстрировали Hu23F4-13, Hu23F4-27 и Hu23F4-36; из 50C5 наибольшую аффинность связывания по сравнению с химерным антителом продемонстрировали Hu50C5-8, Hu50C5-17, Hu50C5-18, Hu50C5-19, Hu50C5-21 и Hu50C5-23.

Антиген	Антитело	$k_a$ (1/Мс)	$k_d$ (1/с)	$KD$ (М)
ГМ-КСФ	3523-Hu23F4-5	1,188E+6	1,239E-4	1,043E-10
	3523-Hu23F4 -6	8,765E+5	1,353E-4	1,544E-10
	3523-Hu23F4-13	1,279E+6	1,195E-4	9,349E-11
	3523-Hu23F4-20	8,007E+5	1,137E-4	1,420E-10
	3523-Hu23 F4-23	8,994E+5	1,164E-4	1,295E-10
	3523-Hu23 F4-25	6,354E+5	1,091E-4	1,718E-10
	3523-Hu23F4-27	9,232E+5	9,461E-5	1,025E-10
	3523-Hu23F4-29	6,673E+5	1,013E-4	1,518E-10
	3523-Hu23F4-36	1,271E+6	1,026E-4	8,070E-11
	Химерное 3523-Hu23F4	1,229E+6	3,873E-5	3,150E-11

Антиген	Антитело	$k_a$ (1/Мс)	$k_d$ (1/с)	$KD$ (М)
ГМ-КСФ	35230Hu50C5-6	4,418E+6	1,375E-4	3,112E-11
	35230Hu50C5-8	4,911E+6	1,386E-4	2,822E-11
	35230Hu50C5-11	4,368E+6	1,363E-4	3,121E-11
	35230Hu50C5-17	4,466E+6	1,112E-4	2,491E-11

	35230Hu50C5-19	4,724E+6	1,089E-4	2,306E-11
	35230Hu50C5-19	4,622E+6	1,061E-4	2,295E-11
	35230Hu50C5-21	4,592E+6	1,082E-4	2,356E-11
	35230Hu50C5-23	4,535E+6	1,251E-4	2,760E-11
	Химерное 35230Hu50C5	4,433E+6	1,419E-4	3,202E-11

### Пример 10. Ингибирование гуманизированными антителами пролиферации TF-1

[0189] Перед стимуляцией ГМ-КСФ клетки TF-1 промывали минимальной средой RPMI1640 и выдерживали в минимальной среде в течение ночи. На 2 день эти клетки, выдержанные в минимальной среде, собирали и затем высевали их с концентрацией  $3 \times 10^5$  клеток/мл в количестве 50 мкл на лунку 96-луночного планшета для культивирования клеток с плоским дном. Человеческий рекомбинантный ГМ-КСФ (Genscript) в концентрации 0,2 нг/мл (4X) смешивали в соотношении 1:1 с гуманизированными антителами к ГМ-КСФ (0,01 нг/мл – 1000 нг/мл, разведенными в полной среде), и 50 мкл смеси добавляли к клеткам TF-1. Максимальную клеточную пролиферацию (0% ингибирования) измеряли путем инкубации клеток TF-1 при конечной концентрации ГМ-КСФ 0,05 нг/мл без добавления антитела. 100% ингибирование пролиферации TF-1 измеряли путем исключения ГМ-КСФ из анализа и выдерживания клеток только в полной среде RPMI1640. Затем клетки TF-1 инкубировали в течение 72 часов при 37 °C. Жизнеспособность клеток измеряли с помощью люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo® в соответствии с инструкциями производителя. Среди гуманизированных антител из исследованных 23F4 наибольшее ингибирование продемонстрировали Hu23F4-13, Hu23F4-27 и Hu23F4-36 с IC50, составившими 4,95 нг/мл, 3,95 нг/мл и 3,30 нг/мл, соответственно (фиг. 9). Среди гуманизированных антител из исследованных 50C5 наибольшее ингибирование продемонстрировало Hu50C5-23 с IC50, составившей 14,31 нг/мл (фиг. 9).

Название антитела	IC50 для пролиферации TF-1
Химерное Hu23F4	8,55 нг/мл
Hu23F4-5	15,58 нг/мл
Hu23F4-6	7,87 нг/мл
Hu23F4-13	4,95 нг/мл
Hu23F4-20	8,77 нг/мл
Hu23F4-23	9,08 нг/мл

Hu23F4-25	12,22 нг/мл
Hu23F4-27	3,95 нг/мл
Hu23F4-29	27,44 нг/мл
Hu23F4-36	3,30 нг/мл

Название антитела	IC50 для пролиферации TF-1
Химерное Hu50C5	86,47 нг/мл
Hu50C5-6	23,93 нг/мл
Hu50C5-8	45,90 нг/мл
Hu50C5-11	111,1 нг/мл
Hu50C5-17	22,06 нг/мл
Hu50C5-18	41,27 нг/мл
Hu50C5-19	16,99 нг/мл
Hu50C5-21	21,64 нг/мл
Hu50C5-23	14,31 нг/мл

### Пример 11. Блокирование гуманизированными антителами передачи сигналов pSTAT5

[0190] Моноциты CD14<sup>+</sup> выделяли из периферической крови человека с использованием CD14-положительных микрогранул (Miltenyi Biotec). Очищенные моноциты стимулировали человеческим ГМ-КСФ (0,2 нг/мл) в течение 30 минут при 37 °C в присутствии различных концентраций гуманизированных антител. После инкубации клетки собирали и промывали буфером FACS (1x PBS + 2% FBS) и пермеабелизовали 2% PFA с последующей фиксацией клеток с использованием ледяного метанола. Затем к клеткам добавляли конъюгированное с PE антитело к pSTAT5, инкубировали в течение еще 30 минут при 4 °C и анализировали с помощью проточной цитометрии. % ингибирования рассчитывали как  $[1 - (\text{средняя интенсивность флуоресценции исследуемого образца} / \text{средняя интенсивность флуоресценции контроля})] \times 100\%$ . Добавление Hu23F4-13, Hu23F4-27, Hu23F4-36, Hu50C5-17 и Hu50C5-23 в дозе 0,1 или 1 мкг/мл может значительно снизить уровень вызванной ГМ-КСФ активации pSTAT5 (фиг. 10).

### Пример 12. Связывание гуманизированных антител с ГМ-КСФ макака-резуса

[0191] Рекомбинантный белок ГМ-КСФ макака-резуса (Genscript) наносили в концентрации 1 мкг/мл в PBS на планшеты для микротитрования на 2 ч при комнатной

температуре (комн. темп.). После нанесения антигена лунки блокировали PBS/0,05% Tween (PBST) с 1% BSA в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывки лунок PBST в лунку добавляли различные концентрации гуманизированных антител к ГМ-КСФ и инкубировали в течение 1 при комнатной температуре. Для обнаружения связывающих антител добавляли конъюгированные с HRP вторичные антитела к мышиному Fc (Jackson Immuno Research) с последующим добавлением флуорогенных субстратов (Roche). В промежутках между всеми стадиями инкубации лунки планшета трижды промывали PBST. Флуоресценцию измеряли в ридере для микропланшетов TECAN Spectrafluor. Как показано на **фиг. 11**, Hu23F4-13, Hu23F4-27 и Hu23F4-36 продемонстрировали дозозависимое связывание с ГМ-КСФ макака-резуса с EC50, составившими 7,44 нг/мл, 6,25 нг/мл и 7,75 нг/мл, соответственно; Hu50C5-17 и Hu50C5-23 продемонстрировали дозозависимое связывание с ГМ-КСФ макака-резуса с EC50, составившими 18,86 нг/мл и 21,63 нг/мл, соответственно.

Название антитела	EC50 для связывания ГМ-КСФ макака-резуса
Hu23F4-13	7,44 нг/мл
Hu23F4-27	6,25 нг/мл
Hu23F4-36	7,75 нг/мл
Hu50C5-17	18,86 нг/мл
Hu50C5-23	21,63 нг/мл

### Пример 13. Фармакокинетика Hu23F4-27 у яванского макака

[0192] По результатам проведенных анализов биологической активности *in vitro* Hu23F4-27 было выбрано для определения фармакокинетических свойств у интактного яванского макака. Антитело Hu23F4-27 вводили с помощью болюсной внутривенной инъекции интактному яванскому макаку в различных дозах: 0,4 мг/кг, 2 мг/кг и 10 мг/кг, соответственно. Образцы плазмы собирали в выбранные моменты времени через 28 дней после введения дозы и определяли концентрацию соответствующего белка с помощью ELISA. Затем рассчитывали фармакокинетические параметры с помощью некомпартментного подхода, реализованного в программе WinNonlin (Certara, Калифорния), показанные на **фиг. 12**.

Группа (n=2)	T <sub>1/2</sub> (ч)	C <sub>max</sub> (мкг/мл)	AUC <sub>0-t</sub> (сут*мкг/мл)	AUC <sub>inf</sub> (сут*мкг/мл)	Клиренс (мл/ч/кг)
10 мг/кг	121,4±11,4	432,2±31,7	1254,5±38,3	1276,1±48,6	0,327±0,012

2 мг/кг	220,7±94,8	74,1±8,3	280,3±46,3	311,4±76,6	0,276±0,068
0,4 мг/кг	178,2±4,8	11,1±4,6	49,4±1,9	52,9±1,7	0,315±0,010

\* \* \*

**[0193]** Объем настоящего изобретения не должен быть ограничен отдельными описанными вариантами осуществления, которые играют роль отдельных иллюстраций конкретных аспектов изобретения, и любые композиции или способы, которые являются функционально эквивалентными, находятся в пределах объема настоящего изобретения. Специалистам в данной области техники будет очевидно, что способы и композиции согласно настоящему изобретению могут быть подвергнуты различным модификациям и вариациям без отклонения от сущности или объема изобретения. Таким образом, подразумевается, что настоящее изобретение охватывает его модификации и вариации при условии, что они входят в объем прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов.

**[0194]** Все публикации и патентные заявки, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка была конкретным и индивидуальным образом включена посредством ссылки.



ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> I-MAV

<120> АНТИТЕЛА К ГМ-КСФ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

<130> 54LW-258793-WO

<150> CN201610831525.9

<151> 2016-09-19

<150> CN201610832677.0

<151> 2016-09-19

<160> 46

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 1

Ser His Tyr Leu His

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 2

Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Lys Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 11

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 3

Gly Thr Lys Tyr Leu Asn Trp Asn Phe Asp Val

1 5 10

<210> 4  
<211> 11  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 4

Lys Ala Asn Gln Asn Val Gly Thr Thr Leu Ala  
1 5 10

<210> 5  
<211> 7  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 5

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser  
1 5

<210> 6  
<211> 9  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 6

His Gln Tyr Thr Thr Tyr Pro Leu Thr  
1 5

<210> 7  
<211> 120  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 7

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

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Asp Tyr Thr Leu Thr Ser His  
20 25 30

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

Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Lys Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

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

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Glu Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Lys Tyr Leu Asn Trp Asn Phe Asp Val Trp Gly Thr  
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 8

<211> 120

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 8

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His  
20 25 30

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

Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Lys Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 9

<211> 120

<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 9

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His  
20 25 30

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

Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Lys Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 10  
<211> 120  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 10

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His  
20 25 30

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

Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Lys Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 11  
<211> 120  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 11

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His  
20 25 30

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

Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Lys Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 12  
<211> 120  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 12

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Asp Tyr Thr Leu Thr Ser His  
20 25 30

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

Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Lys Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 13

<211> 120

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 13

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

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

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

Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Lys Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 14

<211> 120

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 14

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

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

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

Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Lys Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 15

<211> 120

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 15

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

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

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

Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Lys Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 16

<211> 120

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 16

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

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

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

Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Lys Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

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



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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 17

<211> 120

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 17

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Asp Tyr Thr Leu Thr Ser His  
20 25 30

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

Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Lys Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 18

<211> 107

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 18

Asp Ile Val Leu Thr Gln Pro Gln Lys Phe Leu Ser Thr Ser Val Gly  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 19

<211> 107

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

<210> 20

<211> 107

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

<210> 21

<211> 107

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 21

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

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

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

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

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

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

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

<210> 22

<211> 107

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

<210> 23

<211> 5

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 23

Pro Tyr Ser Ile His  
1 5

<210> 24  
<211> 17  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 24

Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Ile Glu Tyr Asn Gln His Phe Lys  
1 5 10 15

Asp

<210> 25  
<211> 10  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 25

Gly Gly Asp Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 26  
<211> 11  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 26

Arg Leu Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Phe Leu Ala  
1 5 10

<210> 27  
<211> 7  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 27

Asn Ala Glu Thr Leu Ala Glu  
1 5

<210> 28  
<211> 9  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 28

Gln Gln His Tyr Gly Thr Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 29  
<211> 119  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 29

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Gly Asp Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115

<210> 30  
<211> 119  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 30

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

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

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

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

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Asp Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 31

<211> 119

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 31

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

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

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

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

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Asp Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 32  
<211> 119  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 32

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

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

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

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

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Asp Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 33  
<211> 119  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 33



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

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

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

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

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Asp Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 34  
<211> 119  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 34

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Gly Asp Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 35  
<211> 119  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 35

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Gly Asp Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 36  
<211> 107  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 36

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Leu Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Phe  
20 25 30

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

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

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

Asp Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Gly Thr Pro Tyr  
85 90 95

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

<210> 37  
<211> 107  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 37

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Leu Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Phe  
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Gly Thr Pro Tyr  
85 90 95

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

<210> 38  
<211> 107  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 38

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Leu Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Phe  
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Gly Thr Pro Tyr  
85 90 95

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

<210> 39  
<211> 107  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 39

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Leu Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Phe  
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Gly Thr Pro Tyr  
85 90 95

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

<210> 40

<211> 107

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 40

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Leu Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Phe  
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Gly Thr Pro Tyr  
85 90 95

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

<210> 41

<211> 107

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 41

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Leu Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Phe  
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Gly Thr Pro Tyr  
85 90 95

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

<210> 42  
<211> 5  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 42

Asp Tyr Thr Leu Thr  
1 5

<210> 43  
<211> 5  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 43

Gly Tyr Thr Phe Thr  
1 5

<210> 44  
<211> 5  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 44

Gly Tyr Ile Phe Thr  
1 5

<210> 45  
<211> 5  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 45

Gly Tyr Ile Phe Ser  
1 5

<210> 46  
<211> 5  
<212> ПРТ  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая

<400> 46

Gly Gly Thr Phe Ser  
1 5

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Выделенное антитело или его фрагмент, причем указанное антитело или его фрагмент обладает специфичностью к человеческому белку ГМ-КСФ и содержит CDR1 VH с последовательностью SEQ ID NO: 1, CDR2 VH с последовательностью SEQ ID NO: 2, CDR3 VH с последовательностью SEQ ID NO: 3, CDR1 VL с последовательностью SEQ ID NO: 4, CDR2 VL с последовательностью SEQ ID NO: 5 и CDR3 VL с последовательностью SEQ ID NO: 6.
2. Антитело или его фрагмент по п. 1, дополнительно содержащее константную область тяжелой цепи, константную область легкой цепи, область Fc или их комбинацию.
3. Антитело или его фрагмент по п. 1, отличающиеся тем, что константная область легкой цепи представляет собой константную область каппа-цепи или лямбда-цепи.
4. Антитело или его фрагмент по п. 1, отличающиеся тем, что указанное антитело или его фрагмент имеет изотип IgG, IgM, IgA, IgE или IgD.
5. Антитело или его фрагмент по п. 4, отличающиеся тем, что изотип представляет собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.
6. Антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-5, отличающиеся тем, что указанное антитело или его фрагмент представляют собой химерное антитело, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело.
7. Антитело или его фрагмент по п. 6, отличающиеся тем, что указанное антитело или его фрагмент представляет собой гуманизированное антитело.



8. Антитело или его фрагмент по п. 7, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую один или более аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из:

- (a) Glu в положении 1,
- (b) Arg в положении 98,
- (c) Ser в положении 72,
- (d) Ala в положении 68,
- (e) Leu в положении 70,
- (f) Ile в положении 48,
- (g) Asp в положении 26 и
- (h) Leu в положении 29, согласно системе нумерации по Kabat, и их комбинации

9. Антитело или его фрагмент по п. 8, отличающиеся тем, что переменная область тяжелой цепи содержит по меньшей мере (a) Glu в положении 1.

10. Антитело или его фрагмент по п. 8, отличающиеся тем, что переменная область тяжелой цепи содержит фрагмент DYTLLT (SEQ ID NO: 42) или GYTFT (SEQ ID NO: 43), начинающийся с положения 26 согласно системе нумерации по Kabat.

11. Антитело или его фрагмент по п. 7, содержащее переменную область легкой цепи, содержащую один или более аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из:

- (a) Ala в положении 46,
- (b) Asp в положении 60,
- (c) Asp в положении 70,
- (d) Ser в положении 43 и
- (f) Phe в положении 87, согласно системе нумерации по Kabat, и их комбинации.

12. Антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-11, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-17, или пептид, последовательность которого по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-17.

13. Антитело или его фрагмент по п. 1, отличающиеся тем, что переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, 14 или 17.

14. Антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-13, содержащее переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19-22, или пептид, последовательность которого по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19-22.

15. Антитело или его фрагмент по п. 1, отличающиеся тем, что переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 или 22.

16. Антитело или его фрагмент по п. 1, отличающиеся тем, что переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

17. Антитело или его фрагмент по п. 1, отличающиеся тем, что указанное антитело или его фрагмент представляет собой биспецифическое антитело или одноцепочечный переменный фрагмент.
18. Композиция, содержащая антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-17 и фармацевтически приемлемый носитель.
19. Выделенная клетка, содержащая один или более полинуклеотидов, кодирующих антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-17.
20. Способ лечения воспалительного или аутоиммунного заболевания или состояния у нуждающегося в этом пациента, включающий введение указанному пациенту антитела или его фрагмента по любому из пп. 1-17.
21. Способ по п. 20, отличающийся тем, что воспалительное заболевание или состояние выбрано из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, болезни Аддисона, атеросклероза, анкилозирующего спондилита, артрита, остеоартрита (ОА), ревматоидного артрита (РА), псориатического артрита (ПА), анкилозирующего спондилита, астмы, атеросклероза, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), болезни Крона, колита, дерматита, дивертикулита, фибромиалгии, гепатита, синдрома раздраженного кишечника (СРК), системной красной волчанки (СКВ), нефрита, болезни Паркинсона (БП), васкулита и язвенного колита.
22. Способ по п. 20, отличающийся тем, что аутоиммунное заболевание или состояние выбрано из группы, состоящей из очаговой алопеции, аутоиммунной гемолитической анемии, аутоиммунного гепатита, дерматомиозита, диабета (1 типа), целиакии, аутоиммунного ювенильного идиопатического артрита, гломерулонефрита, болезни Грейвса, синдрома Гийена-Барре, идиопатической тромбоцитопенической

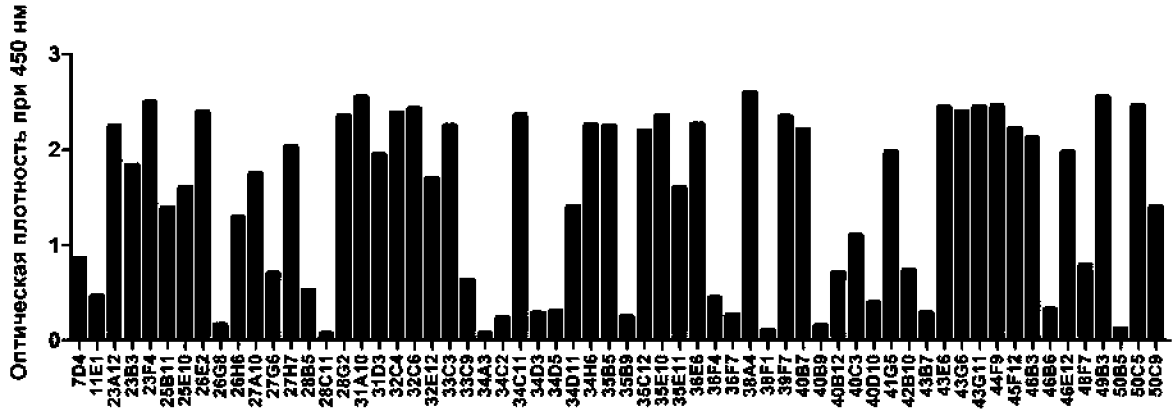
пурпуры, миастении гравис, аутоиммунного миокардита, рассеянного склероза, пемфигуса/пемфигоида, пернициозной анемии, узелкового полиартериита, полимиозита, первичного билиарного цирроза, псориаза, ревматоидного артрита, склеродермии/системного склероза, синдрома Шегрена, системной красной волчанки, аутоиммунного тиреоидита, тиреоидита Хашимото, аутоиммунного увеита, витилиго и гранулематоза с полиангиитом (Вегенера).

23. Способ лечения рака у нуждающегося в этом пациента, включающий введение указанному пациенту антитела или его фрагмента по любому из пп. 1-17.

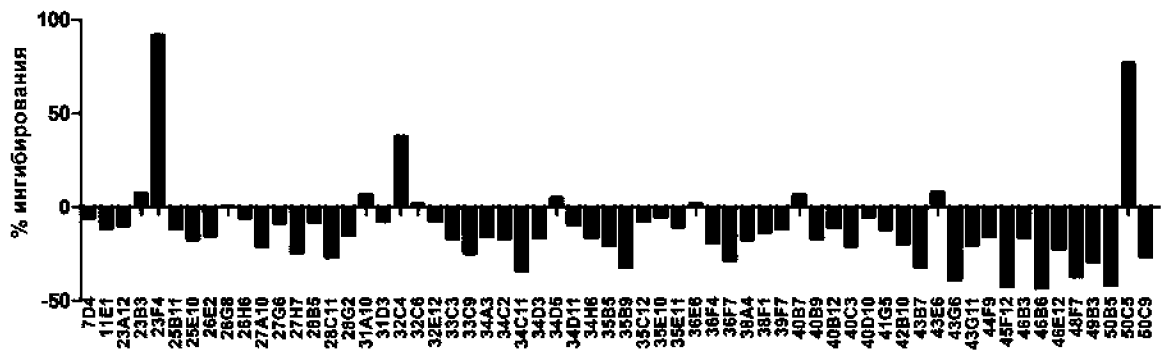
24. Способ по п. 23, отличающийся тем, что рак выбран из группы, состоящей из рака мочевого пузыря, рака молочной железы, колоректального рака, рака эндометрия, рака пищевода, рака головы и шеи, рака почки, лейкоза, рака печени, рака легкого, лимфомы, меланомы, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы и рака щитовидной железы.

25. Способ уменьшения или облегчения боли у нуждающегося в этом пациента, включающий введение указанному пациенту антитела или его фрагмента по любому из пп. 1-17.

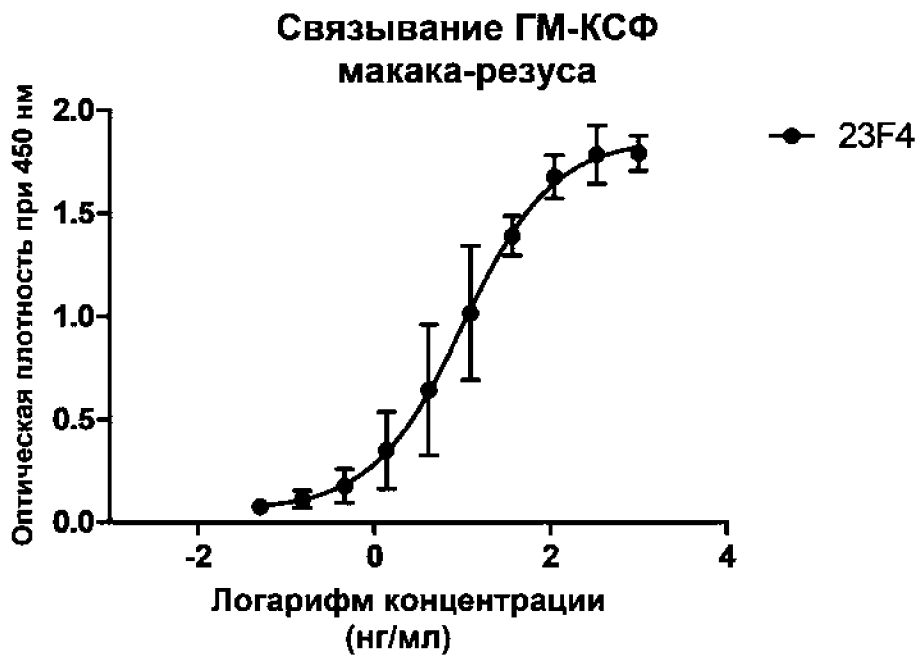
26. Способ обнаружения экспрессии ГМ-КСФ в образце, включающий приведение образца в контакт с антителом или его фрагментом по любому из пп. 1-17 в условиях, обеспечивающих связывание антитела или его фрагмента с ГМ-КСФ, и обнаружение связывания, свидетельствующего об экспрессии ГМ-КСФ в образце.



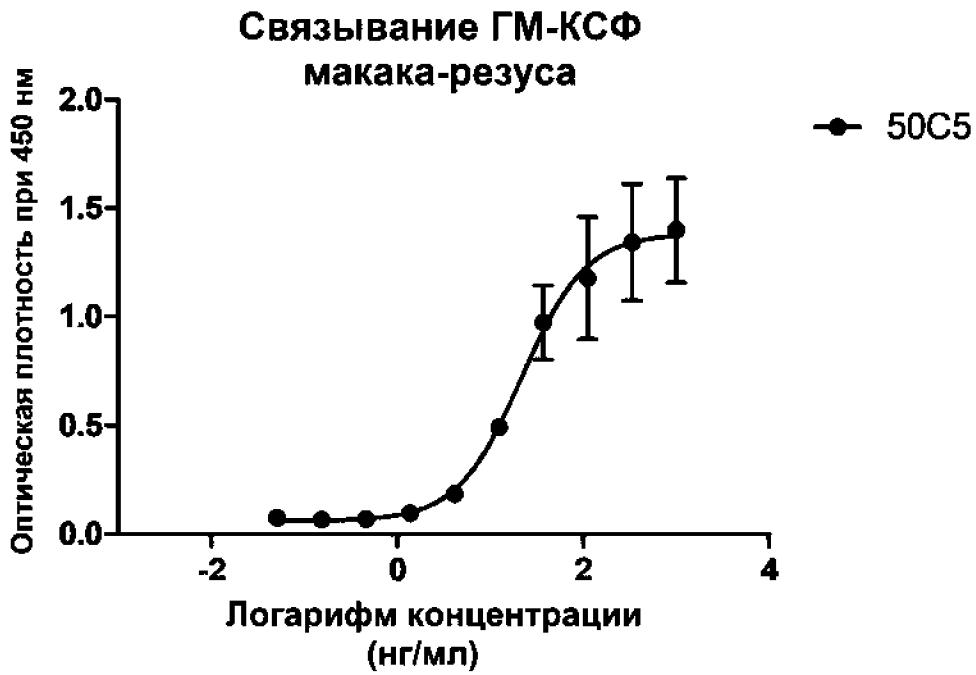
ФИГ. 1



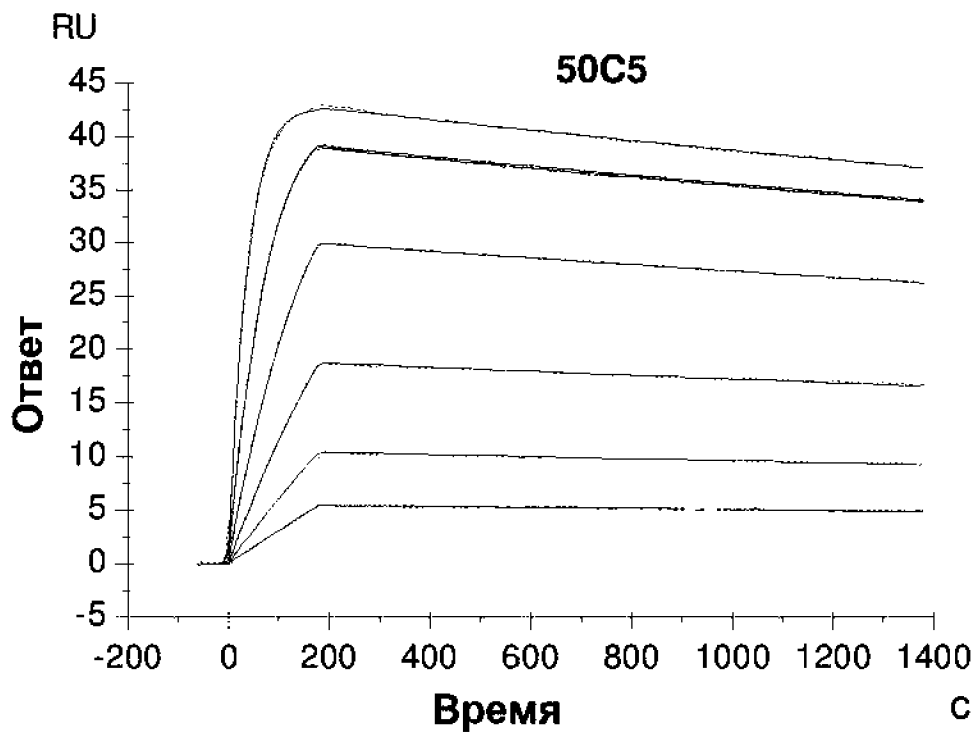
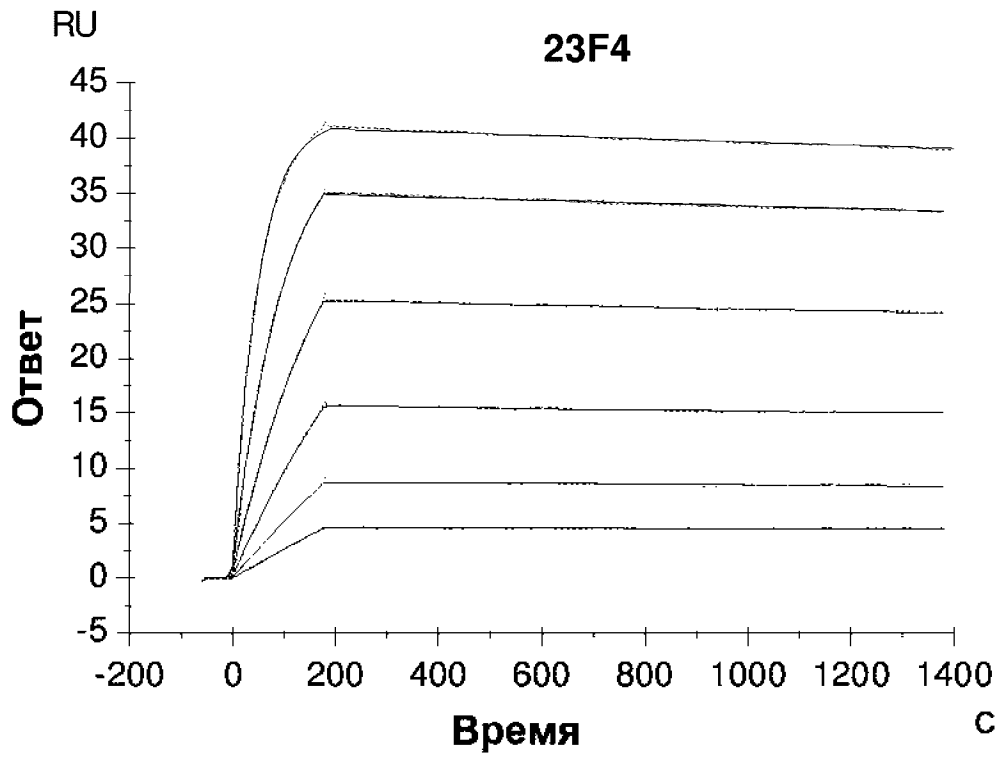
ФИГ. 2



ФИГ. 3

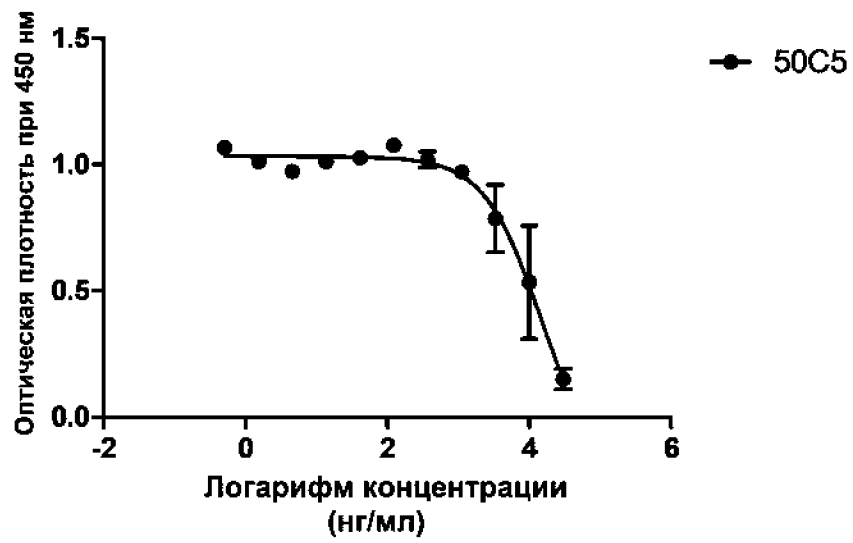
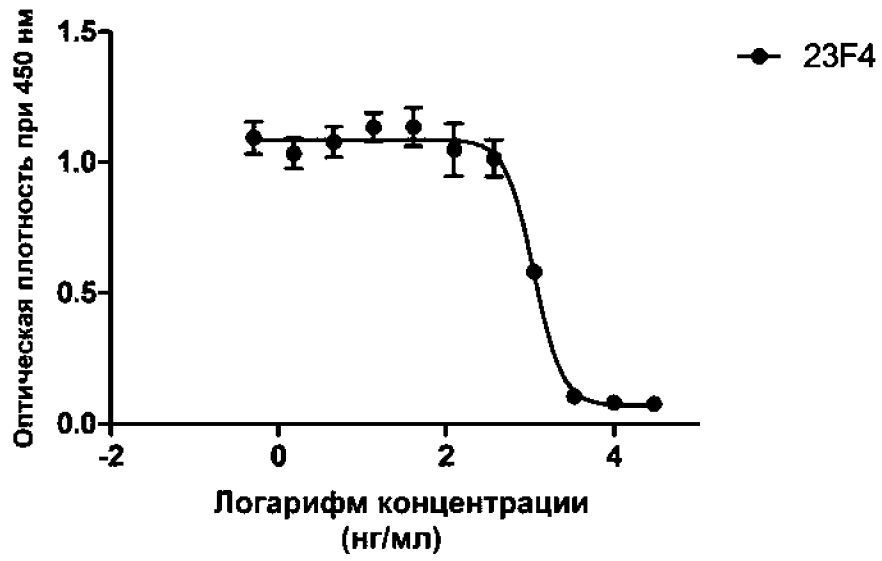


ФИГ. 3 (продолжение)

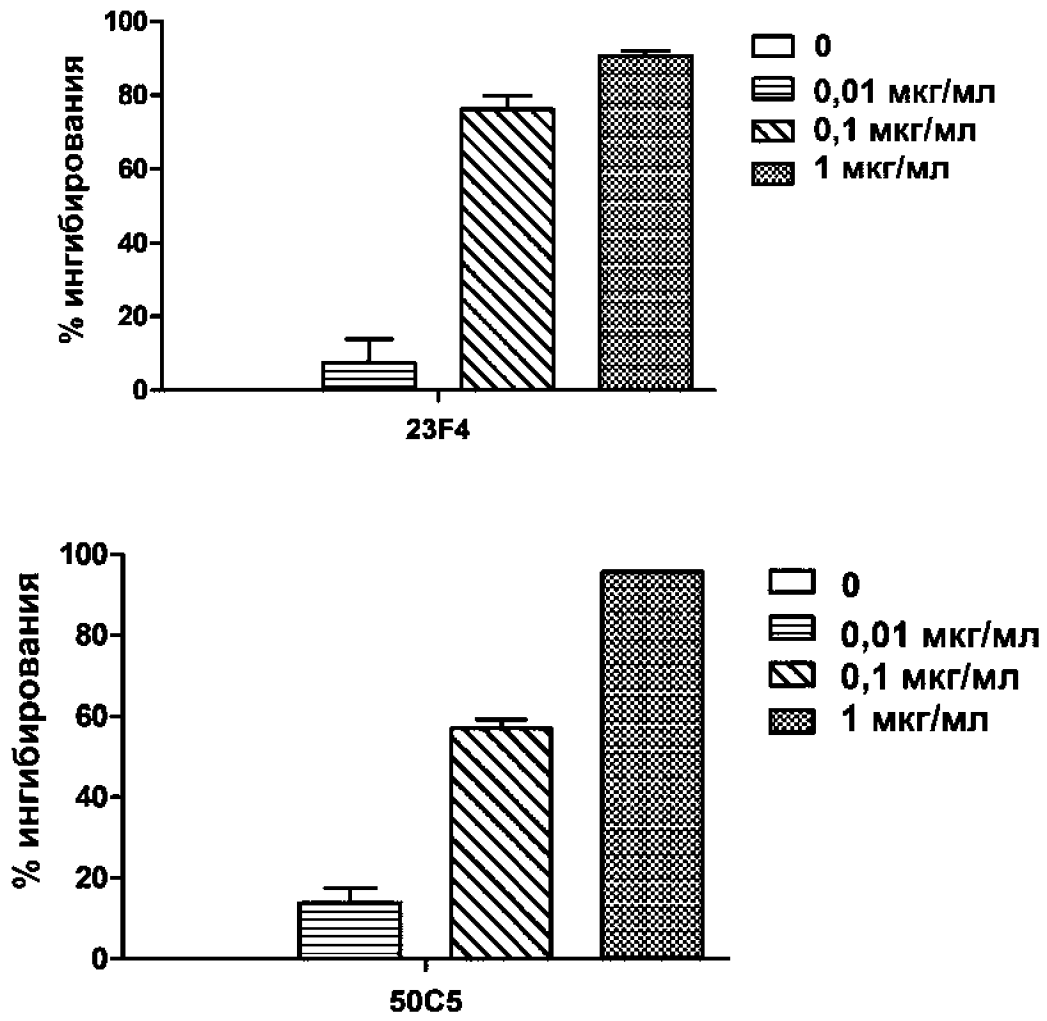


ФИГ. 4

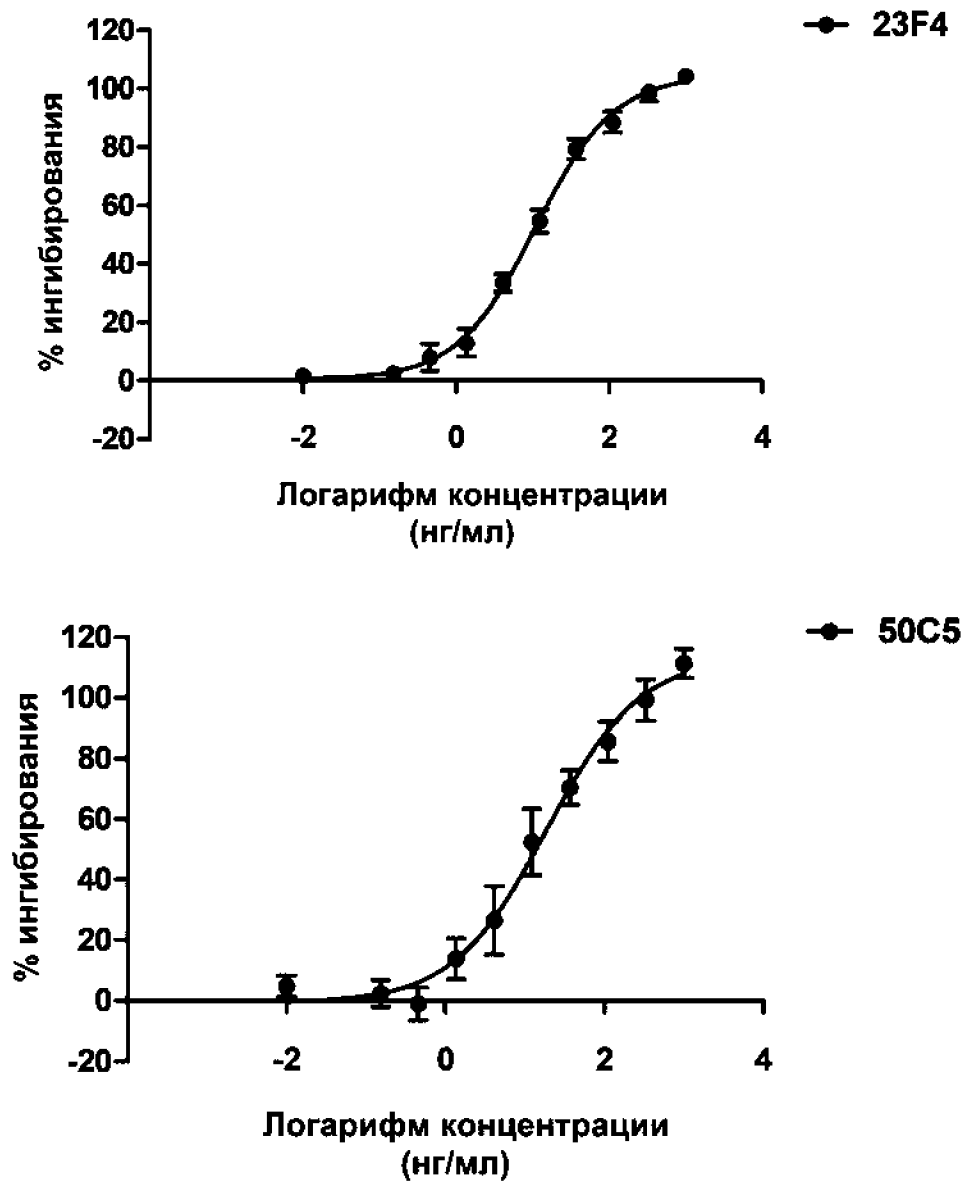




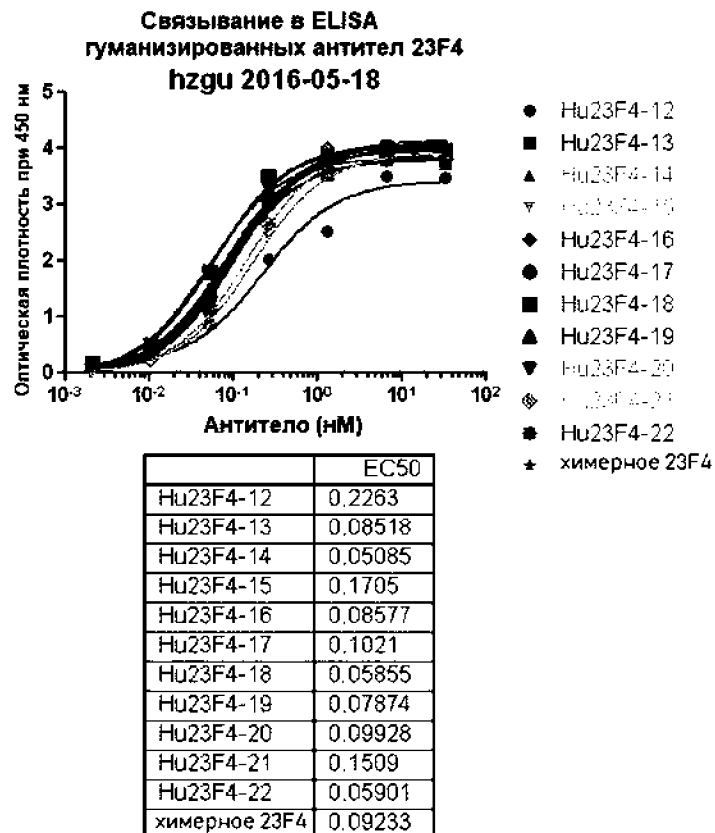
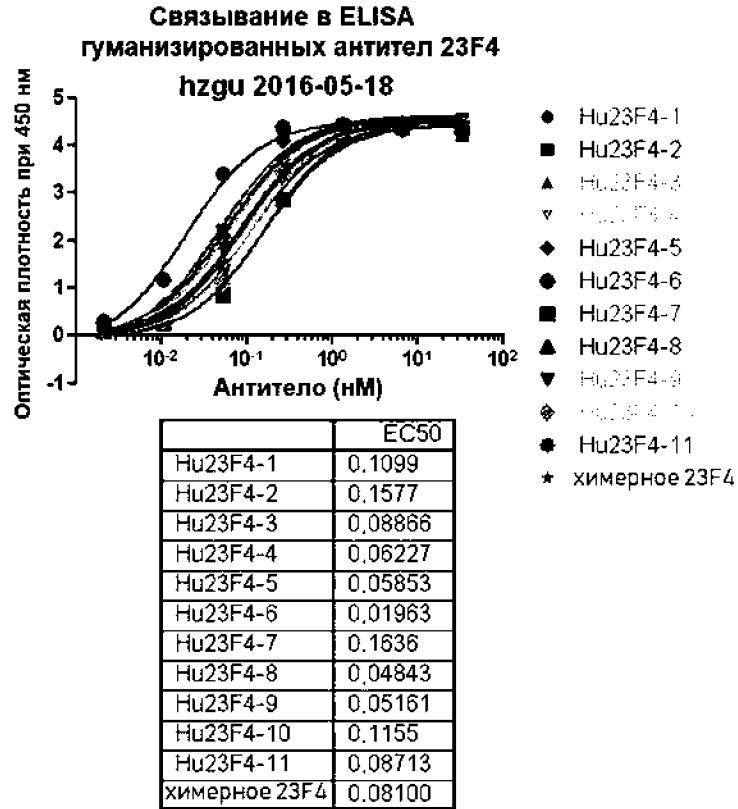
ФИГ. 5



ФИГ. 6

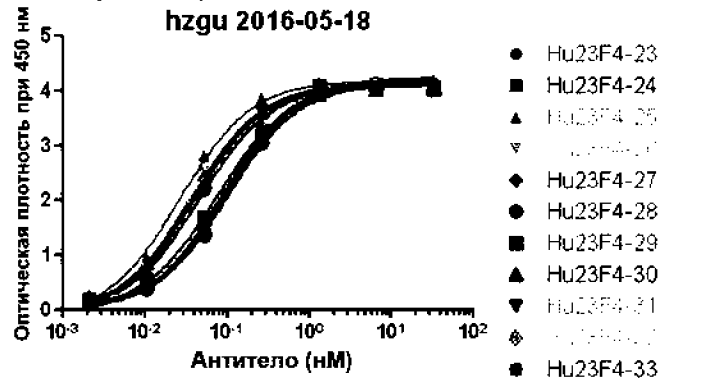


ФИГ. 7



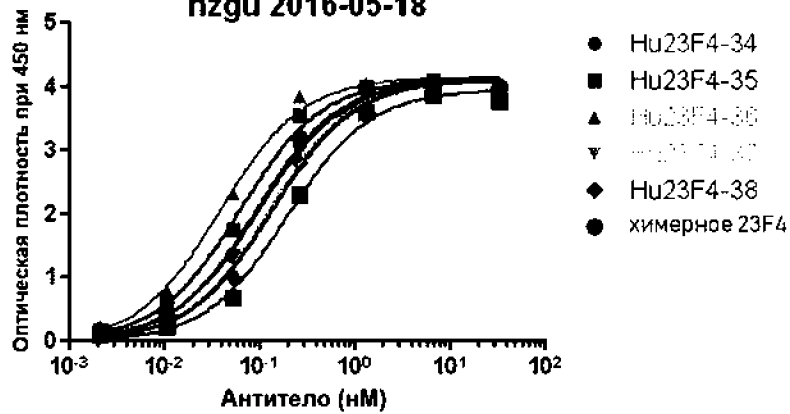
ФИГ. 8

Связывание в ELISA  
гуманизированных антител 23F4  
hzgu 2016-05-18



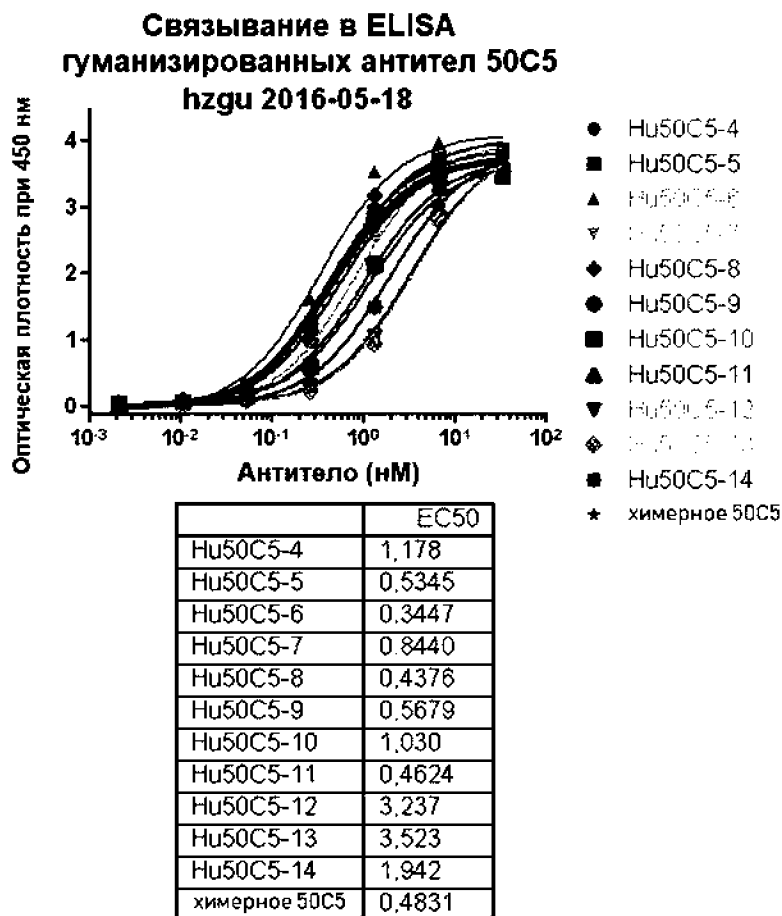
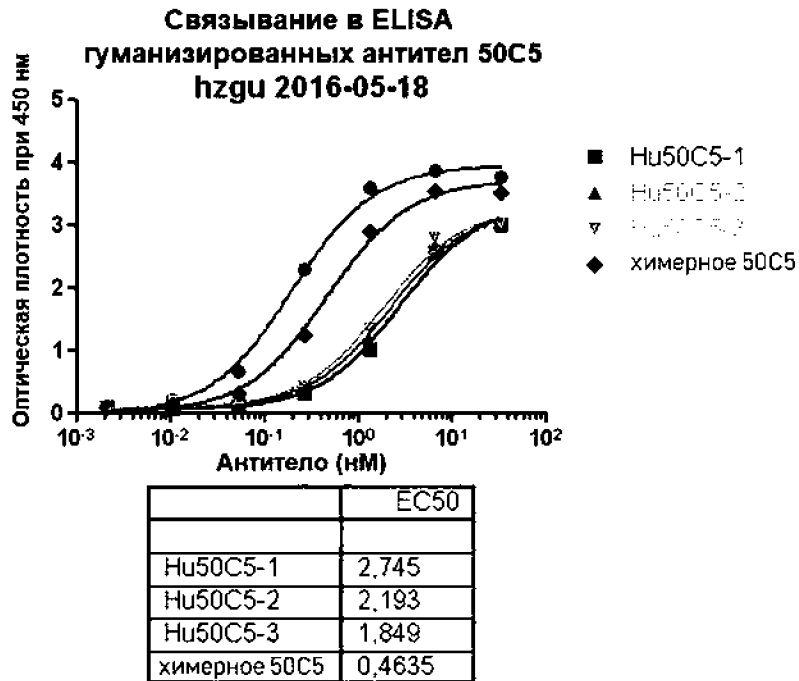
	EC50
Hu23F4-23	0,04696
Hu23F4-24	0,09075
Hu23F4-25	0,02678
Hu23F4-26	0,03480
Hu23F4-27	0,03837
Hu23F4-28	0,1005
Hu23F4-29	0,07358
Hu23F4-30	0,04112
Hu23F4-31	0,04243
Hu23F4-32	0,08733
Hu23F4-33	0,09543
химерное 23F4	0,08810

Связывание в ELISA  
гуманизированных антител 23F4  
hzgu 2016-05-18

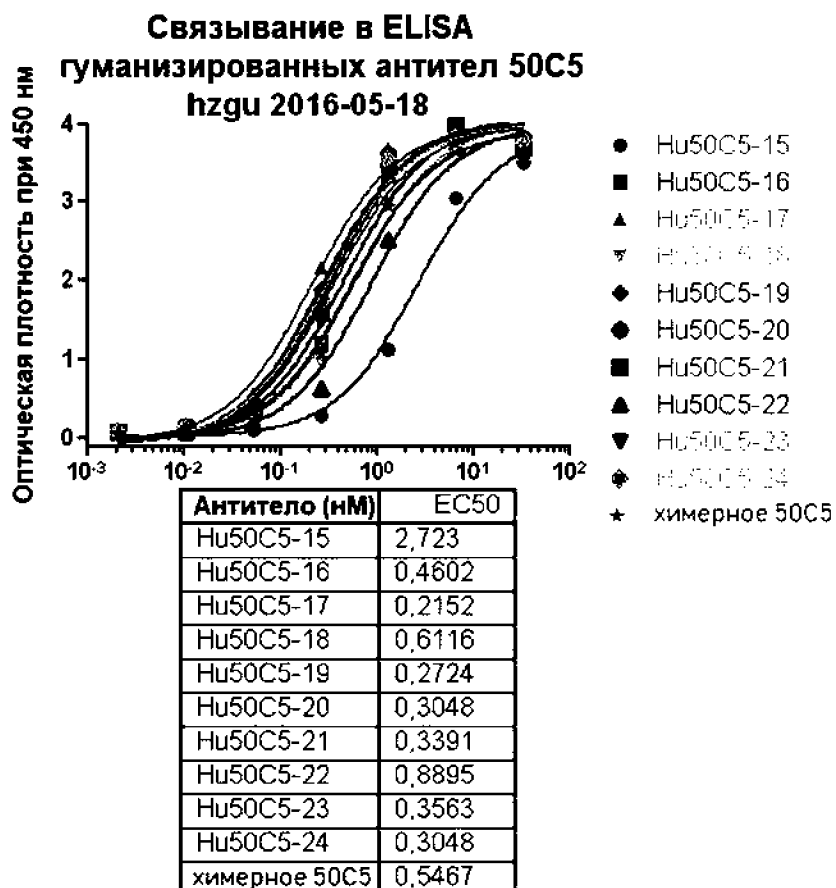


	EC50
Hu23F4-34	0,09767
Hu23F4-35	0,06245
Hu23F4-36	0,03837
Hu23F4-37	0,1272
Hu23F4-38	0,1356
химерное 23F4	0,09195

ФИГ. 8 (продолжение)

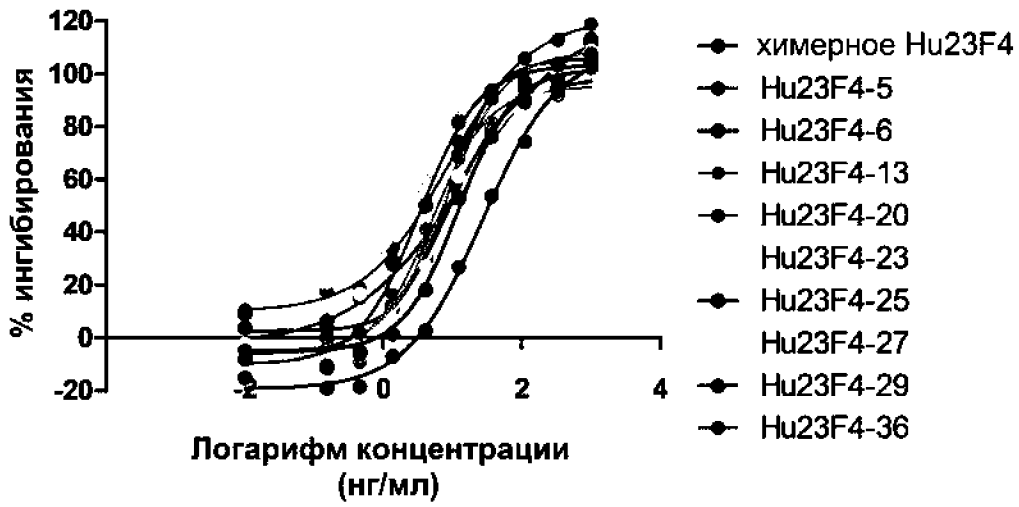


ФИГ. 8 (продолжение)

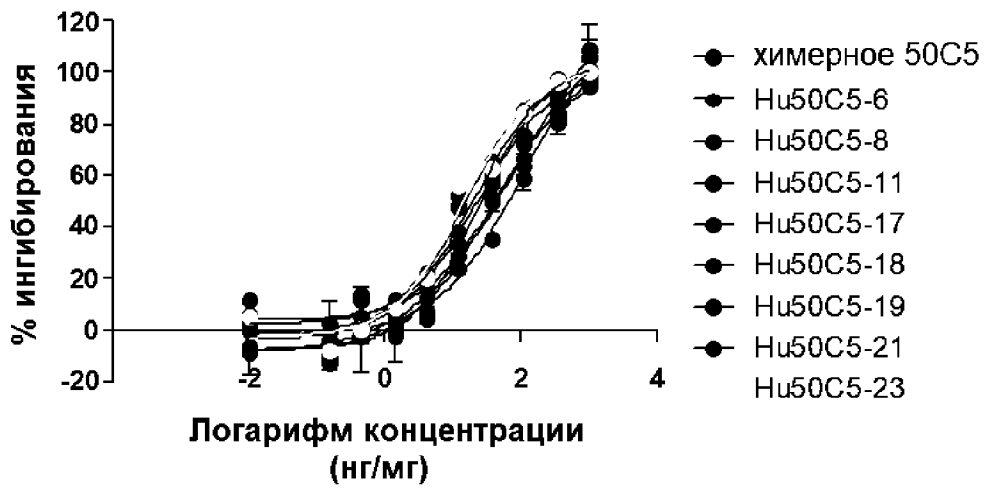


ФИГ. 8 (продолжение)

### Вызванная ГМ-КСФ пролиферация TF-1

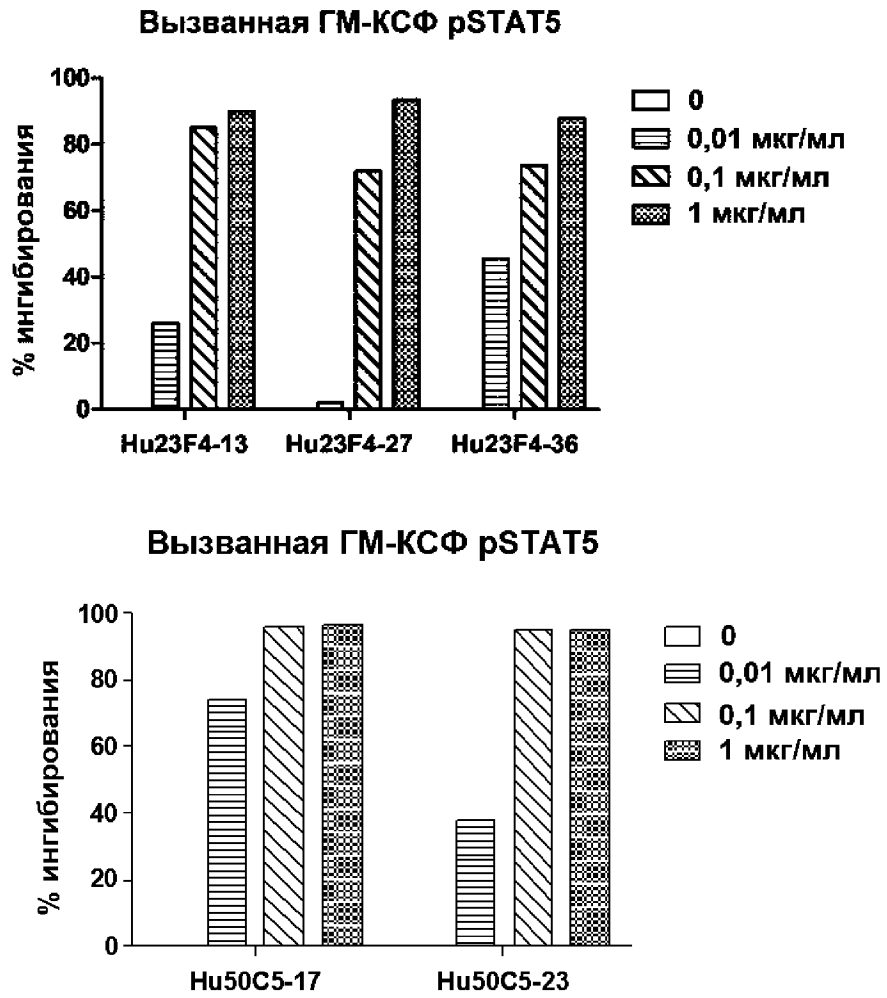


### Вызванная ГМ-КСФ пролиферация TF-1

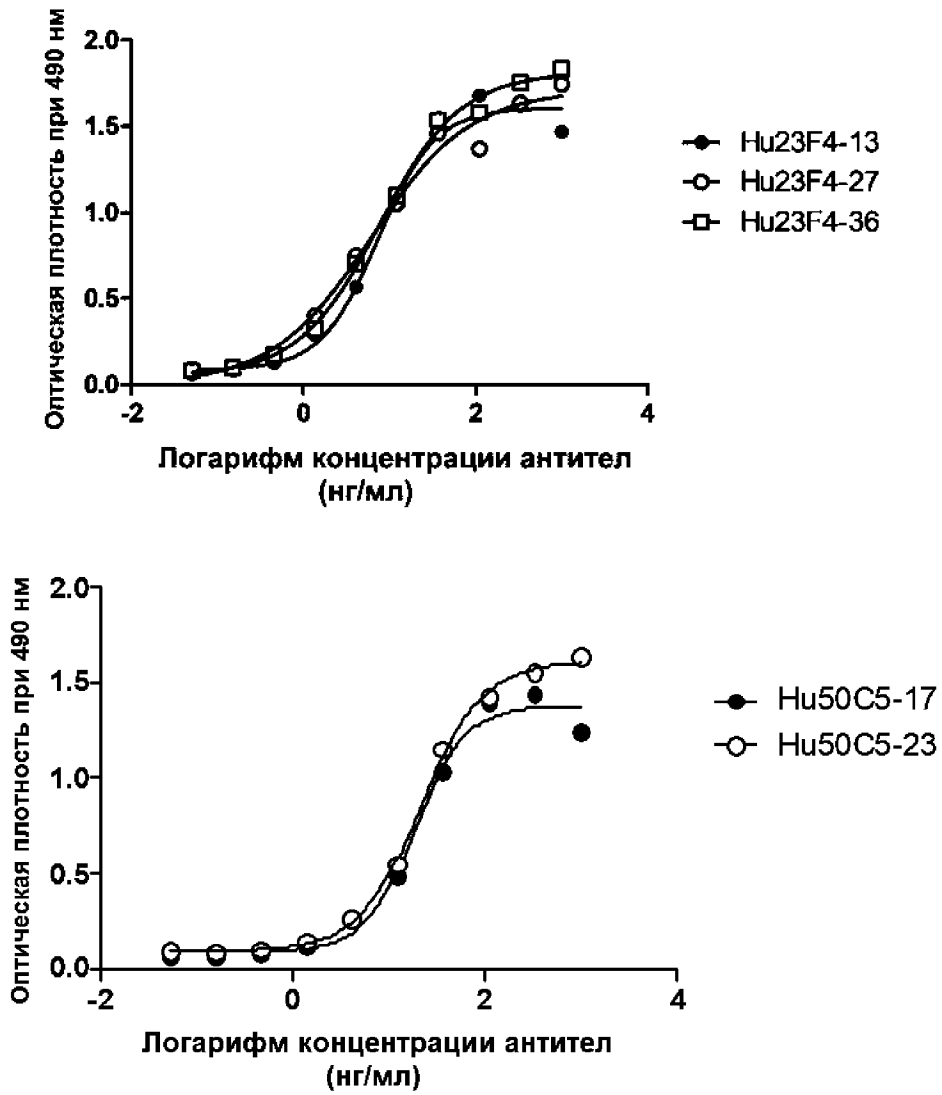


ФИГ. 9



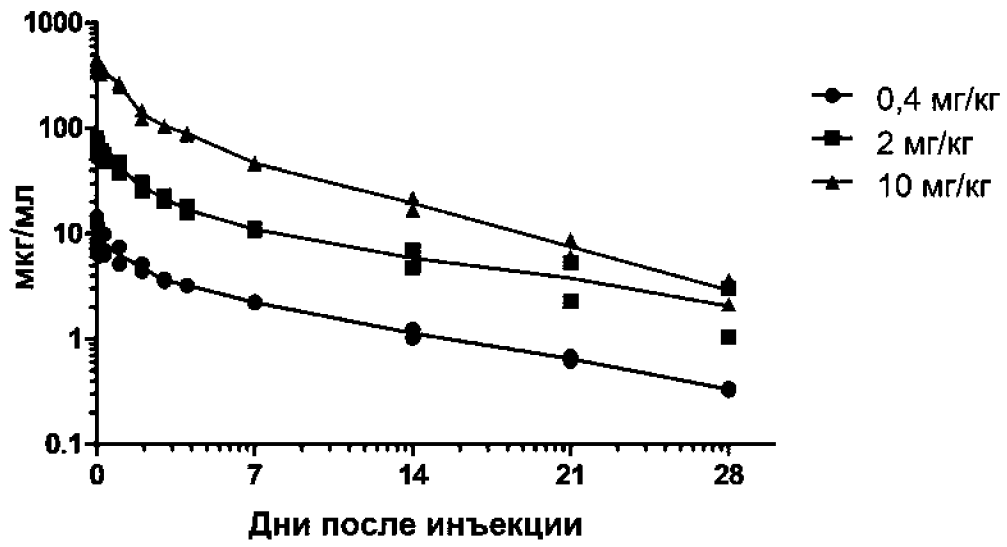


ФИГ. 10



ФИГ. 11

## Фармакокинетика у јаванског макака



ФИГ. 12